

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka



Bc. Jana Bohatá

**Expresní profil kardiovaskulárních microRNA u těhotenství s klinickou manifestací gestační hypertenze, preeklampsie a fetální růstové retardace**

**The expression profile of cardiovascular disease associated microRNAs in pregnancies with clinical manifestation of gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction**

Diplomová práce

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

Praha, 2017

**Prohlášení:**

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

V Praze dne 15. 8. 2017

Podpis

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. RNDr. Iloně Hromadníkové, Ph.D. za odborné vedení práce, ochotu, čas, cenné rady a připomínky. Nemalý dík patří též kolegyním z laboratoře za ochotu, snahu pomoci a přátelskou atmosféru. Zvláště bych chtěla poděkovat Mgr. Kateřině Kotlabové za trpělivost a pomoc při zpracování vzorků i výsledných dat.

## Abstrakt

MicroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující 21–23 nukleotidů dlouhé jednořetězcové RNA. Patří mezi významné posttranskripční regulátory genové exprese, které regulují jak fyziologické, tak patologické procesy. Některé microRNA, resp. výše jejich exprese, jsou specifické pouze pro určitý typ tkáně nebo pro patologický stav.

Předpokladem mé diplomové práce bylo, že genová exprese vybraných 28 kardiovaskulárních microRNA (miR-1-3p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-92a-3p, miR-100-5p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-181-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-210-3p, miR-221-3p, miR-342-3p, miR-499a-5p, miR-574-3p) se liší v pupečnickové krvi těhotných žen s fyziologickým průběhem gravidity (FG), gestační hypertenzí (GH), preeklampsií (PE) a fetální růstovou retardací (FGR). Soubor pacientek čítal 184 těhotných žen, z toho 44 kontrol, 47 s diagnózou GH, 56 s diagnózou PE a 37 s diagnózou FGR. Relativní kvantifikace microRNA byla provedena metodou kvantitativní PCR v reálném čase.

Výsledky ukázaly trend k down-regulaci miR-195-5p v pupečnickové krvi pacientek s GH. Dále trend k up-regulaci miR-92a-3p u pacientek s mírnou formou preeklampsie. Oproti tomu pacientky se závažnou formou PE, vykazovaly v pupečnickové krvi down-regulaci miR-195-5p a miR-574-3p, a trend k down-regulaci miR-26a-5p, miR-145-5p, miR-199a-5p a miR-221-3p. Podobně pacientky s preeklampsií, u kterých bylo nutno ukončit těhotenství před 34. týdnem, měly v pupečnickové krvi down-regulovanou miR-145-5p a vykazovaly trend k down-regulaci miR-26a-5p a miR-574-3p. Centralizace oběhu plodu byla asociována s vyššími hladinami miR-1-3p a miR-133a-3p u těhotenství s PE. Těhotenství s FGR s abnormálními hodnotami průtoku v *arteria umbilicalis*, resp. *arteria cerebri media*, vykazovala down-regulaci miR-221-3p, resp. miR-143-3p.

Epigenetické změny v pupečnickové krvi způsobené těhotenskými komplikacemi mohou být výsledkem dysfunkce placenty a narušené funkce

kardiovaskulárního systému matky. Později by tyto změny mohly způsobovat kardiovaskulární onemocnění u dětí narozených z těchto těhotenství.

**Klíčová slova:** microRNA, kardiovaskulární onemocnění, gestační hypertenze, preeklampsie, fetální růstová retardace, pupečnicková krev, kvantitativní PCR v reálném čase

## Abstract

MicroRNA (miRNA) are small non-coding 21–23 nucleotides long one strand RNAs. They are among the major posttranscriptional regulators of gene expression that regulate both physiological and pathological processes. Some of microRNAs, amount of their expression respectively, are specific only for certain type of tissue or pathological condition.

The hypothesis for my diploma thesis was that gene expression of 28 cardiovascular disease associated microRNAs (miR-1-3p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-92a-3p, miR-100-5p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-181-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-210-3p, miR-221-3p, miR-342-3p, miR-499a-5p, miR-574-3p) would differ in umbilical cord blood between groups of women with physiological pregnancies (FG), gestational hypertension (GH), preeclampsia (PE) and fetal growth restriction (FGR).

The studied cohort consisted of 184 pregnant women involving 44 controls, 47 GH pregnancies, 56 PE pregnancies and 37 FGR pregnancies. Relative quantification of microRNAs was performed by quantitative real-time PCR.

Results showed a trend to miR-195-5p down-regulation in umbilical cord blood of GH patients. On the other hand, mild PE showed trend to miR-92a-3p up-regulation. Patients diagnosed with severe preeclampsia showed down-regulation of miR-195-5p and miR-574-3p and trend to down-regulation of miR-26a-5p, miR-145-5p, miR-199a-5p and miR-221-3p. Similarly, down-regulation of miR-145-5p and trend to down-regulation of miR-26a-5p and miR-574-3p was observed in severe PE pregnancies requiring termination before 34 weeks of gestation. The centralization of fetal circulation was associated with higher levels of miR-1-3p and miR-133a-3p in PE pregnancies. FGR pregnancies with abnormal values of flow rate in the umbilical artery/the middle cerebral artery demonstrated down-regulation of miR-221-3p, respectively miR-143-3p.

Epigenetic changes in umbilical cord blood induced by pregnancy-related complications may appear as result of dysfunctional placenta and impaired maternal cardiovascular function and may cause later onset of cardiovascular diseases in offsprings.

**Key words:** microRNA, cardiovascular diseases, gestational hypertension, preeclampsia, intrauterine growth restriction, umbilical cord blood, quantitative real-time PCR

# Obsah

Obsah.....	8
Seznam zkratk:	10
1. Úvod.....	12
2. MicroRNA.....	13
2.1 Historie .....	13
2.2 Definice miRNA.....	13
2.3 Distribuce genů pro miRNA v genomu.....	14
2.4 Biogeneze miRNA .....	14
2.5 MicroRNA interference.....	16
2.6 Názvosloví miRNA.....	16
2.7 Kardiovaskulární miRNA.....	17
2.7.1 Klastř miR-1/133a.....	17
2.7.2 MiR-499 .....	18
2.7.3 MiR-15 rodina .....	18
2.7.4 Vaskulární integrita a microRNA.....	18
2.7.5 Ateroskleróza a microRNA.....	19
2.7.6 Ischemická choroba srdeční a microRNA.....	20
2.7.7 Hypertrofická kardiomyopatie a microRNA.....	20
2.7.8 Srdeční selhání a microRNA .....	20
2.7.9 Hypoxie a microRNA.....	21
3. Komplikace v těhotenství.....	27
3.1 Gestační hypertenze .....	27
3.2 Preeklampsie.....	28
3.3 Fetální růstová retardace .....	30
3.4 Dopplerovská ultrasonografie.....	30
4. Cíl práce.....	31
5. Materiál.....	32
6. Metody .....	34
6.1 Prvotní zpracování biologického materiálu .....	34
6.2 Izolace RNA obohacené o krátké RNA.....	34
6.3 Reverzní transkripce .....	35
6.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase.....	36



6.4.1	Princip kvantitativní PCR v reálném čase.....	36
6.4.2	Průběh kvantitativní PCR v reálném čase .....	37
6.5	Relativní kvantifikace.....	38
6.6	Statistická analýza dat .....	38
7.	Výsledky .....	40
7.1	Výběr endogenních kontrol pro normalizaci dat PCR v reálném čase.....	40
7.2	Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v pupečnickové krvi u těhotenství s normálním a patologickým průběhem .....	41
7.2.1	Down-regulace miR-195-5p u těhotenství s gestační hypertenzí.....	42
7.2.2	Up-regulace miR-92a-3p u těhotenství s mírnou preeklampsií .....	42
7.2.3	Down-regulace miR-26a-5p, miR-145-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-221-3p a miR-574-3p u těhotenství se závažnou preeklampsií.....	43
7.2.4	Down-regulace miR-26a-5p, miR-145-5p a miR-574-3p u těhotenství s preeklampsií, která vyžadovala ukončení gravidity před 34. gestačním týdnem 47	
7.2.5	Asociace mezi genovou expresí miR-1-3p a miR-133a-3p a závažnou formou preeklampsie s ohledem na parametry Dopplerovské ultrasonografie...49	
7.2.6	Asociace mezi genovou expresí miR-143-3p a miR-221-3p a závažností fetální růstové retardace s ohledem na parametry Dopplerovské ultrasonografie 51	
8.	Diskuze .....	53
9.	Závěr .....	60
	Seznam literatury:.....	61
	Zdroje ilustrací: .....	72

## Seznam zkratek:

ACOG	The American Congress of Obstetricians and Gynecologists	
AGO2	argonaute-2	argonaute-2
BIRC5	baculoviral inhibitor of apoptosis repeat containing 5	
BMI	body mass index	index tělesné hmotnosti
CDC2A	cell division control protein 2 homolog A	kontrolní protein buněčného dělení
CDC42	cell division control protein homolog 42	kontrolní protein buněčného dělení
cDNA	complementary DNA	komplementární DNA
Ct	threshold cycle	prahová hodnota
DDIT4	DNA damage inducible transkript 4	transkript indukovaný poškozením DNA
DGCR8	DiGeorge syndrom critical region 8	DiGeorgova kritická oblast 8
dsRNA	double-strand RNA	dvouvláknová RNA
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	kyselina ethylendiamintetraoctová
EL pufr	erythrocyte lysis buffer	pufr pro lyzi erytrocytů
eNOS	endothelial nitric oxide synthase	endotelilální syntáza oxidu dusnatého
FG	physiological gravidity	fyziologické gravidita
FGR	fetal growth restriction	fetální růstová retardace
GH	gestational hypertension	gestační hypertenze
GJA1	gap junction alpha-1 protein/connexin 43	konexin 43
GSK3 $\beta$	glycogen synthase kinase 3 $\beta$	glykogen syntáza kináza 3 $\beta$
HDAC4	histone deacetylase 4	histon deacetyláza 4
HELLP	hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count	hemolýza, zvýšené množství jaterních enzymů, snížený počet krevních destiček
HIF-1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$	faktor indukovaný hypoxií 1 $\alpha$
CHEK1	checkpoint kinase 1	kontrolní kináza 1
IGF1R	insuline-like growth factor 1	receptor pro insulinu podobný receptor růstový faktor 1
IUGR	intrauterine growth restriction	intrauterinní růstová restrikce

KCNJ2	potassium voltage-gated channel subfamily J member 2	podjednotka draslíkového kanálu
KLF5	Krüepel-like factor 5	
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
miRNA	microRNA	mikroRNA
NTC	no template control	kontrola bez templátu
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1	
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
PE	preeclampsia	preeklampsie
PI	pulsatility index	index pulzatility
pRB	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein
qPCR	quantitative PCR, real-time PCR	kvantitativní PCR, PCR v reálném čase
RISC	RNA-induced silencing komplex	RNA-indukovaný umlčovací komplex
RLT pufr	buffer for lysis of cells and tissues before RNA isolation	pufr pro lyzi buněk/tkání před izolací RNA
RT-PCR	reverse transcription PCR	reverzní transkripce s následným PCR
siRNA	small/short interfering RNA	malé interferující RNA
SERCA2a	sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase 2a	sarko/endoplazmatické retikulum Ca <sup>2+</sup> ATPáza 2a
SGA	small for gestational age	konstitučně malý plod
SIRT1	sirtuin 1	sirtuin 1
SRF	serum response factor	faktor odpovídající na sérum
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$	faktor nádorové nekrózy $\alpha$
TP53INP1	tumor protein p53-inducible nuclear protein	
TRBP	trans-activator RNA binding protein	trans-aktivační RNA vazebný protein
TRF2	telomeric repeat-binding factor 2	telomerický vazebný faktor 2
UTR	untranslated region	nepřekládaná oblast
VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1	vaskulární adhezní buněčná molekula 1
YKL-40 (CHI3L1)	chitinase-3-like protein	

# 1. Úvod

Pupečníková krev zajišťuje výměnu kyslíku a živin mezi matkou a plodem. Její odběr se provádí až po přestřižení pupečníku a nepředstavuje žádné riziko pro matku ani dítě. Pro mou diplomovou práci představovala pupečníková krev zdroj krátkých nekódujících RNA, microRNA. Konkrétně vybraných microRNA, které se podílejí na rozvoji kardiovaskulárních onemocnění.

MicroRNA jsou krátké nekódující molekuly RNA, které posttranskripčně regulují genovou expresi, degradují mRNA nebo inhibují translaci a tím zastavují proces vzniku proteinu. Jsou důležité v patologických i fyziologických procesech buňky, regulují například diferenciaci, růst, proliferaci i apoptózu buněk (Ambros 2004, Hwang *et Mendell* 2006). Nejen jejich nadměrné množství ale i nedostatek mohou vést k různým dysfunkcím. MicroRNA posttranskripčně regulují přibližně 30 % lidského genomu (Lewis *et al.* 2005). MicroRNA jsou hojně exprimovány v kardiovaskulárním systému (Lagos-Quintana *et al.* 2002). Epigenetické modifikace, jako změny v microRNA expresi, metylace DNA a modifikace histonů se podílejí na patogenezi kardiovaskulárních onemocnění a při přenosu do další generace mohou stav ještě zhoršit (Thornburg 2015).

Vzorky pupečníkové krve byly získány od matek s fyziologickým průběhem těhotenství (kontrolní vzorky) a od matek s abnormálním průběhem těhotenství – gestační hypertenze, preeklampsie, případně fetální růstová retardace. Předpokladem bylo, že by se hladiny některých microRNA mohly mezi jednotlivými skupinami lišit. Dá se předpokládat, že specifický profil genové exprese kardiovaskulárních microRNA je charakteristický pro jednotlivé těhotenské komplikace, což by mohlo znamenat potenciální riziko budoucího rozvoje kardiovaskulárních onemocnění u dětí, které se narodily z těchto komplikovaných těhotenství.

## 2. MicroRNA

### 2.1 Historie

První microRNA byla objevena roku 1993 u modelového organismu *Ceanorhabditis elegans* (*C. elegans*) týmem Rosalindy C. Lee. Sekvence, které byly popsány, ještě nebyly označeny jako microRNA, nicméně byly to dva krátké transkripty genu *lin-4*, přibližně 22 a 61 nukleotidů dlouhé a obsahovaly komplementární sekvence k repetitivní oblasti v 3' nepřekládané oblasti (UTR) mRNA genu *lin-14*. Předpokládalo se tedy, že krátké transkripty genu *lin-4* regulují translaci mRNA *lin-14* pomocí RNA-RNA anti-sense interakce. Transkript *lin-4* negativně reguluje množství proteinu LIN-14 (Lee *et al.* 1993).

V roce 2000 byla popsána další krátká RNA, konkrétně 21 nukleotidů dlouhá *let-7*, taktéž u *C. elegans*. Tato RNA je komplementární k 3' UTR genů *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* a *daf-12*, tudíž funguje obdobně jako transkript genu *lin-4* (Reinhart *et al.* 2000). *Let-7* RNA byla objevena i u dalších druhů živočichů, hraje roli ve fylogenezi, u *C. elegans* je nutná pro přechod z posledního larválního stádia do stádia dospělého (Pasquinelli *et al.* 2000).

O rok později vyšla série článků věnujících se této problematice a pro malé regulační RNA byl ustanoven termín microRNA, stále přibývalo více genů kódujících microRNA a také se ukázalo, že některé microRNA jsou vysoce konzervované a plní podobné úlohy u odlišných druhů (Lagos-Quintana *et al.* 2001, Lee *et al.* 2001, Lau *et al.* 2001).

### 2.2 Definice miRNA

Aby nedocházelo k záměnám miRNA s jinými krátkými RNA molekulami, řídí se jejich klasifikace následujícími kritérii:

- a) Detekce přibližně 22 nukleotidů dlouhého RNA transkriptu probíhá pomocí hybridizace RNA (nejčastěji pomocí metody Northern blot).
- b) Identifikace sekvence v knihovně cDNA, sekvence musí přesně odpovídat sekvenci organismu, z kterého byla získána.

- c) Predikce potenciální prekurzorové struktury, která obsahuje přibližně 22 nukleotidů dlouhou sekvence uvnitř jednoho raménka vlásenky. U živočichů jsou tyto prekurzory dlouhé 60-80 nukleotidů, u rostlin jsou variabilnější a mohou dosáhnout délky několik set nukleotidů.
- d) Fylogenetická konzervace sekvence a jejího prekurzoru.
- e) Detekce zvýšeného množství prekurzoru u organismů se sníženou funkcí Diceru (viz kap. *Biogeneze miRNA*).

Žádné z výše uvedených kritérií nestačí samo o sobě, aby kandidátní gen byl označen jako nová miRNA. Kritéria *a* a *b* by nevyloučily siRNA, vlásenková sekvence taktéž není charakteristická pouze pro miRNA a totéž platí i o Diceru. Proto je nutné, aby nová miRNA splňovala alespoň jedno z kritérií pro expresi (*a*, *b*) a jedno pro biogenezi (*c*, *d*, *e*) (Ambros *et al.* 2003).

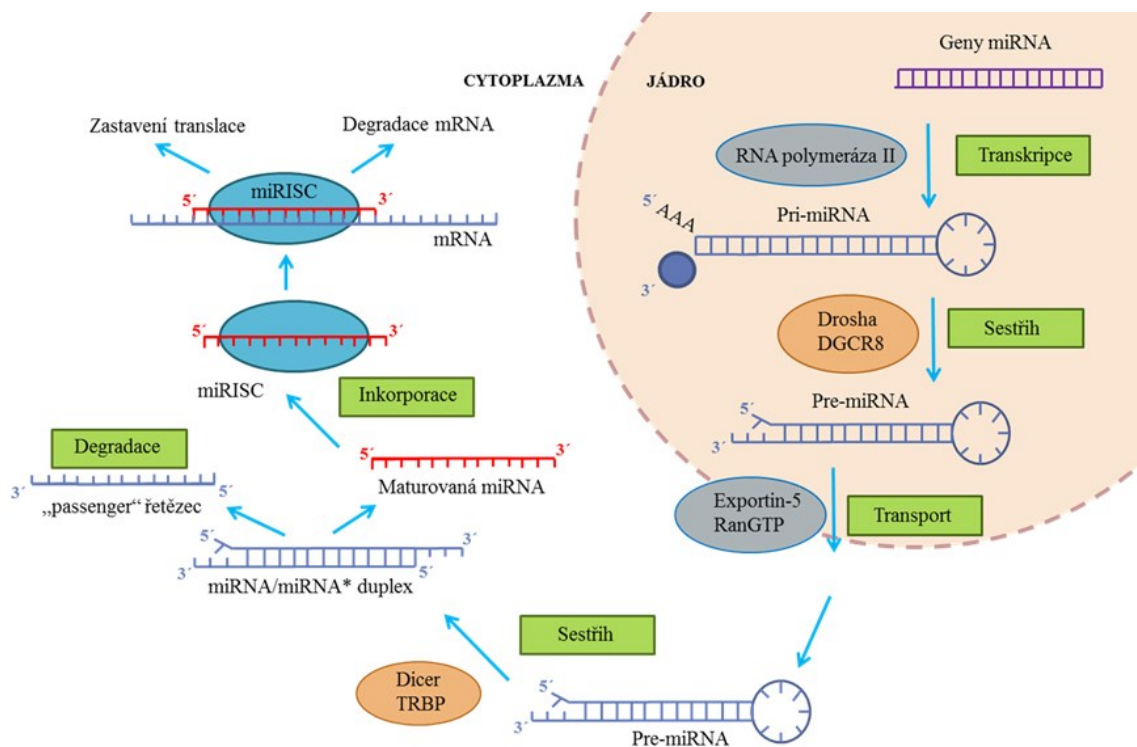
### 2.3 Distribuce genů pro miRNA v genomu

Geny pro miRNA jsou rozmístěny po celém genomu, na všech chromozomech vyjma chromozomu Y. Přibližně polovina těchto genů je v klastrech a je primárně transkribována jako polycistronní transkript (Lee *et al.* 2002). Geny pro miRNA v rámci jednoho klastru jsou si často příbuzné, předpokládá se u nich vznik genovou duplikací, mimo to ale klastry obsahují i nepříbuzné geny, je však možná jejich funkční příbuznost, tedy vliv na stejnou cílovou sekvenci (Kim *et al.* 2006). Původně se předpokládalo, že geny pro miRNA jsou umístěny v intergenových oblastech (Lagos-Quintana *et al.* 2001, Lee *et al.* 2001). Pozdější studie však ukázaly, že většina genů pro miRNA je lokalizována v tzv. transkripčních jednotkách, v intronech kódujících genů a v intronech i exonech genů pro nekódující RNA (Rodriguez *et al.* 2004).

### 2.4 Biogeneze miRNA

Geny pro miRNA mají vlastní promotory a jsou transkribovány pomocí RNA polymerázy II, čímž vzniká primární miRNA transkript, pri-miRNA. Primární transkript obsahuje 5' čepičku a 3' poly(A) konec, což jsou ochranné oblasti typické i pro mRNA (Lee *et al.* 2004). Později bylo zjištěno, že některé geny pro miRNA, konkrétně klastr na chromozomu 19, C19MC, je transkribován RNA polymerázou III (Borchert *et al.*

2006). Primární prekurzor, pri-miRNA, je delší než 70 nukleotidů a vytváří komplementární sekundární struktury, které se skládají do vlásenkových struktur (Lee *et al.* 2002). Pri-miRNA jsou dále zkracovány na přibližně 70 nukleotidů dlouhé pre-miRNA, děje se tak díky jaderné nukleáze zvané *Drosha* (Lee *et al.* 2003), která je v komplexu s proteinem vázajícím dsRNA *Pasha* (jinak označovaným jako DGCR8, protein kódovaný genem, jenž je deletovaný u DiGeorgova syndromu), společně vytvářejí multiproteinový komplex zvaný *mikroprocesor* (Denli *et al.* 2004, Gregory *et al.* 2004). Každá pre-miRNA je následně exportována do cytoplazmy pomocí GTP-dependentního transportního proteinu exportinu-5 (Yi *et al.* 2003). V cytoplazmě jsou pre-miRNA dále zpracovávány interakcí s enzymem *Dicer* do podoby maturovaných dvouřetězcových miRNA (Bernstein *et al.* 2001). *Dicer* je v komplexu s dsRNA vazebným proteinem TRBP (z anglického trans-activator RNA binding protein) (Chendrimada *et al.* 2005).



Obr. 1: Biogeneze miRNA (převzato z Vlahová *et al.* 2014)

Syntéza microRNA začíná v jádře buňky. RNA polymeráza II vytváří primární transkript – pri-miRNA. Pri-miRNA vytváří vlásenkové struktury. Pri-miRNA je rozeznávána mikroprocesorem (Drosha+DGCR8), která ji mění na pre-miRNA. Exportin-5 poté přesune pre-miRNA z jádra do cytoplazmy. *Dicer* spolu s TRBP (trans-activator RNA binding protein) štěpí pre-miRNA na duplexy miRNA/miRNA\*. Řetězec miRNA je navázán na komplex RISC (RNA-induced silencing complex), druhý řetězec je degradován. Aktivní miRNA se váže na 3' UTR konec mRNA dle komplementarity bazí na polyribosomech.

Jeden z řetězců je poté degradován (tzv. *passenger* řetězec, \*miRNA) a druhý tzv. *guide* řetězec je inkorporován do tzv. miRISC (miRNA-induced silencing complex) multiproteinového komplexu, jehož centrální část tvoří proteiny Argonautové rodiny (Carthew *et* Sontheimer 2009). Osud řetězců, tedy to, který z řetězců je určený k degradaci není vždy stejný, závisí na okolních podmínkách (typ tkáně, stupeň vývoje atd.) a aktivními řetězci se mohou stát oba. \*miRNA tedy není jen zbytečným nadproduktem, ale může být ukazatelem změněného stavu tkáně (Bhayani *et al.* 2012).

## 2.5 MicroRNA interference

Jak již bylo zmíněno, microRNA mají schopnost se vázat na mRNA, a tak buď tlumí její translaci nebo způsobují její úplnou degradaci. MicroRNA se vážou na 3' UTR sekvence mRNA. Párování není zcela komplementární až na 2.–8. nukleotid, tzv. seed sekvenci. 3' UTR oblasti kontrolují mnoho vlastností mRNA, jako jsou transport, lokalizace, účinnost translace a stabilita, proto tak mají microRNA široké spektrum regulace. Nicméně vazba na 3' konec mRNA není pravidlem, byla pozorována i vazba na 5' konec mRNA (Ørom *et al.* 2008). Úplná komplementarita způsobuje degradaci cílové mRNA, prostřednictvím proteinu AGO2, neúplná komplementarita pouze inhibuje translaci, což je regulační mechanismus většiny microRNA (Carthew *et* Sontheimer 2009).

## 2.6 Názvosloví miRNA

Každá (maturovaná) microRNA je označena zkratkou „miR“ a identifikačním číslem (např. miR-1). Geny kódující miRNA se označují velmi podobně, změnou je malé r a kurzíva (např. *mir-1*). Stejně tak pre-miRNA je značena s malým r jako „mir“. Pro identifikaci organismu, z kterého miRNA pochází, se jako předpona přidává 3–4 písmenná zkratka označující druh, v případě člověka je to zkratka „hsa“ (z *Homo sapiens*). MiRNA lišící se pouze předponou označující druh jsou ortologní. Paralogní sekvence lišící se v jednom či dvou nukleotidech jsou odlišeny pouze přidáním malého písmene (např. miR-20a a miR-20b). Pre-miRNA, jejichž geny jsou lokalizovány na jiném místě v genomu, ale přesto dávají vzniknout identickým maturovaným miRNA, se odlišují přidáním číselné přípony (např. *mir-125b-1* a *mir-125b-2* dávají vzniknout zcela identické miR-125b). Pokud pochází dvě miRNA z jedné vlásenkové struktury, tak dle toho, z kterého řetězce vlásenkového prekurzoru daná miRNA pochází nese na



konci jména ještě příponu „-3p“ nebo „-5p“ (Griffiths-Jones *et al.* 2006, Ambros *et al.* 2003).

## 2.7 Kardiovaskulární miRNA

U člověka je známo již přes 2500 miRNA (dle databáze miRBase, <http://www.mirbase.org/>) a jejich počet neustále stoupá, mnoho z nich je tkáňově i vývojově specifických. Kardiovaskulární miRNA hrají roli v patogenezi kardiovaskulárních onemocnění, ovlivňují expresi genů, které mají vliv na vývoj srdce, rozvoj onemocnění apod. Ve své diplomové práci jsem detekovala 28 takových miRNA, jejich seznam a lokalizace jsou uvedeny v tabulce č. 1. Bližší charakteristika jednotlivých miRNA je popsána dále v této kapitole.

### 2.7.1 Klastř miR-1/133a

MiR-1 i miR-133a jsou miRNA specifické pro svalstvo, tedy i pro srdeční svalovinu. Během embryonálního vývoje hrají obě microRNA roli ve specializaci embryonálních kardiomyocytů, především prostřednictvím úpravy hladiny myokardinu (Wystub *et al.* 2013). MiR-1 je nadměrně exprimována u jedinců s onemocněním koronárních artérií. Pokud je u potkanů nadměrně exprimována u normálních jedinců, případně u těch, co prodělali srdeční infarkt, dochází u nich ke zhoršení arytmogeneze. Nadměrná exprese miR-1 zpomaluje kondukcii a depolarizuje cytoplazmatickou membránu posttranskripční modifikací genu *KCNJ2* (kóduje podjednotku draslíkového kanálu) a genu *GJA1* (kóduje konexin 43), proto může mít miR-1 podstatnou patofyziologickou funkci v srdci (Yang *et al.* 2011). Mimo to miR-1 také blokuje mRNA genu kódujícího kalmodulin, který je velmi důležitý pro vápníkovou signalizaci, jež je klíčovým regulátorem růstu a funkce kardiomyocytů. Navíc miR-1 negativně reguluje i expresi klíčových transkripčních faktorů, které ovlivňují genovou expresi v závislosti na vápníku. MiR-1 tedy negativně reguluje komponenty vápníkové signalizace a tím ovlivňuje růstovou odpověď kardiomyocytů (Ikeda *et al.* 2009). Up-regulace miR-1 přispívá také k srdeční arytmií. (Su *et al.* 2017). Do stejného klastru patří i miR-133a, která má zásadní úlohu v kontrole proliferace kardiomyocytů a suprimuje expresi genů asociovaných s buněčným cyklem (geny pro SRF transkripční faktor a cyklin D2) v srdečním svalstvu (Liu *et al.* 2008).

### 2.7.2 MiR-499

MiR-1 společně s miR-499 také regulují proliferaci kardiomyocytárních progenitorových buněk a jejich následnou diferenciaci v kardiomyocyty. Díky modulaci genové exprese můžou tyto miRNA ovlivnit kardiomyogenní diferenciaci. Konkrétně miR-1 skrze represi HDAC4 (histon deacetyláza 4) indukuje diferenciaci buněk. MiR-499, která je bohatě zastoupena v srdeční tkáni, cílí na transkripční faktor SOX6, a tím podporuje diferenciaci kardiomyocytů (Sluijter *et al.* 2010).

### 2.7.3 MiR-15 rodina

Do této skupiny miRNA patří miR-15, miR-16 i miR-195 (ještě miR-497, která je mimo předmět zájmu mé práce), které společně sdílí stejnou sekvenci na 5' konci. Up-regulace těchto miRNA během neonatálního období může být důležitým regulačním mechanismem, který řídí buněčný cyklus kardiomyocytů. Příliš vysoká exprese miR-195 v období vývoje srdce způsobuje kongenitální srdeční abnormality související s předčasným zastavením buněčného cyklu, miR-195 tedy negativně reguluje expresi genů, které se podílí na řízení buněčného cyklu (např. geny *CHEK1*, *CDC2A*, *BIRC5*, *NUSAP1* a další) (Porrello *et al.* 2011). Značně snížená exprese miR-16 byla nalezena v hypertrofických kardiomyocytech u myšího modelu, zároveň v těchto buňkách byla zvýšená exprese cyklinů D1, D2 a E1 a fosforylovaného pRb (retinoblastomový protein) (Huang *et al.* 2015).

### 2.7.4 Vaskulární integrita a microRNA

Některé microRNA hrají roli v angiogenezi a vaskulární maturaci, taktéž regulují vaskulární i endoteliální funkce. Mezi takové microRNA patří i miR-126, která je specifická pro endotel a moduluje jeho fenotyp (Fish *et al.* 2008). Cílená delece miR-126 u myši způsobila netěsnost cév, krvácení a částečnou letalitu embryí, kvůli ztrátě vaskulární integrity a defektům endotelu (problémy s proliferací a migrací buněk) (Wang *et al.* 2008). Zvýšené hladiny miR-126 snižují expresi VCAM-1 (vaskulární adhezní buněčná molekula 1), čímž přeruší signální kaskádu TNF $\alpha$  (faktor nádorové nekrózy  $\alpha$ ) v endoteliálních buňkách, čímž se snižuje interakci leukocytů s buňkami endotelu. MiR-126 by tak mohla být potenciálním regulátorem vaskulárních zánětů (Harris *et al.* 2007).

Klastr miR-17/92 patří mezi jeden z nejlépe prozkoumaných klastrů microRNA. Patří do něj hned 3 z 28 námi analyzovaných microRNA: miR-17, miR-20a a miR-92a, mimo to obsahuje i jiné microRNA. Dysregulace microRNA tohoto klastru souvisí nejen s kardiovaskulárními ale i imunitními, neurodegenerativními a nádorovými onemocněními. Paralogním klastrem je miR-106a/363, kde se mimo jiné nachází i miR-20b (Mogilyansky *et Rigoutsos* 2013). MiR-92a je vysoce exprimována v endoteliálních buňkách a kontroluje růst nových cév – angiogenezi. Avšak přílišná exprese této microRNA blokuje angiogenezi. MiR-92a cílí na mRNA několika proangiogenních proteinů, včetně alfa5 podjednotky integrinu, což v endoteliálních buňkách způsobuje snížení formování kapilárních klíčků. Antagonisté miR-92a zlepšují růst cév a obnovu poškozené tkáně po infarktu myokardu u myši, proto tato microRNA může sloužit jako cenný terapeutický cíl (Bonauer *et al.* 2009).

#### 2.7.5 Ateroskleróza a microRNA

Ateroskleróza neboli kornatění tepen je jednou z hlavních příčin kardiovaskulárních onemocnění, je to chronické zánětlivé onemocnění způsobené ukládáním lipidů a zánětlivých faktorů v cévní stěně. Nejhojnější microRNA v makrofázích je miR-21 a její nedostatek vede k akcelerované ateroskleróze, nekrotickým plakům a zánětům cév (Canfrán-Duque *et al.* 2017). V poškozených či aterosklerotických cévách bylo prokázána snížená hladina miR-143 a miR-145. MiR-145 je nezbytná pro reprogramaci fibroblastů v buňky hladkého svalstva indukovanou myokardinem a indukuje diferenciaci multipotentních kmenových buněk neurální lišty v buňky hladké svaloviny cévní stěny. Obě microRNA, miR-143 i miR-145, kooperativně cílí na transkripční faktory, pro podporu diferenciace na úkor proliferace buněk hladkého svalstva (Cordes *et al.* 2009). Cílovým genem pro miR-145 je *KLF5*, pokud je jeho exprese inhibována, stoupá hladina myokardinu, což přispívá k modulaci fenotypu buněk hladké svaloviny cévní stěny (Cheng *et al.* 2009). Snížená exprese miR-143 a miR-145 byla nalezena i u pacientů s aortálním aneurysmatem, nedostatek těchto microRNA indukuje strukturální změny aorty (Elia *et al.* 2009). Přímým cílem miR-195 je gen *CDC42* (protein CDC42 je podstatný pro správný chod buněčného cyklu), tudíž i miR-195 inhibuje proliferaci a migraci buněk hladké svaloviny cévní stěny (Wang *et al.* 2012).

### 2.7.6 Ischemická choroba srdeční a microRNA

MiR-23a může přímo inhibovat expresi TRF2 (telomerický vazebný faktor 2) a tím indukovat zkracování telomer a buněčnou senescenci (Luo *et al.* 2015). Velmi recentní studie spojila tento objev s ischemickou chorobou srdeční a jejím cílem bylo zjistit výši exprese miR-23a v periferních mononukleárních buňkách u pacientů s touto chorobou. Výsledky ukázaly, že u pacientů s ischemickou chorobou srdeční byla zvýšená exprese miR-23a, což by mohlo posloužit jako prognostický marker, vhodný pro monitoring v periferní krvi, pro toto onemocnění (Satoh *et al.* 2017).

U pacientů s ischemickou chorobou srdeční, v případné kombinaci s diabetes mellitus 2. typu, byly prokázány snížené hladiny exprese miR-24 v periferní krvi. Cílem této microRNA je mRNA kódující YKL-40, což je prozánětlivý glykoprotein, jehož hladina stoupá při kardiovaskulárních komplikacích (Deng *et al.* 2017).

### 2.7.7 Hypertrofická kardiomyopatie a microRNA

V plazmě pacientů s diagnózou hypertrofické kardiomyopatie byla zjištěna zvýšená exprese 12 microRNA v plazmě. Mezi nimi i miR-26a, miR-29a, miR-126, miR-133a, miR-143, miR-145 a miR-199a, což naznačuje, že remodelace myokardu je spojena s uvolňováním těchto microRNA do krevního řečiště, avšak pouze hladiny miR-199a a miR-29a pozitivně korelovaly s hypertrofií kardiomyocytů a pouze miR-29a navíc i s intersticiální fibrózou, což z ní dělá potenciální neinvazivní biomarker pro sledování remodelace myokardu při hypertrofické kardiomyopatii (Roncarati *et al.* 2014). Oproti tomu miR-26 reguluje patologické strukturální změny, alespoň u potkaního modelu, pokud je v kardiomyocytech downregulovaná dochází ke strukturálním změnám a vzniku hypertrofie (Zhang *et al.* 2013). Nadměrná exprese miR-199a v kardiomyocytech vede ke zvětšování buněk, hraje tedy také roli v patogenezi srdeční hypertrofie (Song *et al.* 2010).

### 2.7.8 Srdeční selhání a microRNA

U biopsie myokardu pacientů, kteří prodělali srdeční selhání, byly oproti kontrolní skupině up-regulované následující microRNA: miR-1, miR-21, miR-23, miR-29, miR-130, miR-195 a miR-199 (Lai *et al.* 2015). Dále byla prokázána nadměrná exprese miR-100 u případů srdečního selhání, způsobuje down-regulaci genů

podstatných pro funkci srdce, např. geny pro těžký řetězec  $\alpha$ -myosinu a *SERCA2a* (Sucharov *et al.* 2008). Up-regulace miR-100 byla taktéž nalezena u  $H_2O_2$  indukované apoptózy kardiomyocytů neonatálních myší, funkční analýza odhalila, že down-regulace miR-100 tlumí apoptózu indukovanou  $H_2O_2$ . Děje se tak skrze potlačení exprese IGF1R (receptor pro insulinu podobný růstový faktor 1) během tohoto procesu (Chen *et al.* 2015).

### 2.7.9 Hypoxie a microRNA

Při poklesu kyslíku je miR-199a v kardiomyocytech akutně downregulována. To znamená okamžitou expresi HIF-1 $\alpha$  (hypoxií indukovaný faktor 1 $\alpha$ ), který stabilizuje protein p53, což vede k apoptóze. Dalším cílem miR-199a je *SIRT1* (sirtuin 1), který je zodpovědný za regulaci prolyl hydroxylázy 2, která stabilizuje HIF-1 $\alpha$ . MiR-199a je tedy hlavním regulátorem drah vyvolaných hypoxií (Rane *et al.* 2009). Také miR-221 reaguje na hypoxii a redukuje poškození srdce inhibicí autofágie, děje se tak pomocí down-regulace *DDIT4* (transkript indukovaný poškozením DNA), který inhibuje formování autofagozomu a down-regulací *TP53INP1* (Tumor Protein p53-inducible nuclear protein), který inhibuje degradaci autofagozomu. MiR-221 má protektivní účinky při poškození buněk hypoxií a následnou reoxygenací (Chen *et al.* 2016).

Tab. č. 1: Charakteristika zkoumaných miRNA

<b>název</b>	<b>chromozomální lokalizace</b>	<b>sekvence 5' → 3'</b>	<b>hraje roli v patogenezi/funkce</b>
hsa-miR-1-3p	20q13.33	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	dyslipidémie <sup>1</sup> , hypertrofická kardiomyopatie <sup>2</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>3,4</sup> , arytmie <sup>5</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>5</sup>
hsa-miR-16-5p	13q14.2	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	angiogeneze <sup>6</sup> , ateroskleróza <sup>7</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>8</sup>
hsa-miR-17-5p	13q31.3	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	angiogeneze <sup>9</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>10</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>11</sup>
hsa-miR-20a-5p	13q31.3	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	angiogeneze <sup>9</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>10</sup>
hsa-miR-20b-5p	X26.2	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG	inzulinová rezistence a diabetes <sup>12</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>13</sup>
hsa-miR-21-5p	17q23.1	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	dyslipidémie <sup>14</sup> , hypertenze <sup>15</sup> , inzulinová rezistence a diabetes <sup>12</sup> , ateroskleróza <sup>16</sup> , angiogeneze <sup>17</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>4,15</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>18</sup>
hsa-miR-23a-3p	19p13.12	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	ischemická choroba srdeční <sup>19</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>4,20</sup>
hsa-miR-24-3p	19p13.12	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	inzulinová rezistence a diabetes <sup>12</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>21</sup>
hsa-miR-26a-5p	3p22.2	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	inzulinová rezistence a diabetes <sup>22</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>23</sup> , hypertrofická kardiomyopatie <sup>24</sup>
hsa-miR-29a-3p	7q32.3	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	inzulinová rezistence a diabetes <sup>31</sup> , hypertrofická kardiomyopatie <sup>24</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>4,25</sup>
hsa-miR-92a-3p	13q31.3	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	angiogeneze <sup>9</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>10</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>26</sup>
hsa-miR-100-5p	11q24.1	AACCCGUAGAUCGGAACUUGUG	angiogeneze <sup>27</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>26</sup>
hsa-miR-103-3p	20p13	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>23</sup>

hsa-miR-125b-5p	21q21.1	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>21</sup>
hsa-miR-126-3p	9q34.3	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	vaskulární záněty <sup>28</sup> , inzulinová rezistence a diabetes <sup>12</sup> , ateroskleróza <sup>28</sup> , angiogeneze <sup>9</sup> , hypertrofická kardiomyopatie <sup>24</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>10</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>29</sup>
hsa-miR-130b-3p	22q11.21	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	hypoxie <sup>30</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>4,31</sup>
hsa-miR-133a-3p	20q13.33	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	inzulinová rezistence a diabetes <sup>32</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>10</sup> , hypertrofická kardiomyopatie <sup>24</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>3</sup>
hsa-miR-143-3p	5q32	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	hypertenze <sup>33</sup> , aortální aneurysma <sup>34</sup> , hypertrofická kardiomyopatie <sup>24</sup> , ateroskleróza <sup>35</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>33</sup>
hsa-miR-145-5p	5q32	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	hypertenze <sup>33</sup> , aortální aneurysma <sup>34</sup> , hypertrofická kardiomyopatie <sup>24</sup> , ateroskleróza <sup>35</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>10</sup>
hsa-miR-146a-5p	5q33.3	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	dyslipidémie <sup>36</sup> , ateroskleróza <sup>16</sup> , vaskulární záněty <sup>37</sup>
hsa-miR-181a-5p	9q33.3	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	inzulinová rezistence a diabetes <sup>38</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>39</sup>
hsa-miR-195-5p	17p13.1	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	vaskulární záněty <sup>40</sup> , ateroskleróza <sup>40</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>4,21</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>40</sup>
hsa-miR-199a-5p	19p13.2	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	hypoxie <sup>41</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>4,21</sup> , hypertrofická kardiomyopatie <sup>24</sup>
hsa-miR-210-3p	11p15.5	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	ateroskleróza <sup>16</sup> , angiogeneze <sup>42</sup> , infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>43</sup>
hsa-miR-221-3p	Xp11.3	AGCUACAUUGUCUGCGGUUUC	angiogeneze <sup>44</sup> , hypoxie <sup>45</sup> , ischemická choroba srdeční <sup>46</sup>
hsa-miR-342-3p	14q32.2	UCUCACACAGAAUUCGCACCCGU	infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>47</sup>
hsa-miR-499a-5p	20q11.22	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU	infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>3</sup>

hsa-miR-574-3p	4p14	CACGCUCAUGCACACACCCACA	infarkt myokardu a srdeční selhání <sup>48</sup>
----------------	------	------------------------	--

Data jsou z online databází: <http://www.omim.org/>, <http://www.mirbase.org/> a literatury

#### Seznam literatury k tabulce č. 1:

- [1] Zhong D, Huang G, Zhang Y, Zeng Y, Xu Z, Zhao Y, He X, He F. 2013. MicroRNA-1 and microRNA-206 suppress LXR $\alpha$ -induced lipogenesis in hepatocytes. *Cellular Signaling* 25:1429–1437.
- [2] Ikeda S, He A, Kong SW, Lu J, Bejar R, Bodyak N, Lee K-H, Ma Q, Kang PM, Golub TR, Pu WT. 2009. MicroRNA-1 Negatively Regulates Expression of the Hypertrophy-Associated Calmodulin and Mef2a Genes. *Molecular and Cellular Biology* 29:2193–2204
- [3] D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, Micheli B, Biglioli P, Achilli F, Martelli F, Maggiolini S, Marenzi G, Pompilio G, Capogrossi MC. 2010. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal* 31:2765–2773.
- [4] Lai KB, Sanderson JE, Izzat MB, Yu CM. 2015. Micro-RNA and mRNA myocardial tissue expression in biopsy specimen from patients with heart failure. *International Journal of Cardiology* 199:79–83.
- [5] Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. 2007. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature Medicine* 13:486–91.
- [6] Zhu Y, Lu H, Huo Z, Ma Z, Dang J, Dang W, Pan L, Chen J, Zhong H. 2016. MicroRNA-16 inhibits feto-maternal angiogenesis and causes recurrent spontaneous abortion by targeting vascular endothelial growth factor. *Scientific Reports* 6:35536.
- [7] Liang X, Xu Z, Yuan M, Zhang Y, Zhao B, Wang J, Zhang A, Li G. 2016. MicroRNA-16 suppresses the activation of inflammatory macrophages in atherosclerosis by targeting PDCD4. *International Journal of Molecular Medicine* 37:967–975.
- [8] Kuosmanen SM, Hartikainen J, Hippeläinen M, Kokki H, Levonen AL, Tavi P. 2015. MicroRNA profiling of pericardial fluid samples from patients with heart failure. *PLoS One* 10:e0119646.
- [9] Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. 2010. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood* 115:4944–4950.
- [10] Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. 2010. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation Research* 107:677–684.
- [11] Wang Q, Hu W, Lei M, Wang Y, Yan B, Liu J, Zhang R, Jin Y. 2013. MiR-17-5p impairs trafficking of H-ERG K<sup>+</sup> channel protein by targeting multiple ER stress-related chaperones during chronic oxidative stress. *PLoS One* 8:e84984.
- [12] Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. 2010. Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. *Circulation Research* 107:810–817.
- [13] Dickinson BA, Semus HM, Montgomery RL, Stack C, Latimer PA, Lewton SM, Lynch JM, Hullinger TG, Seto AG, Van Rooij E. 2013. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *European Journal of Heart Failure* 15:650–659.
- [14] Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T, Yokoi T. 2011. PPAR $\alpha$  is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharmaceutical Research* 28:2467–2476.
- [15] Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456:980–984.



- [16] Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, Klopp N, Illig T, Kähönen M, Karhunen PJ, Laaksonen R, Lehtimäki T. 2011. MiR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* 219:211–217.
- [17] Hu J, Ni S, Cao Y, Zhang T, Wu T, Yin X, Lang Y, Lu H. 2016. The Angiogenic Effect of microRNA-21 Targeting TIMP3 through the Regulation of MMP2 and MMP9. *PLoS One* 11: e0149537.
- [18] Li S, Fan Q, He S, Tang T, Liao Y, Xie J. 2015. MicroRNA-21 negatively regulates treg cells through a TGF- $\beta$ 1/smad-independent pathway in patients with coronary heart disease. *Cellular Physiology and Biochemistry* 37:866–878.
- [19] Satoh M, Nasu T, Takahashi Y, Osaki T, Hitomi S, Morino Y, Nakamura M. 2017. Expression of miR-23a induces telomere shortening and is associated with poor clinical outcomes in patients with coronary artery disease. *Clinical Science*.
- [20] Mao J, Lv Z, Zhuang Y. 2014. MicroRNA-23a is involved in tumor necrosis factor- $\alpha$  induced apoptosis in mesenchymal stem cells and myocardial infarction. *Experimental and Molecular Pathology* 97:23–30.
- [21] van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. 2006. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 103:18255–18260.
- [22] Fu X, Dong B, Tian Y, Lefebvre P, Meng Z, Wang X, Pattou F, Han W, Wang X, Lou F, Jove R, Staels B, Moore DD, Huang W. 2015. MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. *Journal of Clinical Investigation* 125:2497–2509.
- [23] Lin Y, Sibanda VL, Zhang H-M, Hu H, Liu H, Guo A-Y. 2015. MiRNA and TF co-regulatory network analysis for the pathology and recurrence of myocardial infarction. *Scientific Reports* 5:9653.
- [24] Roncarati R, Chiara Y, Anselmi V, Losi MA, Papa L, Cavarretta E, Da P, Martins C, Contaldi C, Jotti GS, Franzone A, Galastri L, Latronico MVG, Imbriaco M, Esposito G, De Windt L, Betocchi S, Condorelli G. 2014. Circulating miR-29a, Among Other Up-Regulated MicroRNAs, Is the Only Biomarker for Both Hypertrophy and Fibrosis in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 63:920–927.
- [25] van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. 2008. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105:13027–13032.
- [26] Sucharov C, Bristow MR, Port JD. 2008. miRNA expression in the failing human heart: Functional correlates. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45:185–192.
- [27] Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, Bluhm F, Sluijter JPG, Hoefler I, Pasterkamp G, Bode C, Moser M. 2011. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation* 123:999–1009.
- [28] Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. 2008. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:1516–1521.
- [29] Wei XJ, Han M, Yang FY, Wei GC, Liang ZG, Yao H, Ji CW, Xie RS, Gong CL, Tian Y. 2015. Biological significance of miR-126 expression in atrial fibrillation and heart failure. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* 48:983–989.
- [30] Saito K, Kondo E, Matsushita M. 2011. MicroRNA 130 family regulates the hypoxia response signal through the P-body protein DDX6. *Nucleic Acids Research* 39:6086–6099.
- [31] Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, Dong Q, Pang Z, Guan Q, Gao L, Zhao J, Zhao L. 2011. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. *Acta Diabetologica* 48:61–69.
- [32] Chen S, Puthanveetil P, Feng B, Matkovich SJ, Dorn GW, Chakrabarti S. 2014. Cardiac miR-133a overexpression prevents early cardiac fibrosis in diabetes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 18:415–421.
- [33] Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2009. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes and Development* 23:2166–2178.

- [34] Elia L, Quintavalle M, Zhang J, Contu R, Cossu L, Latronico MVG, Peterson KL, Indolfi C, Catalucci D, Chen J, Courtneidge SA, Condorelli G. 2009. The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death Differ* 16:1590–1598.
- [35] Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee T-H, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D. 2009. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 460:705–710.
- [36] Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, Sun Z, Shen WF. 2011. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS Letters* 585:854–860.
- [37] Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, Delgado-Olguin P, Cybulsky MI, Fish JE. 2013. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Molecular Medicine* 5:949–966
- [38] Zhou B, Li C, Qi W, Zhang Y, Zhang F, Wu JX, Hu YN, Wu DM, Liu Y, Yan TT, Jing Q, Liu MF, Zhai QW. 2012. Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity. *Diabetologia* 55:2032–2043.
- [39] Hulsmans M, Sinnaeve P, Van Der Schueren B, Mathieu C, Janssens S, Holvoet P. 2012. Decreased miR-181a expression in monocytes of obese patients is associated with the occurrence of metabolic syndrome and coronary artery disease. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97: E1213–E1218.
- [40] Wang YS, Wang HY, Liao YC, Tsai PC, Chen KC, Cheng HY, Lin RT, Juo SHH. 2012. MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation. *Cardiovascular Research* 95:517–26.
- [41] Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Abdellatif M. 2009. Downregulation of MiR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circulation Research* 104:879–886.
- [42] Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, Fasanaro P, Sun N, Wang X, Martelli F, Robbins RC, Wu JC. 2010. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation* 122:S124-131.
- [43] Endo K, Naito Y, Ji X, Nakanishi M, Noguchi T, Goto Y, Nonogi H, Ma X, Weng H, Hirokawa G, Asada T, Kakinoki S, Yamaoka T, Fukushima Y, Iwai N. 2013. MicroRNA 210 as a Biomarker for Congestive Heart Failure. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 48:48–54.
- [44] Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, Mercatanti A, Hammond S, Rainaldi G. 2006. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108:3068–3071.
- [45] Chen Q, Zhou Y, Richards AM, Wang P. 2016. Up-regulation of miRNA-221 inhibits hypoxia/reoxygenation-induced autophagy through the DDIT4/mTORC1 and Tp53inp1/p62 pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 474:168–174.
- [46] Liu X, Cheng Y, Yang J, Xu L, Zhang C. 2012. Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: Molecular mechanism and therapeutic application. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52:245–255.
- [47] Kaneko M, Satomi T, Fujiwara S, Uchiyama H, Kusumoto K, Nishimoto T. 2016. AT1 receptor blocker azilsartan medoxomil normalizes plasma miR-146a and miR-342-3p in a murine heart failure model. *Biomarkers* 22:1–8.
- [48] Boštjančič E, Zidar N, Glavač D. 2012. MicroRNAs and cardiac sarcoplasmic reticulum calcium ATPase-2 in human myocardial infarction: expression and bioinformatic analysis. *BMC Genomics* 13:552.

### 3. Komplikace v těhotenství

Těhotenství je náročným obdobím v životě ženy a dochází během něj k řadě fyziologických, biochemických i anatomických změn. Patří mezi ně například vznik placenty, zvýšení objemu krve o 30–50 %, což znamená větší zatížení srdce, u kterého dochází k mírné hypertrofii. Krevní tlak je v těhotenství nižší než normálně. Placenta, která je klíčovým dočasným orgánem pro těhotenství, je s plodem propojena pomocí pupečníku, který je tvořen třemi cévami (dvě *arteriae umbilicales* a *vena umbilicalis*). Hlavní funkce placenty jsou výměna kyslíku a živin mezi matkou a plodem, dále tvorba hormonů a termoregulace.

Funkční nedostatečnost placenty (placentární insuficience) ovlivňuje několik funkcí placenty a způsobuje nutriční a respirační insuficienci plodu. Rozlišujeme placentární insuficienci primární a sekundární. Primární placentární insuficience vzniká v důsledku defektní placentace. Následná maladaptace mateřského kardiovaskulárního systému je asociována se širokým spektrem komplikací, mezi nimiž jsou i časná preeklampsie (klinická manifestace před 34. týdnem gravidity) a časná fetální růstová retardace (klinická manifestace před 32. týdnem gravidity) (Brosens *et al.* 2011). Nedávné studie ukázaly, že pozdní preeklampsie a fetální růstová retardace (klinická manifestace po 34., resp. po 32. týdnu gravidity) mohou být způsobeny sekundární placentární insuficiencí, která je zapříčiněna nedostatečností mateřského kardiovaskulárního systému, jenž není schopen zvládnout zvýšené hemodynamické a metabolické nároky těhotenství (Thilaganathan 2016).

#### 3.1 Gestační hypertenze

Gestační hypertenze (GH) je nejčastější příčinou zvýšeného krevního tlaku v těhotenství. Postihuje přibližně 10 % žen v průběhu těhotenství (Duley 2009). Gestační hypertenze je definována jako výskyt hypertenze poprvé během druhé poloviny těhotenství (po 20. týdnu gravidity), bez proteinurie a preeklampsie (viz dále) s navrácením krevního tlaku do normálních hodnot během 12 týdnů po porodu. Chronická hypertenze je definována jako hypertenze, která se objevuje do 20. týdne těhotenství (případně je přítomná už před těhotenstvím) a po porodu nemizí.

Hypertenze je krevní tlak vyšší nebo rovný 140/90 mmHg (Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy 2000).

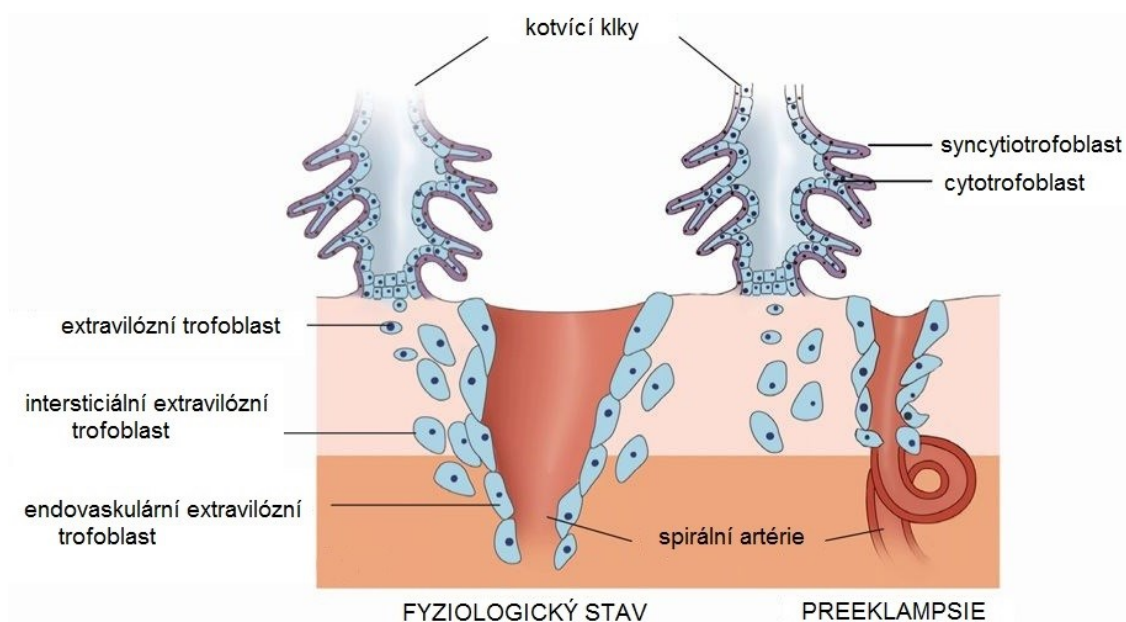
Hypertenze v těhotenství zvyšuje u matek riziko pozdějšího výskytu kardiovaskulárních onemocnění, jako jsou ischemická choroba srdeční, infarkt myokardu, selhání srdce, ale i chronických onemocnění ledvin a diabetu 2. typu (Männistö *et al.* 2013).

### 3.2 Preeklampsie

Preeklampsie (PE) se obvykle objevuje po 20. týdnu těhotenství. Je charakterizována zvýšeným krevním tlakem (> 140/90 mmHg) doprovázeným proteinurií, případně otoky. Vyskytuje se až u 2–8 % těhotných žen (WHO 1988). Preeklampsie může způsobovat problémy jater, ledvin, mozku a srážení krve. Tyto komplikace mají vliv i na plod, což se projeví špatným růstem a rozvojem plodu. Preeklampsie může matku ohrozit na životě, zejména v zemích s nedostatečnou lékařskou péčí. Zhruba 10 % případů přímé smrti matky v souvislosti s těhotenstvím je asociováno s preeklampií nebo eklampií (Duley 1992).

Rizikovými faktory preeklampsie jsou: věk nad 40 let, nuliparita, více než 10 let od posledního těhotenství, vícečetné těhotenství, preeklampsie v rodinné anamnéze, BMI nad 30, onemocnění kardiovaskulárního systému či ledvin (Sibai 2003).

Jednou z hlavních příčin preeklampsie je nerovnováha angiogenních faktorů, je tak narušena vaskulární remodelace vedoucí k placentální insuficienci, což ohrožuje plod nedostatkem kyslíku (Pennington *et al.* 2012). U normálního těhotenství je placenta vaskularizována, aby mohlo docházet k výměně kyslíku a živin mezi mateřským a fetálním oběhem. Děje se tak invazí buněk extravilózního cytotrofoblastu, která je doprovázena výraznou změnou exprese molekul buněčné adheze. V případě preeklampsie je tato invaze nedokonalá a v mateřské spirální artérii nejsou schopny dostatečné remodelace a dilatace, což vede k hypoperfuzi placenty a placentární insuficienci (Fischer 2015).



Obr. 2: Schématické znázornění implantace placenty. Buňky extravilózního trofoblastu jsou proliferovány z kotvících klků a invadují do sliznice dělohy, kde remodelují a dilatují mateřské spirální artérie. U preeklampsie nedochází k dostatečné invazi buněk extravilózního trofoblastu tudíž ani k dostatečné dilataci mateřských spirálních artérií, tím dochází k hypoperfuzi placenty. Placenta je tak vystavena hypoxii a neplní správně všechny fyziologické funkce, což přináší komplikace pro matku i plod. (převzato a upraveno z <https://obgynkey.com/hypertensive-disorders-4/>)

Preeklampsie může být dle závažnosti klinických příznaků dále rozdělena na mírnou a závažnou formu (mild preeclampsia – mPE, severe preeclampsia – sPE). Mírná preeklampsie je charakterizována krevním tlakem vyšším než 140/90 mmHg v kombinaci s proteinurií nad 300 mg za 24 hodin. Závažná preeklampsie se projevuje vyšším krevním tlakem nad 160/110 mmHg a proteinurií – 5 g za 24 hodin. Mezi další příznaky závažnější formy preeklampsie patří zvýšená hladina kreatininu (oligurie – méně než 500 ml moči/24 hodin), bolest hlavy, poruchy vizu, plicní edém, fetální růstová retardace (ACOG Committee on Obstetric Practice 2002). Závažná preeklampsie může vést k syndromu HELLP (zkratka z anglických slov: Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count), jehož hlavními příznaky jsou hemolýza, zvýšené množství jaterních enzymů, snížený počet krevních destiček (Weinstein 1982). Tento syndrom se vyvine přibližně u 20 % pacientek se závažnou preeklampií (Sibai *et al.* 1993).

Děti narozené z těhotenství s preeklampií mají prokazatelně více rizikových faktorů pro rozvoj kardiovaskulárního onemocnění již od rané fáze života, jedná se

zejména o vyšší krevní tlak a BMI (Davis *et al.* 2012). Dále matkám, které prodělaly preeklampsii v těhotenství a jejich dětem, hrozí vyšší riziko rozvoje diabetu 2. typu, u dětí toto riziko negativně koreluje s porodní hmotností (Libby *et al.* 2007).

### 3.3 Fetální růstová retardace

Fetální růstová retardace (FGR) neboli intrauterinní růstová restrikce (IUGR) je označení pro zpomalený růst plodu, který je pod 10. váhovým percentilem vzhledem ke gestačnímu stáří plodu. Příčiny vzniku mohou být různé, hrubě je lze rozdělit na tři skupiny: maternální, fetální a placentální příčiny (ACOG Committee on Obstetric Practice 2013). Do poslední skupiny patří i výše zmiňovaná preeklampsie. Pro plody, jejichž hmotnost je pod 10. percentilem pro daný gestační věk a mají normální Dopplerovské parametry, používáme označení SGA (z anglického Small for Gestational Age).

### 3.4 Dopplerovská ultrasonografie

Dopplerovská ultrasonografie je neinvazivní metoda, která umožňuje vizualizaci toku krve arteriemi. Mezi parametry Dopplerovské ultrasonografie patří: index pulzatility *arteria umbilicalis* a *arteria cerebri media* a cerebroplacentární poměr. Indexy pulzatility udávají hodnoty průtoku krve v daných cévách, cerebroplacentární poměr ukazuje míru centralizace oběhu plodu. Cerebroplacentární poměr vyjadřuje poměr mezi indexem pulzatility *arteria cerebri media* a indexem pulzatility *arteria umbilicalis*. Pomocí této metody lze monitorovat stav plodu, odhalit jeho případné ohrožení a pokud je to nezbytné, tak ukončit těhotenství dříve. Za patologické hodnoty indexu pulzatility v *arteria umbilicalis* byly považovány všechny nad 95. percentilem, v případě indexu pulzatility v *arteria cerebri media* naopak všechny pod 5. percentilem. Hodnoty cerebroplacentárního poměru byly považovány za abnormální, pokud byly pod 5. percentilem.

Dalším ukazatelem nestandardního průběhu těhotenství a placentární insuficience je množství plodové vody. Za normální množství plodové vody se považuje objem, kdy plod má dostatek prostoru pro pohyb, je-li plod v pohybu omezen a okolo sebe má malé množství plodové vody, označuje se tento stav jako oligohydramnion, pokud plodová voda zcela chybí jedná se o anhydramnion.

## 4. Cíl práce

Prvním cílem práce bylo vybrat vhodné stabilní endogenní kontroly, pro normalizaci dat PCR v reálném čase. Stabilní endogenní kontroly jsou takové geny, které vykazují nejstabilnější expresi napříč testovanými vzorky.

Dalším cílem práce bylo porovnat míru exprese vybraných kardiovaskulárních microRNA v pupečnickové krvi mezi těhotenstvími s fyziologickým průběhem a těhotenstvími s patologickým průběhem (u pacientek s diagnózou gestační hypertenze, preeklampsie a fetální růstové retardace).

A konečně porovnat míru exprese kardiovaskulárních microRNA v pupečnickové krvi s ohledem na závažnost patologie (mírná/závažná forma preeklampsie, Dopplerovské parametry) a s ohledem na termín porodu (před/po 34. týdnu gestace).

Studie je součástí dlouhodobého výzkumu, jehož cílem je popsat komplexní patologický mechanismus u těhotenství s komplikovaným průběhem a nalézt biomarkery, které by pomohly v diagnostice, případně predikci pozdějšího výskytu takových těhotenských komplikací.

## 5. Materiál

Zpracovávaným materiálem byla pupečníková krev v EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) odebírána v průběhu porodu. Veškeré vzorky pocházely z Ústavu pro péči o matku a dítě v Podolí, byly získány s informovaným souhlasem pacientek i se souhlasem etické komise 3. lékařské fakulty UK a ÚPMD. Celkem bylo zpracováno 184 vzorků pupečníkové krve od matek s fyziologickým průběhem těhotenství (44 vzorků), s klinickou manifestací preeklampsie (56 vzorků), gestační hypertenze (47 vzorků) a fetální růstové retardace (37 vzorků). Podrobnější charakteristika matek a novorozenců je rozepsána v tabulce č. 2.

Tab. č. 2: Podrobná charakteristika matek a novorozenců u fyziologických/patologických gravidit

	FG (n=44)	PE (n=56)	GH (n=47)	FGR (n=37)
věk matky (roky)	32 (20–39)	33 (22–43)	33 (26–41)	31 (20–41)
gestační stáří v době porodu/odběru vzorků (týdny)	40+0 (36+3 – 41+6)	36+0 (25+6 – 41+2)	39+0 (26+6 – 41+1)	37+5 (30+0 – 40+4)
způsob porodu				
vaginální	37 (84,1 %)	8 (14,3 %)	28 (59,6 %)	19 (51,4 %)
císařským řezem	7 (15,9 %)	48 (85,7 %)	19 (40,4 %)	18 (48,6 %)
váha novorozence (g)	3430 (2780–4060)	2320 (580–3770)	3160 (1012–4580)	2470 (910–3000)
pohlaví novorozence				
chlapec	21 (47,7%)	27 (48,2 %)	18 (38,3 %)	15 (40,5 %)
dívka	23 (52,3 %)	29 (51,8 %)	29 (61,7 %)	22 (54,5 %)
matka prvoroďička				
ano	29 (65,9 %)	45 (80,4 %)	31 (66 %)	27 (73 %)
ne	15 (34,1 %)	11 (19,6 %)	16 (34 %)	10 (27 %)

Vysvětlení zkratk: FG = fyziologická gravidita, PE = preeklampsie, GH = gestační hypertenze, FGR = fetální růstová retardace. Uvedené hodnoty jsou mediány (rozptyly) pro kontinuální data, pro proměnné kategorické jsou hodnoty vyjádřeny počtem (procentem).

Za ženy s fyziologickou graviditou byly považovány ty, jež neměly žádné lékařské, těhotenské ani chirurgické komplikace a které porodily zdravé dítě s váhou > 2500 g po ukončeném 37. týdnu gravidity. Mezi ženy s gestační hypertenzí se řadily



ty, u kterých se nově objevila hypertenze (tlak vyšší než 140/90 mmHg) po 20. týdnu gravidity. Hypertenze nebyla doprovázena proteinurií ani jinými příznaky typickými pro preeklampsii. Preeklampsie byla definována jako vysoký krevní tlak  $> 140/90$  mmHg, naměřený dvakrát alespoň s 4 hodinovým odstupem, a s proteinurií vyšší než 300 mg/24 hodin po 20. týdnu gestace. Pacientky s preeklampsií byly dále rozděleny do skupin dle závažnosti preeklampsie na mírnou formu (15 pacientek) a závažnou formu (41 pacientek). Závažná forma preeklampsie byla diagnostikována, pokud byl přítomen jeden nebo více z následujících příznaků: systolický krevní tlak  $> 160$  mmHg nebo diastolický krevní tlak  $> 110$  mmHg, proteinurie vyšší než 5 g/24 hodin, malé množství moči (méně než 500 ml/24 hodin), respirační problémy (plicní edém nebo cyanóza), porucha funkce jater, bolesti hlavy a poruchy vize, bolesti v oblasti epigastria nebo pravém horním kvadrantu, trombocytopenie, závažná fetální růstová retardace. Fetální růstová retardace a SGA plody byly diagnostikovány, když odhadovaná váha plodu byla pod 10. percentilem pro daný gestační věk. Plody s fetální růstovou retardací musely navíc vykazovat ještě alespoň jeden z následujících příznaků: abnormální index pulzatility v *arteria umbilicalis*, nulový nebo reverzní end-diastolický tok v *arteria umbilicalis*, abnormální index pulzatility v *arteria cerebri media*, příznaky centralizace oběhu plodu nebo nedostatek amniové tekutiny (oligohydramnion nebo anhydramnion). Centralizace oběhu plodu je protektivní reakcí proti hypoxii, která se projevuje v redistribuci cirkulace v mozku, játrech a srdci na úkor prokrvení periférie.

Ze studie byly vyloučeny pacientky, u nichž byla prokázána předčasná ruptura membrán, infekce in utero, potrat, mrtvorozenost a dále pacientky se strukturálními a chromozomálními abnormalitami u plodu.

## 6. Metody

### 6.1 Prvotní zpracování biologického materiálu

Vzorky pupečnickové krve byly odebírány v průběhu porodu do 9ml zkumavek s protisrážlivým činidlem EDTA. Poté byly ihned po příjmu do laboratoře dále zpracovány. Pupečnicková krev byla použita pro izolaci RNA (QIAamp RNA Blood Mini Kit; Qiagen, Hilden, Německo). K 200  $\mu$ l pupečnickové krvi bylo přidáno 1000  $\mu$ l pufru EL. Následovala inkubace na ledu po dobu 10 minut, poté byl vzorek stáčen po dobu 10 minut v centrifuze vychlazené na 4 °C při 400  $\times$  g. Poté byl odstraněn supernatant a pro lepší promytí pelety buněk byl opět přidán pufr EL o objemu 400  $\mu$ l. Následovala opět centrifugace a odstranění supernatantu. Na závěr se k peletě buněk přidala směs pufru RLT a  $\beta$ -merkaptoethanolu (347:3). Vzorek byl poté zamrazen při teplotě -80 °C, až do doby dalšího zpracování.

### 6.2 Izolace RNA obohacené o krátké RNA

K izolaci byl používán mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, USA). Vzorky byly rozmrazeny při 37 °C po dobu 4 minut, posléze bylo ke vzorkům přidáno 600  $\mu$ l pufru (Lysis/Binding Buffer) a promícháno. K této směsi se přidala 1/10 objemu homogenizačního roztoku (miRNA Homogenate Additive) a vzorek bylo nutno řádně promíchat a poté nechat inkubovat na ledu po dobu 10 minut. Po inkubaci byl přidán 1  $\mu$ l 0,1nM syntetické miRNA *C. elegans*, která sloužila jako potenciální vnitřní kontrola. Následovalo opět promíchání, po kterém se přidal Acid-Phenol-Chloroform v objemu odpovídajícím původnímu lyzátu, poté bylo nutné směs alespoň 30 s vortexovat. Pro oddělení vodné a organické fáze byla směs následně centrifugována 5 minut při 10000  $\times$  g. Vodná fáze, tzn. fáze obsahující pouze RNA, byla odebrána do čisté zkumavky a podle objemu byla naředěna 100% ethanolem (třetina původního objemu) a promíchána. Následovala aplikace na kolonku pro odstranění nečistot a dlouhých RNA molekul a centrifugace 15 sekund při 10000  $\times$  g. Vzniklý filtrát byl postupně sbírán do nové zkumavky a opět naředěn 100% ethanolem (dvě třetiny původního objemu) a promíchán. Vzorek byl aplikován na novou kolonku a centrifugován 15 sekund při 10000  $\times$  g, na kolonce se zachytily krátké molekuly RNA. Poté byla kolonka promyta promývacími roztoky (miRNA Wash Solution 1 a miRNA Wash Solution 2/3)

a zbavena reziduální tekutiny. Finálním krokem bylo kolonku promýt 100 µl elučního roztoku ohřátého na 95 °C, tím došlo k uvolnění potřebných RNA molekul to roztoku, ke kterému bylo posléze přidáno ještě 5 µl pufru a 5 µl DNázy – k minimalizaci kontaminace DNA (Thermo Fisher Scientific, California, USA). Následovala inkubace při 37 °C po dobu 30 minut. Na závěr se přidalo 5 µl EDTA a vzorek byl inkubován dalších 10 minut při teplotě 65 °C.

### 6.3 Reverzní transkripce

Ještě tentýž den musely být vzorky obsahující jednotlivé miRNA přepsány pomocí reverzní transkripce na cDNA, z důvodu rychlé degradace izolovaných miRNA. K transkripci byl použit TaqMan Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Branchburg, USA) a TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Branchburg, USA), jejichž součástí jsou specifické RT primery s vlásenkou, tzv. stem-loop primery. Reakční objem pro všechny testované miRNA i pro kontroly byl 7 µl. Složení reakční směsi pro jednu jamku je uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Složení reakční směsi pro reverzní transkripci

komponenta	množství v µl
100 mM dNTPs	0,07
reverzní transkriptáza	0,49
pufr	0,70
inhibitor RNázy	0,07
voda	1,89
celkový objem	3,22
RT primer	1,40
vzorek	2,38
celkový reakční objem	7,00

Reverzní transkripce byla prováděna v přístroji 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Branchburg, USA), teplotní profil je uveden v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Teplotní profil reverzní transkripce

doba (min)	teplota (°C)
30	16
30	42
5	85
∞	4

## 6.4 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

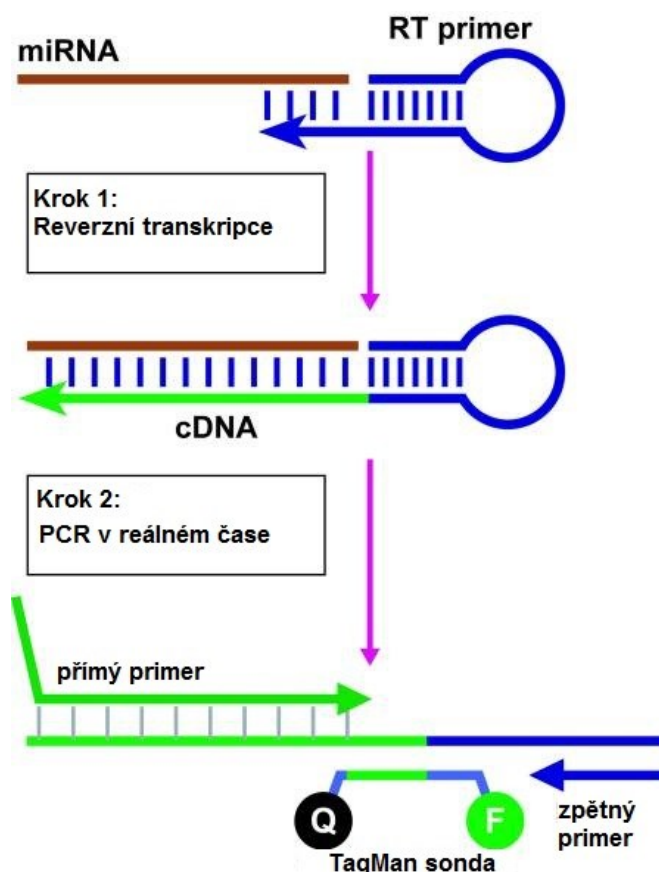
Po reverzní transkripci následovala kvantitativní polymerázová řetězová reakce (kvantitativní PCR v reálném čase). Jedná se o metodu, kde je možné sledovat amplifikaci cDNA v reálném čase, tedy je možné určit relativní množství jednotlivých sledovaných úseků cDNA.

### 6.4.1 Princip kvantitativní PCR v reálném čase

Kvantitativní PCR v reálném čase je založena na principu klasické PCR, umožňuje však sledování množství vybraného úseku DNA v čase, hlavní výhodou této metody je její vysoká citlivost. Nejprve je nutné microRNA reverzně transkribovat do cDNA. Protože jsou microRNA velmi krátké, zhruba stejné velikosti jako běžný primer pro PCR, a navíc vykazují vysoké množství sekvenční homologie v rámci rodin, byly vyvinuty modifikované formy PCR, speciálně pro microRNA.

Jednou z nich je i metoda, kterou jsem používala pro účely této studie, konkrétně analýza exprese microRNA založená na použití tzv. stem-loop primerů neboli vlásenkových primerů při reverzní transkripci, které se navážou na 3' konec microRNA, tímto způsobem dosáhneme prodloužení maturované microRNA a vyšší specifity. TaqMan sondy jsou vysoce specifické pro maturované microRNA, s přesností na jeden nukleotid, mimo nich se při amplifikaci využívají ještě dva druhy primeru – přímý a zpětný (Chen *et al.* 2005, Schmittgen *et al.* 2008). Schématické znázornění průběhu reakce je na obrázku č. 2.

TaqMan sonda je pojmenována dle *Thermus aquaticus*, což je bakterie odolná vysokým teplotám a vyznačuje se speciální Taq DNA polymerázou. Tento termostabilní enzym má 5'→3' exonukleázovou aktivitu, která se uplatňuje při štěpení TaqMan sondy (ta se skládá z fluoroforu kovalentně navázaného na 5' konec, oligonukleotidu a z tzv. zhášeče na 3' konci) a tím dochází k uvolnění fluorescence, která umožňuje měřit množství DNA templátu (Holland *et al.* 1991)



Obr. 3: Schéma průběhu detekce microRNA pomocí real-time PCR; prvním krokem je reverzní transkripce, kdy dojde k navázání vlásenkového primeru, následuje druhý krok, samotná real-time PCR, která vyžaduje dva primery a specifickou TaqMan sondou; Q značí quencher = zhášec a F značí fluorofor (převzato a upraveno dle Chen *et al.* 2005)

#### 6.4.2 Průběh kvantitativní PCR v reálném čase

K reakci byl použit univerzální master mix (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems), dále specifické primery a sondy (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystems), voda a vzorek cDNA z předchozí reakce. Přesné objemy jednotlivých komponent jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Složení reakční směsi PCR v reálném čase

reagent	množství v $\mu\text{l}$
TaqMan univerzální PCR master mix	7,50
Voda (bez nukleáz)	3,75
TaqMan microRNA směs primerů + sondy	0,75
celkový objem	12,00
+ cDNA	+ 3,00

Součástí každé analýzy byl i referenční vzorek (vzorek placentární tkáně z fyziologického těhotenství s porodem v termínu ředěný na koncentraci 3 ng) a negativní kontrola (dále jen NTC), kdy byl vzorek cDNA nahrazen vodou a která sloužila ke zjištění případné kontaminace. PCR byla prováděna na přístroji 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), teplotní profil je uveden v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Teplotní profil PCR v reálném čase

doba	teplota (°C)	proces	
2 min	50	aktivace enzymů	
10 min	95	aktivace enzymů	
15 s	95	denaturace	PCR – 50 cyklů
60 s	60	annealing + elongace	

## 6.5 Relativní kvantifikace

Expresie jednotlivých miRNA byla relativně kvantifikována pomocí tzv. komparativní Ct metody (Ct, threshold cycle – prahová hodnota). Tato metoda porovnává množství templátu vzorku vůči interní kontrole – referenčnímu vzorku. Pomocí komparativní Ct metody byla porovnána Ct hodnota vzorku a geometrický průměr Ct hodnot dvou námi vybraných endogenních kontrol (U75 a RNU44), což jsou takové miRNA, které vykazovaly stálou expresi napříč analyzovanými vzorky. Pro každý vzorek byl vypočten rozdíl Ct hodnoty příslušné miRNA a geometrického průměru Ct hodnot dvou endogenních kontrol, totéž bylo spočteno pro referenční vzorek. Výsledná  $\Delta Ct$  referenčního vzorku byla odečtena od  $\Delta Ct$  jednoho konkrétního vzorku, čímž jsme získali jednu výslednou hodnotu  $\Delta\Delta Ct$ , která byla přepočítána dle vzorce  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , s touto konečnou hodnotou byla provedena statistická analýza.

## 6.6 Statistická analýza dat

Statistická analýza dat byla provedena v softwaru Statistica (verze 9.0; StatSoft, Inc., USA). Normalita dat byla ověřena Shapiro-Wilkovým testem (Shapiro *et* Wilk 1965), vzhledem k nenormálnímu rozdělení dat byly následně použity neparametrické testy. Pro srovnávání výsledků dvou skupin byl použit Mann-Whitneyův *U* test, pro srovnání tří a více skupin Kruskal-Wallisův test. Mann-Whitneyův *U* test je neparametrický test nulové hypotézy, zda-li je stejně pravděpodobné, že náhodně

vybraná hodnota z jedné skupiny bude menší než, nebo větší než náhodně vybraná hodnota z druhé skupiny test (Mann *et* Whitney 1947). Kruskal-Wallisův test rozšiřuje Mann-Whitneyův  $U$  test pro více než dvě skupiny, testuje shodu výběrových distribučních funkcí (Kruskal *et* Wallis 1952). Jako signifikantní jsou považovány výsledky s  $p$ -hodnotou nižší než 0,05. Dále byla aplikována Bonferroniho korekce, která zamítá nulovou hypotézu ve chvíli, kdy je její  $p$ -hodnota menší nebo rovna  $a/m$ , kde  $a$  je hladina významnosti testu (0,05) a  $m$  je počet zároveň provedených testů. Pro srovnání dvou skupin byla tedy  $p$ -hodnota stanovena na  $p < 0,025$ , pro srovnání 3 skupin byla  $p$ -hodnota stanovena na  $p < 0,017$ , resp. 4 skupin  $p < 0,013$ . Korelace mezi proměnnými byla vypočtena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu ( $\rho$ ) (Spearman 1904). Pokud byla hodnota korelačního koeficientu 0–0,5 jednalo se o slabě pozitivní korelaci, pokud –0,5–0, jednalo se o slabě negativní korelaci. Hladina významnosti byla stanovena na  $p < 0,05$ .

Výsledkem grafického zpracování jsou boxploty, kde tmavá horizontální linie značí medián. Horní a dolní strana boxplotu ohraničuje 75. a 25. percentil. Horní a dolní linie tzv. vousy znázorňují hodnoty, které nepřesáhly 1,5násobek interkvartilového rozpětí (25.–75. percentil). Odlehlé hodnoty jsou označeny kroužky, extrémní hodnoty hvězdičkami.

## 7. Výsledky

Byla studována genová exprese 28 kardiovaskulárních miRNA v pupečnickové krvi na souboru 184 těhotných žen. Porovnána byla exprese mezi jednotlivými skupinami i v rámci skupin podle závažnosti onemocnění.

Soubor byl rozdělen do 4 základních skupin – 44 žen s normálním průběhem těhotenství (FG), 47 s gestační hypertenzí (GH), 56 s preeklampií (PE) a 37 s fetální růstovou retardací (FGR). V rámci skupiny 56 žen s preeklampií, 15 ženám byla diagnostikována mírná forma preeklampsie a zbylým 41 ženám závažná forma. Preeklampsie se objevila u 9 pacientek s chronickou hypertenzí a v 47 případech se vyvinula preeklampsie, bez předchozího výskytu hypertenze. Z 37 pacientek s fetální růstovou retardací jich 13 vykazovalo symptomy SGA. Většina dětí (35) z FGR těhotenství se narodila po 34. gestačním týdnem, pouze dvě před 34. gestačním týdnem. Oligohydramnion nebo anhydramnion byl přítomen u 8 FGR případů a 6 pacientek s PE.

Při vyšetření hemodynamiky pomocí Dopplerovské ultrasonografie byl nalezen abnormální index pulzatility v *arteria umbilicalis* u 9 žen s PE a 7 žen s FGR, a abnormální index pulzatility v *arteria cerebri media* u 8 žen s PE a 3 žen s FGR. Cerebroplacentární poměr byl pod 5. percentilem celkem u 26 případů (14 PE a 12 FGR).

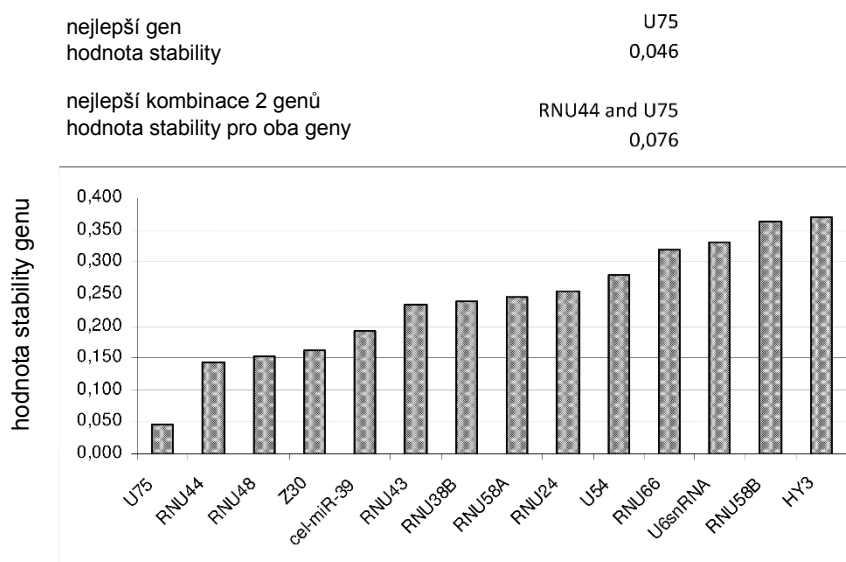
### 7.1 Výběr endogenních kontrol pro normalizaci dat PCR v reálném čase

Jako endogenní kontroly exprese byly vybrány RNU44 a U75. Tyto dvě měly nejstabilnější expresi napříč analyzovanými vzorky, vybírány byly původně z 19 testovaných kandidátních endogenních kontrol (HY3, RNU6B, RNU19, RNU24, RNU38B, RNU43, RNU44, RNU48, RNU49, RNU58A, RNU58B, RNU66, RPL21, U6 snRNA, U47, U54, U75, Z30 and cel-miR-39), jejichž exprese byla měřena u 80 vzorků plné pupečnickové krve (20 FG, 20 GH, 20 PE a 20 FGR) a zpracována pomocí softwaru NormFinder (Torres *et al.* 2013). Výsledky byly ověřeny na větším souboru vzorků (44 FG, 47 GH, 52 PE a 37 FGR). V obou případech byly RNU44 a U75 identifikovány jako nejstabilnější krátké nekódující RNA s rovnoměrnou expesí u těhotných



s fyziologickým (FG) i abnormálním (GH, PE, FGR) průběhem těhotenství. Proto byly vybrány jako normalizátory exprese miRNA pro metodu qPCR.

Graf č. 1: Stabilita exprese krátkých nekódujících RNA /výběr nejvhodnějších endogenních kontrol



Identifikace a následná validace ukázala, že U75 a RNU44 jsou v stabilně exprimovány pupečnickové krvi u obou skupin pacientek – s normálním nebo komplikovaným průběhem těhotenství.

## 7.2 Genová exprese kardiovaskulárních miRNA v pupečnickové krvi u těhotenství s normálním a patologickým průběhem

Nejprve byly porovnány exprese kardiovaskulárních miRNA ve vzorcích pupečnickové krve mezi skupinami fyziologických gravidit a patologických gravidit. Genová exprese miRNA byla dále analyzována s ohledem na závažnost onemocnění (mírná vs. závažná forma preeklampsie) a termín porodu (před/po 34. týdnu těhotenství). Navíc byla sledována asociace mezi genovou expresí kardiovaskulárních miRNA v pupečnickové krvi a předchozím výskytem hypertenze ve skupině pacientek s preeklampsií.

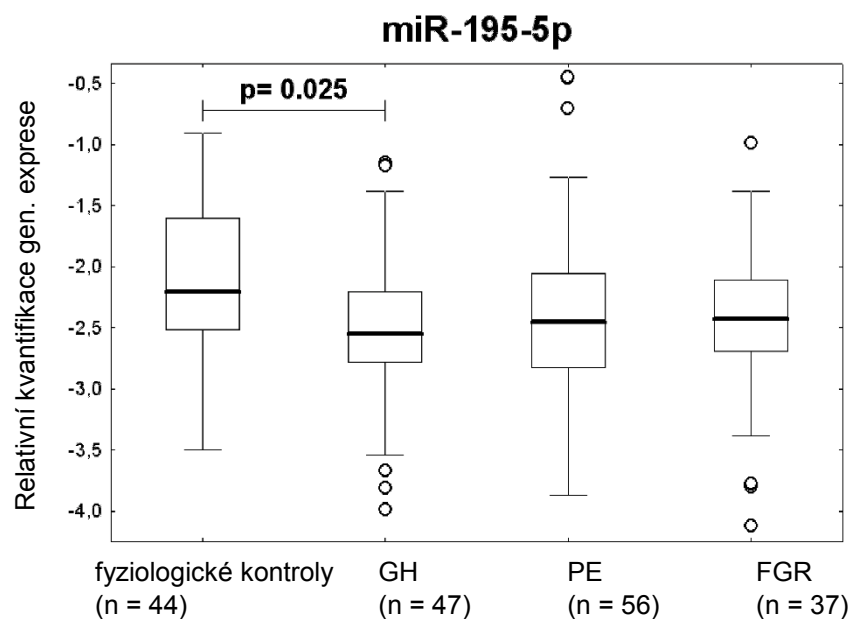
U těhotenství s preeklampsií a/nebo fetální růstovou retardací byla exprese jednotlivých miRNA hodnocena i s ohledem na parametry Dopplerovské ultrasonografie (index pulzatility v *arteria umbilicalis*, index pulzatility v *arteria*

*cerebri media* a cerebroplacentární poměr). Níže jsou popsány pouze výsledky, které dosáhly statistické signifikance, nebo vykazovaly trend k down-regulaci/up-regulaci miRNA u pacientek s abnormálním průběhem těhotenství.

### 7.2.1 Down-regulace miR-195-5p u těhotenství s gestační hypertenzí

Při srovnání všech testovaných skupin mezi sebou, byl u skupiny gravidit s GH zjištěn trend k down-regulaci miR-195-5p ( $p = 0,025$ ) v pupečnickové krvi.

Graf č. 2: Genová exprese miR-195-5p u FG, GH, PE a FGR

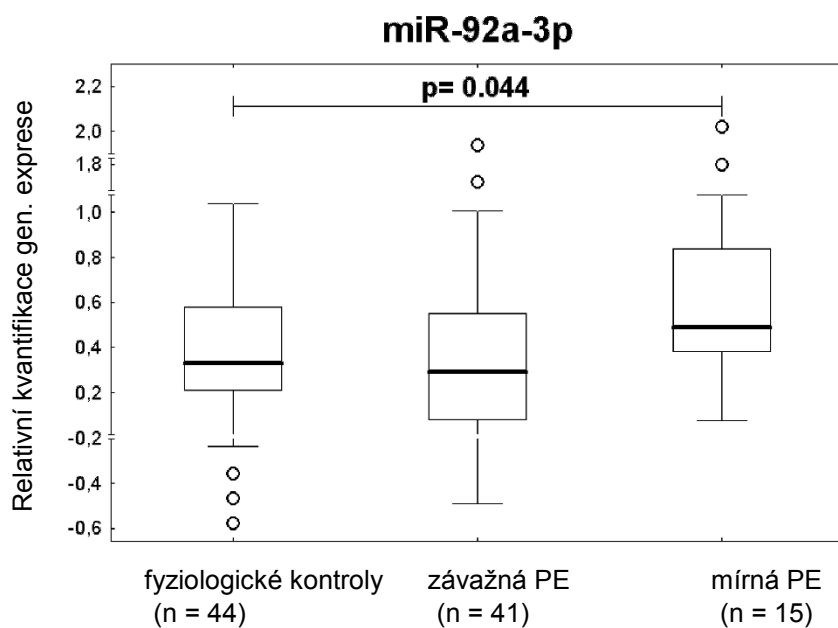


Down-regulace miR-195-5p ( $p = 0,025$ ) v pupečnickové krvi pacientek s GH v porovnání s fyziologickými kontrolami dosáhla statistické signifikance pouze před aplikací Bonferonniho korekce ( $p < 0,013$ ).

### 7.2.2 Up-regulace miR-92a-3p u těhotenství s mírnou preeklampsií

Ve srovnání se skupinou fyziologických gravidit, vykazovaly vzorky pupečnickové krve z těhotenství s mírnou formou PE trend k vyšší expresi miR-92a-3p ( $p = 0,044$ ).

Graf č. 3: Genová exprese miR-92a-3p u FG, závažné PE a mírné PE

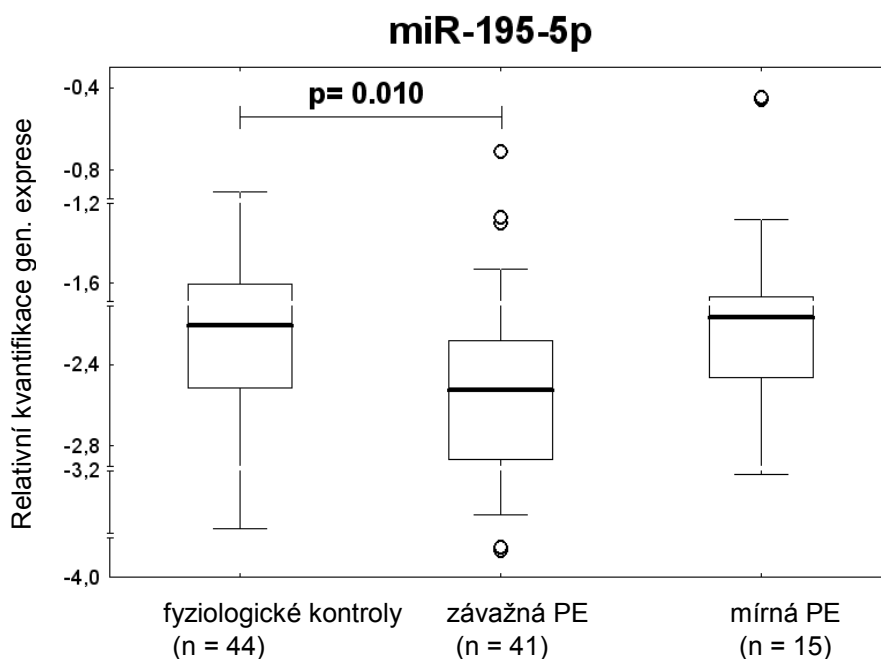


Up-regulace miR-92a-3p ( $p = 0,044$ ) v pupečnickové krvi patientek s mírnou formou PE v porovnání s fyziologickými kontrolami dosáhla statistické significance pouze před aplikací Bonferonniho korekce ( $p < 0,017$ ).

### 7.2.3 Down-regulace miR-26a-5p, miR-145-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-221-3p a miR-574-3p u těhotenství se závažnou preeklamsií

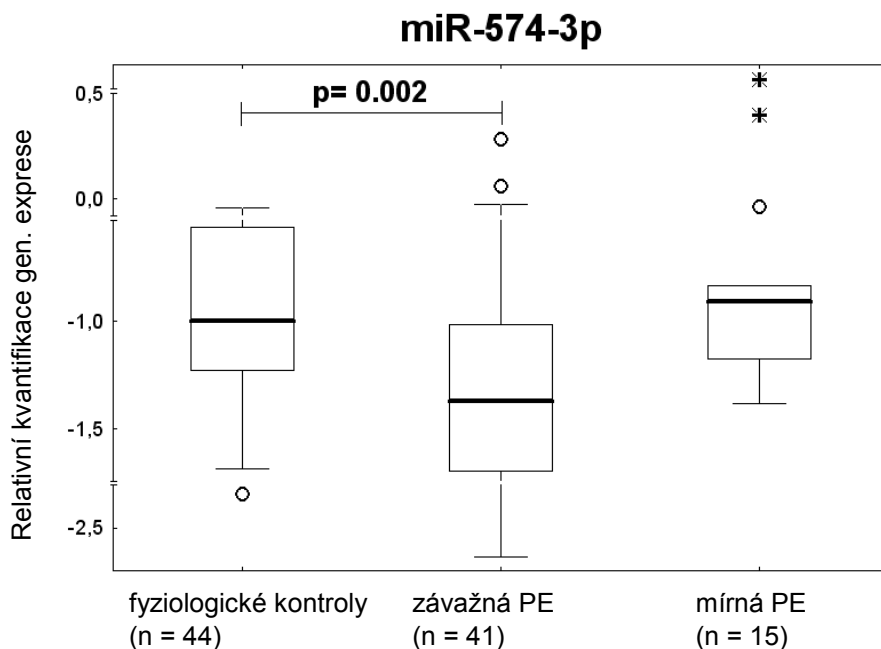
Ve srovnání s kontrolní skupinou patientek byl nalezen signifikantní rozdíl – snížená exprese miR-195-5p ( $p = 0,010$ ) a miR-574-3p ( $p = 0,002$ ) u skupiny patientek se závažnou PE.

Graf č. 4: Genová exprese miR-195-5p u FG, závažné PE a mírné PE



Down-regulace miR-195-5p ( $p = 0,010$ ) v pupečnickové krvi pacientek se závažnou formou PE v porovnání s fyziologickými kontrolami je statisticky signifikantní i po aplikaci Bonferonniho korekce ( $p < 0,017$ ).

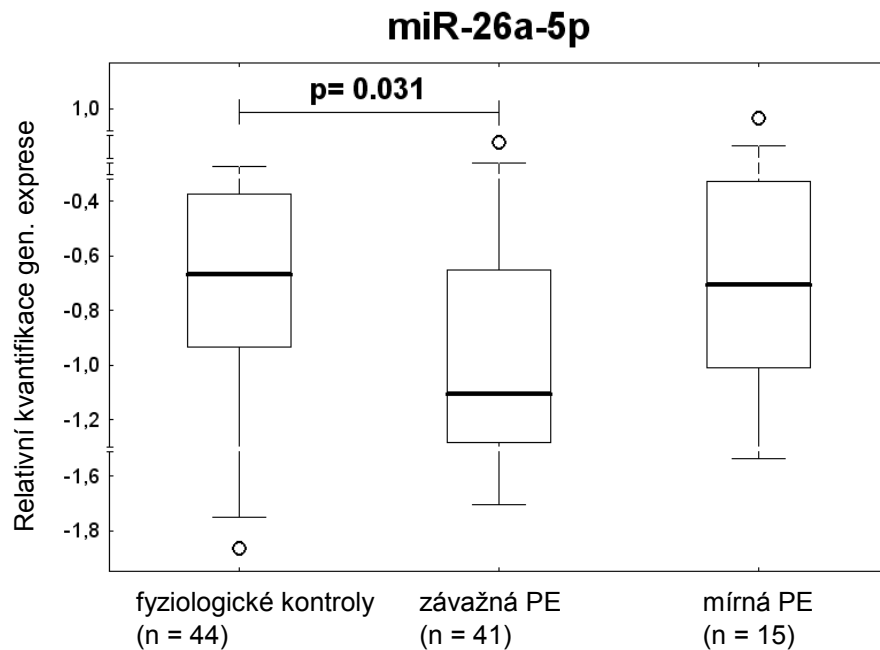
Graf č. 5: Genová exprese miR-574-3p u FG, závažné PE a mírné PE



Down-regulace miR-574-3p ( $p = 0,002$ ) v pupečnickové krvi pacientek se závažnou formou PE v porovnání s fyziologickými kontrolami je statisticky signifikantní i po aplikaci Bonferonniho korekce ( $p < 0,017$ ).

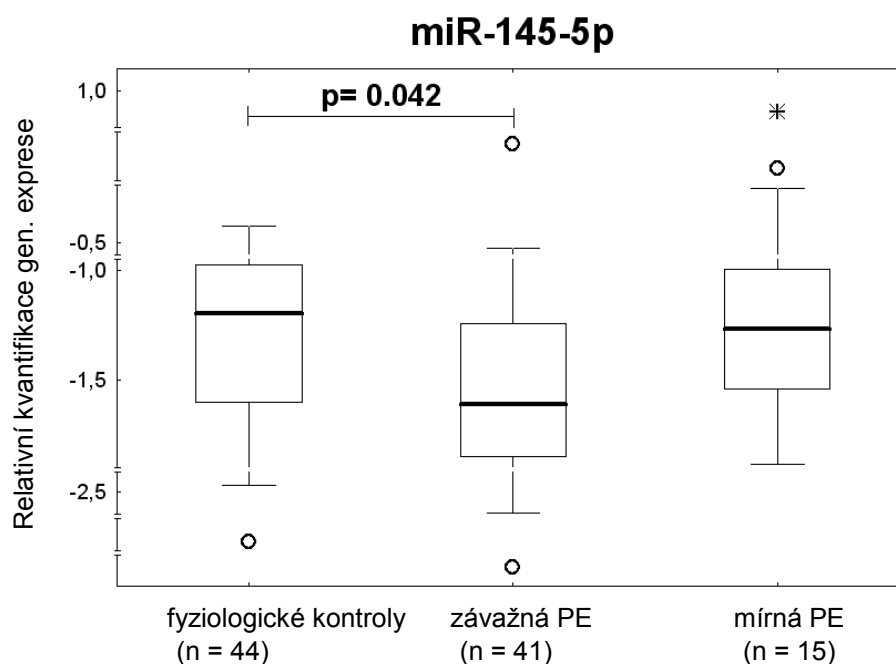
Navíc další čtyři miRNA ve skupině pacientek se závažnou PE vykazovaly trend k down-regulaci, konkrétně miR-26a-5p ( $p = 0,031$ ), miR-145-5p ( $p = 0,042$ ), miR-199a-5p ( $p = 0,048$ ), miR-221-3p ( $p = 0,028$ ).

Graf č. 6: Genová exprese miR-26a-5p u FG, závažné PE a mírné PE



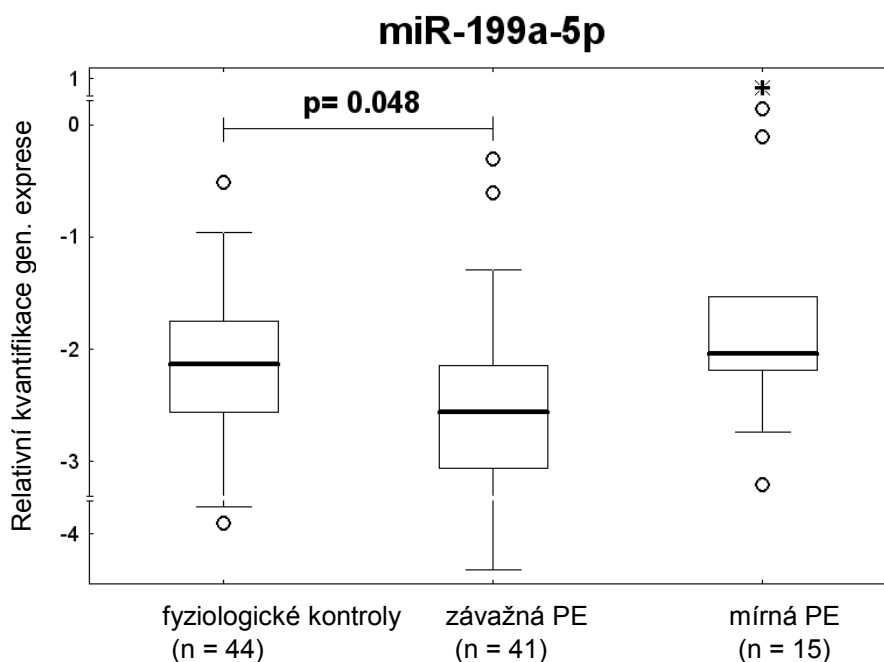
Down-regulace miR-26a-5p ( $p = 0,031$ ) v pupečnickové krvi pacientek se závažnou formou PE v porovnání s fyziologickými kontrolami dosáhla statistické signifikance pouze před aplikací Bonferonniho korekce ( $p < 0,017$ ).

Graf č. 7: Genová exprese miR-145-5p u FG, závažné PE a mírné PE



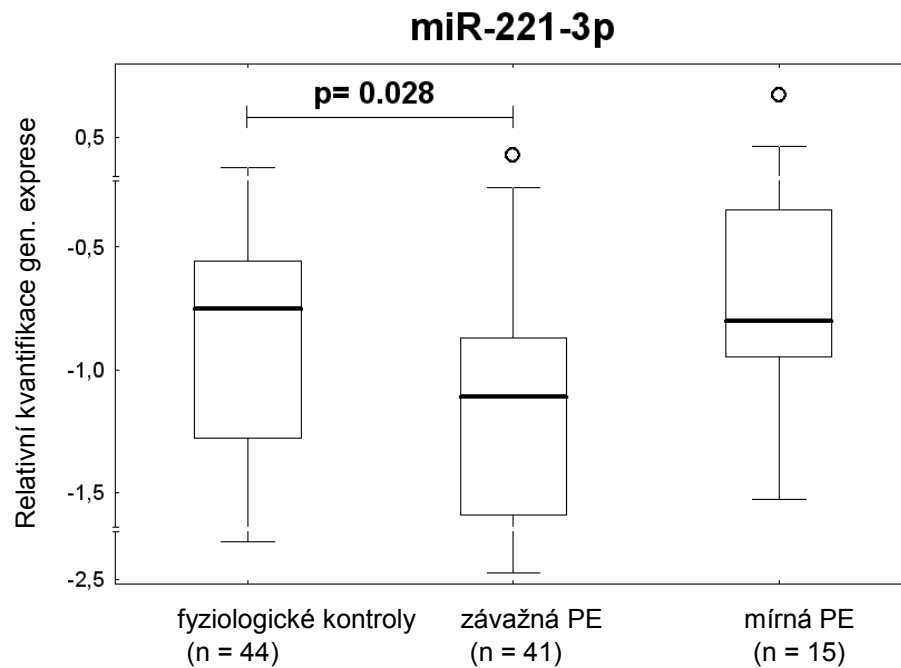
Down-regulace miR-145-5p ( $p = 0,042$ ) v pupečníkové krvi pacientek se závažnou formou PE v porovnání s fyziologickými kontrolami dosáhla statistické signifikance pouze před aplikací Bonferonniho korekce ( $p < 0,017$ ).

Graf č. 8: Genová exprese miR-199a-5p u FG, závažné PE a mírné PE



Down-regulace miR-199a-5p ( $p = 0,048$ ) v pupečníkové krvi pacientek se závažnou formou PE v porovnání s fyziologickými kontrolami dosáhla statistické signifikance pouze před aplikací Bonferonniho korekce ( $p < 0,017$ ).

Graf č. 9: Genová exprese miR-221-3p u FG, závažné PE a mírné PE

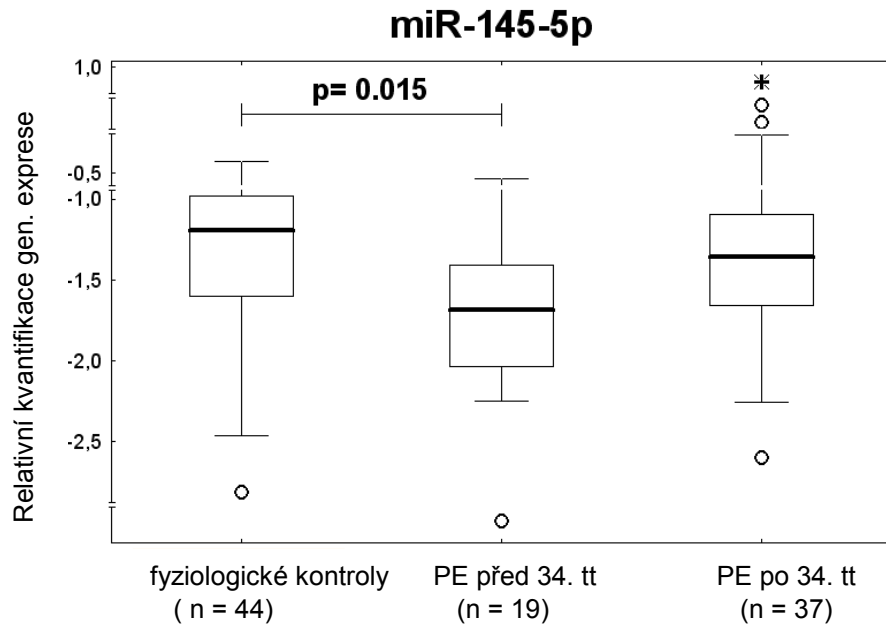


Down-regulace miR-221-3p ( $p = 0,028$ ) v pupečníkové krvi pacientek se závažnou formou PE v porovnání s fyziologickými kontrolami dosáhla statistické signifikance pouze před aplikací Bonferonniho korekce ( $p < 0,017$ ).

#### 7.2.4 Down-regulace miR-26a-5p, miR-145-5p a miR-574-3p u těhotenství s preeklamsií, která vyžadovala ukončení gravidity před 34. gestačním týdnem

Ve srovnání se skupinou fyziologických gravidit vykazovaly vzorky pupečníkové krve z těhotenství s preeklamsií, která bylo nutno ukončit před 34. týdnem gravidity, sníženou expresi se signifikantním rozdílem u miR-145-5p ( $p = 0,015$ ).

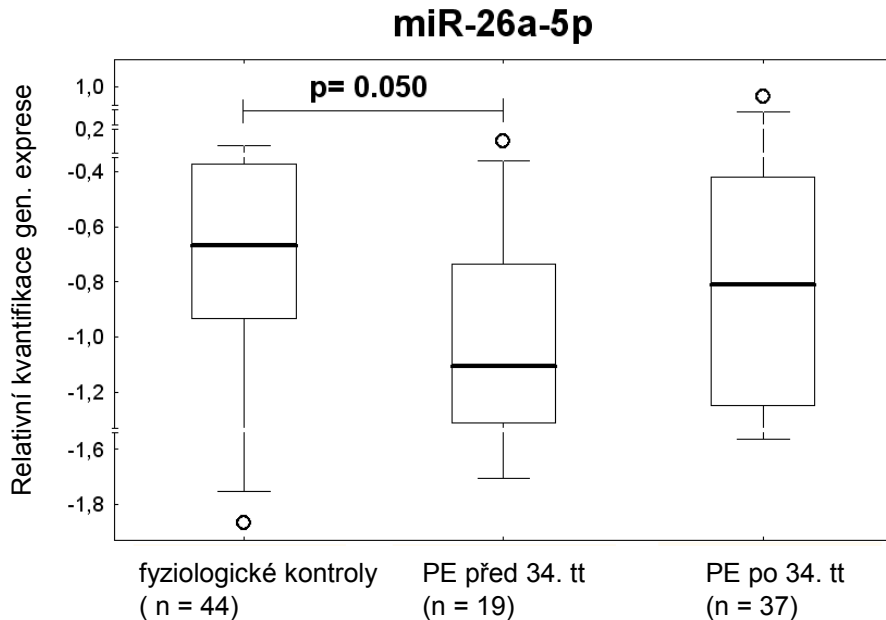
Graf č. 10: Genová exprese miR-145-5p u FG a PE ukončenou před/po 34. týdnů gravidity



Down-regulace miR-145-5p ( $p = 0,015$ ) v pupečníkové krvi pacientek s PE vyžadující ukončení gravidity před 34. týdnem v porovnání s fyziologickými kontrolami je statisticky signifikantní i po aplikaci Bonferonniho korekce ( $p < 0,017$ ).

Dále byl pozorován trend k down-regulaci u miR-26a-5p ( $p = 0,050$ ) a miR-574-3p ( $p = 0,022$ ) u preeklamptických těhotenství ukončených před 34. týdnem gestace.

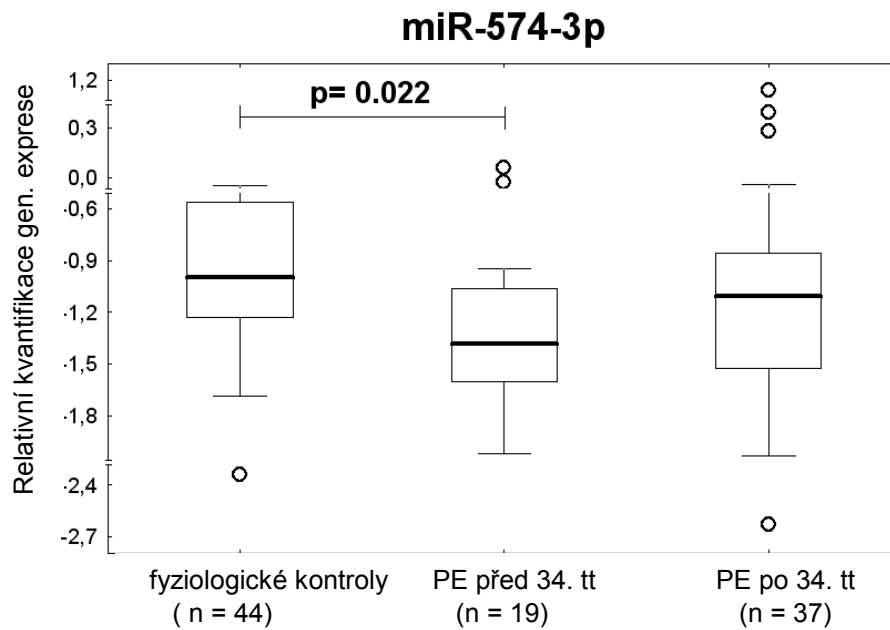
Graf č. 11: Genová exprese miR-26a-5p u FG a PE ukončenou před/po 34. týdnů gravidity



Down-regulace miR-26a-5p ( $p = 0,050$ ) v pupečníkové krvi pacientek s PE vyžadující ukončení gravidity před 34. týdnem v porovnání s fyziologickými kontrolami dosáhla statistické signifikance pouze před aplikací Bonferonniho korekce ( $p < 0,017$ ).



Graf č. 12: Genová exprese miR-574-3p u FG a PE ukončenou před/po 34. týdnu gravidity

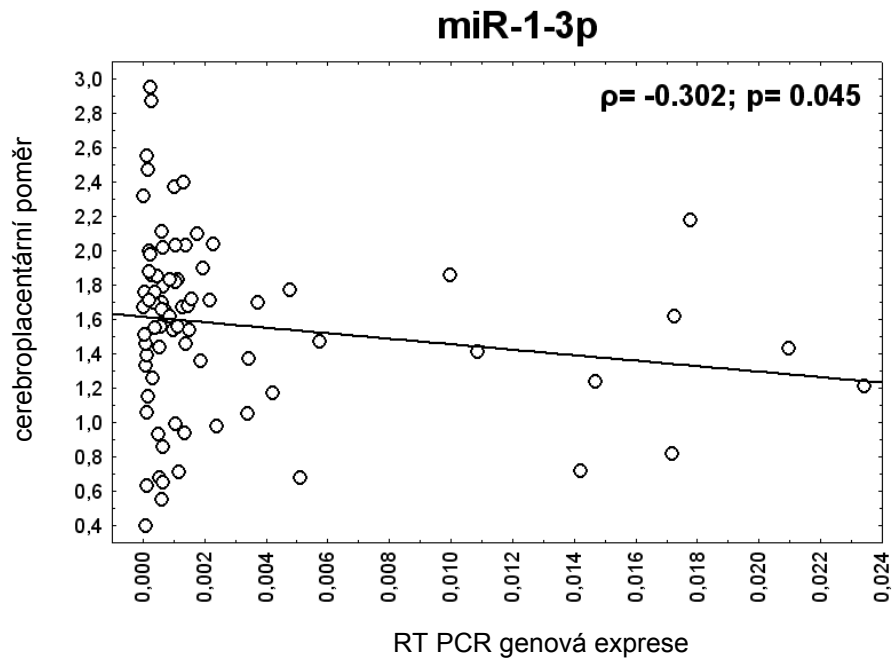


Down-regulace miR-574-3p ( $p = 0,022$ ) v pupečníkové krvi pacientek s PE vyžadující ukončení gravidity před 34. týdnem v porovnání s fyziologickými kontrolami dosáhla statistické signifikance pouze před aplikací Bonferonniho korekce ( $p < 0,017$ ).

### 7.2.5 Asociace mezi genovou expresí miR-1-3p a miR-133a-3p a závažnou formou preeklampsie s ohledem na parametry Dopplerovské ultrasonografie

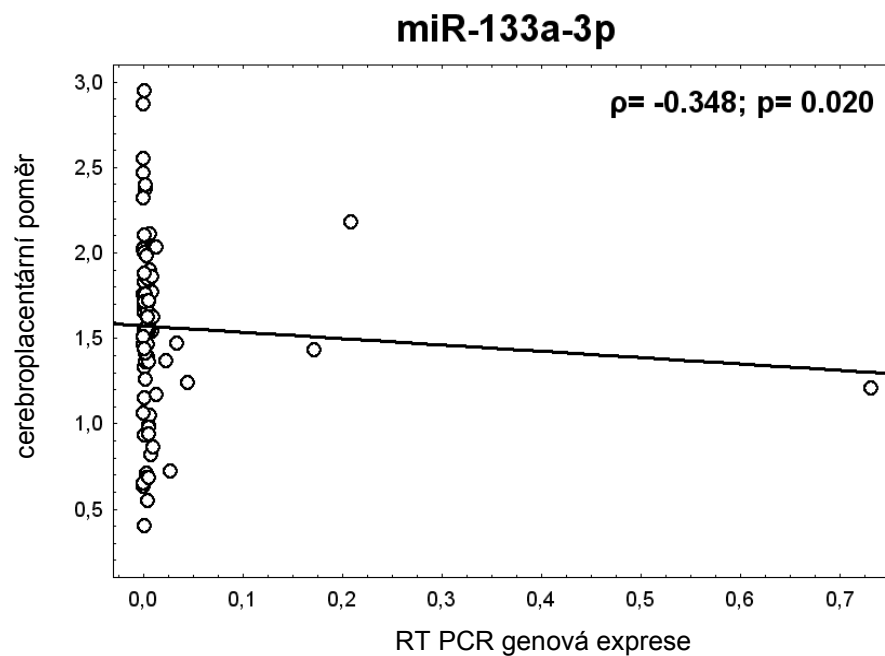
Byl vypořádán vliv cerebroplacentárního poměru na hladiny miR-1-3p ( $\rho = -0,302$ ,  $p = 0,045$ ) a miR-133a-3p ( $\rho = -0,348$ ,  $p = 0,020$ ) u preeklamptických těhotenství s/bez FGR v pupečníkové krvi, což znamená, že centralizace krevního oběhu plodu zvyšuje hladiny miR-1-3p a miR-133a-3p.

Graf č. 13: Asociace mezi genovou expresí miR-1-3p v pupečníkové krvi a cerebroplacentárním poměrem pacientek s PE s/bez FGR



Centralizace fetálního oběhu slabě negativně korelovala s genovou expresí miR-1-3p ( $\rho = -0,302$ ,  $p = 0,045$ ). Se snižujícími se hodnotami cerebroplacentárního poměru (pod 5. percentil) se zvyšovaly hladiny miR-1-3p v pupečníkové krvi pacientek s PE s/bez FGR.

Graf č. 14: Asociace mezi genovou expresí miR-133a-3p v pupečníkové krvi a cerebroplacentárním poměrem pacientek s PE s/bez FGR

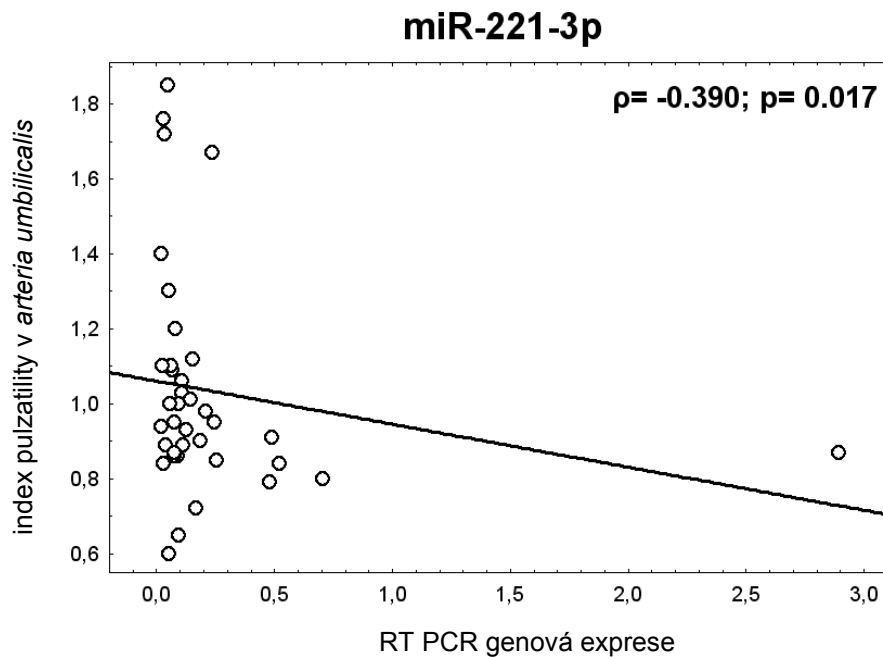


Centralizace fetálního oběhu slabě negativně korelovala s genovou expresí miR-133a-3p ( $\rho = -0,348$ ,  $p = 0,020$ ). Se snižujícími se hodnotami cerebroplacentárního poměru (patologické pod 5. percentilem) se zvyšovaly hladiny miR-133a-3p v pupečníkové krvi pacientek s PE s/bez FGR.

## 7.2.6 Asociace mezi genovou expresí miR-143-3p a miR-221-3p a závažností fetální růstové retardace s ohledem na parametry Dopplerovské ultrasonografie

Index pulzatility v *arteria umbilicalis* ukázal slabou negativní korelaci s genovou expresí miR-221-3p ( $\rho = -0,390$ ,  $p = 0,017$ ) v pupečníkové krvi žen s FGR.

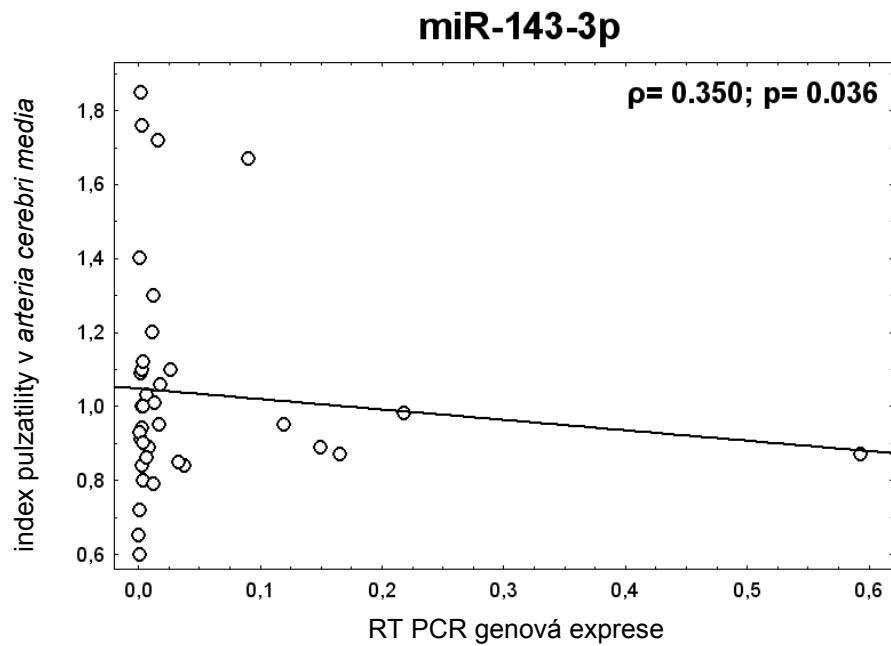
Graf č. 15: Asociace mezi genovou expresí miR-221-3p a indexem pulzatility v *arteria umbilicalis* u těhotných žen s FGR



Index pulzatility v *arteria umbilicalis* slabě negativně koreloval s genovou expresí miR-221-3p ( $\rho = -0,390$ ,  $p = 0,017$ ). Čím vyšší byly hodnoty indexu pulzatility v *a. umbilicalis* (patologické nad 95. percentilem) tím nižší byla exprese miR-221-3p v pupečníkové krvi pacientek s FGR.

Paralelně byla zjištěna i snížená genová exprese miR-143-3p ( $\rho = 0,350$ ,  $p = 0,036$ ) v pupečnickové krvi u těhotenství s FGR s abnormálními průtoky krve v *arteria cerebri media*.

Graf č. 16: Asociace mezi genovou expresí miR-143-3p a indexem pulzatility v *arteria cerebri media*



Index pulzatility v *arteria cerebri media* slabě pozitivně koreloval s genovou expresí miR-143-3p ( $\rho = 0,350$ ,  $p = 0,036$ ). Čím nižší byly hodnoty indexu pulzatility v *a. cerebri media* (patologické pod 5. percentilem), tím nižší byla i exprese miR-143-3p.

## 8. Diskuze

V diplomové práci jsem analyzovala expresní profil 28 kardiovaskulárních microRNA (miR-1-3p, miR-16-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p, miR-21-5p, miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-26a-5p, miR-29a-3p, miR-92a-3p, miR-100-5p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-126-3p, miR-130b-3p, miR-133a-3p, miR-143-3p, miR-145-5p, miR-146a-5p, miR-181-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-210-3p, miR-221-3p, miR-342-3p, miR-499a-5p, miR-574-3p) v pupečníkové krvi těhotných žen s fyziologickým průběhem gravidity (FG), s gestační hypertenzí (GH), s preeklampsií (PE) a s fetální růstovou retardací (FGR).

Analýza expresních profilů microRNA může být důležitým nástrojem pro diagnostiku a léčbu onemocnění. MicroRNA regulují genovou expresi na posttranskripční úrovni pomocí RNA interference. Navíc microRNA ovlivňují i transkripční faktory a mají vliv na kontrolu genové exprese. Pokud je komplementarita microRNA a cílové mRNA úplná, je mRNA naštěpena, pokud je komplementarita částečná může microRNA potlačit translaci cílové mRNA. Více microRNA může regulovat stejný gen. Mnoho genů je regulováno současně několika microRNA. MicroRNA regulace je velice komplexní děj a interpretace dat je tím pádem složitá (Vera *et al.* 2013).

Nejprve bylo nutné před provedením vlastních experimentů genové exprese miRNA v pupečníkové krvi vybrat stabilní endogenní kontroly pro normalizaci dat qPCR. Jako optimální kontroly pro qPCR normalizaci dat byly vybrány dvě malé nekódující RNA – RNU44 a RNU75.

Následovalo srovnání genové exprese kardiovaskulárních microRNA mezi skupinami pacientek s fyziologickým a abnormálním průběhem gravidity. Jednotlivé microRNA byly vybrány na základě předchozích studií a o nichž je známo, že hrají roli v patogenezi angiogeneze, zánětu cév, hypertenze, plicní hypertenze, dyslipidémie, insulinové rezistence a diabetu, aterosklerózy, ischemické choroby srdeční, infarktu myokardu a srdečního selhání.

Nebyly prokázány žádné signifikantní rozdíly v genové expresi vybraných microRNA mezi skupinou fyziologických gravidit a gravidit s preeklampsií a fetální růstovou retardací, bez ohledu na klinickou a další symptomatologii. V případě gestační hypertenze vykazovala trend k abnormální expresi pouze miR-195-5p, jejíž exprese byla ve vzorcích pupečnickové krve pacientek s GH snižena ve srovnání se skupinou fyziologických kontrol. V předchozí studii zkoumající expresní profil kardiovaskulárních microRNA v mateřské periferní krvi, byl rovněž pozorován trend k down-regulaci miR-195-5p u případů s gestační hypertenzí (Hromadníková *et al.* 2016, 2017). Tyto shodné výsledky naznačují, že miR-195-5p hraje roli v patogenezi gestační hypertenze a naznačují její potenciál pro neinvazivní monitoring rozvoje gestační hypertenze.

Hojná exprese miR-195 byla identifikována i v buňkách hladkého svalstva cév u potkaního modelu. Hladina exprese byla nižší v poškozených cévách ve srovnání s hladinou exprese v cévách neporaněných. MiR-195 může být potenciálním terapeutickým cílem, protože podávání miR-195 podstatně snížilo zánět a buněčnou proliferaci a inhibovalo tvorbu neointimy (Wang *et al.* 2012).

Dále byla studována souvislost mezi expresí microRNA v pupečnickové krvi a závažností onemocnění s ohledem na stupeň klinických příznaků, termín porodu (před/po 34. týdnu těhotenství) a parametry Dopplerovské ultrasonografie. Výsledky ukázaly, že tři microRNA, konkrétně miR-26a-5p, miR-145-5p a miR-574-3p, byly dysregulovány nebo vykazovaly trend k dysregulaci u těhotenství s projevem závažné preeklampsie, která vyžadovala ukončení gravidity před 34. týdnem těhotenství. V porovnání s předchozími studii, která byla zaměřena na sledování expresního profilu kardiovaskulárních microRNA v placentární tkáni se výsledky shodují u dvou ze třech dysregulovaných microRNA. V placentární tkáni pacientek s preeklampsií, jejichž těhotenství bylo ukončeno před 34. týdnem těhotenství, byly rovněž downregulovány miR-26a-5p, miR-103a-3p a miR-145-5p (Hromadníková *et al.* 2015). Tyto výsledky naznačují, že minimálně dvě microRNA (miR-26a-5p a miR-145-5p), se podílejí na patogenezi primární placentární dysfunkce doprovázené následnou maladaptací mateřského kardiovaskulárního systému, což vede k manifestaci časně preeklampsie se závažnými klinickými příznaky (Hromadníková *et al.* 2017). Takový stav vyžaduje okamžité ukončení těhotenství císařským řezem, aby se předešlo potenciálně

závažným maternálním a perinatálním následkům. Zhoršení kardiovaskulárních funkcí matky, které jsou spojené s primární placentární dysfunkcí se v periferní krvi matky projevuje down-regulací několika klíčových microRNA (miR-17-5p, miR-100-5p, miR-103a-3p, miR-125b-5p, miR-146a-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-221-3p, and miR-574-3p), které hrají roli ve výskytu a rozvoji některých kardiovaskulárních onemocnění (Hromadníková *et al.* 2016).

MiR-26a/b byla downregulována u *in vitro* (kardiomyocyty) i *in vivo* potkaního modelu (s konstrikcí abdominální aorty). MiR-26 reguluje patologické strukturální změny srdce u potkanů, což by mohlo souviset s ovlivněním signální dráhy GSK3 $\beta$  (glykogen synthase kinase-3  $\beta$ ). MiR-26 má tedy potenciál pro diagnózu a léčbu srdeční hypertrofie. Nadměrná exprese miR-26a tlumí expresi GSK3 $\beta$  a inhibuje hypertrofii myokardu (Zhang *et al.* 2013).

MiR-145 reguluje proliferaci a diferenciaci buněk hladkého svalstva cév, kde je hojně exprimována, v cévních stěnách je nejhojnější microRNA (Cordes *et al.* 2009, Cheng *et al.* 2009). Exprese klastru miR-143/145 je snížena v aortě při stavu akutního i chronického stresu (konstrikce aorty, aneurysma aorty) (Elia *et al.* 2009). Naopak up-regulace miR-145 byla pozorována u buněk plicní tepny a plicní tkáně pacientů s plicní arteriální hypertenzí (Caruso *et al.* 2012).

MiR-574 je up-regulována v tkáni srdce po infarktu ve srovnání se zdravou srdeční tkání (Boštjančič *et al.* 2012). Výsledky naší studie jsou v rozporu, ukazují opačný výsledek a to down-regulaci miR-574-3p u vzorků pupečnickové krve pacientek s těhotenskými komplikacemi.

Navíc další tři microRNA – miR-195-5p, miR-199a-5p a miR-221-3p, vykazovaly odlišné exprese ve vzorcích pupečnickové krve matek s projevem závažné preeklampsie bez ohledu na gestační stáří. Přestože tyto microRNA nebyly dysregulované v placentární tkáni pacientek s projevem závažné PE (Hromadníková *et al.* 2015), v periferní krvi matek s preeklampsií, jejichž těhotenství bylo ukončeno před 34. týdnem, byla nalezena rovněž down-regulace nebo trend k down-regulaci miR-195-5p, miR-199a-5p a miR-221-3p (Hromadníková *et al.* 2016). Tyto výsledky naznačují možný diagnostický potenciál miR-195-5p, miR-199a-5p a miR-221-3p, které by mohly

příspět k časné diagnóze závažné formy preeklampsie, jež vyžaduje okamžité ukončení těhotenství (Hromadníková *et al.* 2017).

MiR-199a hraje roli v udržování velikosti kardiomyocytů (Song *et al.* 2010) a v regulaci drah spouštěných hypoxií. MiR-199a je akutně down-regulována při poklesu kyslíku, což způsobuje rapidní nárůst HIF1 $\alpha$  (Rane *et al.* 2009).

MiR-221 vykazuje protektivní účinky při poškození buněk hypoxií a následnou reoxygenací a mohla by tedy být novým terapeutickým cílem pro léčbu srdečního ischemicko-reperfuzního poškození (Chen *et al.* 2016).

V případě vzorků pupečníkové krve těhotných žen s preeklampsií, kde bylo těhotenství ukončeno až po 34. týdnu, nebyla nalezena dysregulace žádné kardiovaskulární microRNA. Pouze jediná microRNA, miR-92a-3p, vykazovala vyšší genovou expresi v pupečníkové krvi mezi kontrolní skupinou a skupinou s mírnou formou preeklampsie. Uměle vyvolaná nadměrná exprese miR-92a v buňkách endotelu blokovala angiogenezi *in vitro* i *in vivo*. U myšího modelu s ischemií končetin a infarktem myokardu vedla inhibice miR-92a ke zlepšení růstu cév a uzdravení poškozené tkáně (Bonauer *et al.* 2009). Dysregulace miR-92-3p v pupečníkové krvi nezpůsobuje samotný patologický proces, ale může být výsledkem dlouhodobého kompenzačního mechanismu (Hromadníková *et al.* 2017). Tyto výsledky podporují Thilaganathanovu hypotézu, že pozdější nástup preeklampsie je spíše spojen se získanou dysfunkcí placenty (sekundární placentární insuficience), jakožto důsledek toho, že kardiovaskulární systém matky není schopen zvládnout nadměrné hemodynamické a metabolické požadavky pokročilého těhotenství (Thilaganathan 2017).

Ve vzorcích periferní krve pacientek s mírnou formou preeklampsie studovaných v předchozí studii byla prokázána nižší exprese dvou jiných microRNA, miR-100-5p a miR-125b-5p (Hromadníková *et al.* 2016).

V placentární tkáni se sekundární placentární dysfunkce projevuje dysregulací jiných microRNA (miR-1-3p a miR-499a-5p), vyšší exprese těchto microRNA byla detekována v placentární tkáni pacientek s preeklampsií, kde těhotenství bylo ukončeno až po 34. týdnu (Hromadníková *et al.* 2015). Ani dysregulace miR-92a-3p



v pupečnickové krvi matek s mírnou formou preeklampsie, ani dysregulace miR-1-3p v placentární tkáni matek s preeklampií po 34. týdnu zjevně nezapříčiňuje samotný patologický proces, ale je nejspíš důsledkem dlouhodobých kompenzačních mechanismů. Dysregulace miR-499a-5p se začíná objevovat v placentární tkáni již během prvních klinických příznaků gestační hypertenze, preeklampsie i fetální růstové retardace. Čím delší je doba trvání klinických obtíží, tím větší je up-regulace miR-499a-5p. Vyšší exprese miR-499a-5p je zřejmě výsledkem rozvoje kompenzačního mechanismu, pokud onemocnění přetrvává delší dobu (Hromadníková *et al.* 2016, 2017).

Přestože se hladiny genové exprese miR-1-3p a miR-133a-3p nelišily mezi kontrolní skupinou a skupinou těhotenství s preeklampií, nejvyšší hladiny těchto microRNA vykazovaly vzorky pupečnickové krve pacientek s abnormálním cerebroplacentárním poměrem. Centralizace fetálního oběhu se tedy zřejmě projevuje vyššími hladinami miR-1-3p a miR-133a-3p v pupečnickové krvi. Obdobně těhotenství s klinickými příznaky preeklampsie po 34. týdnu a těhotenství s intrauterinní růstovou restrikcí s abnormálními průtoky v *arteria umbilicalis* vykazovala signifikantně zvýšenou expresi miR-1-3p v placentární tkáni (Hromadníková *et al.* 2015). V periferní krvi matek se up-regulace těchto microRNA neobjevila, což je neumožňuje využít jako potenciální neinvazivní biomarkery v diagnostice PE a FGR (Hromadníková *et al.* 2016). Nicméně v séru pacientek se syndromem HELLP, což je stav závažné preeklampsie s dalšími komplikacemi, byla prokázána zvýšená hladina miR-133a (Stubert *et al.* 2013). MiR-1 byla up-regulovaná v srdeční tkáni pacientů, kteří prodělali srdeční selhání ve srovnání se zdravými kontrolami (Lai *et al.* 2015). Up-regulace miR-1 u experimentálního myšího modelu navíc přispívá k arytmií (Su *et al.* 2017).

V případě těhotenství s fetální růstovou retardací ukončených až po 34. týdnu nebyly nalezeny žádné statisticky významné změny v hladinách exprese microRNA ve srovnání s kontrolní skupinou. Stejně výsledky přinesla i studie exprese microRNA v placentární tkáni, jedinou výjimkou byla miR-499a-5p, která byla up-regulovaná v placentární tkáni pacientek s intrauterinní růstovou restrikcí (Hromadníková *et al.* 2015). Protože pozdní forma FGR je následkem sekundární placentární nedostatečnosti způsobené nejspíše dysfunkcí maternálního kardiovaskulárního systému, projevuje se tento fakt i v expresi kardiovaskulárních microRNA v periferní

krvi matek. MiR-100-5p a miR-199a-5p vykazovaly sníženou expresi u těhotenství s intrauterinní růstovou restrikcí ukončených po 34. týdnu a další microRNA vykazovaly trend k down-regulaci – miR-17-5p, miR-125b-5p, miR-146a-5p, miR-221-3p a miR-574-3p (Hromadníková *et al* 2016).

S ohledem na parametry Dopplerovské ultrasonografie, které odrážejí závažnost preeklampsie a fetální růstové retardace, lze pozorovat jistou korelaci s expresí microRNA v pupečnickové krvi. Slabá negativní korelace byla nalezena mezi rychlostí průtoku krve v *arteria umbilicalis* a genovou expresí miR-221-3p u pacientek s FGR. Těhotenství s FGR s abnormálními průtoky v *arteria umbilicalis* (PI nad 95. percentil) vykazovala nižší hladiny exprese miR-221-3p v pupečnickové krvi. Stejně tak i v placentární tkáni a periferní krvi matek u těhotenství s intrauterinní růstovou restrikcí byla miR-221-3p downregulována (Hromadníková *et al.* 2015, 2016). MiR-221-3p tedy hraje roli v patogenezi FGR a mohla by po dalším prozkoumání sloužit jako potenciální neinvazivní biomarker pro diagnostiku FGR. Snížené hladiny cirkulující miR-221 jsou také spojovány s gestační obezitou (Carreras-Badosa *et al.* 2015). Dále miR-221 nepřímo ovlivňuje expresi endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS) v buňkách během angiogeneze (Suaréz *et al.* 2007). Syntáza oxidu dusnatého je exprimována v placentárním syncytiotrofoblastu a fetoplacentárním a pupečnickovém vaskulárním endotelu, kde bazální produkce oxidu dusnatého (NO) přispívá k nízké fetoplacentární vaskulární rezistenci. Aktivita syntázy oxidu dusnatého klesá ke konci těhotenství a exogenní oxid dusnatý relaxuje myometrium (Sladek *et al.* 1997). Zdá se, že preeklampsie a fetální růstová retardace intenzifikují downregulaci miR-221, obecně s cílem zvýšit produkci oxidu dusnatého, k udržení nebo zpětnému navození dilatace.

Na druhou stranu byla pozorována slabá pozitivní korelace mezi průtoky krve v *arteria cerebri media* a genovou expresí miR-143-3p v pupečnickové krvi u těhotenství s fetální růstovou retardací. Těhotenství s FGR, která měla hodnoty průtoku krve pod 5. percentilem, zároveň vykazovala sníženou expresi miR-143-3p v pupečnickové krvi (Hromadníková *et al.* 2017). Podobné výsledky byly nalezeny i v placentární tkáni, kde downregulace miR-143-3p byla asociována s časnou formou intrauterinní růstové restrikce, která vyžadovala ukončení těhotenství před 34. týdnem (Hromadníková *et al.* 2015). Nicméně v periferní krvi matek nebyla nalezena odlišná exprese miR-143-3p

mezi patologickými a kontrolními graviditami, tudíž ani tato microRNA nemůže být použita jako neinvazivní biomarker pro predikci a diagnostiku FGR (Hromadníková *et al.* 2016). Ačkoliv knock-out genu kódujícího miR-143 zabránil rozvoji plicní arteriální hypertenze u experimentálního myšího modelu, deficiencie miR-143 má tedy jistou protektivní funkci v případě pulmonární arteriální hypertenze (Deng *et al.* 2015).

## 9. Závěr

Ve své diplomové práci jsem analyzovala expresní profil 28 kardiovaskulárních microRNA v pupečnickové krvi těhotných žen s fyziologickým průběhem gravidity, s diagnózou gestační hypertenze, preeklampsie a fetální růstové retardace, pomocí kvantitativní PCR v reálném čase. Expresní profily jednotlivých skupin byly dále porovnány mezi sebou s ohledem na další klinické parametry.

U těhotenství s gestační hypertenzí byl nalezen trend k down-regulaci miR-195-5p ve srovnání s kontrolami. U těhotenství s projevy mírné preeklampsie se objevil trend k up-regulaci miR-92a-3p. Oproti tomu u těhotenství s projevy závažné preeklampsie bylo down-regulováno, nebo byl pozorován trend k down-regulaci hned u několika microRNA – miR-26a-5p, miR-145-5p, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-221-3p a miR-574-3p. U těhotenství s preeklampsií ukončených před 34. týdnem byla nalezena down-regulace nebo byl pozorován trend k down-regulaci miR-26a-5p, miR-145-5p a miR-574-3p. Dále byla pozorována asociace mezi hladinami miR-1-3p a miR-133a-3p v pupečnickové krvi a závažností preeklampsie a asociace mezi expresí miR-143-3p a miR-221 a závažností fetální růstové retardace s ohledem na parametry Dopplerovské ultrasonografie.

Epigenetické změny v pupečnickové krvi způsobené těhotenskými komplikacemi, které jsou výsledkem primární či sekundární placentární insuficience, mohou přispívat k výskytu kardiovaskulárních onemocnění u dětí narozených z těchto těhotenství. Nicméně kardiovaskulární onemocnění jsou multifaktoriálně podmíněná, velkou roli tedy hrají i environmentální faktory. Je potřeba další výzkum, který by se zabýval genovou expresí microRNA v periferní krvi dětí po narození, případně otázkou, zda jsou epigenetické změny způsobené těhotenstvím přenášeny skrze více generací.

### Seznam literatury:

ACOG Committee on Obstetric Practice. 2002. ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics* 77:67–75.

ACOG Committee on Obstetric Practice. 2013. ACOG Practice bulletin no. 134: fetal growth restriction. *Obstetrics and Gynecology* 121:1122–1133.

Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9:277–279.

Ambros V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350–5.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363–366.

Bhayani MK, Calin GA, Lai SY. 2012. Functional relevance of miRNA sequences in human disease. *Mutation Research* 731:14–9.

Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. 2009. MicroRNA-92a Controls Angiogenesis and Functional Recovery of Ischemic Tissues in Mice. *Science* 324:1707–1710.

Bonferroni CE. 1936. *Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità*, Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural and Molecular Biology* 13:1097–1101.

Boštjančič E, Zidar N, Glavač D. 2012. MicroRNAs and cardiac sarcoplasmic reticulum calcium ATPase-2 in human myocardial infarction: expression and bioinformatic analysis. *BMC Genomics* 13:552.

Brosens I, Pijnenborg R, Vercruyse L, Romero R. 2011. The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 204:193–201.

Canfrán-Duque A, Rotllan N, Zhang X, Fernández-Fuertes M, Ramírez-Hidalgo C, Araldi E, Daimiel L, Busto R, Fernández-Hernando C, Suárez Y. 2017. Macrophage deficiency of miR-21 promotes apoptosis, plaque necrosis, and vascular inflammation during atherogenesis. *EMBO Molecular Medicine*

Carreras-Badosa G, Bonmatí A, Ortega FJ, Mercader JM, Guindo-Martínez M, Torrents D, Prats-Puig A, Martínez-Calcerrada JM, Platero-Gutierrez E, De Zegher F, Ibáñez L, Fernández-Real JM, López-Bermejo A, Bassols J. 2015. Altered circulating miRNA

expression profile in pregestational and gestational obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100:E1446–E1456.

Carthew RW, Sontheimer EJ. 2009. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642–655.

Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee T-H, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D. 2009. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 460:705–710.

D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M, Micheli B, Biglioli P, Achilli F, Martelli F, Maggiolini S, Marenzi G, Pompilio G, Capogrossi MC. 2010. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *European Heart Journal* 31:2765–2773.

Davis EF, Lazdam M, Lewandowski AJ, Worton SA, Kelly B, Kenworthy Y, Adwani S, Wilkinson AR, McCormick K, Sargent I, Redman C, Leeson P. 2012. Cardiovascular risk factors in children and young adults born to preeclamptic pregnancies: A systematic review. *Pediatrics* 129:e1552–e1561.

Deng L, Blanco FJ, Stevens H, Lu R, Caudrillier A, McBride M, McClure JD, Grant J, Thomas M, Frid M, Stenmark K, White K, Seto AG, Morrell NW, Bradshaw AC, MacLean MR, Baker AH. 2015. MicroRNA-143 Activation Regulates Smooth Muscle and Endothelial Cell Crosstalk in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation Research* 117:870–883.

Deng X, Liu Y, Luo M, Wu J, Ma R, Wan Q, Wu J. 2017. Circulating miRNA-24 and its target YKL-40 as potential biomarkers in patients with coronary heart disease and type 2 diabetes mellitus. *Oncotarget*:1.

Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432:231–235.

Dickinson BA, Semus HM, Montgomery RL, Stack C, Latimer PA, Lewton SM, Lynch JM, Hullinger TG, Seto AG, Van Rooij E. 2013. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *European Journal of Heart Failure* 15:650–659.

Doebele C, Bonauer A, Fischer A, Scholz A, Reiss Y, Urbich C, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. 2010. Members of the microRNA-17-92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells. *Blood* 115:4944–4950.

Duley L. 1992. Maternal mortality associated with hypertensive disorders of pregnancy in Africa, Asia, Latin America and the Caribbean. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 99:547–553.

Duley L. 2009. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Seminars in Perinatology* 33:130–137.

Elia L, Quintavalle M, Zhang J, Contu R, Cossu L, Latronico MVG, Peterson KL, Indolfi C, Catalucci D, Chen J, Courtneidge SA, Condorelli G. 2009. The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death Differ* 16:1590–1598.

Endo K, Naito Y, Ji X, Nakanishi M, Noguchi T, Goto Y, Nonogi H, Ma X, Weng H, Hirokawa G, Asada T, Kakinoki S, Yamaoka T, Fukushima Y, Iwai N. 2013. MicroRNA 210 as a Biomarker for Congestive Heart Failure. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 48:48–54.

Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. 2010. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circulation Research* 107:677–684.

Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DYR, Srivastava D. 2008. miR-126 Regulates Angiogenic Signaling and Vascular Integrity. *Developmental Cell* 15:272–284.

Fisher SJ. 2015. Why is placentation abnormal in preeclampsia? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 213:S115–S122.

Fu X, Dong B, Tian Y, Lefebvre P, Meng Z, Wang X, Pattou F, Han W, Wang X, Lou F, Jove R, Staels B, Moore DD, Huang W. 2015. MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. *Journal of Clinical Investigation* 125:2497–2509.

Gregory RI, Yan K, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhattar R. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432:235–240.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research* 34:D140–D144.

Grundmann S, Hans FP, Kinniry S, Heinke J, Helbing T, Bluhm F, Sluijter JPG, Hoefler I, Pasterkamp G, Bode C, Moser M. 2011. MicroRNA-100 regulates neovascularization by suppression of mammalian target of rapamycin in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Circulation* 123:999–1009.

Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. 2008. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proceedings of the National Academy of the Sciences* 105:1516–1521.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. 1991. Detection of Specific Polymerase Chain-Reaction Product By Utilizing the 5'→3' Exonuclease Activity of

Thermus-Aquaticus Dna-Polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 88:7276–7280.

Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, Krofta L. 2015. Cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs are dysregulated in placental tissues affected with gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction. PLoS One 10:1–27.

Hromadnikova I, Kotlabova K, Hympanova L, Krofta L. 2016. Gestational hypertension, preeclampsia and intrauterine growth restriction induce dysregulation of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNAs in maternal whole peripheral blood. Thrombosis Research 137:126–140

Hromadnikova I, Kotlabova K, Ivankova K, Vedmetskaya Y, Krofta L. 2017. Profiling of cardiovascular and cerebrovascular disease associated microRNA expression in umbilical cord blood in gestational hypertension, preeclampsia and fetal growth restriction. International Journal of Cardiology *in press*

Hu J, Ni S, Cao Y, Zhang T, Wu T, Yin X, Lang Y, Lu H. 2016. The Angiogenic Effect of microRNA-21 Targeting TIMP3 through the Regulation of MMP2 and MMP9. PLoS One 11: e0149537.

Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, Fasanaro P, Sun N, Wang X, Martelli F, Robbins RC, Wu JC. 2010. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. Circulation 122:S124-131.

Huang S, Zou X, Zhu J-N, Fu Y-H, Lin Q-X, Liang Y-Y, Deng C-Y, Kuang S-J, Zhang M-Z, Liao Y-L, Zheng X-L, Yu X-Y, Shan Z-X. 2015. Attenuation of microRNA-16 derepresses the cyclins D1, D2 and E1 to provoke cardiomyocyte hypertrophy. Journal of Cellular and Molecular Medicine 19:608–619.

Hulsmans M, Sinnaeve P, Van Der Schueren B, Mathieu C, Janssens S, Holvoet P. 2012. Decreased miR-181a expression in monocytes of obese patients is associated with the occurrence of metabolic syndrome and coronary artery disease. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 97: E1213–E1218.

Hwang HW, Mendell J. 2006. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. British Journal of Cancer 94:776–780.

Chen A, Li G, Chen L, Guo J, Liu Y. 2015. Downregulation of microRNA-100 protects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 8:5491–5496.

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. Nucleic Acids Research 33.



- Chen Q, Zhou Y, Richards AM, Wang P. 2016. Up-regulation of miRNA-221 inhibits hypoxia/reoxygenation-induced autophagy through the DDIT4/mTORC1 and Tp53inp1/p62 pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 474:168–174.
- Chen S, Puthanveetil P, Feng B, Matkovich SJ, Dorn GW, Chakrabarti S. 2014. Cardiac miR-133a overexpression prevents early cardiac fibrosis in diabetes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 18:415–421.
- Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436:740–744
- Cheng HS, Sivachandran N, Lau A, Boudreau E, Zhao JL, Baltimore D, Delgado-Olguin P, Cybulsky MI, Fish JE. 2013. MicroRNA-146 represses endothelial activation by inhibiting pro-inflammatory pathways. *EMBO Molecular Medicine* 5:949–966
- Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA, Huo Y, Delphin ES, Zhang C. 2009. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circulation Research* 105:158–166.
- Ikeda S, He A, Kong SW, Lu J, Bejar R, Bodyak N, Lee K-H, Ma Q, Kang PM, Golub TR, Pu WT. 2009. MicroRNA-1 Negatively Regulates Expression of the Hypertrophy-Associated Calmodulin and Mef2a Genes. *Molecular and Cellular Biology* 29:2193–2204.
- Kaneko M, Satomi T, Fujiwara S, Uchiyama H, Kusumoto K, Nishimoto T. 2016. AT1 receptor blocker azilsartan medoxomil normalizes plasma miR-146a and miR-342-3p in a murine heart failure model. *Biomarkers* 22:1–8.
- Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T, Yokoi T. 2011. PPAR $\alpha$  is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver. *Pharmaceutical Research* 28:2467–2476.
- Kim VN, Nam JW. 2006. Genomics of microRNA. *Trends in Genetics* 22:165–173.
- Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, Dong Q, Pang Z, Guan Q, Gao L, Zhao J, Zhao L. 2011. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. *Acta Diabetologica* 48:61–69.
- Kruskal WH, Wallis WA. 1952. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association* 47:583–621.
- Kuosmanen SM, Hartikainen J, Hippeläinen M, Kokki H, Levonen AL, Tavi P. 2015. MicroRNA profiling of pericardial fluid samples from patients with heart failure. *PLoS One* 10:e0119646.

- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. 2001. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* 294:853–858.
- Lai KB, Sanderson JE, Izzat MB, Yu CM. 2015. Micro-RNA and mRNA myocardial tissue expression in biopsy specimen from patients with heart failure. *International Journal of Cardiology* 199:79–83.
- Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:858–862.
- Lee RC, Ambros V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:862–864.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, Arasu P, Ruvkun G, Staden R, Halloran N, Green P, Thierry-Mieg J, Qui L, Dear S, Coulson A, Craxton M, Durbin R, Berks M, Metzstein M, Hawkins T, Ainscough R, Waterston R. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–54.
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415–419.
- Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. 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 SH, Kim VN. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 23:4051–4060.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120:15–20.
- Li S, Fan Q, He S, Tang T, Liao Y, Xie J. 2015. MicroRNA-21 negatively regulates treg cells through a TGF- $\beta$ 1/smad-independent pathway in patients with coronary heart disease. *Cellular Physiology and Biochemistry* 37:866–878.
- Liang X, Xu Z, Yuan M, Zhang Y, Zhao B, Wang J, Zhang A, Li G. 2016. MicroRNA-16 suppresses the activation of inflammatory macrophages in atherosclerosis by targeting PDCD4. *International Journal of Molecular Medicine* 37:967–975.
- Libby G, Murphy DJ, McEwan NF, Greene SA, Forsyth JS, Chien PW, Morris AD. 2007. Pre-eclampsia and the later development of type 2 diabetes in mothers and their children: An intergenerational study from the Walker cohort. *Diabetologia* 50:523–530.
- Lin Y, Sibanda VL, Zhang H-M, Hu H, Liu H, Guo A-Y. 2015. MiRNA and TF co-regulatory network analysis for the pathology and recurrence of myocardial infarction. *Scientific Reports* 5:9653.

- Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2008. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes and Development* 22:3242–3254.
- Liu X, Cheng Y, Yang J, Xu L, Zhang C. 2012. Cell-specific effects of miR-221/222 in vessels: Molecular mechanism and therapeutic application. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 52:245–255.
- Luo Z, Feng X, Wang H, Xu W, Zhao Y, Ma W, Jiang S, Liu D, Huang J, Songyang Z. 2015. Mir-23a induces telomere dysfunction and cellular senescence by inhibiting TRF2 expression. *Aging Cell* 14:391–399.
- Mann HB, Whitney DR. 1947. On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Annals of Mathematical Statistics*. 18:50–60.
- Männistö T, Mendola P, Vääräsmäki M, Järvelin M-R, Hartikainen A-L, Pouta A, Suvanto E. 2013. Elevated blood pressure in pregnancy and subsequent chronic disease risk. *Epidemiology and Prevention* 127:681–90.
- Mao J, Lv Z, Zhuang Y. 2014. MicroRNA-23a is involved in tumor necrosis factor- $\alpha$  induced apoptosis in mesenchymal stem cells and myocardial infarction. *Experimental and Molecular Pathology* 97:23–30.
- Mogilyansky E, Rigoutsos I. 2013. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death and Differentiation* 20:1603–1614.
- National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. 2000. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 183:1–22.
- Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. 2008. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. *Molecular Cell* 30:460–471.
- Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408:86–89.
- Pennington KA, Schlitt JM, Jackson DL, Schulz LC, Schust DJ. 2012. Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Disease Models and Mechanisms* 5:9–18.
- Poliseno L, Tuccoli A, Mariani L, Evangelista M, Citti L, Woods K, Mercatanti A, Hammond S, Rainaldi G. 2006. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108:3068–3071.

- Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, Simpson E, Nam Y-J, Matkovich SJ, Dorn II GW, Van Rooij E, Olson EN. 2011. The miR-15 Family Regulates Post-natal Mitotic Arrest of Cardiomyocytes. *Circulation Research* 109:670–679.
- Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, Klopp N, Illig T, Kähönen M, Karhunen PJ, Laaksonen R, Lehtimäki T. 2011. MiR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* 219:211–217.
- Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Abdellatif M. 2009. Downregulation of MiR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circulation Research* 104:879–886.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403:901–906.
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. 2004. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Research* 14:1902–1910.
- Roncarati R, Chiara Y, Anselmi V, Losi MA, Papa L, Cavarretta E, Da P, Martins C, Contaldi C, Jotti GS, Franzone A, Galastri L, Latronico MVG, Imbriaco M, Esposito G, De Windt L, Betocchi S, Condorelli G. 2014. Circulating miR-29a, Among Other Up-Regulated MicroRNAs, Is the Only Biomarker for Both Hypertrophy and Fibrosis in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 63:920–927.
- Saito K, Kondo E, Matsushita M. 2011. MicroRNA 130 family regulates the hypoxia response signal through the P-body protein DDX6. *Nucleic Acids Research* 39:6086–6099.
- Satoh M, Nasu T, Takahashi Y, Osaki T, Hitomi S, Morino Y, Nakamura M. 2017. Expression of miR-23a induces telomere shortening and is associated with poor clinical outcomes in patients with coronary artery disease. *Clinical Science*
- Shapiro SS, Wilk MB. 1965. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* 52:591–611.
- Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, Chen C. 2008. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods* 44:31–38.
- Sibai BM. 2003. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology* 102:181–192.
- Sibai BM, Ramadan MK, Usta I, Salama M, Mercer BM, Friedman SA. 1993. Maternal morbidity and mortality in 442 pregnancies with hemolysis, elevated liver enzymes,

and low platelets (HELLP syndrome). *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 169:1000–1006.

Sladek SM, Ronald RM, Kirk PC. 1997. Nitric oxide and pregnancy. *The American Journal of Physiology* 272:R441–R463.

Sluijter JPG, Van Mil A, Van Vliet P, Metz CHG, Liu J, Doevendans PA, Goumans MJ. 2010. MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 30:859–868.

Song XW, Li Q, Lin LI, Wang XC, Li DF, Wang GK, Ren ANJ, Wang YR, Qin YW, Yuan WJ, Jing Q. 2010. MicroRNAs are dynamically regulated in hypertrophic hearts, and miR-199a is essential for the maintenance of cell size in cardiomyocytes. *Journal of Cellular Physiology* 225:437–443.

Spearman C. 1904. The Proof and Measurement of Association between Two Things. *American Journal of Psychology* 15:72–101.

Stubert J, Koczan D, Richter D-U, Dieterich M, Ziems B, Thiesen H-J, Gerber B, Reimer T. 2013. miRNA expression profiles determined in maternal sera of patients with HELLP syndrome. *Hypertension in Pregnancy* 33:215–235.

Su X, Liang H, Wang H, Chen G, Jiang H, Wu Q, Liu T, Liu Q, Yu T, Gu Y, Yang B, Shan H. 2017. Over-expression of microRNA-1 causes arrhythmia by disturbing intracellular trafficking system. *Scientific Report* 7:46259.

Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, Sessa WC. 2007. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circulation Research* 100:1164–1173.

Sucharov C, Bristow MR, Port JD. 2008. miRNA expression in the failing human heart: Functional correlates. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 45:185–192.

Thilaganathan B. 2016. Association of Higher Maternal Blood Pressure With Lower Infant Birthweight Placental Cause or Cardiovascular Effect? *Hypertension* 67:499–500.

Thilaganathan B. 2017. Placental syndromes: getting to the heart of the matter. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 49:7–9.

Thornburg KL. 2015. The programming of cardiovascular disease. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 6:366–376.

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliensky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J,

- Engelhardt S. 2008. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456:980–984.
- Torres A, Torres K, Wdowiak P, Paszkowski T, Maciejewski R. 2013. Selection and validation of endogenous controls for microRNA expression studies in endometrioid endometrial cancer tissues. *Gynecologic Oncology* 130:588–594.
- van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. 2006. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 103:18255–18260.
- van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. 2008. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 105:13027–13032.
- Vera J, Lai X, Schmitz U, Wolkenhauer O. 2013. MicroRNA-regulated networks the perfect storm for classical molecular biology, the ideal scenerio for systems biology. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 774:55–76.
- Wang Q, Hu W, Lei M, Wang Y, Yan B, Liu J, Zhang R, Jin Y. 2013. MiR-17-5p impairs trafficking of H-ERG K<sup>+</sup> channel protein by targeting multiple ER stress-related chaperones during chronic oxidative stress. *PLoS One* 8:e84984.
- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2008. The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Developmental Cell* 15:261–271.
- Wang YS, Wang HYJ, Liao YC, Tsai PC, Chen KC, Cheng HY, Lin RT, Juo SHH. 2012. MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation. *Cardiovascular Research* 95:517–26.
- Wei XJ, Han M, Yang FY, Wei GC, Liang ZG, Yao H, Ji CW, Xie RS, Gong CL, Tian Y. 2015. Biological significance of miR-126 expression in atrial fibrillation and heart failure. *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* 48:983–989.
- Weinstein L. 1982. Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: A severe consequence of hypertension in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 142:159–167.
- World Health Organization international collaborative study of hypertensive disorders of pregnancy. 1988. Geographic variation in the incidence of hypertension in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 158:80–83.
- Wystub K, Besser J, Bachmann A, Boettger T, Braun T. 2013. miR-1/133a Clusters Cooperatively Specify the Cardiomyogenic Lineage by Adjustment of Myocardin Levels during Embryonic Heart Development. *PLoS Genetics* 9:1–17.

- Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. 2009. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes and Development* 23:2166–2178.
- Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. 2007. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature Medicine* 13:486–91.
- Yang K, He YS, Wang XQ, Lu L, Chen QJ, Liu J, Sun Z, Shen WF. 2011. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4. *FEBS Letters* 585:854–860.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development* 17:3011–3016.
- Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. 2010. Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. *Circulation Research* 107:810–817.
- Zhang Z, Li J, Liu B, Luo C, Dong Q, Zhao L, Zhong Y, Chen W, Chen M, Liu S. 2013. MicroRNA-26 was decreased in rat cardiac hypertrophy model and may be a promising therapeutic target. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 62:312–319.
- Zhong D, Huang G, Zhang Y, Zeng Y, Xu Z, Zhao Y, He X, He F. 2013. MicroRNA-1 and microRNA-206 suppress LXR $\alpha$ -induced lipogenesis in hepatocytes. *Cellular Signaling* 25:1429–1437.
- Zhou B, Li C, Qi W, Zhang Y, Zhang F, Wu JX, Hu YN, Wu DM, Liu Y, Yan TT, Jing Q, Liu MF, Zhai QW. 2012. Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity. *Diabetologia* 55:2032–2043.
- Zhu Y, Lu H, Huo Z, Ma Z, Dang J, Dang W, Pan L, Chen J, Zhong H. 2016. MicroRNA-16 inhibits fetomaternal angiogenesis and causes recurrent spontaneous abortion by targeting vascular endothelial growth factor. *Scientific Reports* 6:35536.

### Zdroje ilustrací:

Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, Lao KQ, Livak KJ, Guegler KJ. 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 33.

Vlahová V, Šmerková K, Vaculovičová M, Kizek R. 2014. MiRNA: Od biogeneze po využití v lékařství. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 1: 18–22.

<https://obgynkey.com/hypertensive-disorders-4/>