

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Plzni
Ústav lékařské biologie a genetiky

Disertační práce

Úloha mikroRNA v progresi kardiovaskulárních chorob

Disertační práce

PharmDr. Václava Černá

Školitel: Doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Školitel specialista: prof. MUDr. Otto Mayer CSc.

V Plzni, 6. 5. 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Plzni, 6. 5. 2022

PharmDr. Václava Černá

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především doc. RNDr. Martinovi Peštovi, Ph.D. za odborné vedení po celou dobu mého doktorského studia, za jeho profesionální rady i za vynaložený čas a velkou trpělivost.

Mé poděkování patří rovněž mému konzultantovi prof. MUDr. Otto Mayerovi CSc. za jeho odborné vedení, vstřícný přístup a mnoho cenných rad. Dále děkuji přednostovi II. interní kliniky prof. MUDr. Janu Filipovskému CSc., přednostovi kardiologické kliniky prof. MUDr. Richardu Rokytovi Ph.D., přednostovi chirurgické kliniky prof. MUDr. Vladislavu Třeškovi, DrSc. a primáři Oddělení imunochemické diagnostiky FN Plzeň prof. MUDr. Ondřeji Topolčanovi, CSc. za umožnění a podporu spolupráce.

Děkuji též prof. MUDr. Jiřímu Moláčkovi, Ph.D. a doc. MUDr. Milanu Hromádkovi Ph.D. za významnou podporu a spolupráci na společném výzkumu i publikacích, a rovněž tak i všem ostatním spoluautorům publikovaných článků, které tvoří základ této disertační práce.

Seznam použitých zkratek:

3' UTR	3' nepřekládaná oblast (3' untranslated region)
AAA	aneurysma abdominální aorty (abdominal aortic aneurysm)
AAS	akutní aortální syndromy (acute aortic syndromes)
Ago2	argonaute 2 protein
AHI	index apnoe-hypopnoe
AIM	akutní infarkt myokardu (acute myocardial infarction = AMI)
ApoA	apolipoprotein A
ATF6	activating transcription factor 6
BIM	Bcl-2-like protein 11 (BCL2L11)
BMI	body mass index
BNP	mozkový natriuretický peptid (brain natriuretic peptide)
CDK1	cyklin dependentní kináza 1 (cyclin dependent kinase 1)
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1
cDNA	komplementární DNA (complementary cDNA)
ceRNA	soutěžící endogenní RNA (competing endogenous RNA)
circRNA	cirkulární RNA
CK	kreatin kináza (creatine kinase)
CPAP	continuous positive airway pressure
CYP27A1	cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1
DBR1	enzym Lariat debranching enzyme kódovaný DBR1 genem
DCP2	protein: decapping protein 2
DGCR8	protein DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DLL4	δ-like ligand 4
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

ECmiRNA	extracelulární mikroRNA (extracellular miRNA)
EFLK	ejekční frakce levé komory (left ventricular ejection fraction - LVEF)
ElciRNAs	exon–intron cirkulární RNA (exon–intron circRNAs)
ERK	extracellular signal-regulated kinases
ESC	Evropská kardiologická společnost (European Society of Cardiology)
ETS1	ETS proto-oncogene 1
FOXO4	forkhead box protein O4
GATA2	GATA-binding factor 2
GDF-15	growth/differentiation factor 15
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3 β
GWAS	genome-wide association study
H2AFX	H2A histone family member X
hnRNA	heterogenní nukleární RNA (heterogeneous nuclear RNA)
hnRNPA2B	heterogenní nukleární ribonukleoprotein A2B1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1)
hs-cTnT	high-sensitivity cardiac troponin T
hsTnT	high-sensitivity troponin T
CHI3L1	chitinase-3-like protein 1
CHOP	C/EBP homologous protein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
ICD	implantable cardioverter defibrillator
IFN- γ	interferonu gama
ICHS	ischemická choroba srdeční
IM	infarkt myokardu
KV	kardiovaskulární
LIN28A	faktor (factor lin-28 homologue A)

LRP6	LDL receptor related protein 6
lncRNA	dlouhé nekódující RNA (long non-coding RNA) = lnRNA
lnRNA	dlouhé nekódující RNA (long noncoding RNA) = lnRNA
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza (mitogen-activated protein kinase)
MED13	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13
MEF2A	myocyte enhancer factor 2A
miR	mikroRNA (=miRNA)
miRISC	miRNA indukovaný umlčující komplex (miRNA-induced silencing complex)
miRNA	mikroRNA (=miR)
MKN	mezinárodní klasifikace nemocí
MMP-13	matrixová metaloproteináza 13 / kolagenáza-3
MREs	miRNA response elements
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (messenger RNA)
mtDNA	mitochondriální DNA (mitochondrial DNA)
ncRNA	nekódující RNA (non-coding RNA)
Non-STEMI	Infarkt myokardu bez elevace úseku ST (Non-ST-Elevation Myocardial Infarction)
NSTEMI	Infarkt myokardu bez elevace úseku ST (Non-ST-Elevation Myocardial Infarction)
NTproBNP	N-terminální fragment prohormonu mozkového natriuretického peptidu (N-terminal pro-brain natriuretic peptide)
NYHA	klasifikace dušnosti podle NYHA (New York Heart Association)
ODI	Oxygen Distress Index
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OPG	osteoprotegerin
OPN	osteopontin

OR	poměr šancí (Odds ratio)
OSA	obstrukční spánková apnoe
OSAS	syndrom obstrukční spánkové apnoe
PAK4	p21 aktivovaná kináza PAK 4 (p21-activated kinase),
PCI	perkutánní koronární intervence
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDCD4	programmed cell death protein 4
piRNA	PIWI interagující RNA (Piwi-interacting RNA)
PPAR γ	peroxisome proliferator activated receptor gamma
pre-mRNA	prekurzorová mRNA (precursor mRNA)
pri-miRNA	primární miRNA (primary-microRNA)
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RASA1	RAS p21 protein aktivátor
Rb	retinoblastoma protein
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomální RNA (ribosomal RNA)
RT-PCR	reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce (reverse transcription polymerase chain reaction)
SCN5A	sodium voltage-gated channel alpha subunit 5
SEMA6A	Semaphorin 6A
SEMA6D	Semaphorin 6D
siRNA	malé interferující RNA (small interfering RNA)
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (Single nucleotide polymorphism)
snRNA	malá nukleární RNA (small nuclear RNA)
snRNP	malý nukleární ribonukleoprotein (small nuclear ribonucleoprotein)
SOX6	SRY-box transcription factor 6

SRP	signál rozpoznávající částice (signal recognition particle)
SRSF3	sestříhový faktor - serine/arginine- rich splicing factor 3
ST6GALNAC5	ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5
STEMI	infarkt myokardu s elevací úseku ST (ST-Elevation Myocardial Infarction)
SUMO	small ubiquitin-like modifier
TAA	aneurysma torakální aorty (thoracic aortic aneurysm)
TGFBR2	transforming growth factor beta receptor 2
TGF- β	transforming growth factor β
TNF- α	tumor necrosis factor α
TRBP	dsRBP trans- activation-responsive RNA- binding protein
tRNA	transferová RNA (Transfer RNA)
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor (Vascular endothelial growth factor)
VEGFR2	receptor 2 pro vaskulární endotelový růstový faktor (vascular endothelial growth factor receptor 2)
XRN1	exoribonukleáza 1

1 Obsah

1	Obsah.....	9
2	Abstrakt.....	11
3	Úvod.....	15
4	Cíl práce.....	17
5	Úvod do problematiky.....	18
5.1	Kardiovaskulární onemocnění.....	18
5.1.1	Ischemická choroba srdeční a akutní infarkt myokardu.....	20
5.1.2	Aneurysma aorty.....	21
5.1.3	Kardiovaskulární změny spojené se spánkovou apnoe.....	22
5.2	Genetické faktory u kardiovaskulárních onemocnění.....	24
5.3	Aktuálně používané biomarkery.....	25
5.4	Biomarkery ze skupiny mikroRNA.....	27
5.5	Nukleové kyseliny z perspektivy biomarkerů.....	28
5.5.1	DNA.....	29
5.5.2	RNA.....	30
5.5.2.1	Mediátorová RNA (mRNA).....	31
5.5.2.2	RNA s regulační funkcí.....	31
5.5.2.3	mikroRNA.....	32
5.5.2.3.1	Počátky výzkumu mikroRNA.....	33
5.5.2.3.2	Geny kódující mikroRNA.....	34
5.5.2.3.3	Biogeneze mikroRNA.....	34
5.5.2.3.4	Mechanismus regulace genové exprese pomocí mikroRNA.....	37
5.5.2.3.5	Extracelulární mikroRNA (ECmiRNA).....	39
5.5.2.3.6	Výsledný efekt mikroRNA na fenotyp.....	43
5.5.2.3.7	Mutace a SNP v genech pro mikroRNA.....	44
5.5.2.3.8	mikroRNA v rozvoji KV chorob.....	45
5.5.2.3.9	mikroRNA jako terapeutický cíl.....	46

5.5.2.4	Nekódující RNA a jejich další funkce	47
5.5.2.5	Ribosomální RNA (rRNA)	47
5.5.2.6	Transferová RNA (tRNA)	48
6	Metodika	50
6.1	Izolace mikroRNA	50
6.1.1	Izolace mikroRNA z plazmy	50
6.1.2	Izolace mikroRNA z tkáně.....	52
6.2	Kvantifikace cirkulujících a tkáňových mikroRNA.....	52
6.3	Statistické metody.....	57
7	Výsledky a diskuse	58
7.1	mikroRNA u onemocnění srdce	58
7.2	mikroRNA u syndromu obstrukční spánkové apnoe (OSAS)	70
7.3	mikroRNA u onemocnění cév (aorty)	73
8	Závěr	80
9	Nejvýznamnější výsledky	83
10	Literatura	84
11	Seznam publikací v příloze I.....	101
12	Seznam publikací v příloze II.....	102

2 Abstrakt

Současný aplikovaný výzkum molekul mikroRNA je zaměřen na identifikaci jejich rolí v patogenezi různých typů onemocnění, včetně kardiovaskulárních (KV), a to s předpokladem jejich uplatnění jako biomarkerů nebo cílů léčby. Kardiovaskulární onemocnění mají v populaci vysokou incidenci i prevalenci, jsou převážně chronická, jsou také vedoucí příčinou hospitalizace i úmrtí a představují proto velkou zátěž pro pacienty i zdravotní systém.

Aktuálně je využíváno v diagnostice kardiovaskulárních chorob a odhadu kardiovaskulárního rizika mnoho metabolických parametrů, většinou ze skupiny proteinů a lipidů, zatímco parametrů ze skupiny nukleových kyselin, a to až již v podobě mutací v molekule DNA, nebo různých molekul RNA, prozatím velice omezeně. Přes nesporný význam a přínos metabolických biomarkerů v diagnóze i prognóze kardiovaskulárních chorob, tyto markery stále neumožňují efektivně identifikovat všechny osoby ve vysokém riziku, a jsou proto hledány další molekuly, které by mohly ke zpřesnění této identifikace přispět.

A právě nalezení dalších diagnostických a prognostických markerů pro zpřesnění odhadu KV rizika a následně zefektivnění léčby pacientů ve vysokém riziku je tématem této disertační práce. Zaměřili jsme se na skupinu molekul mikroRNA, krátkých nekódujících RNA, které se účastní posttranskripční regulace genové exprese a ovlivňují u člověka expresi většiny protein kódujících genů. Jsou syntetizovány v buňkách, pasivně i aktivně uvolňovány do cirkulace, kde jsou relativně stabilní, a je možné je stanovit jak v tkáních, tak v různých tělních tekutinách, včetně krve. Hladiny mnohých z nich se mění v souvislosti s rozvojem různých patologických stavů a v případě akutních příhod mohou být tyto změny velmi dynamické.

MikroRNA jsme izolovali z tkání i plazmy a pomocí molekulárně biologických metod stanovovali jejich expresní hladiny s cílem stanovit či zpřesnit diagnózu či prognózu konkrétních KV onemocnění. U tkáně aorty byly expresní hladiny mikroRNA porovnávány v tkáni aorty s abdominálním aneurysmatem (AAA) a bez těchto patologických změn; u pacientů s akutním infarktem myokardu byly vybrané miR stanovovány v plazmě, stejně jako u pacientů v sekundární prevenci KV onemocnění, a také u pacientů se syndromem obstrukční spánkové apnoe, u kterého jsou KV onemocnění velmi častou komorbiditou.

S cílem nalézt mikroRNA účastnící se patogeneze a progresu abdominálního aneurysmatu aorty jsme identifikovali u pacientů s AAA panel miR se změněnou expresí v této tkáni oproti zdravým kontrolám, a to u malých i velkých aneurysmat. Tyto mikroRNA mohou v budoucnu přispět k identifikaci pacientů s rizikem dynamičtější progresu tohoto onemocnění, či zvýšeným rizikem ruptury. U pacientů s infarktem myokardu jsme identifikovali miR-499 jako nejslibnější biomarker z námi analyzovaných mikroRNA, s největším potenciálem přispět k nalezení pacientů s nejvyšším rizikem úmrtí po AIM do jednoho roku. U chronických pacientů po prodělané KV příhodě jsme zjistili, že snížené expresní hladiny miR-19a jsou spojeny s vyšším rizikem úmrtí, a mohou být využity jako prognostický biomarker mortality. Dále jsme identifikovali miR-499 jako potenciální doplňkový diagnostický biomarker u pacientů se syndromem obstrukční spánkové apnoe.

Podařilo se nám u všech sledovaných diagnóz identifikovat alespoň jednu miR jako potenciální diagnostický či prognostický marker a diskutovat její zapojení do zkoumané patogeneze.

Abstract

Current applied research of microRNA molecules is focused on the identification of their roles in the pathogenesis of various types of diseases, including cardiovascular (CV), with the assumption of their use as biomarkers or treatment targets. Cardiovascular diseases have a high incidence and prevalence in the population, are predominantly chronic, and are also a leading cause of hospitalization and death, and therefore represent a major burden on patients and the health system.

Many metabolic parameters are currently used in the diagnosis of cardiovascular diseases and cardiovascular risk assessment, mostly proteins and lipids, while parameters from the group of nucleic acids, whether in the form of mutations in DNA molecules, or various RNA molecules, are very limited so far. Despite the undeniable importance and contribution of metabolic biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular diseases, these markers still do not allow effective identification of all patients at high risk, and therefore additional molecules are being sought that could contribute to the accuracy of this identification.

Finding other potential diagnostic and prognostic markers to contribute to the more precise CV risk assessment, and subsequently also to the more effective treatment of patients at high risk, is the topic of this dissertation. We focused on a group of microRNAs, short non-coding RNAs, involved in the post-transcriptional regulation of gene expression, influencing the expression of most protein-coding genes in humans. MicroRNAs are synthesized in cells, passively and actively released into the circulation, where they are relatively stable, and can be determined in both tissues and various body fluids, including blood. In addition, the expression levels of many microRNAs change in relation to the various pathological conditions or acute events, and these changes can be very dynamic.

microRNAs were isolated from tissues and plasma, and their expression levels were measured, using molecular biological methods, in order to set a diagnosis or improve its setting, or to improve prognosis estimation for particular cardiovascular diseases. In aortic tissue, microRNA expression levels were compared between tissues with and without aortic abdominal aneurysm (AAA). In acute myocardial infarction patients, plasma levels of selected miRs were determined, as well as in patients in secondary prevention of CV diseases, and in patients with obstructive sleep apnoea syndrome, where heart diseases are very common comorbidities.

In order to find microRNAs involved in the pathogenesis and progression of the abdominal aortic aneurysm, we identified a panel of miRs dysregulated in AAA tissue compared to healthy controls, in both small and large aneurysms. In the future, these microRNAs may help identify patients at risk for more dynamic disease progression, or increased risk of rupture. In patients with myocardial infarction, we identified miR-499 as the most promising biomarker of all the microRNAs we analysed, with the greatest potential to contribute to the high risk patients identification, having the highest annual risk of death. In the group of chronic patients after a CV event, we found that decreased miR-19a expression levels are associated with a higher risk of death, and therefore they may be used as a prognostic biomarker of mortality. We further identified miR-499 as a potential additional diagnostic biomarker in patients with obstructive sleep apnoea syndrome.

We succeeded to identify at least one miR as a potential diagnostic or prognostic marker for all studied diagnoses, and to discuss its involvement in pathological processes.

3 Úvod

Kardiovaskulární (KV) onemocnění jsou stále v centru pozornosti, protože postihují vysoký podíl dospělé populace, jsou v Evropě i v České republice dlouhodobě hlavní příčinou úmrtí, a také hospitalizace, a představují velkou zátěž pro pacienta i pro zdravotní systém. Mnohá KV onemocnění jsou chronická a pacient žije s tímto onemocněním mnoho let; čeští muži, kteří mají střední délku života 76 let, tráví s KV onemocněním v průměru 15 let, české ženy se střední délkou života 82 let dokonce 20 let, a jsou v tomto parametru druhé nejhorší mezi Evropskými zeměmi (Zafarová, 2021). Chronická onemocnění vedou také k akutním KV příhodám, které jsou spojeny s vyšší mortalitou, a rovněž zvýšením KV rizika, takže je v důsledku toho snížena jak kvalita života pacienta, tak i jeho průměrné dožití. Podle současných odhadů, v evropské populaci způsobí ročně tato onemocnění celkově ztrátu více jak 60 milionů let života v důsledku předčasné smrti (Townsend et al., 2022).

Vývoj KV chorob je ovlivněn mnoha faktory. Hrají zde roli genetické faktory, věk, a řada dalších rizikových faktorů, které přispívají k rozvoji jednotlivých KV onemocnění. Patří sem faktory související s nezdravým životním stylem (kouření, obezita, nedostatek pohybu), hypertenze, dyslipidemie či diabetes. Právě na tyto ovlivnitelné faktory je zaměřena prevence KV onemocnění. Ve velmi vysokém riziku jsou všichni pacienti po již prodělané KV příhodě, revaskularizaci, diabetici, pacienti se závažným renálním onemocněním, aneurysmatem a s ischemickou chorobou dolních končetin, a také pacienti s vypočteným rizikem SCORE deset procent a vyšším (Býma et al., 2018). SCORE je u nás nejčastěji používaný výpočet rizika úmrtí na KV onemocnění v období příštích deseti let.

Takto vyčleněná skupina vysoce rizikových pacientů je stále velmi velká, a dosud není k dispozici příliš laboratorních markerů, které by mohly v této skupině pomoci identifikovat jedince, u kterých je riziko další fatální či nefatální KV příhody nejvyšší. Vedle laboratorních biochemických parametrů souvisejících s monitorováním rizikových faktorů jsou u některých onemocnění či KV příhod stanovovány vybrané specifické proteinové markery, například hladiny troponinu nebo NTproBNP (N-terminal pro-brain natriuretic peptide). Tyto markery slouží k diagnostice a/nebo ke stanovení prognózy. Mnoho proteinů stanovitelných z krve či plazmy bylo v minulosti zkoumáno z hlediska potenciálu stát se takovými markery. Důvodem hledání dalších markerových molekul je skutečnost, že i přes nesporné přínosy v současnosti používaných biomarkerů, jako je například troponin, nejsou informace poskytované těmito molekulami pro současnou praxi dostačující, a to zejména v oblasti prognózy a odhadu rizik. Vzhledem k těmto skutečnostem je z mnoha důvodů slibné hledat

další potenciální biomarkery ve skupině molekul mikroRNA, krátkých nekódujících RNA účastnících se u člověka regulace exprese většiny protein kódujících genů. Jsou syntetizovány v buňkách, pasivně i aktivně uvolňovány do cirkulace, kde jsou relativně stabilní, a je možné je stanovit jak v tkáních, tak v různých tělních tekutinách, včetně krve. Hladiny mnohých z nich se mění v souvislosti s rozvojem různých patologických stavů a v případě akutních příhod mohou být tyto změny velmi dynamické.

První molekula mikroRNA byla objevena na konci minulého století a od začátku tohoto století jsou mikroRNA předmětem intenzivního výzkumu. Jedná se o velkou skupinu jednovláknových RNA o délce okolo 21 nukleotidů, které jsou tvořeny v buňkách a jsou důležitým posttranskripčním regulátorem genové exprese. Díky asociaci s různými RNA-vazebnými proteiny jsou relativně stabilní v tkáních i v tělních tekutinách, kam jsou z buněk vylučovány. V současné době je jen u člověka známo více než dva tisíce těchto regulačních molekul, a jsou stále objevovány další. MikroRNA se účastní regulace genové exprese většiny protein kódujících genů a produkce některých miR je tkáňově specifická, což je mimo jiné potenciálně využitelné v diagnostice. Prostřednictvím takto regulovaných genů ovlivňují důležité biologické procesy v buňce, jako je proliferace, diferenciace, hypertrofie, fibróza, remodelace, angiogeneze, zánět nebo buněčná smrt (apoptóza). Bylo zjištěno, že v každém typu lidských buněk je průměrně 50 % jejich objemu tvořeno velmi omezeným počtem miR, jedna čtvrtina známých miR je významně exprimována, přibližně polovina z nich se vyskytuje ve vyšší hladině v určitém typu buněk, a zbylé miR jsou obecně exprimovány na nízkých hladinách (O'Brien et al., 2018).

Bylo zjištěno, že změna exprese miR je spojena s mnoha patologickými stavy (Chakraborty et al., 2018). Četné dosud publikované práce označují mikroRNA jako molekuly s vysokým potenciálem využití v diagnostice, predikci i léčbě vybraných onemocnění (Wang et al., 2010, Zhao et al., 2019, Karakas et al., 2017).

Hlavním cílem této disertační práce je nalezení nových biomarkerů ze skupiny molekul miRNA, které by přispěly k zodpovězení klinických otázek v léčbě KV onemocnění, na které nedokáží dát dostatečně přesnou odpověď stávající proteinové markery nebo biochemické parametry.

Výzkum proběhl v laboratořích Ústavu biologie a Biomedicínského centra LF UK v Plzni ve spolupráci s řadou klinických pracovišť Fakultní nemocnice v Plzni, jmenovitě II. Interní klinikou, Kardiologickou klinikou, Chirurgickou klinikou, Otorinolaryngologickou klinikou, Ústavem klinické chemie a biochemie a Centrální laboratoří pro imunoanalýzu.

4 Cíl práce

Cílem této disertační práce bylo hledání diagnostických, prognostických a prediktivních biomarkerů, které by umožnily přesnější diagnostiku a/nebo přesnější rozhodování o klinických otázkách další léčby pacientů s KV onemocněním. Jako zdroj potenciálních aditivních biomarkerů byla vybrána skupina ribonukleových kyselin s regulační funkcí, jmenovitě mikroRNA, molekul které jsou schopné regulovat postranskripčně expresi většiny protein kódujících genů. U některých mikroRNA již byla prokázána souvislost mezi změnami jejich exprese a rozvojem patologických stavů.

Vlastní komentovaná disertační práce je založena na čtyřech článcích publikovaných v zahraničních časopisech s impakt faktorem. Tyto práce si kladly za cíl:

- nalézt prognostický biomarker ze skupiny kardio-myo-specifických miR, který by mohl být využit při odhadování KV rizika u pacientů po akutním infarktu myokardu
- nalézt prognostický marker ze skupiny miR sloužící k odhadu KV rizika u stabilizovaných chronických pacientů v sekundární prevenci po předchozí KV příhodě
- nalézt diagnostický marker ze skupiny kardio-myo-specifických miR, který by mohl být využit v diagnostice syndromu obstrukční spánkové apnoe
- nalézt panel mikroRNA, které jsou dysregulované u pacientů s abdominálním aneurysmatem aorty, a které by mohly být potenciálními markery progresu tohoto onemocnění a/nebo zvýšeného rizika ruptury

5 Úvod do problematiky

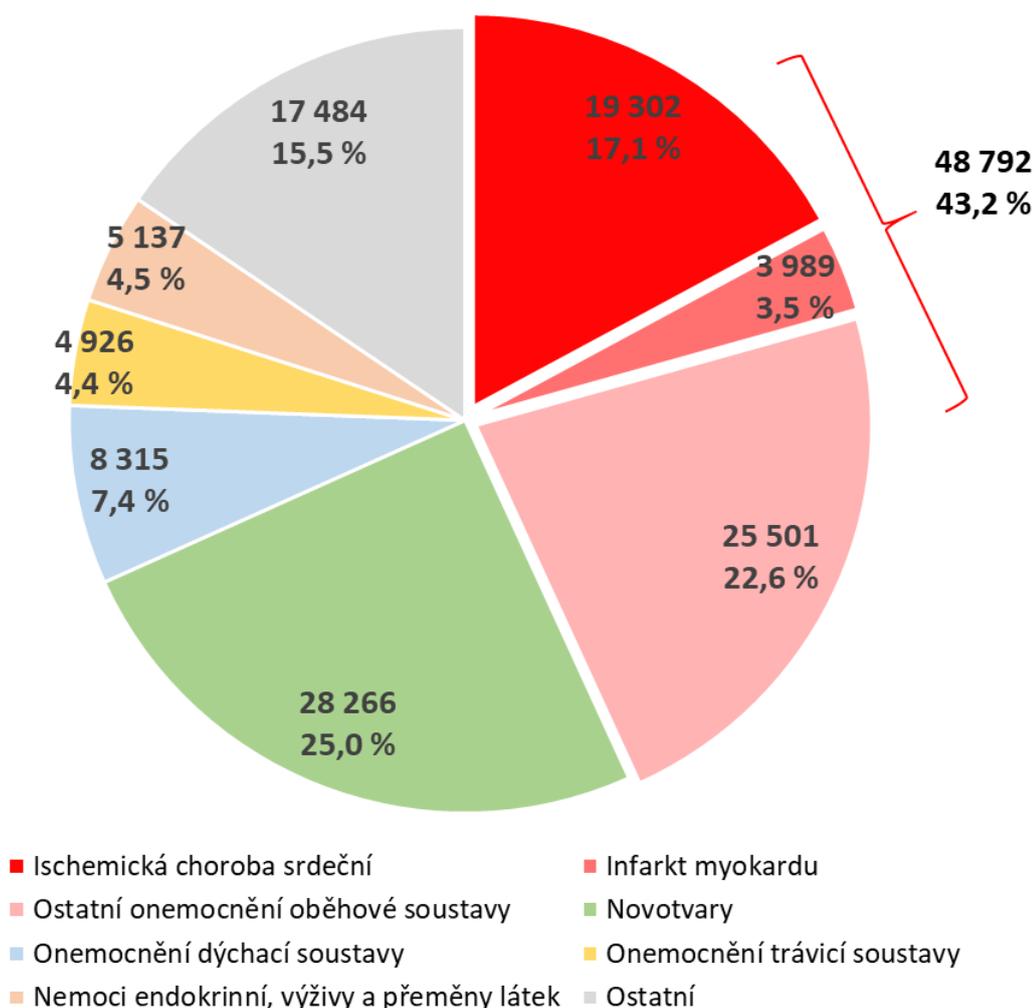
5.1 Kardiovaskulární onemocnění

Podle mezinárodní klasifikace nemocí patří do skupiny onemocnění oběhové soustavy ischemická choroba srdeční (IČHS), akutní revmatická horečka, chronické revmatické choroby srdeční, hypertenzní nemoci, kardiopulmonální nemoc a nemoci plicního oběhu, jiné formy srdečního onemocnění, cévní nemoci mozku (především mozková mrtvice), nemoci tepen, tepének a vlásečnic (zahrnující aneurysma a aterosklerózu), nemoci žil a některé další.

Kardiovaskulárními chorobami trpí vysoký podíl populace, jsou nejčastějším důvodem přijetí do nemocnic a představují 285 tisíc hospitalizací za rok, tj. přibližně 2,14 milionů ošetrovacích dnů. To znamená, že je v ČR hospitalizováno z KV příčin asi 2 684 pacientů na 100 000 obyvatel. Zároveň v roce 2018 tyto choroby zapříčinily 47,7 tisíc pracovních neschopností, s průměrným trváním jedné pracovní neschopnosti 79,5 dne. KV choroby jsou také důvodem přiznání 35,7 tisíc invalidních důchodů (ÚZIS 2019). Z těchto dat vyplývá, že skupina KV onemocnění představuje velkou zátěž nejen pro pacienty, ale i pro celý zdravotní systém.

Kardiovaskulární choroby jsou již po dlouhou dobu i nejčastější příčinou úmrtí. V roce 2018 dosahoval podíl zemřelých z důvodů onemocnění oběhové soustavy 43,2 %, a nečastější příčinou byla ischemická choroba srdeční včetně akutního infarktu myokardu (AIM) (ÚZIS 2019) (obrázek 1).

Podle statistik Evropské kardiologické společnosti (ESC) trpí kardiovaskulárními chorobami v Evropě 113 milionů lidí, s mediánem 6 963 nemocných na 100 000 obyvatel, s ročním přírůstkem 12,7 milionů nově diagnostikovaných a jejich prevalence se v průběhu posledních dvaceti let výrazně nemění. Pro ČR ukazují data z roku 2019 prevalenci 7 786 na 100 000 obyvatel a incidenci 792 na 100 000 obyvatel (Timmis et al., 2021).



Obrázek 1 - Hlavní příčiny úmrtí v ČR roce 2018 (ÚZIS 2019)

Nejčastější kardiovaskulární chorobou je ischemická choroba srdeční, onemocnění cév srdce. Součástí etiologie tohoto onemocnění je rozvoj aterosklerózy, která postupně vede k ischemii nebo infarktu myokardu. Podle ESC trpělo ICHS v 57 sledovaných zemích celkem 47,6 milionů lidí s roční incidencí 5,8 milionů, a její výskyt byl nižší u žen než u mužů. V ČR byly hodnoty incidence a prevalence ICHS na úrovni 364 na 100 000 obyvatel a 3 406 na 100 000 obyvatel (Timmis et al., 2021). Incidence i prevalence v ČR byla podle této statistiky nad průměrem sledovaného panelu zemí.

Rovněž v 57 zemích hodnocených ESC byla onemocnění oběhové soustavy celkově nejčastější příčinou úmrtí, kde v roce 2019 stála za úmrtím 2,2 milionů žen a 1,9 milionu mužů, i když v některých jednotlivých zemích, mezi které se řadí například Velká Británie, Nizozemí či Dánsko, je již převažující příčinou úmrtí onkologické onemocnění. Nečastější

KV příčinou úmrtí je ICHS, která stojí za 17 % úmrtí u žen i mužů, druhou v pořadí je mozková mrtvice, která vedla ke 12 % úmrtí u žen a 8 % u mužů (Timmis et al., 2021).

Přestože je v současné době kladen velký důraz na prevenci KV onemocnění a v jejich léčbě je dostupná řada léků i léčebných postupů, podle publikovaných dat prevalence těchto chorob výrazně neklesá. Příčinou může být i vysoký výskyt rizikových faktorů pro vývoj těchto onemocnění v populaci. Podle statistiky z roku 2019 je v české populaci 21,1 % kuřáků (tj. medián z analyzovaných zemí), lidé mají vysoký příjem soli, a ČR měla též vedoucí postavení v konzumaci alkoholu, což představuje zvýšené riziko vzniku KV chorob. Mezi klinickými rizikovými faktory jsou hypertenze, diabetes, dyslipidemie a obezita. V ČR je v dospělé populaci více než 27 % hypertoniků, 7 % diabetiků a 26 % dospělé populace trpí obezitou (Timmis et al., 2021). Zároveň je dnes známo, že na fenotypu KV onemocnění se podílí i genetická (dědičná) složka, a to přibližně ze čtyřiceti procent.

Velký význam KV onemocnění představoval hlavní důvod, proč byla zvolena jako téma této disertační práce. Z celé škály diagnóz jsme se zaměřili na následující skupiny:

- ischemická choroba srdeční – pacienti s akutním infarktem myokardu a chroničtí pacienti po kardiovaskulární příhodě
- aneurysma aorty
- syndrom obstrukční spánkové apnoe a kardiospecifické mikroRNA jako jeho markery

5.1.1 Ischemická choroba srdeční a akutní infarkt myokardu

Ischemická choroba srdeční (ICHS) je ischemie myokardu, způsobená ve většině případů aterosklerózou věnčitých tepen, a projevuje buď při zátěži, nebo i v klidu. K rozvoji ICHS přispívají i rizikové faktory, jako je kouření, diabetes, dyslipidemie, hypertenze, pozitivní rodinná anamnéza, věk, a další. Z klinického hlediska může být ICHS zcela bez projevů či vést až k náhlé smrti. Obecně lze formy ICHS dělit na chronické (zahrnují asymptomatickou či dysrytmickou formu, stabilní anginu pectoris, stavy po infarktu myokardu a chronické srdeční selhání) a na akutní (nestabilní angina pectoris, akutní infarkt myokardu a náhlá srdeční smrt) (Hradec et al., 2018).

Akutní infarkt myokardu (AIM) je prokázané poškození myokardu ložiskovou nekrózou odpovídající v dané klinické situaci ischemii myokardu. Může být provázen elevací úseku ST na EKG (tzv. STEMI) anebo je bez těchto elevací (non-STEMI nebo NSTEMI) (Kala et al., 2017). Nejčastější příčinou je uzávěr věnčité tepny intrakoronárním trombem, který se vytvoří na aterosklerotickém plátu, a během 20 až 30 minut dochází k nekróze

subendokardiálních vrstev. Pokud nedojde k reperfuzi, do 6 hodin postihne nekróza celou tloušťku stěny srdeční komory (Hradec et al., 2018). Typickými symptomy u pacientů s AIM je bolest na hrudi, která přetrvává více jak 20 minut, a její projekce v těle. K diagnostice se standardně používá anamnéza, vyšetření EKG a stanovení biochemických markerů poškození myokardu, především troponinu T nebo I a NTproBNP.

Včasné stanovení diagnózy a včasný transport pacienta do nemocnice jsou rozhodujícími faktory v úspěšnosti léčby. V ČR onemocní AIM přibližně 25 tisíc lidí a přibližně jedna třetina zemře, často do 1 hodiny od objevení symptomů a obvykle před přijetím do nemocnice. Oproti tomu je nemocniční mortalita nízká, pohybuje se okolo 6 procent. Vedle farmakologické léčby je nejčastějším řešením provedení perkutánní koronární intervence (PCI), která obnovuje oběh v postižené oblasti. Pokud je provedena včasná rekanalizace do jedné hodiny od počátku IM, je možné zachránit až 60 % postižené oblasti myokardu, zatímco po šesti hodinách bývají změny již nevratné (Hradec et al., 2018). V roce 2018 bylo hospitalizováno 22 608 pacientů s AIM, kteří celkově strávili v nemocnici 166 241 pracovních dnů, tj. 7,35 dnů na jednoho pacienta (ÚZIS 2018). Při propouštění pacientů z nemocnice je pro každého provedena kalkulace, zda se nachází v nízkém či vysokém riziku.

Poté je pacient v péči praktického lékaře a jeho léčba je řízena dále kardiologem nebo internistou. Pacientovi je nastavena farmakologická léčba, která je zaměřena na léčbu rizikových faktorů (hypertenze, diabetes, dyslipidemie), a také systém režimových opatření (odvykání kouření a životospráva), aby bylo maximálně sníženo riziko další KV příhody.

V této disertační práci jsme se zaměřili na hledání doplňkových markerů, které by přispěly k přesnějšímu stanovení KV rizika, a odhalení pacientů s vysokým rizikem u skupiny pacientů s AIM (STEMI) a dále u skupiny pacientů s delším časovým odstupem po kardiiovaskulární příhodě.

5.1.2 Aneurysma aorty

Aorta je hlavní tepna vedoucí okysličenou krev ze srdce do těla a hlavy. Anatomicky je členěna na kořen aorty, ascendentní část, oblouk aorty s výstupem tří velkých větví a descendentní aortu, která se dále rozlišuje na torakální a abdominální podle pozice bránice. Z histologického hlediska se aortální stěna skládá ze tří základních vrstev: tunica intima, media a adventitia. Aorta se směrem dolů zužuje a u zdravých jedinců není její průměr větší než 4 cm, s rostoucím věkem se ale zvyšuje, a to u žen o průměrně 0,7 mm a u mužů o 0,9 mm za deset let (Šťásek et al., 2015).

Aneurysma (výduť) je trvalá dilatace úseku aorty. Onemocnění aorty patří podle MKN (mezinárodní klasifikace nemocí) mezi nemoci tepen, tepének a vlásečnic, a po ateroskleróze jsou druhé nejčastější v této skupině. Onemocnění aorty lze členit na aneurysma torakální aorty (TAA), aneurysma abdominální aorty (AAA) a akutní aortální syndromy (AAS) (Bossone et al., 2021).

Nejčastější je aneurysma břišní aorty, obvykle se nachází infrarenálně, a jedná se o rozšíření o více jak 50 procent ve srovnání se zdravým úsekem. Vedle věku jsou dalšími významnými rizikovými faktory kouření, ICHS, hypertenze, AAA v rodinné anamnéze a mužské pohlaví, neboť aneurysma se vyskytuje u mužů přibližně čtyřikrát až šestkrát častěji než u žen, V mužské populaci ve věku 65 až 80 let se prevalence pohybuje od 4 do 8 procent (Šťásek et al., 2015, Joviliano et al., 2017). U většiny pacientů je počáteční vývoj AAA klinicky bez příznaků, ale s rostoucím průměrem aorty narůstá významně riziko ruptury (to je naopak vyšší u žen). Při průměru aneurysmatu mezi 4 až 5 cm je roční riziko ruptury 0,5 %, zatímco u velkých aneurysmat 7 až 8 cm dosahuje 20 až 40 %. Ruptura aneurysmatu má jasné klinické příznaky a je spojena s vysokým rizikem úmrtí (Šťásek et al., 2015, Joviliano et al., 2017). Pravděpodobnost úmrtí spojená s aneurysmatem nebo disekcí aorty je ve věkové skupině 60 až 64 let 9,41 resp. 3,31 na 100 000 mužů resp. žen, ve věkové skupině 70 až 74 let 29,11 resp. 12,33 na 100 000 mužů resp. žen, a u lidí nad 80 let 86,82 resp. 52,46 na 100 000 mužů resp. žen (Joviliano et al., 2017). Vedle samotného průměru aorty a rychlosti jeho změn je jen málo dalších markerů, které by mohly dostatečně spolehlivě předpovědět riziko ruptury. Léčba AAA, pokud je včas diagnostikována, je buď chirurgická nebo endovaskulární a je obvykle prováděna u pacientů s průměrem aneurysmatu nad 5,5 cm a růstem nad 1 cm/rok. Do té doby je pacient pravidelně kontrolován a často dostává farmakologickou léčbu, obvykle zaměřenou na ovlivnění rizikových faktorů (např. hypertenzi) a minimalizaci komplikací (Šťásek et al., 2015).

V disertační práci jsme analyzovali vzorky tkáně abdominálního aneurysmatu a kontrolní tkáně, s cílem nalézt mikroRNA, jejichž hladiny jsou v procesu patogeneze aneurysmatu dysregulovány. Tyto mikroRNA mají potenciál stát se biomarkery AAA, a mohou přispět k určení cílových protein kódujících genů důležitých pro proces patogeneze.

5.1.3 Kardiovaskulární změny spojené se spánkovou apnoe

Obstrukční spánková apnoe (OSA) patří mezi poruchy dýchání ve spánku. Je nejběžnějším typem poruchy spánku a je spojena s potenciálními kardiovaskulárními, neurokognitivními a metabolickými následky. Dochází při ní k opakovaným epizodám kolapsu horních cest dýchacích během spánku, vedoucím k úplnému zastavení nebo významnému snížení

průtoku vzduchu. Závažnost je vyjádřena počtem epizod apnoe a hypopnoe za jednu hodinu spánku jako AHI (apnoe-hypopnoe index), přičemž apnoe znamená úplné uzavření dýchacích cest přetrvávající minimálně deset vteřin s omezením průtoku vzduchu o více jak 90 % a hypopnoe omezení průtoku vzduchu o více jak 30 % po výše uvedenou dobu. V důsledku změn svalového tonu a zúžení dýchacích cest tak dochází k poklesu saturace krve kyslíkem, aktivaci sympatiku, častým mikroprobuzením a fragmentaci spánku, a k omezení trvání hlubokého spánku a REM spánku (Kamasova et al., 2017). Pokud má pacient více než 5 takových příhod za hodinu spánku a některý z obvyklých příznaků (nadměrná denní spavost bez vysvětlitelného důvodu, dušení nebo lapání po dechu, opakované probouzení, pocit neosvěžení spánkem, neschopnost koncentrace), trpí syndromem obstrukční spánkové apnoe (OSAS), a to buď lehkým (AHI 5–15), středním (AHI 15–30) nebo těžkým (AHI > 30).

Prevalence OSA je vysoká, ale zůstává často nediodagnostikovaná, neboť pacienti považují některé příznaky za „normální“. V populaci trpí OSA podle odhadů 5 % žen a 14 % mužů, u populace středního věku je tato prevalence vyšší, u žen 17 % a mužů 34 %. OSAS zhoršuje kvalitu života pacienta, narušuje kognitivní výkon i společenské fungování, a je spojována s vyšší nemocností a úmrtností (Kamasova et al., 2017, Yeghiazarians et al., 2021). Zároveň je nezávislým rizikovým faktorem pro vývoj kardiovaskulárních onemocnění, metabolického syndromu a diabetu (Yeghiazarians et al., 2021, Kamasova et al., 2017).

U pacientů s KV chorobami, zahrnujícími hypertenzi, srdeční selhání, ICHS, plicní hypertenzi, fibrilaci síní a mozkovou mrtvici, dosahuje prevalence OSA dokonce 40 % u žen a 80 % u mužů. Rizikovými faktory pro rozvoj tohoto onemocnění jsou mužské pohlaví, vyšší věk, rodinná anamnéza a obezita. OSA je tak asociována s mnoha KV onemocněními, s navzájem negativním vlivem, což znamená, že OSA zhoršuje KV onemocnění, které následně zhoršuje OSA (Yeghiazarians et al., 2021). OSA je nezávislým rizikovým faktorem v případě hypertenze, fibrilace síní a cerebrovaskulárních chorob, je asociována vyšším rizikem progresu, hospitalizace a úmrtí u srdečního selhání, nezávisle zvyšuje riziko srdečních příhod, a u pacientů s těžkou OSA je spojována se zvýšenou kardiovaskulární i celkovou mortalitou (Yeghiazarians et al., 2021).

Dosud neexistují relevantní molekulární markery syndromu obstrukční spánkové apnoe, proto byla cílem naší práce identifikace takovýchto biomarkerů. Přístup vycházel z hypotézy poškození kardiomyocytů v důsledku episod hypoxie, a proto možnosti využití kardiospecifických mikroRNA v diagnostice tohoto syndromu. Analyzovány byly vzorky

krevní plazmy pacientů se středně těžkým a těžkým syndromem obstrukční spánkové apnoe a odpovídajících probandů bez OSAS jako kontrol.

5.2 Genetické faktory u kardiovaskulárních onemocnění

Genetické faktory patří, spolu s pohlavím a věkem, mezi hlavní neovlivnitelné rizikové faktory kardiovaskulárních onemocnění. Podíl genetické složky na patogenezi jednotlivých kardiovaskulárních onemocnění se různí. U ICHS, včetně akutního infarktu myokardu, se odhaduje tento podíl (heritabilita) na úrovni 50 až 60 procent (Dai et al., 2016). K této heritabilitě přispívají dědičné složky jednotlivých rizikových faktorů rozvoje ICHS, jako jsou diabetes, dyslipidemie, hypertenze, obezita, koagulopatie a mnoho dalších.

Obecně ke vzniku patologického fenotypu může vést mutace v jednom genu, tzv. genu velkého účinku. V tomto případě se jedná o monogenní Mendelovskou dědičnost, která však zodpovídá pouze za malý podíl všech KV onemocnění. U ICHS byly takové mutace nalezené v genech ST6GALNAC5 (mutace G295A), CYP27A1 (mutace G674A), MEF2A (delece 21 párů bází v exonu 11) a LRP6 (mutace G1079A nebo T1298C), a vedly k výskytu monogenní ICHS v analyzovaných rodinách. Rovněž mutace v genech způsobujících vysoké hladiny LDL-cholesterolu nebo triglyceridů a nízké hladiny HDL cholesterolu mohou způsobit familiární výskyt ICHS (Dai et al., 2016).

V jednoznačné většině případů se u KV chorob jedná o polygenní dědičnost, kdy kombinace více, často mnoha genů (variant genů) malého účinku výsledně vede, v interakci s negenetickými rizikovými faktory, k překročení prahu pro vznik určitého patologického fenotypu. Obecně se předpokládá, že frekvence genových variant malého účinku jsou v populaci relativně časté (s frekvencí minoritní alely přesahující jedno procento), zatímco genové varianty středního či velkého účinku jsou v populaci mnohem méně časté (Cerrone et al., 2019, Cambien et al., 2007). K identifikaci různých genetických variant, často jednonuleotidových polymorfizmů, přispívají především asociační studie kandidátních genů a studie GWAS (genome-wide association study). Studie GWAS se opírají o hypotézu, že běžně se vyskytující onemocnění jsou podmiňována v populaci běžnými genetickými variantami (alelami), a sledují jejich asociaci s tímto fenotypem. Málo frekventní alely malého či středního účinku, či alely velmi malého účinku, a také vzájemné genové interakce a interakce jednotlivých alel s prostředím je mnohem obtížnější identifikovat, a tak dosud nalezené genové varianty prozatím vysvětlují jen část celkové heritability ICHS nebo infarktu myokardu (Dai et al., 2016). Mutace (varianty) se mohou vyskytovat i mimo kódující oblasti, kupříkladu v oblastech regulačních, a mohou modifikovat efekt alel jiných genů tím, že jedna z variant těchto genů bude, v případě heterozygotního genotypu, více

exprimována (Cerrone et al., 2019). Vedle variant zvyšujících riziko vzniku KV onemocnění byly nalezeny i varianty, které mají opačný vliv na fenotyp, a toto riziko snižují. U ICHS jsou to například genové varianty v genech pro E-selektin (mutace G2692A nebo C901T), ligázu GLUL (Glutamate-Ammonia Ligase) (rs10911021 T>C), interleukin 10 (mutace G(-1082)A, GG genotyp), koagulační faktor XIII (mutace Val34Leu), receptor PPAR γ (mutace C161T) a mnohé další (Dai et al., 2016).

V současné době se ukazuje, že některé genetické varianty jediného genu, například mutace v genu SCN5A kódujícím alfa podjednotku sodíkového kanálu (sodium voltage-gated channel alpha subunit 5), mohou mít pleiotropní efekt a přispívat k rozvoji více různých nepříbuzných fenotypů (Cerrone et al., 2019).

Mnoho KV onemocnění má komplexní genetický základ. Polygenní dědičnost, vliv prostředí a modifikace výsledného efektu interagujícími genetickými variantami i pleiotropní efekt některých alel stojí pravděpodobně za neúplnou penetrancí některých dominantních alel nebo za variabilní expresivitou těchto onemocnění.

5.3 Aktuálně používané biomarkery

V současné době je využívána v diagnostice kardiovaskulárních chorob a při odhadu rizika řada metabolických markerů, většinou ze skupiny proteinů a lipidů. Vedle běžně stanovovaných hladin lipidů, jako je cholesterol a triglyceridy, jsou v praxi běžně vyšetřovány i další biochemické parametry, jako jsou hladiny jednotlivých iontů (draslík, sodík, apod.) a hladiny cukrů a glykovaného hemoglobinu. Hlavním parametrem pro stanovení KV rizika u osob bez prodělané KV příhody metodou SCORE je, vedle věku, kouření a pohlaví, hladina cholesterolu. U akutních i chronických onemocnění srdce či cév se pak nad rámec těchto vyšetření stanovují další biomarkery spojené s konkrétní chorobou, které slouží ke stanovení nebo potvrzení diagnózy a také odhadu rizika další fatální či nefatální KV příhody.

U AIM byly v minulosti využívány pro stanovení diagnózy hladiny kreatin kinázy (CK), aspartát aminotransferázy (AST) a laktát dehydrogenázy (LDH), které v současné době nahrazuje jako standard především srdeční troponin (cTn – cardiac troponin) (Mythili et al., 2015).

Hlavním markerem nekrózy kardiomyocytů je srdeční troponin, měřený jako hsTnT (high-sensitivity cardiac troponin T) nebo hsTnI (high-sensitivity cardiac troponin I). Jeho hladiny jsou u zdravých jedinců velice nízké (obvykle pod 0,001 $\mu\text{g/l}$) a při srdečním poškození se významně zvyšují. I u pacientů se stabilní anginou pectoris je hladina troponinu desetkrát

zvýšená, u akutního srdečního selhání a mikroinfarktu až stokrát, a při AIM se hladina zvyšuje na přibližně 1 až 100 $\mu\text{g/l}$ podle rozsahu poškození (Fathil et al., 2015). Po AIM se hladiny troponinů zvedají 6 až 8 hodin po poškození tkáně, vrcholu dosahují po 12 až 24 hodinách, a zůstávají zvýšeny po dobu 7 až 10 dnů. Hlavní nevýhodou tohoto markeru je pomalá clearance. Tnl je více specifický pro myokard, TnT je uvolňován i z kosterních svalů, a jeho vzestup je bifázický (po nástupu symptomů, a pak ještě přibližně čtvrtý den po AIM) (Aydin et al., 2019). I plazmatické hladiny myoglobinu se zvyšují záhy po AIM, obvykle už po první hodině, s vrcholem mezi 4 a 12 hodinami. Tento protein je však přítomen ve velkém množství i ve svalové tkáni, a je proto méně specifický pro poškození srdečních buněk. U kreatin kinázy, která je přítomna jak ve svalovině srdce, tak v kosterním svalu, je v současné době stanovována její myokardiální frakce CK-MB (CK-myocardial band) se vzestupem hladin v séru po 4 až 9 hodinách po nástupu symptomů, vrcholem okolo 24 hodin, a poklesem na normální hodnoty po 48 až 72 hodinách. Hladiny CK-MB korelují s rozsahem infarktu a mohou sloužit i ke zpřesnění prognózy či hodnocení reperfuze. Její hladiny se ale mohou zvyšovat i ve spojení s jinými diagnózami, jak je například plicní embolie, svalové trauma, některé malignity a mnoho dalších (Aydin et al., 2019, Mythili et al., 2015).

Mezi další proteiny, které mění své hladiny po AIM, patří i BNP (mozkový natriuretický peptid) nebo fragment NTproBNP, který je užíván jako jeden z prediktivních markerů srdečního selhání; GDF-15 (growth-differentiation factor-15), který může sloužit jako diagnostický marker i prediktivní marker mortality; copeptin (uvolňující se v řádu minut z hypofýzy po AIM), který může být potenciálním diagnostickým a prognostickým markerem poškození myokardu, a některé další (Mythili et al., 2015). Vzhledem k tomu, že infarktu myokardu provázeném nekrózou buněk srdečního svalu předchází poškození cév spojené se zánětem, tvorbou aterosklerotických plaků a trombů, které omezují zásobení tkáně kyslíkem, mohou k diagnóze a prognóze přispívat i hladiny zánětlivých markerů (jako jsou CRP (C-reaktivní protein), interleukin-6 (IL-6), pentraxin-3) nebo markerů destabilizace plaků (například metaloproteináz či TNF- α (tumour necrosis factor α)) (Mythili et al., 2015).

Aneurysma aorty je obvykle diagnostikováno pomocí zobrazovacích metod (Bossone et al., 2021). Mnoho prací se zabývá významem některých biomarkerů v diagnostice a prognóze aneurysmat. Stather et al. 2014 provedl metaanalýzu publikovaných dat a přes určitou nejednoznačnost výsledků našel souvislost mezi zvýšenými hladinami několika proteáz a zánětlivých markerů a aneurysmatem. Nalezl signifikantní rozdíl v hladinách MMP-9 (matrix metalloproteinase 9), TIMP-1 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1), IL-6, CRP, α 1AT (α 1-antitrypsin), triglyceridů, lipoproteinů (a), apolipoproteinu A (ApoA) a HDL (high-

density lipoprotein) mezi pacienty s aneurysmatem aorty a kontrolní skupinou bez aneurysmatických změn. Za pomoci metaregrese našel i pozitivní lineární korelaci mezi průměrem aorty a CRP. U MMP-2 (matrix metalloproteinase 2) v tkáni aorty, TNF- α , osteoprotegerinu (OPG), osteopontinu (OPN), interferonu gama (IFN- γ), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) a VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) nebylo možné metaanalýzu provést, ale i zde byly pozorovány vyšší hladiny u pacientů s aneurysmatem (Stather et al., 2014). V poslední době publikovaná práce Memon et al. 2020, analyzující přes 24 tisíc pacientů s AAA, našla 21 proteinových markerů se vztahem k zánětu, oxidativnímu stresu, lipidovému metabolismu a proteolýze, jejichž hladiny byly signifikantně zvýšené (s výjimkou paraoxonázy 3, která byla snížena) u pacientů s aneurysmatem aorty. Největší prognostický význam měla myeloperoxidáza, kdy vyšší hladiny byly spojeny s rychlejším růstem aneurysmatu (Memon et al., 2020).

5.4 Biomarkery ze skupiny mikroRNA

Přestože je v současné době známo mnoho molekul, zejména proteinů, které slouží jako markery KV onemocnění, žádný z nich neodpovídá plně modelu „ideálního“ markeru s vysokou (ideálně stoprocentní) senzitivitou a specifitou. I přes nesporný přínos a význam některých z nich, především troponinů T a I v diagnostice AIM, nejsou stále k dispozici další biomarkery přispívající jednoznačně či velmi významně především ke stanovení dlouhodobého rizika, popřípadě k předpovědi progresu některých KV onemocnění. Proto je pozornost nyní zaměřena na novou velkou skupinu molekul krátkých nekódujících RNA s regulační funkcí, na mikroRNA, jako na zdroj potenciálních biomarkerů. Některé z mikroRNA jsou tkáňově specifické, hladiny mnohých z nich se mění v souvislosti s konkrétním typem onemocnění, a tyto změny mohou být velmi dynamické. Výzkum například ukázal, že molekuly miR-499 a miR-208 jsou specifické pro kardiomyocyty. U zdravých osob jsou jejich hladiny v plazmě neměřitelné, nebo velmi nízké na hranici měřitelnosti, po infarktu jejich hladiny mnohonásobně stoupají, a následně se jejich hladiny opět snižují, a to zejména u miR-208 velmi rychle. Některé miR typické pro myokard dosahují maxima v kratším čase než hladiny troponinů. V nedávné době uveřejněné metaanalýze doposud publikovaných prací Lee et al. 2021 bylo potvrzeno, že expresní hladiny miR-208, miR-499, miR-1 a miR-133 mají diagnostický význam u AIM, a že expresní hladiny miR-208 po AIM mají prokázaný vztah i k mortalitě, a mají tak prediktivní/prognostický význam u tohoto onemocnění.

Diagnostický marker AIM by měl být nejen specifický pro myokard, s minimálním či nulovým výskytem v jiných tkáních, dostatečně specifický a sensitivní, ale i rychlý ve změně hladiny

a s rychlou clearance, a v neposlední řadě i snadno a spolehlivě měřitelný (Mythili et al., 2015). mikroRNA mnohé tyto požadavky alespoň částečně splňují, ale jejich stanovení je zatím, ve srovnání se standardními markery časově i finančně náročnější a v běžné praxi tak nelze využít např. časnější vzestup jejich hladin ve srovnání s troponinem. V případě využití těchto miR jako prediktivního či prognostického markeru by však větší náročnost jejich stanovení neměla představovat zásadní překážku.

MikroRNA jsou analyzovány z hlediska potenciálu stát se diagnostickými, prediktivními či prognostickými markery nejen u KV chorob, ale také v oblasti onkologie, diabetu a dalších onemocnění. Sledovány jsou nejen jednotlivé miR, ale i celé panely miR účastníci se patogeneze daného onemocnění, kde změny jejich expresních hladin mohou přispívat k včasné diagnostice, volbě léčby či prognóze progresu onemocnění.

5.5 Nukleové kyseliny z perspektivy biomarkerů

Nukleové kyseliny (DNA, RNA) jsou nositeli genetické informace, a to jak z hlediska kompletní informace organismu (mtDNA a gDNA), tak z hlediska realizace genetické informace směrem k fenotypu (mRNA). Kromě toho některé nukleové kyseliny mají další funkce, jako je funkce regulační (například miRNA), strukturní (rRNA) nebo funkci enzymatickou (například snRNA). Ke změně fenotypu (patogenezi onemocnění) mohou vést změny ve struktuře nukleových kyselin i změny hladin některých nukleových kyselin. Tyto změny mohou proto sloužit jako biomarkery řady onemocnění.

Nukleové kyseliny se dělí na kyseliny deoxyribonukleové a ribonukleové a liší se svou funkcí v buňce. Přestože jsou jejich konkrétní úlohy v buňce různé, všechny vzájemně spolupracují na procesu genové exprese. Mnoho z nich má také přímý vztah k biogenezi a funkci molekul mikroRNA, které se transkribují z genů v molekule DNA, interagují především s mRNA, jejíž translaci regulují, mohou ale interagovat i s DNA a ovlivňovat transkripci genů podobně jako transkripční faktory. Alternativní nekanonická biogeneze zahrnuje i tvorbu miR z molekul tRNA nebo snoRNA. Jiné RNA, zejména lncRNA (dlouhé nekódující RNA), mohou volné molekuly miR v cytoplazmě na základě komplementarity vylučovat, a snižovat tak jejich dostupnost a výsledný efekt. Jednotlivé typy nukleových kyselin jsou stručně zmíněny v následujících kapitolách, s podrobnějším popisem mikroRNA (hlavního tématu této disertační práce), a také mRNA, která je těmito miR přímo regulována, a dále DNA, která nese genetickou informaci pro tyto miR.

5.5.1 DNA

Kyselina deoxyribonukleová je nositelkou genetické informace. V lidských buňkách se nachází v buněčném jádře, a také v mitochondriích. DNA se skládá z dusíkatých bází purinových (adenin a guanin) a pyrimidinových (tymin a cytosin), cukru deoxyribózy, a fosfátových zbytků. Struktura DNA spolu s asociovanými proteiny ve formě chromatinu odráží účel genetické informace – její uchování, replikaci a realizaci směrem k fenotypu.

V normálních lidských diploidních somatických buňkách jsou dvě sady chromozómů, tj. 46 chromozómů. Jedna sada chromozómů je tvořena více jak třemi miliardami párů bází a obsahuje přibližně 24 tisíc genů. Lidské chromozómy jsou lineární a protein kódující sekvence představují jen jejich velmi malou část (okolo 1,5 %), zbývající část tvoří introny, sekvence kódující RNA, regulační sekvence, repetitivní sekvence, centroméry, teloméry, a další.

Všechny lidské chromozómy obsahují vedle genů kódujících proteiny také geny kódující mikroRNA (Huang et al., 2022). Ty se mohou nacházet přímo v protein kódujících genech (intragenové) nebo jsou v oblastech mezi těmito geny (extragenové).

Před každým buněčným dělením dochází v S fázi buněčného cyklu k replikaci DNA, kdy je celý genom duplikován. Pokud během replikace dojde k nepřesnostem, které nejsou v dalším kroku opraveny, vznikne genová aberace, mutace nebo polymorfismus. Jako polymorfizmy jsou obvykle označovány varianty, které se vyskytují u více než jednoho procenta populace, a to jak v protein kódujících, tak nekódujících sekvencích. Jedná-li se o změnu pouze jednoho nukleotidu (jednoho páru bází) v molekule DNA, označují se tyto polymorfizmy jako jednonukleotidové (SNP - single nucleotide polymorphism). Přestože SNP nejsou obvykle přímou příčinou vzniku nějakého onemocnění, ukazuje se, že některé z nich se mohou častěji vyskytovat u jedinců trpících některým typem onemocnění a jsou s ním pravděpodobně asociovány, či mohou znamenat predispozici k nějaké chorobě.

Názvosloví mutací se odvíjí od změny sekvence DNA, obvykle genomové (gDNA) a je zapisována jako referenční (původní) báze, její pořadí a změněná báze na tomto místě, přičemž první A v ATG iniciačním kodónu je považován za nukleotid číslo jedna. Substituce nukleotidu v sekvenci DNA se zapisuje jako 395A>T, v publikacích také často jako A395T nebo A395>T (Nussbaum et al., Ogino et al., 2007). U menších delecí jsou definována pořadí chybějících nukleotidů (např. 2245-2248del), u insercí pak pořadí nukleotidů mezi kterými k inserci došlo a vložená sekvence (např. 2988-2889insGAT). Změny v sekvenci proteinů se označují referenční aminokyselinou, jejím pořadím a změněnou aminokyselinou v případě missense mutace (například Glu6Val nebo E6V). K označení aminokyselin se

užívají tří nebo jednopísmenné zkratky. V případě nonsense mutace (vznik stop kodonu) je na místě pro novou aminokyselinu písmeno X (například Glu6X nebo E6X).

Identifikované mutace/polymorfizmy malého rozsahu mají také svoje referenční číselné označení rs (RefSNP). Například rs3746444 v genu pro miR-499, kdy změna A na G vede k nižším hladinám této miR (Ding et al., 2018).

Během studia jsem se rovněž zapojila do sledování výskytu SNP u vybraných skupin pacientů trpících kardiovaskulárními chorobami, ale protože analýza DNA není přímo tématem mé disertační práce, jsou tyto publikace, na kterých jsem spolupracovala, a které byly otištěny v zahraničních odborných časopisech s impakt faktorem, uvedeny pouze v Příloze II, a nejsou dále v práci zmiňovány.

Polymorfizmy či mutace mohou vznikat i v genech pro mikroRNA. Pro výslednou interakci jsou pak důležité jak mutace v cílové sekvenci mRNA (tj. v protein kódujících genech), které jsou častěji popisované, tak i v „seed“ sekvencích miR, které s cílovými sekvencemi na mRNA interagují. První bodová mutace v „seed“ sekvenci, která je spojena se změnou fenotypu, byla popsána u miR-96 a způsobuje ztrátu vlasů (Mencía et al., 2009). Častěji jsou identifikovány mutace v genech miR mimo „seed“ oblasti, které mohou ovlivnit zpracování miR během biogeneze s výslednou změnou hladiny kódované miR, nebo výsledné zastoupení miR-5p a miR-3p v buňce. Například mutace v miR-133a, vedoucí ke vzniku varianty 79T>C MIR133A2, zvyšuje podíl miR-133a-5p, které je obvykle v buňce pod jedno procento (Ohanian et al., 2013).

5.5.2 RNA

Molekuly RNA jsou ve srovnání s molekulami DNA výrazně kratší, početnější, jednovláknové, a fragilnější v důsledku přítomnosti ribózy namísto deoxyribózy. Molekuly RNA se podílí především na realizaci (expresi) genetické informace kódované molekulami DNA. Také škála jejich jednotlivých funkcí je velice široká. Mediátorová RNA (mRNA) přináší z jádra do cytoplazmy informaci o struktuře budoucího proteinu, ribosomální RNA (rRNA) tvoří základní část ribozomů, na kterých se proteiny syntetizují, transferová RNA (tRNA) pak převádí informaci zakódovanou v sekvenci nukleotidů na sekvenci aminokyselin v proteinu. Vedle těchto nejznámějších typů RNA, které se přímo podílejí na proteosyntéze, v je organismu ještě mnoho dalších RNA molekul, které se uplatňují v regulaci proteosyntézy (například mikroRNA), nebo posttranskripčních modifikacích či v opravách DNA. Z nich jsou níže popsány podrobněji mRNA a mikroRNA (miRNA), neboť přímo souvisejí s tématem disertační práce.

5.5.2.1 Mediátorová RNA (mRNA)

Mediátorová RNA je cílová molekula, na kterou se miRNA váže, a jejíž transkripci reguluje. Mediátorová RNA je transkribovaná v jádře buněk a nese výsledně do cytoplazmy informaci o struktuře budoucího proteinu. Transkribována je RNA polymerázou II jako dlouhý řetězec RNA, který je následně v několika krocích modifikován. Transkripce je iniciována navázáním transkripčních faktorů na promotor, úsek DNA, který obsahuje některé konzervativní sekvence, jako je TATA-box, CAAT box, GC box a oktamerový box. Tento proces může být dále ovlivněn i vazbou dalších molekul, které působí jako zesilovače (enhancery) nebo tlumiče (silencery). Následně se po částečném rozvinutí DNA navazuje polymeráza a přepisuje celý gen, včetně nekódujících oblastí. 5'-konec nově vznikající molekuly pre-mRNA je opatřen tzv. 7-metylguanozinovou „čepičkou“, která jej chrání před degradací. Po ukončení transkripce je 3'-konec molekuly zkrácen endonukleázami a opatřen poly(A) koncovou sekvencí, která molekulu stabilizuje a je zároveň důležitá pro export z jádra (Snustad et al., 2009). Směs těchto pre-mRNA v jádře se souhrnně nazývá heterogenní jaderná RNA (hnRNA).

Eukaryotní geny obsahují obvykle kromě úseků kódujících sekvenci proteinu (exonů) i úseky nekódující (introny), které jsou často poměrně dlouhé a mohou mít různé funkce, včetně regulace genové exprese. Tyto úseky jsou v jádře odstraněny dvoustupňovým sestřihem (splicing) v komplexech RNA a proteinů, které se nazývají spliceozomy a obsahují vedle proteinů i malé jaderné RNA (snRNA), označované U1, U2, U4, U5 a U6. V prvním stupni úpravy se štěpí 5' sestřihové místo intronu a v druhém stupni 3' sestřihové místo a výsledně jsou spojeny oba sousední exony. Finální sestřihaná molekula mRNA opatřená 7-metylguanozinovou „čepičkou“ a polyadenylovým koncem je pak transportována do cytoplazmy.

V cytoplazmě je následně informace o struktuře proteinu kódovaná mRNA překládána, za pomoci ribozomů a molekul tRNA, do sekvence proteinů. I zde v cytoplazmě může být exprese jednotlivých proteinů regulována, zejména interakcí s molekulami mikroRNA, které ve většině případů negativně ovlivňují translaci (snižují množství syntetizovaného proteinu). Polymorfizmy v cílových sekvencích mRNA (obvykle v oblasti 3'UTR) mohou ovlivňovat interakci s regulujícími miR a tím modifikovat jejich výsledný efekt.

5.5.2.2 RNA s regulační funkcí

Mezi RNA s regulační funkcí patří několik skupin RNA. Vedle mikroRNA (miRNA), kterými se zabývá tato práce, a které jsou popsány v následujících kapitolách, sem patří siRNA

(small interfering RNA), piRNA (Piwi-interacting RNA), cirkulární RNA (circRNA) a lncRNA (dlouhé nekódující RNA).

Dlouhé nekódující RNA jsou molekuly v délce obvykle nad 200 nukleotidů, které mají v buňce mnoho různých funkcí a jsou exprimovány odlišně v různých tkáních. Mohou působit v jádře, kde ovlivňují modifikaci histonů, strukturu chromatinu, a tím genovou expresi, nebo v cytoplazmě, kde mohou na bázi komplementarity interagovat s mnoha RNA (například mRNA a mikroRNA) a tím ovlivňovat jejich stabilitu nebo dostupnost pro jejich další interakce. Jiné lncRNA jsou důležité pro genový imprinting, replikaci telomer, či kompenzaci genové dávky (Fatica et al., 2014).

Cirkulární RNA, podskupina lncRNA, se účastní transkripční a posttranskripční regulace genové exprese. U člověka jich bylo nalezeno okolo 100 000 a tvoří přibližně 1 % až 10 % všech transkriptů. Jsou přepisovány z protein kódujících genů RNA polymerázou II, ale díky odlišnému sestřihu vytvářejí cirkulární molekuly čítající několik exonů (obvykle 1 až 3). Obsahující vazebná místa pro miR, které mohou na sebe navazovat a snižovat tak jejich dostupnost pro interakci s mRNA, čímž antagonizují jejich negativní efekt na genovou expresi (Kulcheski et al., 2016). V některých molekulách cirkulárních RNA jsou přítomny také introny. Tato podskupina se nazývá exon–intron cirkulární RNA (exon–intron circRNAs - ElciRNAs), je lokalizována v jádře blízko místa svého vzniku, a má potenciál pozitivně ovlivňovat transkripci genů, ze kterých vzniká (Ebbesen et al., 2016).

Mezi krátké nekódující RNA patří piRNA, siRNA a miRNA. PiRNA jsou 26 až 30 nukleotidů dlouhé RNA, důležité pro epigenetické a posttranskripční umlčování transposonů v zárodečných buňkách. Molekuly siRNA jsou svou délkou, zpracováním v cytoplazmě nukleázou Dicer a tvorbou RISC komplexu s Ago proteiny (viz dále) podobné mikroRNA, ale jejich původ je exogenní. Jsou vystřihovány z dlouhých virových dvouvláknových RNA molekul a jejich vazba na cílové mRNA molekuly je silnější díky úplné komplementaritě. Jsou důležité pro zachování integrity genomu a působí negativně na expresi proteinů, s jejichž mRNA jsou komplementární (Carthew et al., 2009). Oproti tomu mikroRNA jsou molekuly endogenní.

5.5.2.3 mikroRNA

MikroRNA tvoří velkou skupinu krátkých RNA molekul s regulační funkcí. Byly poprvé popsány na přelomu dvacátého a jednadvacátého století, a od té doby jich bylo nalezeno více než 48 tisíc (Kozomara et al., 2019).

5.5.2.3.1 Počátky výzkumu mikroRNA

První mikroRNA byla nalezena v roce 1993 u modelového organismu hlístice háďátka *Caenorhabditis elegans*, a dostala označení *lin-4* (Lee et al., 1993). Tato mikroRNA sama nekódovala žádný protein, ale posttranskripčně negativně regulovala expresi genu *lin-14* (Lee et al., 2004). Její sekvence byla komplementární k 3'UTR oblasti tohoto genu. Tím byl poprvé popsán nový buněčný regulační mechanismus ovlivňující expresi genu.

Další mikroRNA nalezená v roce 2000 (Reinhart et al., 2000) u stejného organismu a nazvaná *let-7*, byla, na rozdíl od té předchozí, postupně identifikována u mnoha různých organismů, a to včetně člověka. Skutečnost, že se miR nacházejí u více organismů a účastní se zde regulace genové exprese, odstartovala intenzivní výzkum v této oblasti a v následujících letech byly nalezeny tisíce různých mikroRNA molekul, z nichž mnohé mají konzervativní sekvence společné mnoha druhům (Almeida et al., 2011).

Již v následujícím roce byla popsána biogeneze mikroRNA a záhy byly nalezeny některé mikroRNA, které jsou dysregulovány v případě některých, zejména onkologických onemocnění. Výzkum se zaměřil na hledání těch miR, které se rakovinných procesů účastní, jejichž hladiny se v průběhu těchto onemocnění signifikantně mění, a které by proto mohly sloužit jako diagnostické či prognostické markery a pomoci tak k časnější a přesnější diagnostice či výběru vhodnější léčby. V souvislosti s tím byly syntetizovány a testovány první molekuly schopné blokovat mikroRNA, tzv. antimiR, a probíhá výzkum a vývoj některých takových molekul pro léčebné využití (Feng et al., 2009). V průběhu roku 2008 bylo zjištěno, že mikroRNA lze stanovit nejen v tkáni (např. po biopsii), ale že mnohé mikroRNA se nacházejí také v tělních tekutinách, zejména v krvi, ze které je možno je izolovat. Vzorky krve/plazmy jsou u pacientů snadno získatelné v rámci standardně prováděných náběrů, a lze je nabrat i opakovaně, což přináší další velkou výhodu pro sledování jejich hladin u většího počtu pacientů, a celý výzkum se tím opět významně posunul vpřed.

V letech 2005-2006 byly nalezeny první mikroRNA, které se podílejí na vývoji kardiovaskulárního systému, a také ty, jejichž hladiny se mění v souvislosti s některými kardiovaskulárními onemocněními (van Rooij et al., 2006). Od této doby probíhají intenzivní práce na nalezení těch mikroRNA, které se účastní patogeneze těchto nemocí, a které by tak mohly přispět k zpřesnění diagnostiky či stanovení prognózy u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním. Na tuto oblast se zaměřuje i tato disertační práce.

5.5.2.3.2 Geny kódující mikroRNA

Geny kódující molekuly miR se nacházejí v molekule DNA, stejně jako geny pro ostatní RNA. Přibližně polovina genů je lokalizovaná intragenově, převážně v intronech protein kódujících (hostitelských) genů, ale mohou být kódovány i v exonech.

Druhá skupina miRNA genů je intergenová, jejich geny mají vlastní promotor, a jsou transkribovány nezávisle. Tyto geny mohou být monocistronické a kódovat pouze jednu miR, nebo polycistronické a kódovat celou skupinu mikroRNA, čítající několik jednotek až stovek různých miR (Treiber et al., 2019).

Geny kódující miR jsou transkribovány RNA polymerázou II (Lee et al., 2004), v ojedinělých případech RNA polymerázou III (Koo 2015).

5.5.2.3.3 Biogeneze mikroRNA

Krátké molekuly mikroRNA vznikají z výrazně delších prekurzorových molekul přepsaných z genů pro mikroRNA pomocí RNA polymeráz. Tyto molekuly jsou pak v jádře, kde vznikají, a v cytoplazmě, kam jsou následně z jádra exportovány, dále zpracovávány. Výsledně se váží s proteiny a v tomto komplexu pak regulují genovou expresi. Biogeneze mikroRNA je podle proteinů, které se na zpracování prekurzorových molekul podílejí, označována jako kanonická a nekanonická.

Kanonická biogeneze mikroRNA

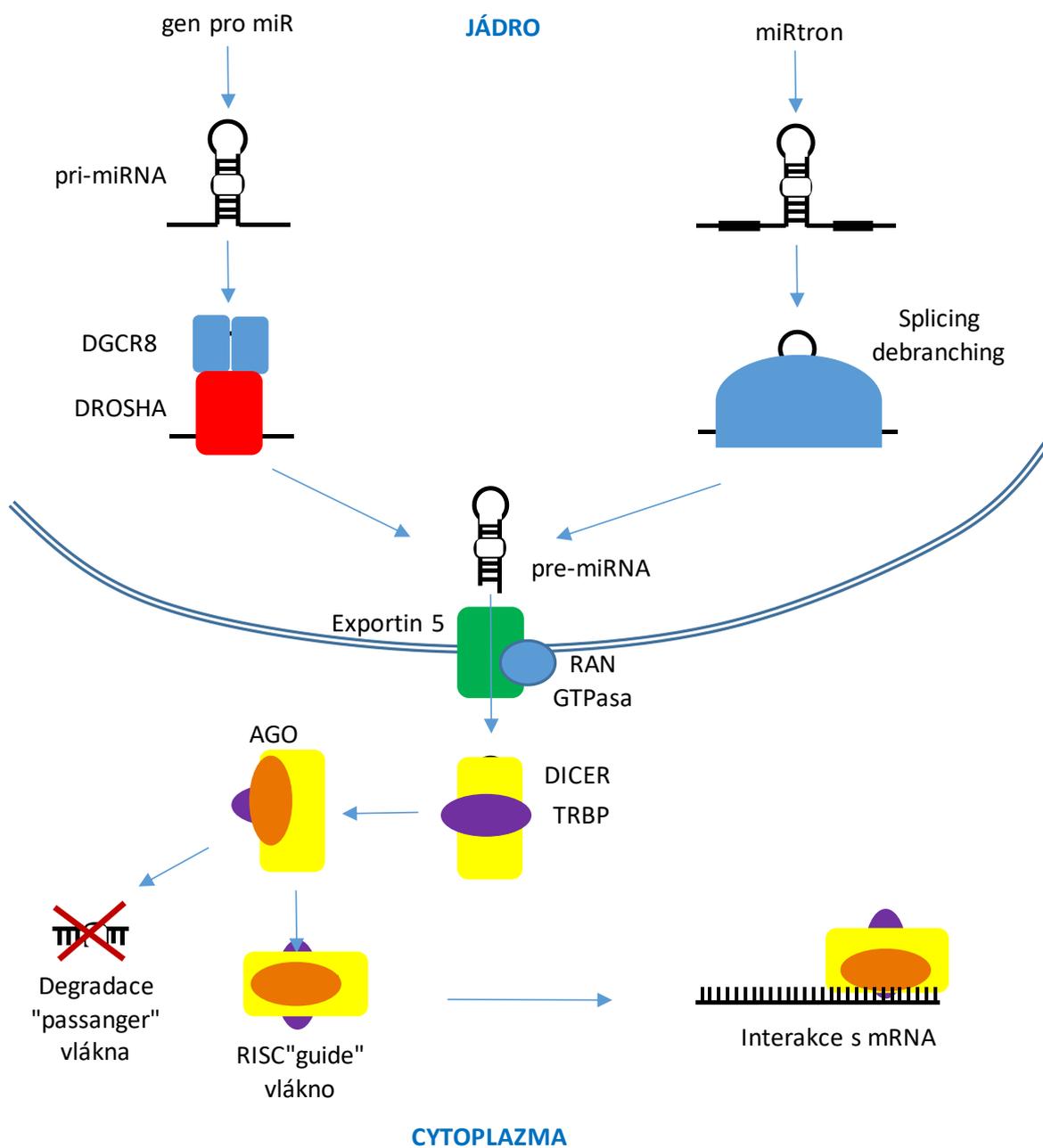
Jako kanonická biogeneze se označuje obvykle biogeneze mikroRNA z vlastních genů z intergenových sekvencí, na které se podílí dva proteinové komplexy Drosha a Dicer (O'Brien et al., 2019). Enzymy účastníci se kanonické biogeneze miR byly identifikovány na samém počátku tohoto století (Almeida et al., 2011).

Biogeneze miR začíná transkripcí genů, kdy se vytvářejí dlouhé molekuly pri-mikroRNA. Takto vzniklé molekuly mají typickou strukturu, v jejíž střední části vzniká tvar „vlásenky“ s nekomplementární kličkou („loop“) dlouhou obvykle více než 10 nukleotidů, lemovanou vzájemně částečně komplementárními segmenty, které se spojují do duplexu („stem“) v délce přibližně 35 párů bází. Oba její 5' a 3' konce jsou nekomplementární, jeden je chráněn „čepičkou“ a druhý je polyadenylován (O'Brien et al., 2019, Treiber et al., 2019).

Pri-mikroRNA jsou zpracovávány (štěpeny) komplexem RNA vazebného proteinu DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) a enzymu ribonukleázy III Drosha. DGCR8 rozeznává některé typické motivy prekurzorové molekuly (například N6-metyladenylovaný GGAC motiv) a váže se na oblast kličky, zatímco na oblast duplexu („stem“) se navazuje

enzym Drosha se dvěma katalytickými RNAza III doménami, pro který je také důležitá délka přesahujících nekomplementárních konců pri-miR a na nich přítomné motivy, které umožňují mimo jiné i vazbu faktoru SRSF3 (serine/arginine-rich splicing factor 3) stimujícího celý proces štěpení (O'Brien et al., 2019).

Drosha štěpí duplex („stem) na bázi jeho dvouvláknového segmentu a odstraňuje tak oba volné konce molekuly. Výsledně je klička zakončena komplementárním duplexem, jehož 3' konec je o dva nukleotidy delší než 5' konec. Takto vytvořená pre-mikroRNA je pomocí komplexu proteinu exportinu 5 s RAN GTPázou přenášena do cytoplazmy, kde biogeneze pokračuje. Po uvolnění z komplexu je pre-mikroRNA zpracovávána endonukleázou DICER, která má opět dvě katalytické domény (jednu pro každé vlákno). Pro navázání je důležitý dvounukleotidový převis pre-miR na 3' konci, který se váže na PIWI–Argonaute–Zwille (PAZ)-like doménu Diceru a následně určuje délku uvolněného duplexu (okolo 25 nukleotidů). Dicer pracuje v komplexu s proteinem TRBP (dsRBP trans-activation-responsive RNA- binding protein), jenž stimuluje celé štěpení a usnadňuje i vstup miR do RISC komplexu (miRNA-induced silencing complex). Při tomto zpracování je odštěpena klička a uvolněna dvouvláknová struktura (duplex) obsahující dvě částečně komplementární vlákna. Po interakci s proteinem Ago (argonaute protein) jsou obě vlákna oddělena. Jedno z nich, takzvaný „guide“ se stává součástí RISC komplexu a účastní se regulace translace. Druhé vlákno, označované jako „passenger“, je v cytoplazmě obvykle rychle degradováno (Stavast et al., 2019 a O'Brien et al., 2018) (obrázek 2). Nejčastější délka výsledných miR v RISC komplexu je 22 – 25 nukleotidů.



Obrázek 2 - Kanonická dráha biosyntézy mikroRNA a syntéza mikroRNA z intronů
 (volně podle Stavast et al., 2019 a O'Brien et al., 2018)

Nekanonická biogeneze mikroRNA

Vedle kanonické biogeneze byly objeveny i další cesty syntézy miR, u kterých je obvykle vynecháno zpracování jedním z důležitých výše uvedených nukleázových komplexů, tj. zpracování v jádře pomocí Drosha nebo v cytoplazmě pomocí Dicer.

Biosyntéza **nezávislá na Drosha** je typická pro vznik miR z **intronů**, tzv. miRtronů. Ty procházejí v jádře sestřihem jako ostatní přepsané introny, ale jejich klíčky jsou na rozdíl od miR přepsaných z jejich vlastních genů kratší a nemohou být zpracovány komplexem s Drosha. Namísto toho u nich dochází k tzv. „debranchingu“ pomocí enzymu DBR1, který otevírá lasovitou strukturu vystřiženého intronu a tvoří lineární vlákno (Stavast et al., 2019). V některých případech jsou konce miRtronů ještě příliš dlouhé a probíhá proto ještě jejich zkracování („trimming“) pomocí jaderného exoribonukleázového komplexu (RNA exosom). Výsledkem je pak pre-miRNA jako v případě kanonické biogeneze. Další export z jádra a zpracování v cytoplazmě je obdobné jako u kanonické biogeneze (O'Brien et al., 2018).

Dalším na Drosha nezávislým zdrojem miR jsou molekuly malých nukleolárních RNA (snoRNA), které jsou obvykle dlouhé 60 – 300 nukleotidů. Zdrojem miR mohou být i molekuly pre-tRNA, které nedosáhnou pomocí chaperonu La typické struktury jetelového listu, a které proto nabývají tvaru dlouhé vlásenky, jež může být zpracována nukleázovým komplexem Dicer. Takto sestřihané miR mohou s Ago vytvářet funkční RISC komplexy (Stavast et al., 2019, Treiber et al., 2019).

Nekanonická cesta biogeneze **nezávislá na Dicer** byla zatím popsána pouze u miR-145. Její prekurzorová molekula je příliš krátká, a proto nemůže být zpracována obvyklým způsobem. Namísto štěpení Dicerem je štěpena proteinem Ago-2 s endonukleázovou aktivitou a její 3' konec je následně zkrácen poly(A)-specifickou nukleázou (Cheloufi et al., 2010).

5.5.2.3.4 Mechanismus regulace genové exprese pomocí mikroRNA

Nejvíce mikroRNA působí v **cytoplazmě**, kde se stávají součástí RISC komplexů. Prvním objeveným, a také nejčastějším mechanismem účinku, je snižování množství syntetizovaných proteinů na základě interakce RISC komplexu s mRNA.

RISC interaguje s cílovými mRNA, a to na základě komplementarity nukleotidových sekvencí miR a mRNA. Tyto sekvence na mRNA se označují jako MREs (miRNA response elements), a na mikroRNA jako „seed“ sekvence, kde jsou pro interakci nejdůležitější nukleotidy v pozici 2 až 8. Stupeň komplementarity mezi miR a MRE následně rozhoduje o tom, zda bude syntéza proteinu snížena, zastavena či dojde k iniciaci degradace celé

molekuly mRNA (O'Brien et al., 2018). Podle komplementarity „seed“ a MRE, a také dalších sekvencí na obou molekulách, může být jejich vzájemná vazba nestabilní (přechodná), stabilní, může uvolnit Ago z komplexu, či stimulovat Ago ke štěpení mRNA (Jo et al., 2015).

Plně komplementární vazba v oblasti „seed“ sekvencí často indukuje nukleázovou aktivitu Ago a štěpení mRNA, ale zároveň také destabilizuje RISC, zatímco částečná komplementarita tuto aktivitu inhibuje. Ago pak působí jako mediátor vzniku většího komplexu proteinů, které se postupně váží na mRNA-RISC komplex, a ty pak spouštějí postupnou degradaci mRNA (O'Brien et al., 2018). Jako první se navazuje protein z rodiny GW182, přes který se připojují efektorové proteiny odpovědné za deadenylaci na 3' konci, či tzv. „decapping“ prostřednictvím DCP2 (decapping protein 2) odstraňující „čepičku“ na 5' konci a umožňující exonukleázovou degradaci v 5'→3' směru prostřednictvím exoribonukleázy 1 (XRN1) (O'Brien et al., 2018). Výsledným efektem této regulace je nižší množství syntetizovaného proteinu z důvodu nižšího počtu dostupných mRNA molekul v cytoplazmě či kratší životnosti těchto molekul.

MikroRNA se nacházejí a mohou působit i v **jádře** buněk, a mohou mít buď aktivační, nebo inhibiční účinek. Byly popsány tři cesty, jak se do jádra dostávají. Některé molekuly miR obsahují speciální sekvence (např. AGUGUU na 3' konci), které jim umožňují vazbu s RNA-vazebnými proteiny, které je pak transportují do jádra. Druhou cestou je import miR v komplexu s Ago-2 do jádra pomocí importinu 8 a nukleázy Dicer. Funkční RISC je pak sestaven až v jádře a interaguje s mRNA. Třetí možností je zpracování pre-miR přímo v jádře pomocí jaderného komplexu Dicer-TRBP (Stavast et al., 2019).

MikroRNA mohou fungovat podobně jako transkripční faktory a aktivovat genovou expresi interakcí s genovými promotory. Například miR-373 indukovala v buňkách karcinomu prostaty expresi cadherinu 1 tím, že se vážala na jeho promotor (Place et al., 2008). Zjištěná aktivace genů byla spojena se zvýšenou aktivitou RNA polymerázy II a modifikacemi histonů (Stavast et al., 2019).

Naopak jiné miR mohou interakcí s promotorem protein kódujících genů transkripci inhibovat. Jednou z nich je miR-552, která se navazuje na promotor genu pro lidský cytochrom P450 (CYP 2E1) a inhibuje tak jeho transkripci. Paralelně probíhá v cytoplazmě obvyklá negativní regulace translace stejného proteinu pomocí miR-552 v RISC komplexu. Tato miR tak negativně ovlivňuje produkci jednoho proteinu jak v jádře, tak v cytoplazmě, a to blokadou transkripce i translace (Miao et al., 2016).

Bylo prokázáno, že miR mohou v různých typech buněk fungovat odlišně a že jejich efekt může být ovlivněn i fyziologickým stavem. Některé miR mohou v proliferujících buňkách

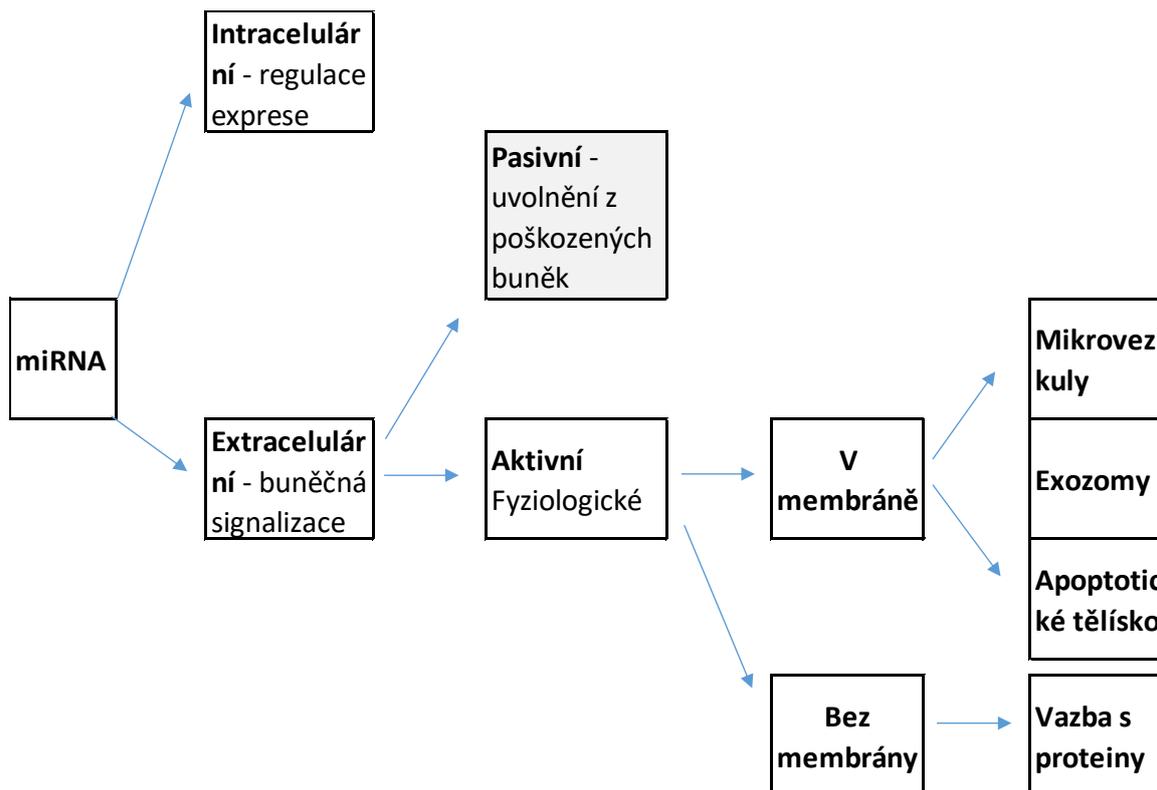
snižovat genovou expresi a naopak v neproliferujících buňkách transkripci stejných genů aktivovat (O'Brien et al., 2018).

5.5.2.3.5 Extracelulární mikroRNA (ECmiRNA)

MikroRNA vznikají v buňkách, kde se účastní genové exprese především v cytoplazmě, ale i v jádře, jak bylo popsáno v předchozích kapitolách. Z buněk (tkání) získaných při vyšetření (např. biopsii) nebo při operaci (vyoperovaná tkáň/nádor) se dají mikroRNA také dobře izolovat. Dostupnost takových vzorků je ale pro celou řadu onemocnění velmi limitovaná.

Mnoho mikroRNA je však rovněž přítomno v tělních tekutinách, jako jsou například slzy, sliny, mateřské mléko, moč, peritoneální tekutina, sperma, mozkomíšní mok, a především krev a plazma. Ukázalo se, že přesto, že jsou molekuly RNA považovány za méně stabilní a podléhají obvykle rychlé degradaci nukleázami, mikroRNA v plazmě/séru či krvi jsou relativně stabilní. Přestože v plazmě jsou přítomny exonukleázy ve velkém množství a purifikované mikroRNA po přidání do plazmy rapidně degradují, hladiny endogenních mikroRNA nejsou výrazně ovlivněny ani po 24 hodinové inkubaci při pokojové teplotě, ani po několikanásobném zmrazení a rozmrazení (Mitchell et al., 2008). Toto zjištění činí vzorky krve/ plazmy/ séra velmi užitečnými a dobře využitelnými zdroji informací o změnách hladin miR spojených s různými patologickými stavy. Rovněž to znamená, že endogenní miR jsou nějakými mechanismy v tělních tekutinách chráněny před degradací.

Molekuly mikroRNA v cirkulaci jsou přítomny obecně ve dvou formách: vázané v komplexech s proteiny, anebo uzavřené v membránou potažených vezikulách. Tyto dvě formy jsou resistantní k působení nukleáz v plazmě (Arroyo et al., 2011). Vedle toho je zde dalším možným zdrojem i frakce miR pocházející z odumřelých či poškozených buněk (obrázek 3).



Obrázek 3 - Buněčné a extracelulární mikroRNA

Extravezikulární ECmikroRNA, představující většinu cirkulujících miR, jsou nejčastěji v komplexu s Ago-2, nucleophosminem či jinými nukleoproteiny (Mori et al., 2019). Část miR je transportována v krvi v HDL nebo LDL lipoproteinech. Profily mikroRNA v HDL- a LDL-lipoproteinech jsou odlišné a liší se i od profilů v exozomech (Creemers et al., 2012). Kupříkladu miR-122 produkovaná hepatocyty je přítomna v plazmě výhradně ve formě komplexů s Ago-2 (Arroyo et al., 2011). Cirkulující mikroRNA mohou vstupovat do blízkých i vzdálenějších buněk, obvykle za spoluúčasti různých membránových receptorů a ovlivňovat zde cíleně biochemické buněčné procesy včetně genové exprese (obrázek 4) (Mori et al., 2019).

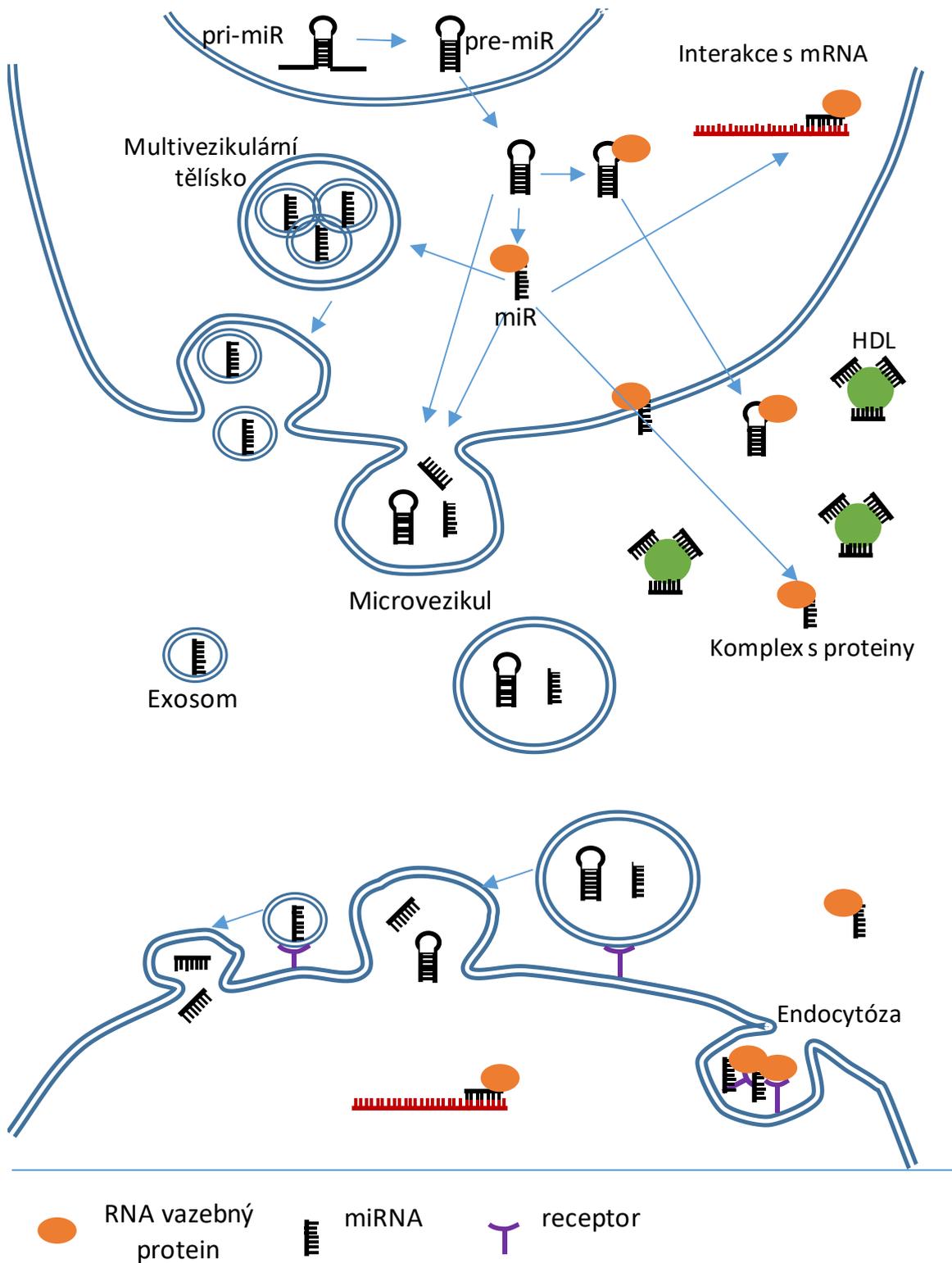
Vezikulární ECmikroRNA jsou před degradací chráněné membránou. Vesikuly se mohou od sebe lišit velikostí, obsahem, původem nebo mechanismem vzniku. Menší extracelulární vezikuly (s průměrem do 200 nm) se obvykle nazývají exosomy a jsou uvolňovány do cirkulace fúzí mulivezikulárních tělísek (které se vyvíjejí v cytoplazmě buněk z endozómů) s buněčnou membránou, tj. exocytózou. Větší vezikuly jsou označovány jako mikrovezikuly a odštěpují se z buněčné membrány „pučením“. Pokud se tímto způsobem vytvářejí menší vezikuly, jsou někdy označovány jako ektozomy (Mori et al., 2019). V membránových

vezikulách jsou vedle miR obsaženy i další složky, jako jsou molekuly mRNA nebo proteiny. Apoptotická tělíška jsou obvykle největší membránové struktury (v průměru nad 1000 nm) a obsahují vedle miR také části cytoplazmy odumírajících buněk, včetně zbytků organel a jaderného materiálu.

Vzhledem k tomu, že zastoupení jednotlivých mikroRNA ve zdrojové buňce, extracelulárních vezikulách a volně cirkulujících frakcích je často odlišné, ukazuje se, že buňky používají mikroRNA jako jednu z cest mezibuněčné komunikace či signalizace. MikroRNA vznikající v buňkách jedné tkáně tak mohou ovlivňovat nejen vlastní genovou expresi, ale i genovou expresi v buňkách sousedních či v buňkách vzdálených cílových tkání.

Profil jednotlivých miR ve vezikulách liší se od cytoplazmy zdrojové buňky znamená, že miR jsou do exosomů selektivně vybírány, a to za pomoci různých proteinů, mezi které se řadí Ago-2, hnRNPA2B, Y-box protein, a další (Mori et al., 2019). Proces tvorby membránových vezikul je rovněž ovlivněn některými membránovými proteiny, které se účastní endocytózy nebo exocytózy, tvorby exosomů nebo endozomů, a mezi které patří například calveolin-1 nebo neurální sfingomyelináza 2 (Groot et al., 2020). Zastoupení jednotlivých miR ve vezikulách se odvíjí od typu buněk, ze kterých pocházejí, a může být ovlivněno některými patologickými stavy. V srdci jsou exozomy tvořeny nejen v kardiomyocytech, ale i buňkách hladkého svalstva, fibroblastech, endotelu a dalších. Vedle mikroRNA a mRNA, bylo v těchto exosomech nalezeno i mnoho proteinů, včetně sarkomerických, cytosolových a mitochondriálních, zahrnujících i jednačtyřicet proteinů, které jsou pro ně jedinečné (Hennig et al., 2021). Srdeční exozomy ovlivňují genovou expresi v mnoha cílových buňkách a hrají tak důležitou roli v angiogenezi, apoptóze, fibróze či hypertrofii buněk (Hennig et al., 2021).

Cílové buňky mohou tyto vezikuly selektivně vylahčovat (stejně jako miR v komplexu s proteiny). Předpokládanými mechanismy vylahčování je vazba na povrchové receptory s následným ovlivněním signalizačních drah, fúze membrán cílové buňky a signálních vezikul, kdy jsou miR uvolněny do buňky či některý z typů endocytózy (Mori et al., 2019).



Obrázek 4 - Transport extracelulárních mikroRNA v cirkulaci jako součást mezibuněčné komunikace (volně podle Mori 2019 a Creemers 2012).

5.5.2.3.6 Výsledný efekt mikroRNA na fenotyp

Většina mikroRNA reguluje negativně expresi cílových genů. Jedna mikroRNA může regulovat více genů, tedy interagovat na bázi komplementarity s mnoha (i stovkami) mRNA, na kterých se nacházejí MRE. Jedna mRNA může být regulována více druhy miR (Romaine et al., 2015). Protože v buňkách je přítomna celá řada různých miR a dalších RNA, regulace pomocí miR je velmi komplexní proces. Tento jev shrnuje tzv. ceRNA (competeing endogenous RNA) hypotéza, která předpokládá soutěž mezi mRNA (na které se může nacházet více MRE) a mikroRNA na základě větší či menší komplementarity MRE a mikroRNA, do které zasahují i další skupiny lncRNA molekul, jako jsou cirkulární RNA, transkripty pseudogenů a další molekuly, u kterých se mohou vyskytovat komplementární MRE. Tyto lncRNA tak fungují jako „houby“, které na sebe navazují miR a snižují tak jejich dostupnost pro další interakce s mRNA. Výsledný efekt v buňce je tak dán nejen pozicí a počtem MRE a stupněm komplementarity, ale i aktuální dostupností (koncentrací a lokalizací) mikroRNA, mRNA a ostatních interagujících molekul v buňce (Salmena et al., 2011).

MikroRNA regulují expresi genů, ale jejich vlastní exprese je rovněž regulována na více úrovních. Regulace probíhá na úrovni posttranslačních modifikací proteinových komplexů, které se účastní biogeneze miR, a mohou tak ovlivňovat rychlost její tvorby. Mezi tyto modifikace patří především MAPK fosforylace proteinů DGCR8 a TRBP, která zvyšuje produkci miR a fosforylace Drosha provedená MAPK nebo GSK3 β na odlišných místech molekuly, kde má buď inhibiční, nebo aktivující efekt. Tlumící efekt má i ubiquitinace Drosha, která vede k její degradaci, zatímco sumoylace DGCR8 a/nebo TRBP vede ke zvýšení produkce miR a RISC (Treiber et al., 2019).

Regulace na úrovni kotranskripční či posttranskripční je více specifická a ovlivňuje hladiny jen některých miR v některých buňkách. Účastní se jí LIN28A (factor lin-28 homologue A), RNA vázající proteiny (RBP) a nekódující RNA. Kupříkladu LIN28A a LIN28B snižují produkci mikroRNA z rodiny let-7, terminální uridylyltransferázy modifikují 3'-konce některých miR s pozitivním i negativním efektem na jejich výsledné množství. Existuje celá řada již objevených RNA vazebných proteinů schopných ovlivnit hladiny určitých miR (Michlewski et al., 2019, Treiber et al., 2019).

Hladiny miR mohou být v organismu ovlivněny i geneticky, a to přítomností mutace (obvykle SNP) v genech, které je kódují, nebo v genech, které kódují proteiny účastnící se jejich zpracování. V genu kódujícím jednu z domén Drosha byla nalezena missense mutace (E1147K) s dominantně negativní efektem, která vede k celkově snížené produkci miR.

Také v genu pro DGCR8 byly nalezeny polymorfizmy (především missense mutace E518K). Obě mutace byly identifikovány ve velkém procentu případů Wilmsova nádoru (Treiber et al., 2019). Podobně i v genu pro Dicer byly nalezeny mutace v somatických i zárodečných buňkách, a to opět u některých nádorů. Ukazuje se, že přítomnost těchto SNP má i v heterozygotní kombinaci významný efekt na fenotyp (Treiber et al., 2019).

5.5.2.3.7 Mutace a SNP v genech pro mikroRNA

Rovněž v genech pro vlastní miR se objevují SNP ovlivňující fenotyp. Příkladem je mutace v oblasti kličky u pri-miR-30c-1(G27A) nalezená u pacientů s nádory prsu a žaludku, která vede k nadprodukci této miR. Změny nukleotidů miR způsobené SNP mohou generovat změnu jejich sekundární struktury a ovlivnit tak rychlost jejich zpracování jednotlivými nukleázovými komplexy (Michlewski et al., 2019). Polymorfizmy v miR-124a (rs531564), miR-146a (rs2910164), miR-27a (rs895819) a miR-34a (rs72631823) mají vztah k rozvoji diabetu. SNP v genech pro miR-196a2 (rs11614913), miR-499 (rs3746444) a pre-miR-27a (rs895819) se uplatňují v patogenezi kardiovaskulárních chorob (Elfaki et al., 2019).

U myomiR, mikroRNA specifických pro sval a srdce, byl identifikován polymorfismus 79T > C MIR133A2 ovlivňující zpracování této miR a vedoucí ke kumulaci „passenger“ vláknů namísto jeho obvyklé degradace. Obě vlákna (miR-3p i miR-5p) se stávají součástí RISC komplexů a regulují rozdílné cílové geny ovlivňující odlišně některé biologické procesy v buňkách srdce (Ohanian et al., 2013), což může následně ovlivnit i výsledný fenotyp. Mutace U17C v kardiospecifické miR-499 (v 3'-oblasti, mimo „seed“ sekvenci), která se vyskytuje v populaci velmi řídky, mění její vazbu s mRNA, a následně i výsledný supresivní efekt u skupiny cílových genů ve srovnání s nemutovanou variantou. Byly pozorovány změny v motilitě a fosforylaci proteinů s následným pozitivním efektem na srdeční kontrakci (Dorn et al., 2012). Další polymorfismus v genu pro miR-499 (rs3746444) vedoucí k A→G změně v sekvenci pre-miR-499 snižuje její hladiny, a tím i inhibiční účinek na cílové geny. Snižuje se tím antiapoptotický efekt miR-499, zmírňuje obvykle výrazný nárůst jejích hladin u pacientů s AIM a zvyšuje se závažnost tohoto onemocnění. Nositelé této mutované alely měli ve srovnání s kontrolní skupinou zhoršenou i funkci levé komory, tj. sníženou EFLK (Ding et al., 2018). Stejný polymorfismus má vztah i k výskytu ischemické mozkové mrtvice, kdy nositelé alely G (genotypy GG a GA) mají vyšší riziko této příhody (OR = 1,455) (Luo et al., 2017).

I když je zatím počet nalezených SNP v molekulách miR/pre-miR relativně nízký (v přibližně deseti procentech) a jejich výskyt v „seed“ sekvencích ojedinělý (pod jedno procento) a

většina z nich nemá zatím prokázaný vztah k fenotypu (Saunders et al., 2006), přesto se některé z nich mohou v patogenezi různých onemocnění uplatnit.

5.5.2.3.8 mikroRNA v rozvoji KV chorob

V posledních letech jsou popisovány změny expresních hladin mnoha mikroRNA u nejrůznějších skupin chorob. Poprvé byly popsány dysregulace hladin miR u onkologických onemocnění, a z této oblasti také pochází celá řada důležitých poznatků. Záhy potom byly nalezeny i změny hladin některých miR u kardiovaskulárních onemocnění, mezi prvními u hypertrofie myokardu a srdečního selhání (van Rooij et al., 2006). Hladiny těchto miR byly sníženy nebo zvýšeny, někdy korelovaly s jinými, pro onemocnění důležitými parametry, a byly stanovovány v tkáních nebo tělních tekutinách, nejčastěji v plazmě. Účinek těchto miR na patologický proces může být jak pozitivní (zpomaluje či zabraňuje progresi onemocnění, například svým antihypertofickým působením na buňky myokardu), tak negativní (urychluje progresi onemocnění).

U srdečního selhání bylo již popsáno více než 30 miR se změněnou hladinou, některé (např. miR-223) spojené se zvýšeným rizikem úmrtí do 180 dnů. Pokles hladin miR-1 koreloval u pacientů se stupněm NYHA (Ovchinnikova et al., 2016). Jiné miR, např. miR-208, miR-328, miR-499 a miR-29, byly dysregulovány u arytmií (Zhou et al., 2018).

Postupně jsou identifikovány a potvrzovány skupiny genů regulované jednotlivými mikroRNA, a údaje o miR a jejich cílových genech jsou sumarizovány v databázích, například miRbase, nebo miRTarBase. Mnoho cílových genů je predikováno na základě komplementarity se „seed“ sekvencemi miR, některé jsou již experimentálně validované, obvykle pomocí metod jako je reporter assay, western blot, kvantitativní PCR, microarray nebo next-generation sequencing (NGS). Kupříkladu miR-499, jejíž hladiny jsme sledovali i v našich analýzách zaměřených na KV choroby (Hromádka et al., 2019, Slouka et al., 2021), ovlivňuje expresi genů SOX6 (SRY-box transcription factor 6), FOXO4 (forkhead box protein O4), PDCD4 (programmed cell death protein 4), ETS1 (ETS proto-oncogene 1), pro které existují silné experimentální důkazy (strong evidence), a pravděpodobně ještě mnohé další (Huang et al., 2022). Uvedené proteiny jsou převážně transkripční faktory, které se účastní genové exprese celých skupin dalších genů, které jsou zapojeny do různých biologických procesů, z nichž mnohé jsou důležité i pro KV systém. Mezi tyto biologické procesy patří zejména proliferace, diferenciací a apoptóza buněk cévního endotelu, hladké svaloviny cév a/nebo kardiomyocytů, angiogeneze a také zánět (UniProt 2021). I kardiospecifická miR-208 má experimentálně potvrzeno mnoho cílů, a nejsilnějšími důkazy (strong evidence) u genů CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) účastnicího se

regulace buněčného cyklu a apoptózy, MED13 (mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13) ovlivňujícího obecně transkripci velkého množství dalších genů touto polymerázou a ETS1 majícího vztah jak k apoptóze a buněčnému cyklu, tak k buněčné motilitě, angiogenezi a zánětu (Huang et al., 2022, UniProt 2021).

Některé mikroRNA, u nichž je známa role v patogenezi jednotlivých onemocnění, mohou sloužit jako biomarkery přispívající k prognóze nebo diagnóze těchto nemocí. První z nich se dostávají do centra výzkumu i jako cílové molekuly potenciální farmakologické léčby.

5.5.2.3.9 mikroRNA jako terapeutický cíl

K některým miR, u kterých byl jejich účinek již potvrzen, a hraje důležitou negativní či pozitivní roli v patogenezi onemocnění, byly již vyrobeny molekuly s antagonistickým či agonistickým účinkem (tzv. anti-miR nebo agomiR) a jsou v různém stupni testování. Některé z těchto molekul mají potenciál stát se v budoucnu léky, kterými bude patologický proces možné příznivě ovlivnit (Zhou et al., 2018).

Velký zájem o tuto skupinu molekul potvrzuje i skutečnost, že byly podány v USA i Evropě desítky tisíc patentů na substance ve vztahu k mikroRNA, z nichž většina spadá do oblastí onkologie, ale zastoupeny jsou i jiné skupiny diagnóz včetně KV onemocnění. Některé látky jsou v preklinickém zkoušení, například miR-15 a miR-145 v léčbě pacientů po AIM, miR-143/145 v léčbě cévních onemocnění nebo miR-29 v léčbě fibrózy srdce. Jiné již vstoupily do první fáze klinického testování, jako miR-34a v léčbě různých typů nádorů, miR-92 v regulaci ischemie a tvorby cév nebo miR-29 u různých typů fibrózy. miR-122 je již v druhé fázi klinických testů v léčbě virové hepatitidy typu C (Chakraborty 2020). Ve druhé fázi je i miR-29 (Remlarsen od firmy miRagen), a to v regulaci kožní fibrózy, kde byl podáván injekčně zdravým dobrovolníkům. Protože miR z této rodiny regulují (snižují) fibrózu ovlivněním TGF- β (transforming growth factor β) a extracelulární matix, byly zde její cílové geny (celkem 21 včetně genů pro kolagen a elastin) použity jako kontrola účinku použitého miR-29 mimika. Látka ukázala pozitivní efekt v oblasti hojení kožního poškození bez tvorby fibrotických jizev, a tlumila tak fibrózu (Gallant-Behm et al., 2019).

Ze skupiny „myomiR“ je v preklinickém testování u srdečního selhání látka Mgn-9103 působící antagonisticky na miR-208. Tato miR je tak nejen potvrzeným diagnostickým a prediktivním markerem (Lee et al., 2021), ale i potenciálním terapeutickým cílem (Chakraborty et al., 2020).

5.5.2.4 Nekódující RNA a jejich další funkce

Do skupiny nekódujících RNA patří dále malé jadéřkové RNA (small nucleolar RNA - snoRNA), malé jaderné RNA (small nuclear RNA - snRNA), a některé další. SnoRNA jsou důležité v biogenezi dalších RNA molekul (snRNA, rRNA nebo tRNA) a jejich chemickou modifikaci, zejména pseudouridylaci a metylaci. Z některých může být nekanonickou biogenezi tvořena i mikroRNA (Treiber 2019). SnRNA jsou modifikované pomocí snoRNA, nacházejí se v komplexech s proteiny ve spliceosomech a jsou důležité pro správnou biogenezi mRNA.

5.5.2.5 Ribosomální RNA (rRNA)

Ribosomální RNA tvoří převažující podíl veškeré buněčné RNA. Geny pro rRNA se nacházejí na krátkých raméncích akrocentrických chromozómů 13, 14, 15, 22 a 21, a to v mnoha za sebou jdoucích kopiích. Tyto oblasti se nazývají NOR (nucleolus organizer region) a vytvářejí buněčné jadérko. Kódují rRNA 18S, 5,8S a 28S, které jsou přepisovány společně RNA polymerázou I do prekurzorové molekuly pre-rRNA (45S). Následně se vyštěpují oblasti mezi jednotlivými rRNA (tzv. spacers) a vznikající rRNA molekuly se spojují s ribosomálními proteiny, které přicházejí z cytoplazmy, aby vytvořily funkční ribosomální podjednotky. Na celém procesu se podílejí i snoRNA přepisované RNA polymerázou II, které chemicky modifikují rRNA (ale také tRNA), především metylací a pseudouridylací.

Poslední ze čtyř rRNA (5S rRNA), které se nachází v ribozomech, je přepisována RNA polymerázou III jako pre-5S rRNA mimo oblast jadérka, do kterého se následně dostává, a je zde také dále zpracovávána.

Ribosomální podjednotky, které jsou kompletovány v jadérku, jsou následně exportovány do cytoplazmy. Velká podjednotka ribozomu (60S) obsahuje vedle proteinů 5S, 5,8S a 28S rRNA. Malá podjednotka (40S) obsahuje jedno vlákno 18S rRNA. Ribozomy syntetizují všechny proteiny v buňce podle informace přinášené molekulami mRNA z jádra. Ribozomy se nacházejí v buňce buď volně v cytoplazmě, nebo připojené k membránám endoplazmatického retikula, kde jsou vytvářeny proteiny zejména pro export z buňky nebo pro vlastní retikulum, membrány, Golgiho aparát či lysozomy. Proteiny určené pro tyto destinace mají na svém počátku signální sekvenci (signal sequence), která je rozeznávána v cytoplazmě signál rozpoznávající částicí (signal recognition particle, SRP). Tato částice je také ribonukleoprotein, který se podílí na proteosyntéze tím, že se váže na nově vznikající peptid, který pak společně s ribozomem přináší k membráně endoplazmatického retikula, kde je protein vsunut do kanálu v jeho membráně a celá proteosyntéza pak

pokračuje směrem do lumen této organely. Proteiny jsou tak od počátku odděleny od cytoplazmy.

Syntéza proteinů pro ribozomy je rovněž regulována pomocí mikroRNA. Například miR-10 je schopna za určitých podmínek vazbou na 5' UTR aktivovat syntézu ribosomálních proteinů a tím nepřímo zvyšovat celkovou proteosyntézu buňky (Ørom et al., 2008). Ukazuje se, že biosyntéza ribozomů je prostřednictvím miR (a ve spolupráci s lncRNA) regulována ve více krocích a vedle vlastní translace ribosomálních proteinů mohou některé miR ovlivňovat i produkci rRNA na několika úrovních od transkripce pre-rRNA (miR-424-5p, miR-504), přes zpracování rRNA (miR-7), až po sestavení ribosomálních podjednotek (miR-595) (McCool et al., 2020).

Při kanonické negativní regulaci proteosyntézy v cytoplazmě vazbou miR-RISC komplexu na MRE na molekule mRNA pak miR buď zabraňují iniciaci translace (a tím vazbě ribosomálních podjednotek) nebo pokračování již započaté translace zpomalením translace či uvolněním ribosomálních podjednotek z vlákna mRNA (Khan et al., 2020).

5.5.2.6 Transferová RNA (tRNA)

Transferová tRNA je adaptorovou molekulou, která umožňuje překlad kodónu mRNA do sekvence aminokyselin, a je zodpovědná za začlenění správných aminokyselin do rostoucího polypeptidového řetězce ve správném pořadí. V lidském genomu je 497 genů pro tRNA (Landers et al., 2001), dalších 22 genů se nachází v mitochondriálním genomu. Každá molekula tRNA je vždy specifická pro jednu danou aminokyselinu. Transferové RNA jsou přepisovány RNA polymerázou III jako větší prekurzorové molekuly, které jsou v jádře za pomoci mnoha enzymů (včetně P ribonukleázy) dále zpracovávány a modifikovány do finální podoby. Enzym P-ribonukleáza je zajímavý tím, že se jedná o ribozym neboli ribonukleoprotein, který sám obsahuje vedle peptidové složky i RNA. Tento enzym se podílí na posttranskripčních modifikacích RNA transkribovaných RNA polymerázou III, jako jsou tRNA, 5S rRNA, snRNA, SRP RNA.

Po finálním zpracování jsou tRNA molekuly malé řetězce RNA (4S) v délce přibližně 75-90 nukleotidů, které po předchozí metylaci a editaci obsahují některé neobvyklé nukleosidy, jako jsou inosin, pseudouridin, dihydrouridin nebo methylguanosen (Snustad et al., 2009). Mají strukturu „jetelového listu“, kdy na 3'-konec jsou aminoacyl-tRNA-syntetázami navazovány příslušné aminokyseliny, a na klíče přibližně v polovině molekuly se nalézají antikodon komplementární ke kodonu na molekule mRNA. Při translaci se pak tRNA navazují na aminoacylové místo ve velké podjednotce ribozomu.

Nekanonické zpracování prekurzorových molekul tRNA je zdrojem miR odvozených od tRNA. Některé nesprávně strukturně uspořádané molekuly tRNA mohou nabývat podobného vlásenkovitého uspořádání jako prekurzorové molekuly miR (Treiber et al., 2019). Po transportu do cytoplazmy pomocí exportinu je molekula modifikována pomocí DICER a angiogeninu a vzniklý fragment je začleněn do RISC komplexu (Statvast et al., 2019).

6 Metodika

V publikacích v příloze I byly užity metody izolace mikroRNA a jejich kvantitativního stanovení.

6.1 Izolace mikroRNA

Molekuly miR se nacházejí v buňkách i v tělních tekutinách, ze kterých je lze izolovat pomocí různých metod. Výhodou těchto molekul je relativně dobrá stabilita, takže je možné je izolovat i ze zmražených vzorků se středně dlouhým časovým odstupem, a to i po několikanásobném zmrazení a rozmrazení (Mitchell et al., 2008). V našich publikacích z Přílohy I jsme prováděli ve většině případů izolaci miR z plazmy, v jedné práci z tkáně aorty.

6.1.1 Izolace mikroRNA z plazmy

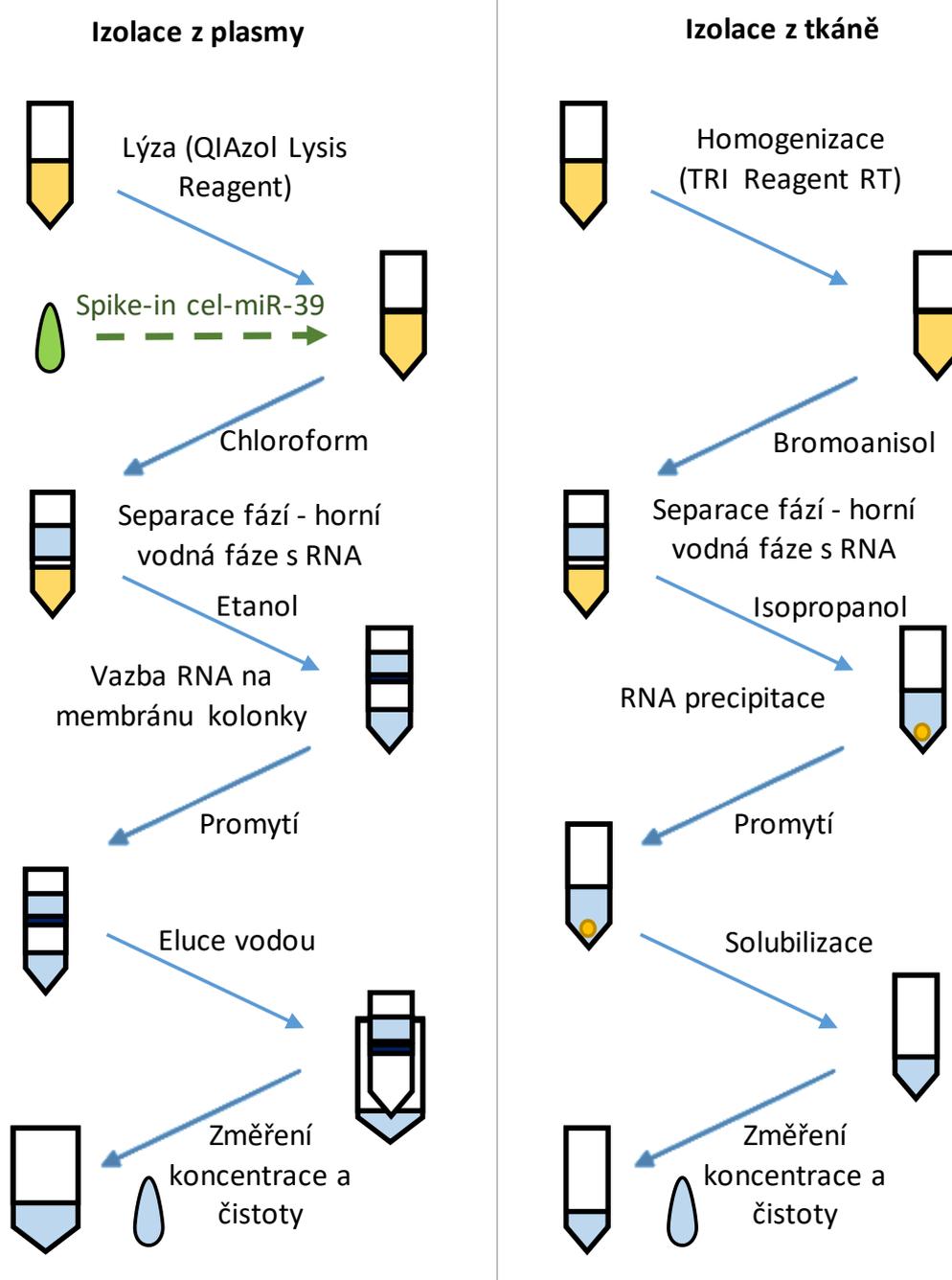
Všechny vzorky plazmy byly odebrány na klinických odděleních FN Plzeň během klinicky indikovaných náběrů (do zkumavek EDTA), zpracovány, odděleny a zamraženy na Ústavu klinické biochemie a hematologie. Všechny vzorky byly skladovány při teplotě -80°C až do izolace.

Každý vzorek plazmy byl po rozmrazení, bezprostředně před izolací, znovu centrifugován, aby se odstranily případné buněčné fragmenty. Následně bylo k izolaci použito 200 μl zcentrifugovaného vzorku, který byl zpracován v souladu s firemním protokolem na membránových kolonkách firmy Qiagen (izolační miRNeasy Serum/Plasma Kit). Při zpracování se nejprve odstraňují proteiny a zbytky DNA (za použití fenolu, guanidinu thiocyanátu a chloroformu), čímž se rovněž inhibuje nukleázová aktivita ve vzorku a RNA je v izolátu chráněná před degradací. V horní vodné fázi pak zůstávají molekuly RNA, zatímco v dolních vrstvách jsou DNA a vysrážené proteiny. Z oddělené vodné fáze se RNA váže po přidání etanolu na silikátové membráně a po promytí a vysušení membrány je eluována do vody s nulovou ribonukleázovou aktivitou (RNase-free water) (obrázek 5).

U všech vzorků byla ihned po izolaci zjišťována orientační koncentrace a čistota miR na spektrofotometru Nanodrop, kde postačuje ke změření potřebných koncentrací jen 1 μl izolátu. Vzhledem k relativně malému objemu eluátu a nízké koncentraci RNA je důležité, že pro tento způsob měření se spotřebuje pouze takto malé množství. Nukleové kyseliny mají maximum absorpance při 260 nm. Poměr absorpance 260 nm/280 nm pak ukazuje na čistotu vyizolované RNA, která je považována za dostatečně čistou, pokud se pohybuje

okolo hodnoty 2 (nízký poměr bývá znakem kontaminace proteiny nebo může být také způsoben velmi malou koncentrací RNA ve vzorku) (ThermoFisher 2012). Vzorky po tomto měření byly ihned zmrazeny a skladovány při teplotě -80°C.

Do vzorků byla v počáteční fázi izolace (před přidáním chloroformu) přidávána cel-miR-39 jako normalizační kontrola (spike-in control). Po provedení real time PCR slouží tato miR, která se u člověka nevyskytuje, k normalizaci rozdílů mezi kolísající výtěžností izolace a/nebo efektivitou samotné PCR reakce.



Obrázek 5 - Postup izolace miR ze vzorků plazmy a z tkáně aorty

6.1.2 Izolace mikroRNA z tkáně

Pro izolaci miR z vyoperovaného úseku aorty byly použity alikvoty odpovídající 0,123 cm³ tkáně, které byly zmrazeny v tekutém dusíku, a dále rozdrčeny na homogenní prach, který byl přenesen do 1ml chlazené TRI Reagent®RT zkumavky. Dále byla RNA izolována podle protokolu výrobce. Po homogenizaci tkáně byl pomocí bromoanisolu a další centrifugace separován vzorek na vodnou fázi (ve které se nachází molekuly RNA) a organickou fází (obsahující DNA a proteiny). RNA byla následně vysrážena z odebrané vodné fáze přidáním isopropanolu a promyta etanolem. Princip jednotlivých kroků je podobný jako u izolace miR z plazmy (Obrázek 5). Vyizolovaná RNA byla rozpuštěna ve vodě s nulovou ribonukleázovou aktivitou (RNase-free water) a její koncentrace a čistota změřena spektrofotometricky na přístroji Infinite M200 instrument. Vyizolované vzorky byly zmrazeny a skladovány při teplotě -80°C.

6.2 Kvantifikace cirkulujících a tkáňových mikroRNA

U vzorků získaných z **plazmy** byly stanovovány relativní koncentrace omezeného panelu vybraných cirkulujících miR. Jednotlivé miR do tohoto panelu byly zvoleny na základě literární rešerše, kde byly vybrány cirkulující miR mající pravděpodobný vztah k danému typu onemocnění nebo k cílovým tkáním (tabulka 1).

Tabulka 1 - Panel sledovaných miR

Publikace	Pacienti	Počet vzorků	Počet miR	Panel miR
Hromádka et al., 2019	AMI	122	4	miR-1,miR-133a, miR-208b, miR-499
Slouka et al., 2021	OSAS	244	3	miR-1,miR-133a, miR-500
Mayer et al., 2019	Sekundární prevence po KV příhodě	826	10	miR-1,miR-133a, miR-208b, miR-499, miR-21, miR-34a, miR-126, miR-223, miR-197, miR-19a, miR-214

Ke kvantifikaci byla užita metoda PCR (polymerase chain reaction). Tato metoda byla navržena v roce 1983 a od té doby nalezla široké využití v laboratořích zkoumajících přímo či nepřímo živé organismy. V medicíně se využívá zejména ve výzkumu, diagnostice a soudním lékařství.

Metoda PCR slouží k amplifikaci předem definovaných úseků DNA, kdy z minimálního množství výchozí DNA vznikají miliardy identických kopií vybraného amplifikovaného úseku. Ty mohou být využity k dalším kvantitativním či kvalitativním analýzám, jako jsou

například sekvenace či identifikace polymorfizmů. PCR je založena na mnohonásobném opakování stejného cyklu jednotlivých kroků, v kterém se vždy (v ideálním případě) zdvojnásobí počet cílových molekul DNA ve vzorku. Cyklus začíná denaturací DNA, při které se oddělují komplementární vlákna DNA přerušením vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi pomocí vysoké teploty (obvykle mezi 94 a 98°C). V následujícím kroku, při kterém je snížena teplota (obvykle na 50 až 65°C) dojde k hybridizaci oddělených DNA vláken s přidanými primery, které tak ohraničují (definují) úsek DNA, který se v reakci amplifikuje. Primery jsou krátké, uměle nasyntetizované úseky DNA, které jsou komplementární k vybraným úsekům obou původních vláken DNA. Tyto primery slouží jako počátky replikace pro přidanou termostabilní DNA-polymerázu, obvykle Taq DNA polymerázu (enzym izolovaný z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*), která syntetizuje DNA při teplotě mezi 70 až 80°C. Na počátku reakce jsou ke vzorku přidány všech potřebné chemikálie, primery, deoxyribonukleotidy a DNA polymeráza na celou PCR reakci.

V PCR cyklu se v krátkých intervalech opakovaně mění teploty spouštějící jednotlivé kroky reakce. Počet cyklů určuje výsledné množství DNA kopií, které s počtem cyklů exponenciálně narůstá. Jedna PCR reakce zahrnuje obvykle 30 až 45 cyklů.

V laboratořích se nejčastěji používá klasická PCR (end-point PCR), kdy je vzniklý produkt detekován a analyzován po ukončení PCR reakce, a nebo real-time PCR, která umožňuje detekci a kvantifikaci PCR produktu již v průběhu reakce a patří tak do kategorie kvantitativní PCR (qPCR).

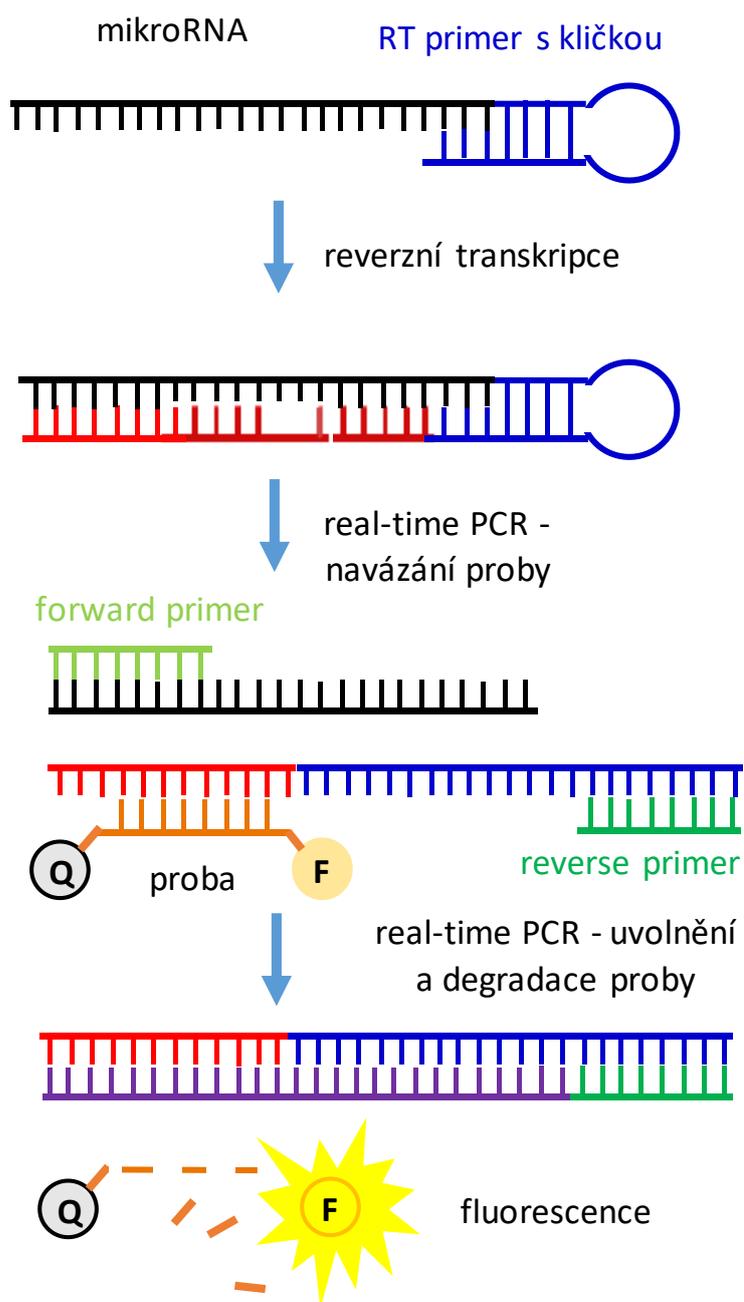
V naší práci jsme stanovovali expresní hladiny mikroRNA. V tomto případě je výchozí molekulou krátká RNA molekula čítající přibližně 22 nukleotidů. V prvním kroku byla tato miR přepsána do komplementární DNA (cDNA) pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Vzhledem k velmi malé délce výchozích miR byly použity specifické primery se strukturou kličky (loop) a komplementárních sekvencí tvořících duplex (stem), které tvoří s miR chimérickou molekulu a prodlužují tak její vlákno na 3' konci.

Reverzní transkripcí vytvořená cDNA byla v druhém kroku kvantifikována pomocí real-time PCR metody, která umožňuje sledovat narůstající počet nově vzniklých molekul v reakci za pomoci fluorescence. Do reakce je přidána sonda (proba), která se váže k amplifikované DNA, a na které je kovalentně vázán fluorofor (F) a zhášec (Q quencher), který ruší fluorescenci fluoroforu. V průběhu syntézy DNA, kdy Taq-polymeráza vytváří komplementární vlákno, zároveň svou nukleázovou aktivitou degraduje sondu a uvolňuje fluorofor z jeho vazby. Bez přítomnosti zhášeče se objevuje fluorescence uvolněných molekul fluoroforu, která se zvyšuje s počtem nasyntetizovaných vláken DNA (obrázek 6).

Tako fluorescence je měřena a zaznamenána po každém cyklu PCR reakce, je vynesena do grafu oproti číslu cyklu a dává výsledně klasickou křivku ve tvaru písmene S, na které je možné rozeznat 3 fáze. První fáze je exponenciální, kdy se počty molekul skutečně při každém cyklu zdvojnásobí a je následována lineární fází, kdy se reakce zpomaluje díky vyčerpání či degradaci některých komponent. Nakonec nastupuje plateau fáze, kdy se amplifikace zastavuje.

Vzhledem k velkému počtu vzorků, a tím i velkému počtu real-time PCR destiček, byly k vyrovnání rozdílů mezi nimi používány kalibrátory. Jako normalizační kontrola (spike-in control) byla použita referenční cel-miR-39. Expresní hladiny měřených miR byly vyjádřeny relativně za použití metody delta Ct, která vyjadřuje násobné rozdíl mezi měřenou miR a referenční cel-miR-39. Finální výpočet koncentrace byl pak proveden podle vzorce $2^{-\Delta Ct}$, kde $\Delta Ct = Ct_{miR-měřená} - Ct_{miR-39}$.

Při stanovování relativních expresních hladin miR je stále vedena debata o možné normalizaci dat, sloužící k odstranění rozdílů mezi jednotlivými vzorky vzniklými v průběhu sběru a zpracování vzorků. K normalizaci je možno použít syntetickou či biologickou miR, geometrický průměr všech detekovaných miR anebo panel endogenních referenčních RNA, zahrnujících např. miR-16. V případě stanovení cirkulujících mikroRNA z krve, destiček či séra již existují takové doporučené panely, například pro sérum se jedná o kombinaci miR-1260, miR-1280, miR-484 a miR-718. Pro plazmu však zatím takový normalizační panel, který by splňoval potřebná kritéria, nalezen nebyl. Pravděpodobně proto, že k získání plazmy je potřeba centrifugace krve při vysokých otáčkách a tím dochází ke ztrátě některých složek, například proteinových a lipidových komplexů (de Ronde et al., 2018). To je také jeden z důvodů, proč byla v našich stanoveních zvolena normalizace pomocí exogenní cel-miR-39.



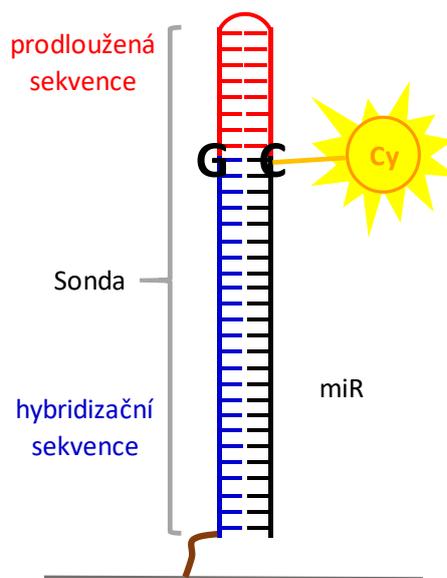
Obrázek 6 - Princip stanovení expresních hladin miR u real time PCR

U porovnání hladin miR ve vzorcích **tkání** (stěny aorty) byla situace opačná. Byl hodnocen celý panel u člověka známých miR (dostupných pro tuto analýzu), ale u omezeného počtu případů vyoperovaných vzorků aorty s aneurysmatem nebo bez patologických změn (tabulka 2).

Tabulka 2: Panel sledovaných miR u aneurysmat aorty

Publikace	Tkáň	Počet vzorků	Počet miR	Panel miR
Černá et al., 2019	Aneurysma aorty / kontrolní tkáň	21	2549	všechny dostupné pro tuto analýzu

Pro zjištění celkového miR profilu v tkáni byla použita metoda čipů (array), která umožňuje v jedné reakci stanovit vysoký počet miR (v našem případě všechny v té době známé lidské miR). Principem mikroRNA array je opět hybridizace izolované mikroRNA s komplementární sekvencí (sondou) a měření intenzity fluorescence jako ukazatele relativní koncentrace určité miR ve vzorku. Na rozdíl od předchozí metody jsou sondy pro jednotlivé miR ukotveny k pevnému povrchu čipu, což umožňuje připojení velkého množství sond na jeden čip a jejich přesnou lokalizaci. Všechny miR ve vzorku jsou před hybridizační reakcí označeny fluoroforem (obvykle Cyaninem 3), který byl užit i v naší reakci (obrázek 7). Vzorek se značenými miR byl nanesen na čip a po uplynutí doby nutné pro hybridizaci byl zbytek vzorku z čipu opláchnut. Pevně navázané miR s fluoroforem zůstávají komplementárně připojené ke svým sondám a jsou zdrojem fluorescence, která je přístrojově změřena a vyhodnocena (skenování čipu). Touto metodou je možné najít celý panel silně exprimovaných miR v určitém typu buněk nebo v tělní tekutině, či (při porovnání s jinými buňkami) panel miR se signifikantně odlišnou expresí. V naší práci byl hledán panel miR z buněk stejné tkáně s a bez patologických změn.



Obrázek 7 - Princip stanovení expresních hladin miR u miRNA microarray (Agilent).
Při značení Cyaninem 3 (Cy) je C zbytek přidán na 3' konec miR, komplementární ke G zbytku na hybridizační sondě, a jejich vzájemná interakce stabilizuje vazbu.

V oblasti analýzy nukleových kyselin je tato metoda čipů (microarray) široce použitelná pro zjišťování genové exprese, včetně exprese RNA (např. mRNA, miRNA, siRNA), detekci jednonukleotidových polymorfizmů nebo alternativního sestřihu (splicing), analýzu genomu aj. Ve srovnání s předchozí metodou real-time PCR (miRNA assay) poskytuje tato metoda velký počet informací z jednoho vzorku. Nevýhodou je pouze relativní kvantitativní stanovení, možnost vzniku chyb v důsledku vysycení sondy na čipu v případě vysokých koncentrací detekovaného oligonukleotidu či naopak absence signálu při jeho velmi nízké koncentraci a v neposlední řadě též poměrně vysoká cena.

6.3 Statistické metody

Při vyhodnocování výsledků jednotlivých prací byly použity různé statistické metody. Popisná statistika pro základní charakteristiku souboru a výsledků zahrnovala především průměr, medián, statistickou odchylku, interval spolehlivosti, percentily, kvartily, procenta, standardní chybu. Při zjišťování korelace byl použit Spearmanův korelační koeficient a pro porovnání dvou či více skupin Mann-Whitney test, t-test a Fisherův exaktní test. U Kaplan-Meierových křivek přežití byl použit Mantel-Cox log-rank test. Dále byl použit Cox regresní model pro odhad rizika a ROC analýza pro nalezení diskriminačního limitu (cut-off value).

7 Výsledky a diskuse

V níže uvedených kapitolách jsou společně uvedeny výsledky a diskuse k publikacím v příloze I. Práce Hromádka et al., 2019, Mayer et al., 2019 a Slouka et al., 2021 se týkají mikroRNA ve vztahu k onemocnění srdce, zejména myokardu, a práce Černá et al., 2019 se zaměřuje na miR spojené s onemocněním cév, jmenovitě aneurysmatem aorty.

7.1 mikroRNA u onemocnění srdce

Srdce je orgán, který pumpuje krev do celého těla. Za jeden průměrný život jím projde přibližně 200 milionů litrů krve (Bossone et al., 2021). Okysličená krev odchází aortou do oběhu, a z aorty také vystupují jako první arterie, které zásobují samotné tkáně srdce. Stěny srdce mají základní tři vrstvy: endokard (tunica intima) s buňkami převodního systému, myokard (tunica media) se dvěma až třemi vrstvami srdeční svaloviny a perikard (tunica serosa) s hustou sítí koronárních cév. V klidu protéká koronárními cévami přibližně 250 ml krve za minutu, což představuje asi 10 procent celkové spotřeby kyslíku. Při zátěži se spotřeba kyslíku zvedá čtyřikrát až pětkrát (Silbernagl, 2015). Žíly pak odvádí odkysličenou krev zpět do pravého atria.

Nejčastějším onemocněním srdce je ischemická choroba srdeční. Její akutní formy, při kterých dojde k ischemii v důsledku blokády či významného omezení průtoku krve v některé ze srdečních arterií, a které bezprostředně ohrožují pacienta na životě, vedou k hospitalizaci (akutní koronární syndrom) nebo přímo ke smrti (náhlá srdeční smrt). Po zvládnutí akutní ICHS (například po nefatálním AIM) se pacient stane chronickým pacientem v sekundární prevenci. Pacient je dále v péči praktického lékaře, který spolupracuje s kardiologem nebo internistou (Hradec et al., 2018).

V posledních patnácti letech byla nalezena řada mikroRNA, které se podílejí na vývoji srdce, na jeho regulaci a také na rozvoji různých kardiovaskulárních chorob. V roce 2006 byly poprvé popsány změny hladin některých miR u srdečního selhání, které vzniká nejčastěji jako důsledek ICHS. V srdeční tkáni byly nalezeny zvýšené hladiny miR-24, miR-125b, miR-195, miR-199a a miR-214 a byla experimentálně prokázána schopnost zejména miR-195 vyvolat hypertrofický růst kardiomyocytů (van Rooij 2006).

MikroRNA jsou nezbytné již pro správný vývoj srdce během embryogeneze. Absence stěžejních proteinových komplexů účastnících se biogeneze miR, jako Drosha, Dicer nebo Ago, jsou obvykle letální. Mir-1 a miR-133 podporují diferenciaci mesodermu z embryonálních kmenových buněk a později ovlivňují diferenciaci kardiomyocytů. Mnoho dalších miR (např. miR-8, mir-27, rodina miR17-92, miR-15) pak ovlivňuje jednotlivé kroky vývoje srdce pre- a postnatálně (Hata 2013). V kardiovaskulárním systému miR během celého života ovlivňují všechny důležité procesy, jako je diferenciace, proliferace, angiogeneze, kontraktilita, rytmicita, konduktivita, regulace metabolismu, remodelace a apoptóza (Goretti et al., 2014). Schopnost miR komplementárně se vázat na více než jednu mRNA znamená, že jedna miR může ovlivňovat produkci více než jednoho proteinu a zasahovat tak do více buněčných dějů a metabolických cest. Výběr z těchto miR je uveden v tabulce 3, s barevným zvýrazněním miR, které v tomto výběru ovlivňují více buněčných dějů (každá miR jinou barvou).

Tabulka 3 - Vybrané mikroRNA ovlivňující jednotlivé buněčné děje v buňkách srdce
(Adaptováno podle Goretti et al., 2012, Liao et al., 2016, Xiao et al., 2019 Chistiakov et al., 2016, Huang et al., 2021)

Diferenciace Proliferace Hypertrofie	Stárnutí Apoptóza	Vápníková signalizace Rytmicita	Fibróza Remodelace	Angiogeneze	Zánět
Kardiomyocyt	Kardiomyocyt	Kardiomyocyt	Fibroblast	Endotel cév	Makrofág
miR-22 miR-23a miR-27b miR-133 miR-143/-145 miR-199b miR-208a miR-212/-132 miR-378 miR-499 miR-590	miR-1 miR-21 miR-24 miR-29 miR-34 miR-133 miR-144/-451 miR-210 miR-212/-132 miR-320 miR-378 miR-499 miR-874	miR-1 miR-34 miR-133 miR-199b miR-208 miR-214 miR-499 miR-590	miR-1 miR-21 miR-24 miR-29 miR-101 miR-126 miR-210 miR-499	miR-24 miR-126 miR-210 miR-503 miR-92a	miR-34

V srdci dospělých myší je exprimováno ve větší míře 18 miR, které tvoří 90 % všech přítomných miR, s dominantním podílem miR-1 okolo 40 % (Rao et al., 2009). Některé nalezené miR jsou běžné i v jiných tkáních, např. miR-34, některé jiné jsou specifické pro buňky kosterního svalu a/nebo kardiomyocyty. Tato myspecifická skupina se někdy

nazývá souhrnně „myomiRs“, a patří do ní zejména miR-1, miR-133, miR-208 a miR-499. Tyto myomiR patří mezi výše zmíněných osmnáct v srdci nejčtenějších mikroRNA (Rao et al., 2009).

MyomiR

miR-1 je nejvíce exprimovanou miR ve tkáni lidského srdce (Li et al., 2010). Je exprimována z bicistronů nesoucích společně informaci pro miR-1 a miR-133a (chromozom 18 a 20) a je pod kontrolou vlastního promotoru. Obě tyto miR patří k těm nejčtenějším miR nalezeným ve tkáni srdce a svalů. Ovlivňují proliferaci a diferenciaci kardiomyocytů již během embryogeneze s parciálně protichůdným efektem, miR-1 stimuluje diferenciaci a miR-133 expanzi bez finální diferenciaci. Obě ale shodně působí antihypertroficky. miR-1 se účastní regulace srdeční konduktivity, rytmicity, repolarizace a vápníkové signalizace tím, že je zapojena do regulace některých iontových kanálů a souvisejících proteinů, například connexinu 43 u mezibuněčných spojů (gap junctions) (Liao et al., 2016). **miR-133** je rovněž zapojena do rytmicity a konduktivity a šíření akčního potenciálu. Zatímco miR-1 je u poškozených kardiomyocytů proapoptociká a zvyšuje oxidativní stres, miR-133 působí opačně, antiapoptoticky (Xiao et al., 2019).

Cistrony miR-208a/b a miR-499 se nacházejí v intronech genů MYH6, MYH7 (chromozom 14) a MYH7B (chromozom 20) kódujících myoziny, ze kterých jsou následně vystříženy. miR-208a je specifická výhradně pro myokard, miR-208b a miR-499 se nachází převážně v srdci, ale jsou i v buňkách kosterního svalu (Wang et al., 2010). **miR-208** je zapojena do procesů remodelace, a má prohypertrofický a profibrotický účinek. Je důležitá pro konduktivitu, ovlivňuje mezibuněčné spoje (gap junctions) prostřednictvím connexinu 40. Ovlivňuje i poměr rychlých a pomalých svalových vláken v srdci a v neposlední řadě i metabolickou homeostázu (Chistiakov et al., 2016, Huang et al., 2021). **miR-499** se spolupodílí s miR-1 na diferenciaci kardiomyocytů během diferenciaci. Jeho vyšší hladiny vedou k hypertrofii a poruše vodivosti a kontraktility. Má, podobně jako miR-133, antiapoptotický efekt (Chistiakov et al., 2016).

Vzhledem k tomu, že ve většině našich sledování jsme se zaměřovali na poškození myokardu, byly tyto myomiR nejčastěji sledovanými mikroRNA v našich publikacích.

V publikaci „Prognostic Value of MicroRNAs in Patients after Myocardial Infarction: A Substudy of PRAGUE-18“ (Hromádka et al., 2019, Příloha I) jsme se zaměřili na pacienty hospitalizované pro akutní koronární syndrom s následně diagnostikovaným AIM s elevací ST úseku (STEMI). Hledali jsme odpověď na otázku přicházející z klinického prostředí, zda

mohou mikroRNA přispět k přesnějšímu odhadu rizika, a dále zda existuje korelace mezi hladinami miR a některými sledovanými biomarkery či parametry.

U všech pacientů, kteří odcházejí z nemocnice po STEMI je odhadováno dlouhodobé riziko zohledňující funkci levé komory, závažnost ICHS, výsledek revaskularizace, zbytkovou ischemii, výskyt komplikací během hospitalizace a hladiny metabolických markerů. Hlavním prognostickým markerem funkce levé komory je ejekční frakce levé komory (EFLK) v procentech, kdy EFLK rovná, nebo menší než 40 % při propuštění, přetrvávající i po dobu dalších 6 až 12 týdnů znamená vysoké riziko a též indikaci k preventivní implantaci kardioverteru (ICD) (Ibanez et al., 2018). Od výše zjištěného rizika se odvíjí i další léčba a péče o pacienta. Cílem je předejít náhlé srdeční smrti, která je zodpovědná za přibližně polovinu všech úmrtí po infarktu myokardu. Přes jednoznačný význam v současné době zohledňovaných kritérií, především EFLK jako základního prediktoru v identifikaci pacientů s vysokým rizikem náhlé srdeční smrti, stále část těchto pacientů není současným způsobem stratifikace včas rozpoznána (Waks et al., 2018). To je také důvod hledat další pomocné markery, které by k identifikaci těchto nejrizikovějších pacientů přispěly. My jsme se v naší práci zaměřili na mikroRNA.

Výběr miR pro naši práci byl založen na literární rešerši, kdy jsme vybírali panel miR, které se vyskytují v srdeční tkáni ve významnějším procentu a jsou pro ni specifické, jejichž hladiny se při KV příhodách mění a které se nacházejí v cirkulaci tak, aby je bylo možno, z hlediska praktického využití, získat z krve pacienta rámci rutinních náběrů během léčby. V našem případě pocházely vzorky plazmy 122 pacientů z klinické studie PRAGUE-18, z podskupiny pacientů FN Plzeň a byly analyzovány retrospektivně. Studie PRAGUE-18 byla zaměřena na porovnání dvou léků, prasugrelu a ticagreloru, v léčbě AIM. Výhodou pro naši práci bylo jednoznačně velké množství kompletních dat o každém případě a roční následné sledování, takže bylo možné dát do souvislosti nalezené hodnoty s biomarkery a zdravotním stavem pacienta po roce od příhody. Nevýhodou pak byla nemožnost naplánovat ideálně odběr vzorku pro stanovení miR (čas, ve kterém byl odebrán od výskytu prvních symptomů či přijetí do nemocnice), a dále dostupnost vzorků pouze z jednoho centra studie a jednoho časového bodu.

Výběr miR zahrnoval myomiR, u kterých dosud publikované studie našly změny hladin související s různými KV onemocněními včetně AIM a prokazovaly jejich měřitelnost v cirkulaci (Wang et al., 2010, Chen et al., 2015, Bialek et al., 2015). Výsledně byly u všech pacientů měřeny hladiny miR-1, miR-133a a miR-499 (tabulka 4). V případě miR-208 jsme provedli orientační stanovení u části vzorků, ale její hladiny byly neměřitelné. Tato miR je vysoce specifická pro myokard a v cirkulaci zdravých lidí ji obvykle nelze běžným

stanovením kvantifikovat (Wang et al., 2010). Podle dostupných dat jsou její hladiny výrazně zvýšené jen v relativně krátkém časovém úseku po AIM, s maximem okolo 3 hodin od počátku AIM (Bialek et al., 2015) a do 24 hodin lze očekávat návrat hladin na obvyklou (neměřitelnou) úroveň. Proto se její hladiny obvykle měří ve vzorcích nabraných bezprostředně po přijetí do nemocnice (Wang et al., 2010, Agiannitopoulos et al., 2018). Naše vzorky byly nabrány až po 24 hodinách po přijetí. I když dynamika ostatních měřených miR je rovněž relativně rychlá, s maximy v období mezi třemi a dvanácti hodinami, jejich pokles už není tak strmý a jejich zvýšené hladiny lze bezpečně prokázat i po 24 hodinách; například miR-499 se vrací ke svým obvyklým hladinám až po 7 dnech (Wang et al., 2010, Chen et al., 2015).

Tabulka 4 - MikroRNA stanovované u pacientů s AIM (Hromádka et al., 2019)

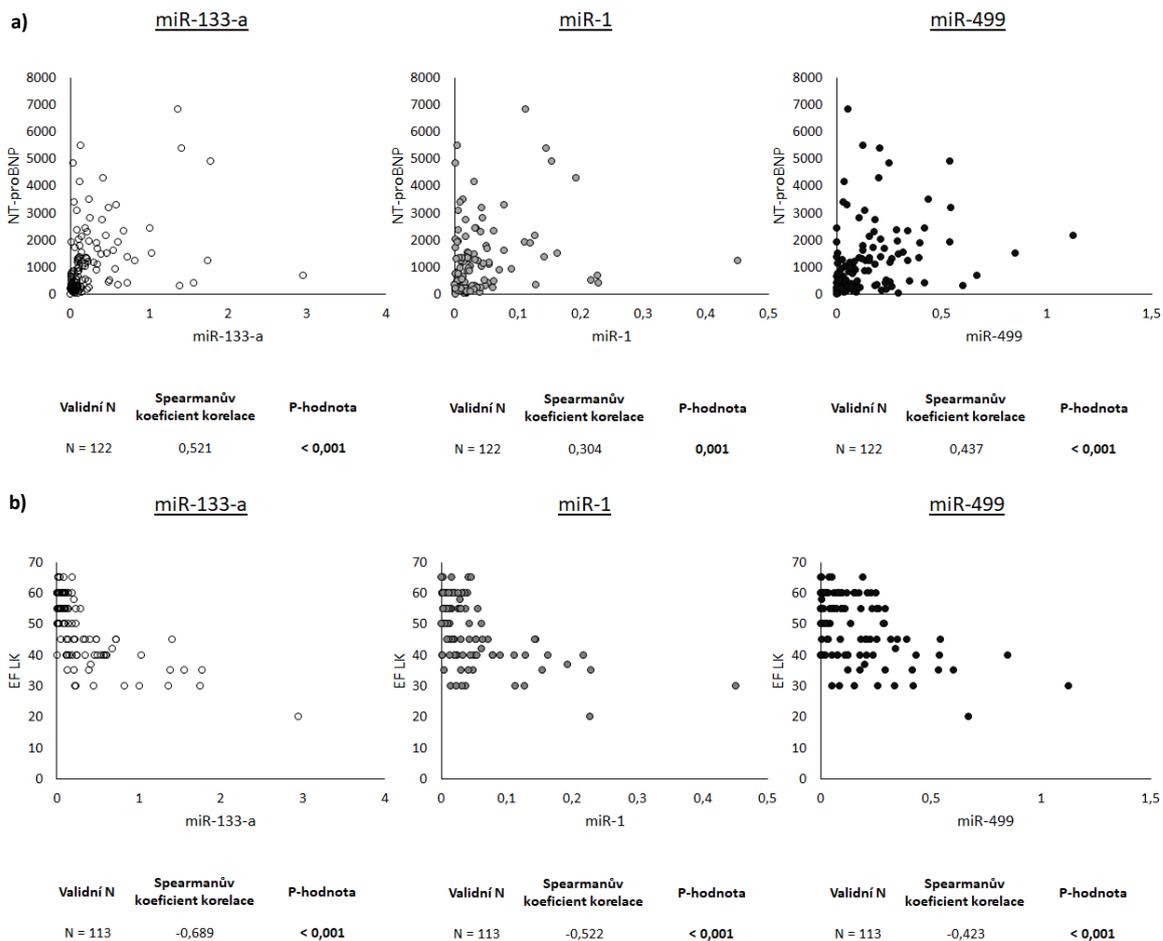
miR	sekvence miR	geny	lokus
miR-1-3p	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	MIR1-1/MIR1-2	20q13.33/18q11.2
miR-133a-3p	UUUGGUCCCCUUAACACGUG	MIR133A1/MIR133A2	18q11.2/20q13.33
miR-499-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU	MIR499	20q11.22

Všichni pacienti (STEMI, N=122) byli sledováni po propuštění z nemocnice po dobu jednoho roku, a v tomto období jich šest zemřelo. U všech pacientů byly známy hladiny standardních markerů, jako je hsTnT (high-sensitivity troponin T), NTproBNP (N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide), kreatin kináza (CK), cystatin C a GDF-15 (growth/differentiation factor 15) a dále ejekční frakce levé komory v procentech (EFLK).

Cílem naší retrospektivní analýzy bylo nalézt korelace mezi hladinami miR a standardními markery AIM, zjistit zda je v těchto hladinách rozdíl mezi skupinou přeživších a zemřelých do 1 roku po AIM a výsledně co nejlépe charakterizovat skupinu zemřelých z hlediska zjištěných parametrů, neboť tato skupina představuje „nejrizikovější“ pacienty. Základní charakteristika všech pacientů (N=122) a obou podskupin (přeživší N=116 a zemřelí N=6) je uvedena v tabulce 1 v Hromádka et al., 2019 příloha I. Žádný z pacientů neměl při kontrole provedené 2 až 3 měsíce po propuštění z nemocnice hodnotu EFLK pod čtyřiceti procenty.

Korelace miR a standardních markerů

Nalezli jsme statisticky významné korelace mezi všemi třemi měřenými miR a hsTnT, NT-proBNP a funkcí levé komory (EFLK). Všechny miR silně negativně korelovaly s EFLK a pozitivně korelovaly s hladinami NT-proBNP (obrázek 8).



Obrázek 8 – Korelace mezi expresními hladinami jednotlivých miR a hladinami NT-proBNP (a) a EFLK (b)

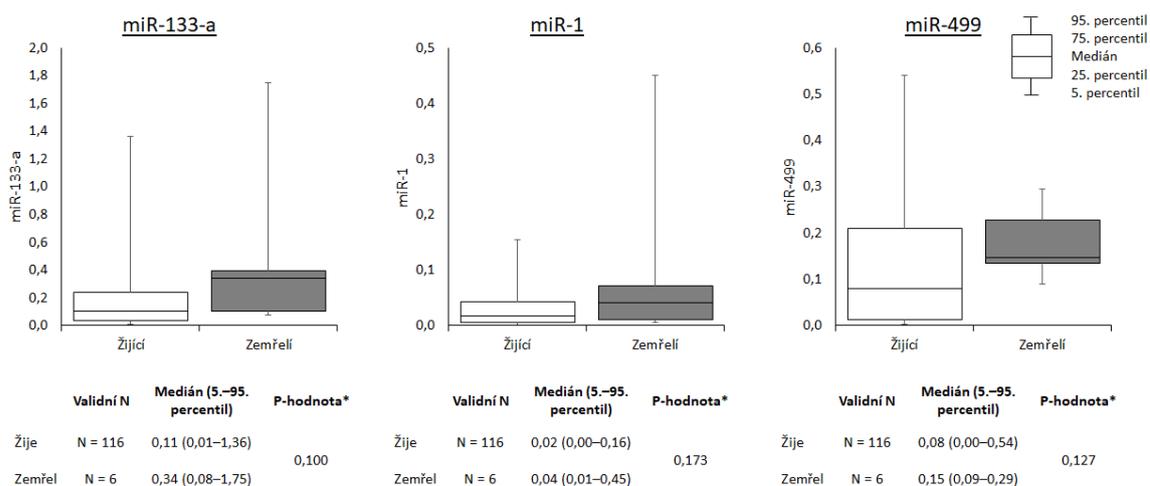
Nejdůležitější diagnostický marker *hsTnT* byl měřen jak při přijetí do nemocnice, tak i o 24 hodin později. Všechny miR pozitivně silně korelovaly s *hsTnT* po 24 hodinách (obrázek 1, Hromádka et al., 2019 v Příloze I), miR-1 a miR-133 pozitivně korelovaly i s *hsTnT* při přijetí. Mezi hladinami miR a koncentracemi GDP-15 a cystatinu nebyly zjištěny žádné korelace.

Již dříve byly popsány korelace hladin miR s některými parametry a biomarkery a naše výsledky se zde shodují s publikovanými daty, i když není vždy shodný časový bod měření či typ troponinu, metodika, nebo přesná charakteristika skupiny pacientů. Významné, až stonásobné, zvýšení hladiny miR-499 je spojeno s AIM (Corsten et al., 2010) a statisticky signifikantní pozitivní korelace mezi miR-499 a troponinem byly potvrzeny v mnoha publikacích (kde se jednalo jak o troponin T tak troponin I) (Corsten et al., 2010, Olivieri et al., 2013, Gidlöf et al., 2013, Devaux et al., 2012, Chen et al., 2015), podobně jako významné negativní korelace s EFLK (Gidlöf et al., 2013, Devaux et al., 2012, Chen et al.,

2015). Chen et al. 2015 uvádí lineární vztah hladin miR-499 a rozsahu poškození myokardu jakož i možné diagnostické využití miR-499 u AIM. Jím zjištěné hladiny miR-499 byly 24 hodin po přijetí do nemocnice signifikantně nižší u pacientů po provedené PCI než u pacientů bez PCI. Devaux et al. 2012 našel rozdíl v expresních hladinách pacientů se STEMI a NSTEMI, kde STEMI pacienti měli hladiny dvakrát vyšší. Uvádí, že na základě ROC analýzy měly hladiny miR-499 srovnatelnou diagnostickou hodnotu jako hs-cTnT (high-sensitivity cardiac troponin T). Oliveiri et al. 2013 analyzující soubor pacientů s NSTEMI našli hladiny miR-499 přibližně 80 krát zvýšené oproti zdravým kontrolám a shledali tuto miR diagnosticky přesnější než cTnT u odlišení těchto pacientů od pacientů s akutním srdečním selháním. U miR-1 byla nalezena pozitivní korelace s troponinem T (Gidlöf et al., 2013) a s rozsahem infarktu (Zhang et al., 2020) i negativní korelace s EFLK (Gidlöf 2013). U miR-133 byla nalezena korelace s troponinem T (Wang et al., 2010) a maxima hladin dosahovala dříve než troponin (Zhang et al., 2020). Oproti tomu informací o korelaci mezi myomiR a NTproBNP, biomarkerem srdečního selhání, v publikacích mnoho není. Corsten et al. 2010 zmiňuje pozitivní korelaci miR-133 a NTproBNP u pacientů s dysfunkcí síní.

Vztah mezi hladinami miR, hsTnT, NTproBNP a roční mortalitou

Byly analyzovány rozdíly mezi skupinou přeživších a zemřelých do jednoho roku. Vzhledem k malému počtu pacientů ve druhé skupině nedosáhly nalezené rozdíly statistické významnosti, ale byl zde vidět zřejmý trend, naznačující vyšší hladiny miR u zemřelých do 1 roku (obrázek 9).



Obrázek 9 – Vztah mezi expresní hladinou jednotlivých miR a jednorocní mortalitou (p* hodnoty z Mann-Whitney testu).

Při pohledu na základní charakteristiku obou skupin je patrné, že přestože nebyly nalezeny signifikantní meziskupinové rozdíly, i mediány hladin NTproBNP a troponinů byly v této skupině vyšší a EFLK naopak nižší.

Dále byl vypočítán diskriminační limit (cut-off value) pro všechny tři miR: miR-1, miR-133a a miR-499, který činil 0,031, 0,330 a 0,088. Relativní koncentrace miR pod tímto limitem byly dále označeny jako nízké a nad tímto limitem jako vysoké.

Diskriminační limity byly stanoveny i pro oba standardní biomarkery a činily 154,5 ng/l pro hsTnT a 891,5 ng/l NTproBNP.

Porovnání obou skupin pacientů z hlediska vysokých či nízkých hladin jednotlivých markerů je v tabulce 2, Hromádka et al., 2019, v příloze I. Nalezený rozdíl dosáhl statistické významnosti u miR-1, miR-499 a NT-proBNP.

Jednotlivé markery byly pak vzájemně otestovány v různých kombinacích s cílem najít co největší statisticky významný rozdíl a odlišit tak co nejlépe skupinu zemřelých pacientů od přeživších za pomoci těchto markerů (tabulka 3, Hromádka et al., 2019 v příloze I). Skupina zemřelých, tj. skupina s největším rizikem, měla hodnoty miR-499 i NT-proBNP ve všech případech nad diskriminačním limitem, tj. vysoké, a nejlépe charakterizovala tuto skupinu ($p=0,001$). I jiné kombinace však dosáhly vysoké statistické významnosti, např. kombinace NT-proBNP + miR-133a ($p=0,003$), miR-1 + miR-133a + miR-499 ($p=0,003$) a miR-133a + miR-499 ($p=0,004$) a další.

NTproBNP je biomarker užívaný k odhadu rizika rozvoje srdečního selhání u pacientů po STEMI, které se rozvíjí v delším časovém horizontu po příhodě a je příčinou opakovaných hospitalizací a úmrtí. Odhadované roční riziko úmrtí dosahuje po STEMI a PCI přibližně deseti procent (Ganovská et al., 2018). Úmrtnost v naší analyzovaném souboru pacientů byla méně než poloviční. Zvýšené hladiny NT-proBNP u stabilních pacientů po AIM a PCI nad určitou diskriminační úroveň predikují zvýšené roční i dvouleté riziko hospitalizace a/nebo úmrtí (Ganovská 2018). V naší práci jsme kombinovali tento proteinový biomarker s potenciálním miRNA markerem, což v naší skupině vedlo ke zvětšení statistického rozdílu mezi oběma skupinami (samotný NTproBNP $p=0,008$, NTproBNP + miR-499 $p=0,001$).

V naší práci jsme našli miR-499 v kombinaci s NTproBNP jako potenciální prognostický marker. Podle v současné době publikovaných metaanalýz byl zatím potvrzen u pacientů s AIM prognostický význam pouze v případě miR-208, zatímco diagnostický význam u všech myomiR (miR-1, miR-133, miR-208 a miR-499) (Lee 2021). Naše sledování tak může

být jednou z prací, která pomůže rozhodnout, zda je možné miR-499 využít i v prognóze, tj. ve stanovení výše KV rizika u pacientů po AIM.

Hlavním limitem naší práce byl omezený počet pacientů ve skupinách, a proto bude třeba v budoucnosti ověřit význam myomiR v prognóze KV rizika na početnějším souboru STEMI PCI pacientů, u kterých bude známa kardiovaskulární mortalita a hospitalizace v delším, alespoň ročním, horizontu.

V druhé práci „**The low expression of circulating microRNA-19a represents an additional mortality risk in stable patients with vascular disease**“ (Mayer et al., 2019, Příloha I) jsme se zaměřili na pacienty v sekundární prevenci, s minimálně půlročním odstupem po prodělané kardiovaskulární příhodě, zahrnující hospitalizaci pro ACS, koronární revaskularizaci nebo první ischemickou mozkovou mrtvici. Tito stabilní chroničtí pacienti tvořili dvě podskupiny. Jedna pocházela ze studie EUROASPIRE III (N=487) s chronickou ICHS, a druhá pocházela ze studie EUROASPIRE III-Stroke Survey (N=339) po ischemické mozkové příhodě. Střední doba sledování činila 2050 dnů (= follow-up 5,6 roku) a během tohoto období došlo k 167 úmrtím, z toho k 126 z kardiovaskulárních příčin, což znamená celkovou 18,3% a kardiovaskulární 13,8% pětiletou mortalitu. Charakteristika souboru je uvedena v tabulce 1, Mayer et al., 2019, Příloha I. Nespornou výhodou vzorků ze studie bylo, jako v předchozím případě, že skupiny pacientů byly značně homogenní, data kompletní a pokrývající dostatečně dlouhé časové období k vyhodnocení prognostického významu sledovaných miR.

Cílem práce bylo zjistit, zda některá z vybraných cirkulujících miR, stanovovaná opět ve vzorcích plazmy retrospektivně, ovlivňuje mortalitu v této skupině stabilních chronických pacientů s KV onemocněním.

Výběr miR proběhl na základě literární rešerše, kde vedle myomiR (které jsou specifické pro myokard) byly zvažovány i další, související s rozvojem KV onemocnění z dlouhodobějšího hlediska. miR-208, která má prokázaný diagnostický i prognostický význam u AIM (Lee et al., 2021) výsledně stanovována nebyla, neboť u neakutních onemocnění jsou její hladiny obvykle neměřitelné, což jsme ověřili na části vzorků pilotního souboru. V prvním kole tak bylo vybráno deset miR, jejichž hladiny byly stanoveny u pilotního souboru sta vzorků. Z nich bylo vybráno pět miR, které byly stanoveny i ve všech zbývajících vzorcích (tabulka 5).

Tabulka 5 - MikroRNA stanovované u stabilních chronických pacientů s kardiovaskulárním onemocněním (Mayer et al., 2019)

miR	sekvence miR	pilotní skupina	celý soubor
miR-1-3p	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	✓	✓
hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA	✓	✓
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	✓	
hsa-miR-34a-5p	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	✓	
hsa-miR-126-3p	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	✓	✓
miR-133a-3p	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	✓	✓
hsa-miR-197-3p	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	✓	
hsa-miR-208b-3p	AUAAGACGAACAAAAGGUUUGU	✓	
hsa-miR-214-3p	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	✓	
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	✓	✓
miR-499a-5p	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU	✓	

V pilotním souboru byly stanovované hladiny tří myomiR (miR-1, miR-133, miR-499) a dále miR-19a, miR-21, miR-34a, miR-126, miR-197, miR-214, miR-223, u kterých je známý vztah ke KV systému. Po analýze výsledků pilotního souboru byly na základě zjištěných rozdílů expresních hladin jednotlivých miR mezi pacienty přeživšími a zemřelými vyselektovány miR-1, miR-19a, miR-126, miR-133a a miR-223 pro další analýzy. U myomiR (miR-1 a miR-133a) je vztah k myokardu jednoznačný.

miR-126 patří mezi takzvané „angiomiR“. Je exprimovaná v buňkách cévního endotelu a v krevních destičkách a hraje důležitou roli v angiogenezi. Stimuluje angiogenezi, má ateroprotektivní efekt, je důležitá pro zachování integrity cév, vaskulární homeostázu a urychluje zotavení po infarktu myokardu. Účastní se i regulace zánětu ovlivněním genové exprese a funkce makrofágů (Welten et al., 2016). Po infarktu myokardu byly nalezeny jak zvýšené hladiny miR-126 (Xue et al., 2019), tak i snížené hladiny této miR (Wang et al., 2017). Buňky endotelu ovlivňuje i další vybraná miR-19a, která zde působí antiprolifativně (Welten et al., 2016).

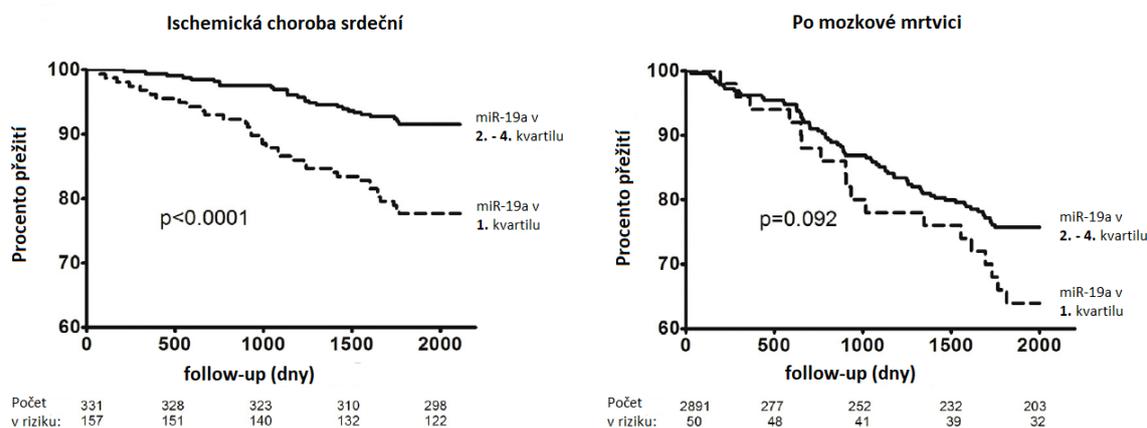
miR-19a patří do rodiny miR-19, společně s miR-19b-1 a miR-19b-2. Všechny mají společnou sekvenci nukleotidů v „seed“ oblasti. miR-19a je transkribována z miR-17-92 klastru, ve kterém je společně s miR-17, miR-18, miR19b, miR-20 a miR-92, a jenž se nachází v intronu lokusu MIR17HG na chromozómu 3. Tato miR hraje důležitou roli nejen v systému kardiovaskulárním, ale i nervovém nebo respiračním, a je zkoumána i v souvislosti s celou řadou onkologických onemocnění (Li et al., 2019). miR-19 hraje

klíčovou roli v proliferaci kardiomyocytů, omezuje poškození srdce při infarktu myokardu a pomáhá zachovat srdeční funkce. Její experimentální podání redukuje poškození při AIM, omezuje velikost jizvy a má krátkodobý i dlouhodobý ochranný účinek. Má i antifibrotický efekt; po podání miR-19 mimik poklesly exprese genů kódujících kolagen (Col1a1 a Col3a1), elastin, fibrillin a transforming growth factor beta receptor 2 (TGFB2). Navíc miR-19 omezuje apoptózu přímým ovlivněním exprese genů, které se jí účastní, včetně genů kódujících Bim1 a Pten (Phosphatase and tensin homolog), a ovlivňuje i geny proteinů účastnící se regulace buněčného cyklu (cyklin B1, cyklin D1 a cyklin dependentní kináza 1 (CDK1)). Dále redukuje imunitní odpověď a tím tlumí zánět spojený s AIM (Gao et al., 2019). V experimentech tak miR-19 mimika limitují důsledky ischemie, omezují poškození srdce při infarktu myokardu a mají i pozitivní efekt při srdečním selhání (Gao et al., 2019, Li et al., 2019). miR-19 hraje důležitou roli i v angiogenezi i apoptóze buněk cévního endotelu (Li et al., 2019). Hladiny miR-19a se signifikantně zvyšují u pacientů po AIM, a podle některých autorů má tato miR potenciál stát se diagnostickým a/nebo prognostickým markerem (Zhong et al., 2014, Mansouri et al., 2019). Zvýšené hladiny byly nalezeny i u pacientů se srdečním selháním (Gao et al., 2019).

miR-223 hraje důležitou roli v hematopoéze, zejména v diferenciaci granulocytů a megakaryocytů, a také osteoklastogenezi a zánětu. Ovlivňuje vstup glukózy do buněk, proliferaci a kontraktilitu buněk hladkého svalu v cévách, kalcifikaci cév a proces vzniku aterosklerózy (Taibi et al., 2017). Po infarktu myokardu má miR-223 antiapoptotický efekt na kardiomyocyty (Xiaoyu et al., 2021), ovlivňuje také následné fibrotické změny (Xiao et al., 2019) a její vyšší hladiny mohou vést k arytmiím z důvodu změny exprese napětově řízených draslíkových kanálů (Xue et al., 2016). U pacientů s ICHS její hladiny stoupají se vzrůstající závažností onemocnění (Guo et al., 2018), podobně i u pacientů s mozkovou mrtvicí z ischemických příčin, kde jsou její stoupající hladiny spojené se závažností příhody i s krátkodobými výsledky (short-term outcomes) (Chen et al., 2017). Ve studii Brunek byla miR-223 pozitivně a miR-126 negativně asociována s rizikem infarktu myokardu (Zampetaki et al., 2012).

Všechny vyselektované miR mají potvrzený vztah k srdci a cévám, a základním procesům proliferace, diferenciaci a/nebo apoptózy či zánětu (popsáno v předchozích odstavcích), což byl důvod zkoumat je z hlediska potenciálu stát se markerem přispívajícím k predikci úmrtí u námi sledované populace chronicky nemocných pacientů s KV onemocněním. Zároveň všechny miR byly stanovitelné z rutinních náběrů periferní krve, což by usnadnilo i jejich potenciální využití v praxi.

U všech pěti výše popsaných miR byly nalezeny statisticky významné rozdíly v expresi mezi skupinou zemřelých a přeživších, kdy hladiny miR u podskupin s úmrtím (celkovým i kardiovaskulárním) byly statisticky signifikantně nižší (tabulka 1, Mayer et al., 2019, Příloha I) a miR-19a, miR-133a a miR-233 byly pozitivně asociovány s primární diagnózou mozkové mrtvice. Nejprve byla hodnocena prediktivní síla každé jednotlivé miR za použití vícerozměrného Coxova modelu společně s potenciálními proměnnými. V této analýze byla každá z pěti miR negativně asociována se zvýšeným rizikem celkového nebo kardiovaskulárního úmrtí. Po zahrnutí všech pěti miR do tohoto modelu však byla pouze nízká exprese miR-19a identifikována jako nezávislý prediktor úmrtí celkového i úmrtí pouze z kardiovaskulárních příčin (tabulka 3, Mayer et al., 2019, Příloha I). Procento přežití v podskupinách pacientů majících expresní hladiny miR-19a v prvním kvartilu a v druhém až čtvrtém kvartilu znázorňuje obrázek 10.



Obrázek 10 - Kaplan-Meierova křivka přežití pro celkovou mortalitu podle expresních hladin miR-19a v podskupinách pacientů s ICHS a po mozkové mrtvici (p hodnoty z Mantel-Cox log-rank testu)

Při analýze podskupin pacientů byla tato prediktivní hodnota signifikantní u skupiny s ICHS (HRR=3.00; $p < 0.0001$) a při rozdělení podle pohlaví pak u mužů (HRR=3,15; $p < 0.0001$), s větší prediktivní silou u mladších pacientů.

Expresní hladiny miR-19 byly v našem souboru stabilních pacientů s KV onemocněním spojeny s více jak čtyřnásobným rizikem úmrtí z kardiovaskulárních příčin. Výsledky je těžké porovnat s podobnými studiemi, neboť většina autorů se zaměřuje na akutní stavy a kratší časové horizonty. Srovnatelná studie zahrnující 1112 pacientů s ICHS našla vztah mezi zvýšením hladin miR-19a o 1SD a zdvojnásobením rizika mortality, ale zahrnovala i pacienty s akutním koronárním syndromem. Po analýze podskupiny se stabilní anginou pectoris (kohorta srovnatelná s naší skupinou) však tento vztah potvrzen nebyl (Karakas et

al., 2017). Vzhledem k tomu, že byl v experimentech prokázán proliferativní, kardioprotektivní, protizánětlivý a antiapoptotický efekt miR-19 (Gao et al., 2019, Li et al., 2019), mohou tyto její vlastnosti přispívat k vysvětlení zvýšeného mortalitního rizika spojeného s jejími sníženými hladinami.

miR-19 byla v naší práci identifikována jako nezávislý prediktor rizika úmrtí u pacientů se stabilním KV onemocněním. Ve srovnání s námi stanovovanými hladinami miR po akutním infarktu myokardu, kde byly nalezeny zvýšené hladiny miR-1 a miR-133 (Hromádka et al., 2019, Příloha I), byly u těchto stabilních chronických pacientů expresní hladiny těchto dvou myomiR snižené, což naznačuje možnost jejich odlišné exprese u akutních a chronických KV stavů.

Nalezené snížené hladiny miR-126 a miR-133 u námi analyzovaného souboru pacientů byly v časopisech diskutovány s jinými autory, kteří poukazovali na v některých případech odlišné změny hladin při hypoxii/ischemii myokardu (Mayer et al., 2020, Mayer et al., 2020, Příloha I). Zásadní rozdíl spatřujeme v odlišně definovaných skupinách pacientů, kdy mnohá měření jsou obvykle spojena s akutní fází onemocnění (např. AIM) nebo byly získány na modelech takových stavů. Naše měření bylo prováděno na souboru pacientů ve stabilizované, chronické fázi onemocnění (převážně ICHS), nebyla vázána na žádnou akutní změnu tohoto stavu a stanovení bylo provedeno ze standardně odebírané periferní krve. Tato kohorta tak odpovídá většině dlouhodobě sledovaných/léčených pacientů po v minulosti prodělané kardiovaskulární příhodě (AIM nebo mozková mrtvice). Porovnání výsledků různých publikací podporuje hypotézu, že hladiny uvedených miR se mohou měnit oběma směry (zvyšovat či snižovat) podle typu a také fáze onemocnění (akutní či chronické) a mohou se lišit také v závislosti na vzorcích, ve kterých jsou stanovovány (tkáních, tělních tekutinách či jiných použitých médiích).

7.2 mikroRNA u syndromu obstrukční spánkové apnoe (OSAS)

Syndrom obstrukční spánkové apnoe přispívá ke vzniku a progresi kardiovaskulárních chorob a poškození srdečního svalu a je spojována s vyšší incidencí ICHS, srdečního selhání, hypertenze, aterosklerózy a cerebrovaskulárních a metabolických chorob (Xie et al., 2016, Šonka et al., 2008). OSAS je provázen poklesem saturace krve kyslíkem, hypoxií a hyperkapnií. Častější noční ischemie je spojena s poruchami srdečního rytmu a postupně může vést k rozvoji plicní hypertenze. K rozvoji hypertenze přispívají i zvýšené noční

hladiny vazoaktivních hormonů. Sympatoadrenální stimulace, postapnoická tachykardie a levostranný komorový afterload jsou uváděny jako hlavní příčiny vyššího výskytu AIM u pacientů s OSA. Riziko srdečního selhání je u těchto pacientů 2,4 násobně vyšší než u běžné populace (Šonka et al., 2008). Obstrukční spánková apnoe postihuje 15-30 % dospělé populace a 2-10 % dětí, a z důvodu stárnutí populace a nárůstu obezity v populaci se očekává v blízké budoucnosti její ještě vyšší prevalence (Pinilla et al., 2021).

Přestože OSA není přímo kardiovaskulární chorobou, přispívá k rozvoji řady KV onemocnění a má úzký vztah k příčinám jak morbidity, tak mortality, s výraznými socioekonomickými důsledky (Pinilla et al., 2021).

Skutečnost, že OSAS je úzce spojen s KV morbiditou a mortalitou, že jeho prevalence je narůstající, a že stanovení diagnózy je časově náročné, pro nás představovala hlavní důvod, proč hledat nový potenciální miR biomarker přispívající k usnadnění diagnostiky. MikroRNA hrají důležitou roli ve vývoji srdce i v patogenezi mnoha onemocnění, a proto jsme zvolili skupinu myomiR, která je specifická pro myokard a mohla by signalizovat KV změny probíhající srdci v souvislosti s opakovanými intermitentními epizodami hypoxie a hyperkapnie. Tyto epizody mají v dlouhodobějším časovém horizontu za následek elektrickou i strukturální remodelaci srdce provázenou cévní dysfunkcí (Mehra et al., 2019). Změny hladin myomiR při hypoxii (ischemii) a remodelaci srdce jsou známy například u AIM, ICHS nebo srdečního selhání. Vybrané myomiR, měřitelné v periferní krvi pacientů s i bez diagnózy OSAS, jsou uvedeny v tabulce 4.

Celkem bylo do sledování začleněno 194 pacientů s čerstvě diagnostikovaným OSAS a 50 zdravých kontrol. Průměrný věk v obou skupinách se významně nelišil, ale KV onemocnění (například ICHS, arytmie nebo hypertenze) byla čtenější ve skupině OSAS, kde byl i signifikantně vyšší průměrný BMI. Charakteristika obou skupin je uvedena v Tabulce 1, Slouka et al., 2021, Příloha I. Vzorky pacientů skupiny OSAS byly odebrány před začátkem léčby.

Hladiny miR-499 byly signifikantně vyšší u skupiny OSAS (0,00561 vs. 0,00003). V této skupině byla vyšší i expresní pozitivita (44 %) ve srovnání s kontrolní skupinou (2 %). Hladiny všech tří miR (miR-1, miR-133 a miR-499) spolu korelovaly, byla nalezena i korelace mezi miR-133a a hypertenzí (tabulka 6). Přestože hladiny miR-499 korelovaly s hladinami ostatních dvou miR (miR-133 a miR-1), vztah těchto dvou miR k OSAS jsme neprokázali. Nebyla zjištěna ani korelace mezi hladinami miR a klinickou závažností OSAS vyjádřenou jako AHI, ODI (Oxygen Distress Index), T90 nebo průměrná saturace kyslíkem.

Tabulka 6 – Korelace mezi expresními hladinami jednotlivých mikroRNA a mezi mikroRNA a hypertenzí ve skupině pacientů s OSAS (Slouka et al., 2021)

miR	Spearmanův korelační koeficient, p hodnota			
	Hypertenze	miR-1	miR-133a	miR-499
miR-1	-0,08140, p=0,2592		0,57201, p<0,0001	0,25199, p=0,0004
miR-133a	-0,18481, p=0,0099	0,57201, p<0,0001		0,34127, p<0,0001
miR-499	-0,05367, p=0,4573	0,25199, p=0,0004	0,34127, p<0,0001	

Zvýšené expresní hladiny miR-499 pomohly odlišit skupinu pacientů s OSAS od kontrolní skupiny a mohly by se proto stát jedním z markerů v diagnostice OSAS. Vyšší hladiny miR-499 byly nalezeny také u pacientů s infarktem myokardu či ischemickou chorobou srdeční, u onemocnění, na jejichž rozvoji se rovněž podílí hypoxie (Wang et al., 2019, Zhang et al., 2015). miR-499 chrání kardiomyocyty před ischemickým poškozením, neboť působí antiapoptoticky, a to cílením na protein PDCD4 (programmed cell death protein 4) (Li et al., 2016). Také inhibuje poškození kardiomyocytů indukovaných hypoxií a reoxygenací cílením na SOX6 (Li et al., 2019). Vyšší hladiny miR-499 byly nalezeny i u kardiomyopatií, kde jsou spojeny s remodelací a hypertrofií myokardu, a následně mohou vést až k srdečnímu selhání (Matkovich et al., 2012). Skutečnost, že jedna miR může mít velké množství cílových genů, jejichž expresi reguluje a tím ovlivňuje zároveň více buněčných procesů, může v případě miR-499 znamenat, že její kardioprotektivní efekt u hypoxie je zároveň provázen nežádoucí remodelací myokardu a jeho následnou dysfunkcí v důsledku zvýšených hladin této miR.

MikroRNA byly zkoumány z hlediska diagnostiky OSAS i jinými autory. Li et al. 2017 našel u omezeného souboru vzorků 104 miR s odlišnou expresí ve srovnání s kontrolami, kde miR-485-5p, miR-107, miR-574-5p a miR-199-3p se pravděpodobně účastní patogeneze OSA. U pacientů s OSA byly nalezeny nižší hladiny miR-133a, miR-181a, miR-199b, miR-340, miR-345 a miR-486-3p a zároveň hladiny miR-181a miR-345 korelovaly s indexem AHI. Léčba CPAP (continuous positive airway pressure) vedla ke změnám hladin cirkulujících miR (Santamaria-Martos et al., 2019). V této studii byl nalezen pokles miR-133a, zatímco v souboru našich pacientů jsme signifikantní pokles nenalezli. Dále miR-320e a miR-1254 byly identifikovány u mužských pacientů s OSA jako miR asociované se závažností onemocnění (Freitas et al., 2020). Exprese miR-1254 je zvýšená u pacientů se srdečním selháním a je spojena se zhoršenou prognózou a vyšší mortalitou. Snížení

exprese miR-320 chrání myokard před poškozením v důsledku ischemie/reperfuze potlačením apoptózy a posílením antiapoptotické signalizace (Freitas et al., 2020). Obě tyto miR, podobně jako námi zkoumané myomiR, hrají důležitou roli v ochraně kardiomyocytů před ischemickým poškozením a v procesech remodelace myokardu.

Naše práce pomohla nalézt další miR, která je u OSAS dysregulována a která zatím nebyla identifikována jako potenciální marker tohoto onemocnění. miR-499 je specifická pro myokard, stanovitelná z periferní krve, více exprimována u pacientů s OSAS a proto by se mohla stát biomarkerem tohoto onemocnění.

7.3 mikroRNA u onemocnění cév (aorty)

Profil mikroRNA jsme stanovovali u onemocnění cév, konkrétně v tkáni stěny aorty pocházející z abdominálního aneurysmatu, a porovnávali jsme jej s profilem miR aneurysmatem nezměněné tkáně. Ve tkáních pocházejících od šestnácti pacientů s AAA a pěti kadaverických dárců bez aneurysmatických změn aortální tkáně byly stanovovány hladiny všech v té době dostupných 2549 miR pro použitou mikroarray. Při porovnání expresních hladin miR mezi malými aneurysmaty (N=10) a zdravými tkáněmi (N=5) bylo nalezeno 6 miR se statisticky signifikantním rozdílem: miR-7158-5p, miR-658, miR-517-5p, miR-122-5p, miR-326 a miR-3180 a měly, s výjimkou miR-326, v aneurysmatu nižší expresi. Při porovnání expresních hladin miR mezi velkými aneurysmaty (N=6) a zdravými tkáněmi (N=5) bylo nalezeno 162 miR se statisticky signifikantním rozdílem, u deseti z nich byly rozdíly v expresi více než dvojnásobné: miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-30d-5p, miR-193a-3p, miR-203a-3p, miR-365a-3p, miR-4291 a miR-3663-3p (tabulka 7). Všechny, s výjimkou miR-3663-3p, měly v aneurysmatu nižší hladiny. Všech šest miR dysregulovaných u malých aneurysmat bylo identifikováno i u velkých aneurysmat, se změnami hladin ve stejném směru, což naznačuje, že tyto miR mění v průběhu patogeneze aneurysmatu své hladiny dříve než ostatní identifikované miR a že změny jejich hladin při progresi onemocnění přetrvávají. Zde je třeba zdůraznit, že statistické vyhodnocení zahrnovalo adjustaci p hodnot pro mnohonásobné porovnání.

Základní charakteristika pacientů je uvedena v tabulce 1, Černá et al. 2019, Příloha I.

Tabulka 7 - Seznam 162 rozdílně exprimovaných miR v tkáni velkých aneurysmat ve srovnání se zdravou tkání aorty ($p < 0.05$)

(miR v oranžových polích jsou méně exprimovány a v bílých polích více exprimovány v tkáni aneurysmat; miR tučným červeným písmem jsou dysregulovány u malých i velkých aneurysmat; miR tučně kurzívou jsou miR s více jak dvojnásobnou změnou exprese u velkých aneurysmat)

hsa-let-7f-1-3p	hsa-miR-634	hsa-miR-4296	hsa-miR-6760-3p
hsa-let-7b-3p	hsa-miR-648	hsa-miR-4307	hsa-miR-6765-3p
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-658	hsa-miR-4310	hsa-miR-6769b-3p
hsa-miR-23c	hsa-miR-671-3p	hsa-miR-4317	hsa-miR-6775-3p
hsa-miR-24-3p	hsa-miR-767-3p	hsa-miR-4328	hsa-miR-6776-3p
hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-939-3p	hsa-miR-4433a-5p	hsa-miR-6782-3p
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-944	hsa-miR-4436b-5p	hsa-miR-6785-3p
hsa-miR-30b-3p	hsa-miR-1227-3p	hsa-miR-4482-5p	hsa-miR-6792-3p
hsa-miR-30d-5p	hsa-miR-1238-5p	hsa-miR-4486	hsa-miR-6794-3p
hsa-miR-122-5p	hsa-miR-1238-3p	hsa-miR-4487	hsa-miR-6795-3p
hsa-miR-129-1-3p	hsa-miR-1266-5p	hsa-miR-4519	hsa-miR-6799-3p
hsa-miR-138-5p	hsa-miR-1288-5p	hsa-miR-4664-3p	hsa-miR-6800-3p
hsa-miR-181c-3p	hsa-miR-1291	hsa-miR-4666b	hsa-miR-6820-3p
hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-1304-3p	hsa-miR-4680-5p	hsa-miR-6827-3p
hsa-miR-203a-3p	hsa-miR-1470	hsa-miR-4697-3p	hsa-miR-6830-5p
hsa-miR-206	hsa-miR-1539	hsa-miR-4714-3p	hsa-miR-6841-3p
hsa-miR-212-5p	hsa-miR-2116-3p	hsa-miR-4723-3p	hsa-miR-6844
hsa-miR-326	hsa-miR-2467-3p	hsa-miR-4732-5p	hsa-miR-6851-3p
hsa-miR-329-3p	hsa-miR-3064-5p	hsa-miR-4742-3p	hsa-miR-6855-3p
hsa-miR-365a-5p	hsa-miR-3156-3p	hsa-miR-4742-5p	hsa-miR-6865-5p
hsa-miR-365a-3p	hsa-miR-3161	hsa-miR-4750-3p	hsa-miR-6865-3p
hsa-miR-365b-5p	hsa-miR-3171	hsa-miR-4753-5p	hsa-miR-6877-3p
hsa-miR-376b-5p	hsa-miR-3173-3p	hsa-miR-4761-5p	hsa-miR-6880-3p
hsa-miR-378f	hsa-miR-3180	hsa-miR-4770	hsa-miR-6885-3p
hsa-miR-378b	hsa-miR-3184-3p	hsa-miR-5571-5p	hsa-miR-6889-3p
hsa-miR-425-3p	hsa-miR-3190-5p	hsa-miR-5681b	hsa-miR-6890-5p
hsa-miR-432-3p	hsa-miR-3198	hsa-miR-5691	hsa-miR-6892-3p
hsa-miR-512-3p	hsa-miR-3613-3p	hsa-miR-6069	hsa-miR-6893-3p
hsa-miR-514b-5p	hsa-miR-3614-5p	hsa-miR-6503-5p	hsa-miR-7107-3p
hsa-miR-517-5p	hsa-miR-3622a-3p	hsa-miR-6507-3p	hsa-miR-7108-3p
hsa-miR-520h	hsa-miR-3654	hsa-miR-6512-5p	hsa-miR-7111-5p
hsa-miR-548x-3p	hsa-miR-3660	hsa-miR-6513-3p	hsa-miR-7154-3p
hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-3663-3p	hsa-miR-6731-5p	hsa-miR-7157-3p
hsa-miR-548ai	hsa-miR-3675-3p	hsa-miR-6732-3p	hsa-miR-7158-5p
hsa-miR-548e-5p	hsa-miR-3920	hsa-miR-6737-3p	hsa-miR-7162-5p
hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-3926	hsa-miR-6738-5p	hsa-miR-7855-5p
hsa-miR-556-5p	hsa-miR-3940-3p	hsa-miR-6747-5p	hsa-miR-7856-5p
hsa-miR-563	hsa-miR-4259	hsa-miR-6752-3p	hsa-miR-7974
hsa-miR-602	hsa-miR-4265	hsa-miR-6753-5p	hsa-miR-8071
hsa-miR-613	hsa-miR-4291	hsa-miR-6757-3p	
hsa-miR-631	hsa-miR-4294	hsa-miR-6759-3p	

Mnohé miR, u nichž jsme našli změněné hladiny, mají potenciální vztah k patologii aneurysmat, protože ovlivňují metabolismus a přežívání buněk hladkého svalstva a cévního endotelu, angiogenezi, zánět nebo aterosklerotické změny (tabulka 8). Snížené hladiny miR-24, miR-27b a miR-193a byly již dříve nalezeny v tkáni nebo plazmě pacientů s aneurysmatem, což je ve shodě s našimi výsledky (Liao et al., 2011, Patuzzo et al., 2012, Maegdefessel et al., 2014).

Tabulka 8 - miRNA s více jak dvojnásobně změněnými expresními hladinami u velkých aneurysmat, cévní biologické procesy, které ovlivňují a jejich cílové geny

miRNA	Proces/funkce	Cílové geny	Ref No v publikaci
miR-23	Angiogeneze (pro-angiogenní)	E2F1	11
	VSMCs proliferace		12
	Apoptóza (anti-apoptotický)	BCL2L11 (BIM)	12
miR-24	Angiogeneze (anti-angiogenní)	GATA2	11
	Apoptóza (anti-apoptotický)	GATA2, PAK4, BIM	11
	Mediátor kontraktálního fenotypu VSMCs	Trb3	11
	Inhibuje proliferaci, migraci a sprouting		14
	Vaskulární zánět a AAA patologie		10, 15
miR-27	Angiogeneze (pro-angiogenní)	SEMA6A, SEMA6D, SPROUTY2, TSP-1, MMP-13	11, 13
	Inhibice růstu buněk endotelu	Rb	11
	Zánět	MMP-13, VEGF, TSG1	13
	Apoptóza	FADD	13
	Ateroskleróza	G2A	13
miR-30	Angiogeneze	DLL4	17
	Poškození edoplasmického retikula; buněčná smrt	GRP78, ATF6, CHOP, CASP12	19
miR-193	Angiogeneze (anti-angiogenní)	HMGB1	25
miR-203	Zánět	SOCS-3	29, 30
miR-365	Apoptóza	BCL2	26
	Ateroskleróza	BCL2	26
miR-3663	snížené hladiny u degenerativní stenózy aorty	NA	31
miR-4291	NA	NA	-

ATF6: activating transcription factor 6; BCL2L11 (BIM): Bcl-2; CASP12: Caspase-12; DLL4: δ -like ligand 4; E2F1: E2F1 transcription factor; FADD: Fas associated protein with death domain; G2A: G protein-coupled receptor 132; GRP78: Glucose-regulated protein 78; HMGB1: High mobility group box-1; CHOP: CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein; MMP-13: Matrix metalloproteinase 13; SEMA6A: Semaphorin 6a; SEMA6D: Semaphorin 6d; SPROUTY2: Sprouty homolog 2; Trb3: Tribbles-like protein-3; TSG-1: Thrombospondin-1; TSP-1: Thrombospondin-1; VEGF: Vascular endothelial growth factor; VSMCs: Vascular smooth muscle cells

O **miR-3663** a **miR-4291** zatím mnoho publikací ve vztahu k cévám či srdci není.

V našem souboru pacientů, kde byla aorta dilatována v důsledku aneurysmatu, měla **miR-3663** zvýšené hladiny a **miR-193** snížené, zatímco opačné změny byly zjištěny u pacientů s degenerativní stenózou aorty (Shi et al., 2016).

Expresní hladiny **miR-365** (**miR-365a-3p**, **miR-365a-5p** a **miR-365b-5p**) byly všechny signifikantně sniženy, **miR-365a-3p** více než dvakrát, u velkých aneuryzmat. Tato **miR** se účastní patogeneze aterosklerózy, cílí na antiapoptotický protein **Bcl-2** a indukuje apoptózu endoteliálních buněk (Madrigal-Matute et al., 2013). Snižená hladina **miR-365** byla nalezena i u pacientů s intrakraniálním aneurysmatem, kde pravděpodobně moduluje více genů účastnících se **TGF- β** a **MAPK** signalizace a ovlivňuje zánětlivé procesy, degradaci extracelulární matrix a apoptózu buněk hladkého svalstva cév, a její deregulace může v konečném důsledku vést k ruptuře cévní stěny (Supriya et al., 2021).

Snižené hladiny **miR-193** u aneurysmat byly již dříve nalezeny jak v plazmě (Zhang et al., 2015, Moushi et al., 2018), tak v aneurysmatické tkáni z abdominální a torakální aorty (Liao et al., 2011, Patuzzo et al., 2012). Shodně nalezená snížená exprese této **miR** v několika podobných publikacích potvrzuje roli této **miR** v patogenezi tohoto onemocnění. Její hladiny se také měnily v souvislosti s chirurgickým výkonem a Moushi et al., 2018 pozoroval zvýšení její exprese 5 až 7 dnů po operaci. Práce Araujo, která vyšla ve stejném roce jako naše publikace, rovněž potvrdila snížení hladin této **miR** u pacientů s AAA, a zároveň identifikovala možný cílový gen jako **ALOX 5** (Arachidonate 5-lipoxygenase). Ten se účastní syntézy eikosanoidů (arachidonové kyseliny a leukotrienů), prozánětlivých leukotrienů a zvyšuje infiltraci tkáně zánětlivými buňkami. Také se účastní modulace katepsinu K, a ovlivněním mnoha biologických procesů včetně obratu kolagenu se přímo podílí na patogenezi aneurysmat (Araujo et al., 2019). **miR-193** byla studována u i progenitorových buněk endotelu (endothelial colony-forming cells), kde hraje negativní regulační roli ovlivňující funkci cév, proliferaci a migraci buněk, a její inhibice stimuluje proliferaci, migraci a tvorbu cév (Grossi et al., 2017). **miR-193** je exprimována ve většině tkání (nejvíce v tukové a prsní) a její změněné expresní hladiny byly nalezeny i u jiných patologických stavů, zejména u některých onkologických onemocnění, kde jsou její hladiny rovněž sniženy, jako u AAA. U onkologických onemocnění hraje obvykle tumor supresorovou úlohu, zpomaluje buněčný cyklus, progresi, migraci a invazi nádorových buněk a brzdí tvorbu metastáz (Grossi et al., 2017).

miR-203a, u které jsme zaznamenali rovněž nižší expresi, je exprimována ve větší míře v kůži (keratinocytech) a jícnu, ovlivňuje růst buněk, jejich diferenciaci a přežívání. Je dysregulována u chronických zánětlivých onemocnění a má vyšší hladiny u pacientů

s psoriázou oproti zdravým kontrolám (Sonkoly et al., 2008). Jedním z jejích cílů je gen SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling-3), negativní regulátor STAT3 signalizace, která je aktivována zánětlivými cytokiny (Sonkoly et al., 2008). Dlouhodobá suprese SOCS-3 touto miR může způsobit silnější a prodlouženou zánětlivou reakci. SOCS-3 hraje i důležitou roli v patogenezi AAA a disekce aorty (Romain et al., 2013, Ohno-Urabe et al., 2018), a proto změněná exprese miR-203a může přispívat k patogenezi tohoto onemocnění, u kterého je zánět jedním z klíčových procesů. Nicholson et al. 2017 na modelu zjistil, že hladiny této miR se během procesu stárnutí v tkáni aorty zvyšují, snižují expresi cílových genů Src, caveolinu-1 a paxillinu, ovlivňují Src/ERK (extracellular signal-regulated kinases) signální dráhy a mění tím tuhost aortální stěny. Zvýšené hladiny miR-203 jsou spojovány se senescencí endoteliálních buněk i buněk hladkého svalu cév (Cao et al., 2020).

miR-30d patří do rodiny miR-30, která zahrnuje miR-30 a-e, a které se účastní regulace angiogeneze regulací exprese DLL4 (δ-like ligand 4) (Mao et al., 2018). Expresní hladiny miR-30d a miR-30b byly u našich pacientů s aneurysmatem statisticky významně sníženy, a pokud by nebyla provedena korekce na mnohočetná porovnání, byly by signifikantně snižené hladiny miR-30a-d. Spears et al. 2015 také pozoroval sníženou expresi miR-30a v aneurysmatické tkáni u pacientů s AAA ve srovnání s tkáni zdravou, a zároveň i snížené hladiny cirkulujících miR-30a, a to jak ve srovnání s pacienty s aterosklerózou (bez aneurysmat), tak i s pacienty s periferním onemocněním tepen. Snížené hladiny miR-30 v kardiovaskulárním systému přispívají k poškození endoplazmatického retikula (ER stres), které hraje důležitou roli v patogenezi různých kardiovaskulárních onemocnění včetně ICHS, srdečního selhání, aterosklerózy, hypertenze a mozkové mrtvice. U modelových pokusů vedl ER stres způsobený absencí miR-30 ke zvýšeným hladinám GRP78/ATF6/CHOP/kaspázy-12 a k buněčné smrti (Chen et al., 2014). Ciavarella et al. 2021 experimentálně potvrdil účast miR-30a a miR-30d na změně fenotypu buněk endotelu na mezenchymální (endothelial to mesenchymal transition), který je pozorován při poškození cév a uplatňuje se při jejich kalcifikaci a patogenezi aterosklerózy. Hladiny obou miR byly při pozorované změně fenotypu snižené (Ciavarella et al., 2021). Z publikovaných dat vyplývá, že snížené hladiny miR-30d jsou spojené s poškozením endoplazmatického retikula posilujícím proapoptotické dráhy, s poškozením cév, jejich kalcifikací a postupnými aterosklerotickými změnami, a tak mohou přispívat i k patogenezi aneurysmatu.

Rodina **miR-23/27/24** je kódována dvěma klastry, jedním intergenovým na chromozómu 19p13.13 kódujícím miR-27a, miR-23a a miR-24-2 a druhým intronovým na chromosomu 9q22.32 kódujícím miR-23b, miR-27b a miR-24-1. Všechny tyto miR, s výjimkou miR-23b,

měly v našem souboru aneurysmatických tkání sníženou expresi. Jednotliví členové této rodiny mikroRNA hrají roli v regulaci buněčného cyklu, proliferaci, diferenciaci a apoptóze a také v angiogenezi. **miR-23** reguluje růst kardiomyocytů, podporuje proliferaci buněk hladkých svalů cév a inhibuje jejich apoptózu cílením na BCL2L1 (gen BIM) (Liu et al., 2018).

miR-27 se v hojné míře vyskytuje v buňkách endotelu a silně vaskularizované tkáni. Inhibuje růst buněk endotelu ovlivněním exprese genů Rb, SEMA6A a SEMA6D, negativně reguluje signální dráhy MAPK a VEGFR2, a také může přispívat k tvorbě aterosklerotických plaků ovlivněním exprese MMP-13 (matrixová metaloproteináza 13 / kolagenáza-3) v těchto buňkách (Bang et al., 2012, Chen WJ et al., 2012). Tato miR ovlivňovala apoptózu endoteliálních buněk v myším modelu, kde její nižší hladiny vedly ke zvýšení exprese FADD (fas-associated protein with death domain) a aktivaci apoptózy buněk endotelu. Naopak zvýšení hladin inhibovalo progresi disekce aorty. Nižší hladiny miR-27 byly nalezeny, podobně jako v naší práci, ve tkáni pacientů s disekcí aorty (Sun et al., 2019), aneurysmatem abdominální aorty (Plana et al., 2019), v plazmě pacientů s AAA i subaneurysmální dilatací (Torres-Do Rego et al., 2020) a také s aterosklerózou (Telkoparan-Akillilar et al., 2021). Změny exprese miR-27 pozorované u více typů vaskulárních onemocnění potvrzují roli této miR v patogenezi cévních chorob.

miR-24 hraje rovněž důležitou roli v angiogenezi a apoptóze buněk cévního endotelu, přispívá ke vzniku kontraktálního fenotypu buněk hladkého svalstva cév a její hladiny v cévním endotelu srdce se zvyšují při ischemii a hypoxii (Bang et al., 2012)). Mezi její validované cíle patří GATA2 (GATA-binding transcription factor 2), p21 aktivovaná kináza PAK 4 (GATA-binding transcription factor 2), RASA1 (RAS p21 protein activator 1) a gen H2AFX (H2A histone family member X), které se podílejí na biologických procesech v endotelových buňkách (Bang et al., 2012). Maegdefessel et al., 2015, který studoval miR-24 v aneurysmatické tkáni zjistil, že hraje též důležitou roli v zánětu cév, kde prostřednictvím cílového genu Chi3l1 (chitinase 3-like protein 1) reguluje produkci cytokinů v makrofázích i jejich přežívání, migraci buněk hladkého svalstva v aortě, produkci adhezních molekul v buňkách endotelu, a tím ovlivňuje progresi aneurysmat (Maegdefessel et al., 2015). Nižší hladiny aktivují makrofágy a jsou prozánětlivé. Maegdefessel et al. 2015 našel snížené expresní hladiny miR-24 a miR-27b u pacientů s AAA, podobně jako v naší práci, s trendem k nižším hladinám u větších aneurysmat. Také tkáňová exprese Chi3l1 pozitivně korelovala se závažností onemocnění. Jiang et al. 2013 našel signifikantně snížené expresní hladiny miR-24 a miR-23 i v tkáni intrakraniálních aneurysmat ve srovnání s aneurysmatem nezměněnou tkání.

Tato publikovaná data podporují hypotézu, že snížené expresní hladiny miR-23/27/24 dysregulují angiogenezi, proliferaci buněk endotelu i hladkého svalu cév, jejich funkce i apoptózu, a společně s prozánětlivým působením přispívají k patogenezi a progresi abdominálního aneurysmatu aorty.

Naše práce testovala kompletní panel 2549 miRNA exprimovaných ve tkáni aorty s a bez aneurysmatických změn. Ve srovnání se zdravou tkání aorty jsme našli 6 odlišně exprimovaných miR u malých aneurysmat a 162 u velkých aneurysmat, z nichž 10 mělo expresi více jak dvojnásobně odlišnou. U miR-23/27/24, miR-193a a miR-30 byla již dříve publikována spojitost s patologickými změnami aorty, a naše zjištění jsou ve shodě s těmito daty. Dále jsme identifikovali miR-203a, miR-3663, miR-365a a miR-4291, u kterých dosud změny hladin ve spojitosti s AAA publikovány nebyly. Pokud se v budoucnosti potvrdí jejich role v progresi tohoto onemocnění, mohly by se stát biomarkery a/nebo i možným terapeutickým cílem.

8 Závěr

Posledních 40 let dominují diagnostice kardiovaskulárních chorob proteinové markery a stanovení řady biochemických parametrů. Nicméně přes jejich jednoznačný přínos, v některých oblastech dosud nejsou schopny zodpovědět všechny klinické otázky. S narůstajícím množstvím identifikovaných nekódujících RNA a pochopením jejich role v buňkách i v patogenezi řady onemocnění, vzrůstá snaha o využití těchto molekul vedle onkologických onemocnění také například u kardiovaskulárních chorob, a to jak pro diagnostiku, tak pro stanovení prognózy. S tím rovněž bezprostředně souvisí skutečnost, že v posledních 20 letech se staly dostupnými metody přesného stanovení expresních hladin RNA, a to ať již metody založené na principu real-time PCR, metody takzvaných microarray či metody sekvenace další generace. Výsledky výzkumu nekódujících RNA dosud ještě nejsou hmatatelné v té podobě, že by byly přímo využity v klinické praxi, nicméně řada identifikovaných molekul má vlastnosti, které bychom očekávali od biomarkerů pro kardiovaskulární choroby, a lze předpokládat, že například v kombinaci s již zavedenými standardními biomarkery dojde k využití těchto potenciálních nových biomarkerů pro přesnější diagnostiku či prognózu mnoha patologických stavů, kde samotné standardní markery nepostačují. Pro klinické využití molekul mikroRNA či lncRNA je, kromě pochopení jejich patofyziologické úlohy, klíčové provádění studií využívajících klinické vzorky a testování hypotéz jejich schopnosti diagnostikovat požadované stavy kardiovaskulárních chorob či predikovat rizika. Tento výzkum také přináší možnost pochopení dynamiky těchto molekul v krevní cirkulaci, a vhodnosti stanovení expresních hladin v jednotlivých časových bodech patogeneze sledovaných kardiovaskulárních onemocnění.

Touto problematikou se zabývá i Ústav biologie LF UK v Plzni, kde byly ve spolupráci s Biomedicínským centrem a klinickými pracovišti získány výsledky diskutované v této disertační práci. Zaměřili jsme se na hledání nových potenciálních biomarkerů ze skupiny mikroRNA. Soustředili jsme se na oblast kardiovaskulárních onemocnění, které díky své vysoké incidenci, prevalenci, chronicitě a svému vedoucímu postavení v četnosti hospitalizací i v příčinách úmrtí, představují velkou zátěž jak pro pacienty, tak i celý zdravotní systém.

Nalezli jsme mikroRNA, které by se mohly stát jedním z prediktivních biomarkerů mortality u pacientů s chronickou ICHS. Signifikantně snížené hladiny miR-1, miR-133, miR-223, miR-126 a miR-19a (dolní kvartil) u těchto stabilizovaných chronických pacientů

v sekundární prevenci po prodělané KV příhodě, od níž uplynulo nejméně půl roku, byly spojené se zvýšeným pětiletým rizikem celkového i kardiovaskulárního úmrtí. Po začlenění všech sledovaných miR spolu s dalšími proměnnými do regresního modelu, pouze snížené hladiny miR-19a byly u pacientů s chronickou ICHS prediktorem úmrtí (HRR: 3,00). Proto má tato mikroRNA ze všech sledovaných miR největší potenciál využití jako marker pětileté mortality.

Zjistili jsme na souboru pacientů s AIM, že i miR-499 má potenciál stát se prediktivním markerem zvýšeného ročního rizika úmrtí po této akutní příhodě. Všichni pacienti ve skupině zemřelých do jednoho roku měli vysoké hladiny miR-499 zároveň společně s vysokými hladinami standardního markeru NTproBNP (nad 891.5 ng/l). Pozorovali jsme signifikantní pozitivní korelaci mezi expresními hladinami miR-1, miR-133a, miR-499 a hsTnT a zároveň negativní korelaci všech tří miR s ejekční frakcí levé komory (EFLK) ve vzorcích odebraných 24 hodin po přijetí pacientů do nemocnice. Mediány relativních expresních hladin všech tří miR byly vyšší ve skupině zemřelých ve srovnání s přeživšími pacienty, tento rozdíl však nedosáhl statistické významnosti, pravděpodobně z důvodu nízkého počtu pacientů v jedné z porovnávaných skupin (N=6).

U téže miR-499 jsme našli potenciál stát se i diagnostickým markerem u pacientů se syndromem obstrukční spánkové apnoe (OSAS), syndromem spojeným s vysokou incidencí kardiovaskulárních onemocnění, kde opakované epizody hypoxie a hyperkapnie přispívají k rozvoji a progresi KV onemocnění, a naopak KV onemocnění zhoršují průběh OSAS. Expresní hladiny miR-499 byly u pacientů s OSAS signifikantně zvýšené ve srovnání s kontrolní skupinou.

V rámci výzkumu stanovení dynamiky progresu abdominálního aneurysmatu aorty jsme identifikovali panel mikroRNA dysregulovaných ve tkáni aorty změněné abdominálním aneurysmatem. U malých aneurysmat (s průměrem do 5 cm) bylo ve srovnání s nepostíženou tkáně nalezeno 6 miR se změněnou expresí (miR-7158-5p, miR-658, miR-517-5p, miR-122-5p, miR-326 a miR-3180), zatímco u velkých aneurysmat bylo nalezeno 162 miR, z celkového počtu 2549 porovnávaných miR. Všechny miR nalezené u malých aneurysmat byly změněné i u velkých aneurysmat, a to ve stejném směru. U velkých aneurysmat mělo expresní hladiny změněné více jak dvakrát celkem deset miR: miR-23a-3p, miR-24-3p, miR-27a-3p, miR-27b-3p, miR-30d-5p, miR-193a-3p, miR-203a-3p, miR-365a-3p, miR-4291 a miR-3663-3p, všechny s výjimkou miR-3663-3p byly sníženy. Potvrdili jsme tak dysregulaci rodiny miR-23/27/24, miR-193a a miR-30 u aneurysmat, která byla již dříve zmiňována v publikacích, a našli dosud nepublikované dysregulace u miR-203a, miR-3663, miR-365a a miR-4291.

Nové biomarkery představují jednu z možností jak zlepšit diagnostiku KV onemocnění, zpřesnit odhad KV rizik a v neposlední řadě přispět k personalizaci léčby. Nalezli jsme potenciální biomarkery ze skupiny mikroRNA, molekul, které jsou nyní v centru zájmu právě pro jejich velkou pravděpodobnost stát se novými diagnostickými, prediktivními a prognostickými markery, a následně i cílovými molekulami v terapii.

9 Nejvýznamnější výsledky

- U pacientů s akutním infarktem myokardu jsme identifikovali miR-499 jako potenciální biomarker, který by v kombinaci se standardním proteinovým markerem NTproBNP mohl sloužit jako prognostický marker mortality.
- Ve vzorcích plazmy pocházejících od pacientů s akutním infarktem myokardu jsme našli silnou pozitivní korelaci expresních hladin miR-1, miR-133 a miR-499 s hsTnT a s NTproBNP a negativní korelaci s EFLK.
- U stabilizovaných pacientů s chronickou ICHS s minimálně půlročním odstupem pro prodělané kardiovaskulární příhodu jsme identifikovali miR-19a jako potenciální prognostický marker mortality.
- U pacientů se syndromem obstrukční spánkové apnoe jsme našli kardijspecifickou miR-499, jejíž zvýšené expresní hladiny jsou spojovány s poškozením myokardu, jako potenciální diagnostický marker.
- V tkáni aneurysmat pocházejících od pacientů s abdominálním aneurysmatem aorty jsme ve srovnání s nepoškozenou aortální tkání našli panel dysregulovaných mikroRNA. U malých aneurysmat jsme identifikovali 6 miR a u velkých aneurysmat 162 miR se změněnou expresí. Změněné hladiny miR-203a, miR-3663, miR-365a a miR-4291 nebyly dříve publikovány.

10 Literatura

1. Agiannitopoulos K, Pavlopoulou P, Tsamis K, Bampali K, Samara P, Nasioulas G, Mertzanos G, Babalis D, Lamnissou K. *Expression of miR-208b and miR-499 in Greek Patients with Acute Myocardial Infarction*. In Vivo. 2018 Mar-Apr;32(2):313-318. doi: 10.21873/invivo.11239. PMID: 29475914; PMCID: PMC5905199.
2. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. *MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers*. Mutat Res. 2011 Dec 1;717(1-2):1-8. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009. Epub 2011 Mar 30. PMID: 21458467. PMID: 30423142; PMCID: PMC6323917.
3. Araujo NNF, Lin-Wang HT, Germano JF, Farsky PS, Feldman A, Rossi FH, Izukawa NM, Higuchi ML, Savioli Neto F, Hirata MH, Bertolami MC. *Dysregulation of microRNAs and target genes networks in human abdominal aortic aneurysm tissues*. PLoS One. 2019 Sep 20;14(9):e0222782. doi: 10.1371/journal.pone.0222782. PMID: 31539405; PMCID: PMC6754147. Mm
4. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M. *Argonaute 2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 22;108(12):5003-8. doi: 10.1073/pnas.1019055108. Epub 2011 Mar 7. PMID: 21383194; PMCID: PMC3064324.
5. Aydin S, Ugur K, Aydin S, Sahin İ, Yardim M. *Biomarkers in acute myocardial infarction: current perspectives*. Vasc Health Risk Manag. 2019 Jan 17;15:1-10. doi: 10.2147/VHRM.S166157. PMID: 30697054; PMCID: PMC6340361.
6. Bang C, Fiedler J, Thum T. *Cardiovascular importance of the microRNA-23/27/24 family*. Microcirculation. 2012 Apr;19(3):208-14. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00153.x. PMID: 22136461.
7. Białek S, Górko D, Zajkowska A, Kołtowski Ł, Grabowski M, Stachurska A, Kochman J, Sygitowicz G, Małeckı M, Opolski G, Sitkiewicz D. *Release kinetics of circulating miRNA-208a in the early phase of myocardial infarction*. Kardiol Pol. 2015;73(8):613-9. PMID: 26528525.
8. Bossone E, Eagle KA. *Epidemiology and management of aortic disease: aortic aneurysms and acute aortic syndromes*. Nat Rev Cardiol. 2021 May;18(5):331-348. doi: 10.1038/s41569-020-00472-6. Epub 2020 Dec 22. PMID: 33353985.

9. Býma S, Hradec J. *Prevence kardiovaskulárních onemocnění*. Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře 2018. Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře; Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP. Sokolská 31, 120 00 Praha 2; <http://www.svl.cz>; ISBN 978-80-86998-95-4
10. Cambien F, Tiret L. *Genetics of cardiovascular diseases: from single mutations to the whole genome*. *Circulation*. 2007 Oct 9;116(15):1714-24. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.661751. PMID: 17923582.
11. Cao Q, Wu J, Wang X, Song C. *Noncoding RNAs in Vascular Aging*. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Jan 4;2020:7914957. doi: 10.1155/2020/7914957. PMID: 31998442; PMCID: PMC6969641.
12. Carthew RW, Sontheimer EJ. *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. *Cell*. 2009 Feb 20;136(4):642-55. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.035. PMID: 19239886; PMCID: PMC2675692.
13. Cerrone M, Remme CA, Tadros R, Bezzina CR, Delmar M. *Beyond the One Gene-One Disease Paradigm: Complex Genetics and Pleiotropy in Inheritable Cardiac Disorders*. *Circulation*. 2019 Aug 13;140(7):595-610. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035954. Epub 2019 Aug 12. PMID: 31403841; PMCID: PMC6697136.
14. Ciavarella C, Motta I, Vasuri F, Fittipaldi S, Valente S, Pollutri D, Ricci F, Gargiulo M, Pasquinelli G. *Involvement of miR-30a-5p and miR-30d in Endothelial to Mesenchymal Transition and Early Osteogenic Commitment under Inflammatory Stress in HUVEC*. *Biomolecules*. 2021 Feb 5;11(2):226. doi: 10.3390/biom11020226. PMID: 33562690; PMCID: PMC7915105.
15. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. *Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease*. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Dec;3(6):499-506. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.957415. Epub 2010 Oct 4. PMID: 20921333.
16. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. *Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?* *Circ Res*. 2012 Feb 3;110(3):483-95. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247452. PMID: 22302755. Mm
17. Dai X, Wiernek S, Evans JP, Runge MS. *Genetics of coronary artery disease and myocardial infarction*. *World J Cardiol*. 2016 Jan 26;8(1):1-23. doi: 10.4330/wjc.v8.i1.1. PMID: 26839654; PMCID: PMC4728103.
18. de Ronde MWJ, Ruijter JM, Moerland PD, Creemers EE, Pinto-Sietsma SJ. *Study Design and qPCR Data Analysis Guidelines for Reliable Circulating miRNA Biomarker*

- Experiments: A Review.* Clin Chem. 2018 Sep;64(9):1308-1318. doi: 10.1373/clinchem.2017.285288. Epub 2018 Jun 14. PMID: 29903876.
19. Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S, Wagner DR. *Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction.* Clin Chem. 2012 Mar;58(3):559-67. doi: 10.1373/clinchem.2011.173823. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22252325.
 20. Dorn GW 2nd, Matkovich SJ, Eschenbacher WH, Zhang Y. *A human 3' miR-499 mutation alters cardiac mRNA targeting and function.* Circ Res. 2012 Mar 30;110(7):958-67. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.260752. Epub 2012 Feb 28. PMID: 22374132; PMCID: PMC3320730.
 21. Ebbesen KK, Kjems J, Hansen TB. *Circular RNAs: Identification, biogenesis and function.* Biochim Biophys Acta. 2016 Jan;1859(1):163-8. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.07.007. Epub 2015 Jul 11. PMID: 26171810.
 22. Elfaki I, Mir R, Mir MM, AbuDuhier FM, Babakr AT, Barnawi J. *Potential Impact of MicroRNA Gene Polymorphisms in the Pathogenesis of Diabetes and Atherosclerotic Cardiovascular Disease.* J Pers Med. 2019 Nov 25;9(4):51. doi: 10.3390/jpm9040051. PMID: 31775219; PMCID: PMC6963792.
 23. Fathil MF, Md Arshad MK, Gopinath SC, Hashim U, Adzhri R, Ayub RM, Ruslinda AR, Nuzaihan M N M, Azman AH, Zaki M, Tang TH. *Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin biomarkers.* Biosens Bioelectron. 2015 Aug 15;70:209-20. doi: 10.1016/j.bios.2015.03.037. Epub 2015 Mar 17. PMID: 25841117.
 24. Fatica A, Bozzoni I. *Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development.* Nat Rev Genet. 2014 Jan;15(1):7-21. doi: 10.1038/nrg3606. Epub 2013 Dec 3. PMID: 24296535.
 25. Freitas LS, Silveira AC, Martins FC, Costa-Hong V, Lebkuchen A, Cardozo KHM, Bernardes FM, Bortolotto LA, Lorenzi-Filho G, Oliveira EM, Drager LF. *Severe obstructive sleep apnea is associated with circulating microRNAs related to heart failure, myocardial ischemia, and cancer proliferation.* Sleep Breath. 2020 Dec;24(4):1463-1472. doi: 10.1007/s11325-019-02003-1. Epub 2020 Jan 3. PMID: 31898194.
 26. Gallant-Behm CL, Piper J, Lynch JM, Seto AG, Hong SJ, Mustoe TA, Maari C, Pestano LA, Dalby CM, Jackson AL, Rubin P, Marshall WS. *A MicroRNA-29 Mimic (Remlarsen) Represses Extracellular Matrix Expression and Fibroplasia in the Skin.* J Invest Dermatol. 2019 May;139(5):1073-1081. doi: 10.1016/j.jid.2018.11.007. Epub 2018 Nov 22. PMID: 30472058.

27. Ganovská E, Jarkovský J, Kala P, Poloczek M, Toman O, Pávková Goldbergová M et al. Zvýšená hladina NP u stabilních pacientů 3 měsíce po STEMI je jednoduchý nástroj k predikci dlouhodobé nepříznivé prognózy *Kardiol Rev Int Med* 2018; 20(1): 71– 76
28. Gao F, Kataoka M, Liu N, Liang T, Huang ZP, Gu F, Ding J, Liu J, Zhang F, Ma Q, Wang Y, Zhang M, Hu X, Kyselovic J, Hu X, Pu WT, Wang J, Chen J, Wang DZ. *Therapeutic role of miR-19a/19b in cardiac regeneration and protection from myocardial infarction.* *Nat Commun.* 2019 Apr 17;10(1):1802. doi: 10.1038/s41467-019-09530-1. PMID: 30996254; PMCID: PMC6470165.
29. Gebert LFR, MacRae IJ. *Regulation of microRNA function in animals.* *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Jan;20(1):21-37. doi: 10.1038/s41580-018-0045-7. PMID: 30108335; PMCID: PMC6546304.
30. Gidlöf O, Smith JG, Miyazu K, Gilje P, Spencer A, Blomquist S, Erlinge D. *Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction.* *BMC Cardiovasc Disord.* 2013 Feb 28;13:12. doi: 10.1186/1471-2261-13-12. PMID: 23448306; PMCID: PMC3598930.
31. Goretti E, Wagner DR, Devaux Y. *miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine?* *Trends Mol Med.* 2014 Dec;20(12):716-25. doi: 10.1016/j.molmed.2014.10.006. Epub 2014 Nov 5. PMID: 25457620.
32. Groot M, Lee H. *Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases.* *Cells.* 2020 Apr 22;9(4):1044. doi: 10.3390/cells9041044. PMID: 32331346; PMCID: PMC7226101.
33. Grossi I, Salvi A, Abeni E, Marchina E, De Petro G. *Biological Function of MicroRNA193a-3p in Health and Disease.* *Int J Genomics.* 2017;2017:5913195. doi: 10.1155/2017/5913195. Epub 2017 Sep 5. PMID: 29038785; PMCID: PMC5605928.
34. Guo JF, Zhang Y, Zheng QX, Zhang Y, Zhou HH, Cui LM. *Association between elevated plasma microRNA-223 content and severity of coronary heart disease.* *Scand J Clin Lab Invest.* 2018 Sep;78(5):373-378. doi: 10.1080/00365513.2018.1480059. Epub 2018 Jun 10. PMID: 29888618.
35. Hata A. *Functions of microRNAs in cardiovascular biology and disease.* *Annu Rev Physiol.* 2013;75:69-93. doi: 10.1146/annurev-physiol-030212-183737. Epub 2012 Nov 13. PMID: 23157557; PMCID: PMC5215839.
36. Henning RJ. *Cardiovascular Exosomes and MicroRNAs in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology.* *J Cardiovasc Transl Res.* 2021 Apr;14(2):195-212. doi: 10.1007/s12265-020-10040-5. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32588374.,,,
37. Hradec J, Býma S: *ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ. Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře 2018.* Společnost všeobecného

lékařství ČLS JEP Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře Sokolská 31,
120 00 Praha 2 <http://www.svl.cz>

38. Huang HY, Lin YC, Cui S, et al. miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(D1):D222-D230. doi:10.1093/nar/gkab1079 [miRTarBase: the experimentally validated microRNA-target interactions database \(cuhk.edu.cn\)](http://miRTarBase.cuhk.edu.cn)
39. Huang XH, Li JL, Li XY, Wang SX, Jiao ZH, Li SQ, Liu J, Ding J. *miR-208a in Cardiac Hypertrophy and Remodeling.* *Front Cardiovasc Med.* 2021 Dec 9;8:773314. doi: 10.3389/fcvm.2021.773314. PMID: 34957257; PMCID: PMC8695683.
40. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Lee SS. *Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update.* *J Adv Res.* 2020 Aug 29;28:127-138. doi: 10.1016/j.jare.2020.08.012. PMID: 33364050; PMCID: PMC7753224.
41. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. *A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis.* *Nature.* 2010 Jun 3;465(7298):584-9. doi: 10.1038/nature09092. PMID: 20424607; PMCID: PMC2995450.Vv
42. Chen M, Ma G, Yue Y, Wei Y, Li Q, Tong Z, Zhang L, Miao G, Zhang J. *Downregulation of the miR-30 family microRNAs contributes to endoplasmic reticulum stress in cardiac muscle and vascular smooth muscle cells.* *Int J Cardiol.* 2014 Apr 15;173(1):65-73. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.02.007. Epub 2014 Feb 20. PMID: 24612558. stress in cardiac muscle and vascular smooth muscle cells Jj
43. Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, Fu YC, Tang CK. *The magic and mystery of microRNA-27 in atherosclerosis.* *Atherosclerosis.* 2012 Jun;222(2):314-23. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.01.020. Epub 2012 Jan 18. PMID: 22307089.
44. Chen X, Zhang L, Su T, Li H, Huang Q, Wu D, Yang C, Han Z. *Kinetics of plasma microRNA-499 expression in acute myocardial infarction.* *J Thorac Dis.* 2015 May;7(5):890-6. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.11.32. PMID: 26101645; PMCID: PMC4454849.
45. Chen Y, Song Y, Huang J, Qu M, Zhang Y, Geng J, Zhang Z, Liu J, Yang GY. *Increased Circulating Exosomal miRNA-223 Is Associated with Acute Ischemic Stroke.* *Front Neurol.* 2017 Feb 27;8:57. doi: 10.3389/fneur.2017.00057. PMID: 28289400; PMCID: PMC5326773.
46. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. *Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction).* *J Mol Cell Cardiol.* 2016 May;94:107-121. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.03.015. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27056419.
47. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E,

- Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P; ESC Scientific Document Group. *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J. 2018 Jan 7;39(2):119-177. doi: 10.1093/eurheartj/ehx393. PMID: 28886621.
48. Jia K, Shi P, Han X, Chen T, Tang H, Wang J. *Diagnostic value of miR-30d-5p and miR-125b-5p in acute myocardial infarction*. Mol Med Rep. 2016 Jul;14(1):184-94. doi: 10.3892/mmr.2016.5246. Epub 2016 May 11. PMID: 27176713; PMCID: PMC4918561.
49. Jiang Y, Zhang M, He H, Chen J, Zeng H, Li J, Duan R. *MicroRNA/mRNA profiling and regulatory network of intracranial aneurysm*. BMC Med Genomics. 2013 Sep 30;6:36. doi: 10.1186/1755-8794-6-36. PMID: 24079748; PMCID: PMC3849943. L
50. Jo MH, Shin S, Jung SR, Kim E, Song JJ, Hohng S. *Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs*. Mol Cell. 2015 Jul 2;59(1):117-24. doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.027. PMID: 26140367.Vv
51. Joviliano EE, Ribeiro MS, Tenorio EJR. *MicroRNAs and Current Concepts on the Pathogenesis of Abdominal Aortic Aneurysm*. Braz J Cardiovasc Surg. 2017 May-Jun;32(3):215-224. doi: 10.21470/1678-9741-2016-0050. PMID: 28832801; PMCID: PMC5570395.
52. Kala P, Mates M, Želízko M, Rokyta R, Ošťádal P. *Doporučené postupy ESC pro léčbu akutního infarktu myokardu u pacientů s elevací úseku ST, 2017: souhrn dokumentu vypracovaný Českou kardiologickou společností*. Cor et Vasa 59 (2017) e613–e644, jak vyšel v online verzi Cor et Vasa na <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010865017301674>
53. Kalayinia S, Arjmand F, Maleki M, Malakootian M, Singh CP. *MicroRNAs: roles in cardiovascular development and disease*. Cardiovasc Pathol. 2021 Jan-Feb;50:107296. doi: 10.1016/j.carpath.2020.107296. Epub 2020 Oct 3. PMID: 33022373.
54. Kamasová M, Václavík J, Kociánová E, Táborský M. *Obstructive sleep apnea in outpatient care – What to do with?*. Cor et Vasa 60 (2018) e274–e280, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010865017301352K>
55. Karakas M, Schulte C, Appelbaum S, Ojeda F, Lackner KJ, Münzel T, Schnabel RB, Blankenberg S, Zeller T. *Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease-results from the large AtheroGene study*. Eur Heart J. 2017 Feb 14;38(7):516-523. doi: 10.1093/eurheartj/ehw250. PMID: 27357355.M

56. Karakas M, Schulte C, Appelbaum S, Ojeda F, Lackner KJ, Münzel T, Schnabel RB, Blankenberg S, Zeller T. *Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease-results from the large AtheroGene study*. Eur Heart J. 2017 Feb 14;38(7):516-523. doi: 10.1093/eurheartj/ehw250. PMID: 27357355.
57. Khan S, Ayub H, Khan T, Wahid F. *MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer*. Biochimie. 2019 Dec;167:12-24. doi: 10.1016/j.biochi.2019.09.001. Epub 2019 Sep 4. PMID: 31493469.
58. Koo CX, Kobiyama K, Shen YJ, LeBert N, Ahmad S, Khatoo M, Aoshi T, Gasser S, Ishii KJ. *RNA polymerase III regulates cytosolic RNA:DNA hybrids and intracellular microRNA expression*. J Biol Chem. 2015 Mar 20;290(12):7463-73. doi: 10.1074/jbc.M115.636365. Epub 2015 Jan 26. PMID: 25623070; PMCID: PMC4367256.Vv
59. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. *miRBase: from microRNA sequences to function*. Nucleic Acids Res. 2019 Jan 8;47(D1):D155-D162. doi: 10.1093/nar/gky1141.
60. Kulcheski FR, Christoff AP, Margis R. *Circular RNAs are miRNA sponges and can be used as a new class of biomarker*. J Biotechnol. 2016 Nov 20;238:42-51. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.09.011. Epub 2016 Sep 23. PMID: 27671698.
61. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al; *International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature. 2001 Feb 15;409(6822):860-921. doi: 10.1038/35057062. Erratum in: Nature 2001 Aug 2;412(6846):565. Erratum in: Nature 2001 Jun 7;411(6838):720. Szustakowki, J [corrected to Szustakowski, J]. PMID: 11237011.Kk
62. Lee GK, Hsieh YP, Hsu SW, Lan SJ. *Exploring diagnostic and prognostic predictive values of microRNAs for acute myocardial infarction: A PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis*. Medicine (Baltimore). 2021 Jul 23;100(29):e26627. doi: 10.1097/MD.00000000000026627. PMID: 34398018; PMCID: PMC8294880.
63. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. *A short history of a short RNA*. Cell. 2004 Jan 23;116(2 Suppl):S89-92, 1 p following S96. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00035-2. PMID: 15055592.
64. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell. 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y. PMID: 8252621.
65. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J. 2004 Oct 13;23(20):4051-60. doi: 10.1038/sj.emboj.7600385. Epub 2004 Sep 16. PMID: 15372072; PMCID: PMC524334.

66. Li C, Feng Y, Coukos G, Zhang L. *Therapeutic microRNA strategies in human cancer*. AAPS J. 2009 Dec;11(4):747-57. doi: 10.1208/s12248-009-9145-9. Epub 2009 Oct 29. PMID: 19876744; PMCID: PMC2782079.
67. Li K, Wei P, Qin Y, Wei Y. *MicroRNA expression profiling and bioinformatics analysis of dysregulated microRNAs in obstructive sleep apnea patients*. Medicine (Baltimore). 2017 Aug;96(34):e7917. doi: 10.1097/MD.00000000000007917. PMID: 28834917; PMCID: PMC5572039.
68. Li Q, Song XW, Zou J, Wang GK, Kremneva E, Li XQ, Zhu N, Sun T, Lappalainen P, Yuan WJ, Qin YW, Jing Q. *Attenuation of microRNA-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twinfilin-1 to provoke cardiac hypertrophy*. J Cell Sci. 2010 Jul 15;123(Pt 14):2444-52. doi: 10.1242/jcs.067165. Epub 2010 Jun 22. Erratum in: J Cell Sci. 2010 Aug 1;123(Pt 15):2680. PMID: 20571053
69. Li X, Teng C, Ma J, Fu N, Wang L, Wen J, Wang TY. *miR-19 family: A promising biomarker and therapeutic target in heart, vessels and neurons*. Life Sci. 2019 Sep 1;232:116651. doi: 10.1016/j.lfs.2019.116651. Epub 2019 Jul 11. PMID: 31302195.
70. Li Y, Lu J, Bao X, Wang X, Wu J, Li X, Hong W. *MiR-499-5p protects cardiomyocytes against ischaemic injury via anti-apoptosis by targeting PDCD4*. Oncotarget. 2016 Jun 14;7(24):35607-35617. doi: 10.18632/oncotarget.9597. PMID: 27231854; PMCID: PMC5094948.
71. Liao C, Gui Y, Guo Y, Xu D. *The regulatory function of microRNA-1 in arrhythmias*. Mol Biosyst. 2016 Feb;12(2):328-33. doi: 10.1039/c5mb00806a. PMID: 26671473.
72. Liao M, Zou S, Weng J, Hou L, Yang L, Zhao Z, Bao J, Jing Z. *A microRNA profile comparison between thoracic aortic dissection and normal thoracic aorta indicates the potential role of microRNAs in contributing to thoracic aortic dissection pathogenesis*. J Vasc Surg. 2011 May;53(5):1341-1349.e3. doi: 10.1016/j.jvs.2010.11.113. Epub 2011 Feb 18. PMID: 21334170.
73. Liu L, Cheng Z, Yang J. *miR-23 regulates cell proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells in coronary heart disease*. Pathol Res Pract. 2018 Nov;214(11):1873-1878. doi: 10.1016/j.prp.2018.09.004. Epub 2018 Sep 13. PMID: 30249504.
74. Liu X, Xu Y, Deng Y, Li H. *MicroRNA-223 Regulates Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction by Targeting RASA1*. Cell Physiol Biochem. 2018;46(4):1439-1454. doi: 10.1159/000489185. Epub 2018 Apr 19. PMID: 29689569.
75. Liu X, Zhang Y, Du W, Liang H, He H, Zhang L, Pan Z, Li X, Xu C, Zhou Y, Wang L, Qian M, Liu T, Yin H, Lu Y, Yang B, Shan H. *MiR-223-3p as a Novel MicroRNA Regulator of Expression of Voltage-Gated K⁺ Channel Kv4.2 in Acute Myocardial*

- Infarction*. Cell Physiol Biochem. 2016;39(1):102-14. doi: 10.1159/000445609. Epub 2016 Jun 20. PMID: 27322747. Regulator of Expression of Voltage-Gated
76. Luo HC, Luo QS, Wang CF, Lei M, Li BL, Wei YS. *Association of miR-146a, miR-149, miR-196a2, miR-499 gene polymorphisms with ischemic stroke in a Chinese people*. Oncotarget. 2017 Jun 1;8(46):81295-81304. doi: 10.18632/oncotarget.18333. PMID: 29113388; PMCID: PMC5655283.
77. Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda JF, Fernández-Hernando C. *MicroRNAs and atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep. 2013 May;15(5):322. doi: 10.1007/s11883-013-0322-z. PMID: 23512606; PMCID: PMC4193541.
78. Maegdefessel L, Spin JM, Raaz U, Eken SM, Toh R, Azuma J, Adam M, Nakagami F, Heymann HM, Chernogubova E, Jin H, Roy J, Hultgren R, Caidahl K, Schrepfer S, Hamsten A, Eriksson P, McConnell MV, Dalman RL, Tsao PS. *miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development*. Nat Commun. 2014 Oct 31;5:5214. doi: 10.1038/ncomms6214. Erratum in: Nat Commun. 2015;6:6506. Nagakami, Futoshi [corrected to Nakagami, Futoshi]; Chernugobova, Ekaterina [corrected to Chernogubova, Ekaterina]. PMID: 25358394; PMCID: PMC4217126.
79. Mansouri F, Seyed Mohammadzad MH. *Molecular miR-19a in Acute Myocardial Infarction: Novel Potential Indicators of Prognosis and Early Diagnosis*. Asian Pac J Cancer Prev. 2020 Apr 1;21(4):975-982. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.4.975. PMID: 32334458; PMCID: PMC7445987.
80. Mao L, Liu S, Hu L, Jia L, Wang H, Guo M, Chen C, Liu Y, Xu L. *miR-30 Family: A Promising Regulator in Development and Disease*. Biomed Res Int. 2018 May 29;2018:9623412. doi: 10.1155/2018/9623412. PMID: 30003109; PMCID: PMC5996469.
81. Matkovich SJ, Hu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Dorn GW 2nd. *Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy*. Circ Res. 2012 Aug 17;111(5):521-31. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.265736. Epub 2012 Jun 29. PMID: 22752967; PMCID: PMC3429338.
82. McCool MA, Bryant CJ, Baserga SJ. *MicroRNAs and long non-coding RNAs as novel regulators of ribosome biogenesis*. Biochem Soc Trans. 2020 Apr 29;48(2):595-612. doi: 10.1042/BST20190854. PMID: 32267487; PMCID: PMC7200637.
83. Mehra R. *Sleep apnea and the heart*. Cleve Clin J Med. 2019 Sep;86(9 Suppl 1):10-18. doi: 10.3949/ccjm.86.s1.03. PMID: 31509499.
84. Memon AA, Zarrouk M, Ågren-Witteschus S, Sundquist J, Gottsäter A, Sundquist K. *Identification of novel diagnostic and prognostic biomarkers for abdominal aortic*

- aneurysm*. Eur J Prev Cardiol. 2020 Jan;27(2):132-142. doi: 10.1177/2047487319873062. Epub 2019 Aug 29. PMID: 31466471.
85. Mencía A, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, Aguirre LA, del Castillo I, Steel KP, Dalmay T, Moreno F, Moreno-Pelayo MA. *Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss*. Nat Genet. 2009 May;41(5):609-13. doi: 10.1038/ng.355. Epub 2009 Apr 12. PMID: 19363479.
86. Miao L, Yao H, Li C, Pu M, Yao X, Yang H, Qi X, Ren J, Wang Y. *A dual inhibition: microRNA-552 suppresses both transcription and translation of cytochrome P450 2E1*. Biochim Biophys Acta. 2016 Apr;1859(4):650-62. doi: 10.1016/j.bbaggm.2016.02.016. Epub 2016 Feb 27. PMID: 26926595.
87. Michlewski G, Cáceres JF. *Post-transcriptional control of miRNA biogenesis*. RNA. 2019 Jan;25(1):1-16. doi: 10.1261/rna.068692.118. Epub 2018 Oct 17. PMID: 30333195; PMCID: PMC6298569.
88. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 29;105(30):10513-8. doi: 10.1073/pnas.0804549105. Epub 2008 Jul 28. PMID: 18663219; PMCID: PMC2492472.
89. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. *Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease*. Cell Metab. 2019 Oct 1;30(4):656-673. doi: 10.1016/j.cmet.2019.07.011. Epub 2019 Aug 22. PMID: 31447320; PMCID: PMC6774861.
90. Moushi A, Michailidou K, Soteriou M, Cariolou M, Bashiardes E. *MicroRNAs as possible biomarkers for screening of aortic aneurysms: a systematic review and validation study*. Biomarkers. 2018 May;23(3):253-264. doi: 10.1080/1354750X.2018.1423704. Epub 2018 Jan 15. PMID: 29297231.
91. Mythili S, Malathi N. *Diagnostic markers of acute myocardial infarction*. Biomed Rep. 2015 Nov;3(6):743-748. doi: 10.3892/br.2015.500. Epub 2015 Jul 29. PMID: 26623010; PMCID: PMC4660641.
92. Nicholson CJ, Seta F, Lee S, Morgan KG. *MicroRNA-203 mimics age-related aortic smooth muscle dysfunction of cytoskeletal pathways*. J Cell Mol Med. 2017 Jan;21(1):81-95. doi: 10.1111/jcmm.12940. Epub 2016 Aug 9. PMID: 27502584; PMCID: PMC5192880.
93. Nussbaum RL et al., *Klinická genetika*. 6. vydání, 2004. TRITON. ISBN10 8072544756

94. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. *Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation*. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Aug 3;9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402. PMID: 30123182; PMCID: PMC6085463.
95. Ogino S, Gulley ML, den Dunnen JT, Wilson RB; Association for Molecular Pathology Training and Education Committee. *Standard mutation nomenclature in molecular diagnostics: practical and educational challenges*. *J Mol Diagn*. 2007 Feb;9(1):1-6. doi: 10.2353/jmoldx.2007.060081. Erratum in: *J Mol Diagn*. 2009 Sep 1;11(5):494. PMID: 17251329; PMCID: PMC1867422.
96. Ohanian M, Humphreys DT, Anderson E, Preiss T, Fatkin D. *A heterozygous variant in the human cardiac miR-133 gene, MIR133A2, alters miRNA duplex processing and strand abundance*. *BMC Genet*. 2013 Mar 6;14:18. doi: 10.1186/1471-2156-14-18. PMID: 23497314; PMCID: PMC3599331.
97. Ohno-Urabe S, Aoki H, Nishihara M, Furusho A, Hirakata S, Nishida N, Ito S, Hayashi M, Yasukawa H, Imaizumi T, Akashi H, Tanaka H, Fukumoto Y. *Role of Macrophage Socs3 in the Pathogenesis of Aortic Dissection*. *J Am Heart Assoc*. 2018 Jan 17;7(2):e007389. doi: 10.1161/JAHA.117.007389. PMID: 29343476; PMCID: PMC5850160.
98. Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, D'Alessandra Y, Lazzarini R, Santini G, Spazzafumo L, Lisa R, La Sala L, Galeazzi R, Recchioni R, Testa R, Pompilio G, Capogrossi MC, Procopio AD. *Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction*. *Int J Cardiol*. 2013 Jul 31;167(2):531-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.01.075. Epub 2012 Feb 12. PMID: 22330002.
99. Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. *MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):460-71. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.001. PMID: 18498749.
100. Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, Ter Maaten JM, Valente MA, Liu LC, van der Harst P, Pinto YM, de Boer RA, Meyer S, Teerlink JR, O'Connor CM, Metra M, Davison BA, Bloomfield DM, Cotter G, Cleland JG, Mebazaa A, Laribi S, Givertz MM, Ponikowski P, van der Meer P, van Veldhuisen DJ, Voors AA, Berezikov E. *Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure*. *Eur J Heart Fail*. 2016 Apr;18(4):414-23. doi: 10.1002/ejhf.332. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26345695.
101. Patuzzo C, Pasquali A, Malerba G, Trabetti E, Pignatti P, Tessari M, Faggian G. *A Preliminary microRNA Analysis of Non Syndromic Thoracic Aortic Aneurysms*. *Balkan J Med Genet*. 2012 Dec;15(Suppl):51-5. doi: 10.2478/v10034-012-0019-6. PMID: 24052744; PMCID: PMC3776682.

102. Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, Langthasa M, Rahman M, Bari M, Singha RS, Malakar AK, Chakraborty S. *Interplay between miRNAs and human diseases*. J Cell Physiol. 2018 Mar;233(3):2007-2018. doi: 10.1002/jcp.25854. Epub 2017 Apr 27. PMID: 28181241.
103. Pinilla L, Barbé F, de Gonzalo-Calvo D. *MicroRNAs to guide medical decision-making in obstructive sleep apnea: A review*. Sleep Med Rev. 2021 Oct;59:101458. doi: 10.1016/j.smrv.2021.101458. Epub 2021 Jan 22. PMID: 33582532.
104. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. *MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 5;105(5):1608-13. doi: 10.1073/pnas.0707594105. Epub 2008 Jan 28. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Mar 19;: PMID: 18227514; PMCID: PMC2234192.
105. Plana E, Galvez L, Medina P, Navarro S, Fornes V, Miralles M. *Study of Dysregulated Micrornas in Abdominal Aortic Aneurysm Tissue*. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2019, Volume 58, Issue 6, Supplement 2, e350; doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.06.974>
106. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, Reinhardt F, Liao R, Krieger M, Jaenisch R, Lodish HF, Blulloch R. *Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure*. Circ Res. 2009 Sep 11;105(6):585-94. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.200451. Epub 2009 Aug 13. PMID: 19679836; PMCID: PMC2828903.
107. Rao PK, Toyama Y, Chiang HR, Gupta S, Bauer M, Medvid R, Reinhardt F, Liao R, Krieger M, Jaenisch R, Lodish HF, Blulloch R. *Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure*. Circ Res. 2009 Sep 11;105(6):585-94. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.200451. Epub 2009 Aug 13. PMID: 19679836; PMCID: PMC2828903.
108. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature. 2000 Feb 24;403(6772):901-6. doi: 10.1038/35002607. PMID: 10706289.
109. Romain M, Taleb S, Dalloz M, Ponnuswamy P, Esposito B, Pérez N, Wang Y, Yoshimura A, Tedgui A, Mallat Z. *Overexpression of SOCS3 in T lymphocytes leads to impaired interleukin-17 production and severe aortic aneurysm formation in mice -brief report*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Mar;33(3):581-4. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300516. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23329138.

110. Romaine SP, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. *MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians*. Heart. 2015 Jun;101(12):921-8. doi: 10.1136/heartjnl-2013-305402. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25814653; PMCID: PMC4484262.
111. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. *A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?* Cell. 2011 Aug 5;146(3):353-8. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.014. Epub 2011 Jul 28. PMID: 21802130; PMCID: PMC3235919.
112. Santamaria-Martos F, Benítez I, Ortega F, Zapater A, Giron C, Pinilla L, Pascual L, Cortijo A, Dalmases M, Fernandez-Real JM, Barbé F, Sánchez-de-la-Torre M. *Circulating microRNA profile as a potential biomarker for obstructive sleep apnea diagnosis*. Sci Rep. 2019 Sep 17;9(1):13456. doi: 10.1038/s41598-019-49940-1. PMID: 31530881; PMCID: PMC6748919.
113. Saunders MA, Liang H, Li WH. *Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27;104(9):3300-5. doi: 10.1073/pnas.0611347104. Epub 2007 Feb 20. PMID: 17360642; PMCID: PMC1805605.
114. Shi J, Liu H, Wang H, Kong X. *MicroRNA Expression Signature in Degenerative Aortic Stenosis*. Biomed Res Int. 2016;2016:4682172. doi: 10.1155/2016/4682172. Epub 2016 Aug 4. PMID: 27579316; PMCID: PMC4989063.
115. Shi Y, Han Y, Niu L, Li J, Chen Y. *MiR-499 inhibited hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes injury by targeting SOX6*. Biotechnol Lett. 2019 Jul;41(6-7):837-847. doi: 10.1007/s10529-019-02685-3. Epub 2019 May 10. PMID: 31076992; PMCID: PMC6551346.
116. Silbernagl S. *Color Atlas of Physiology*. Šesté vydání. 2015. Thieme, Stuttgart. ISBN- 13: 978-3-13-545007-0, ISBN-10: 3-13-545007-4
117. Snustad DP, Simmons MJ, Relichová J. 2009. *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita.
118. Sonkoly E, Stähle M, Pivarcsi A. *MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation*. Semin Cancer Biol. 2008 Apr;18(2):131-40. doi: 10.1016/j.semcancer.2008.01.005. Epub 2008 Jan 15. PMID: 18291670.
119. Sonkoly E, Stähle M, Pivarcsi A. *MicroRNAs: novel regulators in skin inflammation*. Clin Exp Dermatol. 2008 May;33(3):312-5. doi: 10.1111/j.1365-2230.2008.02804.x. PMID: 18419608.
120. Spear R, Boytard L, Blervaque R, Chwastyniak M, Hot D, Vanhoutte J, Staels B, Lemoine Y, Lamblin N, Pruvot FR, Haulon S, Amouyel P, Pinet F. *Adventitial Tertiary*

- Lymphoid Organs as Potential Source of MicroRNA Biomarkers for Abdominal Aortic Aneurysm.* Int J Mol Sci. 2015 May 18;16(5):11276-93. doi: 10.3390/ijms160511276. PMID: 25993295; PMCID: PMC4463700.
121. Stather PW, Sidloff DA, Dattani N, Gokani VJ, Choke E, Sayers RD, Bown MJ. *Meta-analysis and meta-regression analysis of biomarkers for abdominal aortic aneurysm.* Br J Surg. 2014 Oct;101(11):1358-72. doi: 10.1002/bjs.9593. Epub 2014 Aug 18. PMID: 25131707.
122. Stavast CJ, Erkeland SJ. *The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation.* Cells. 2019 Nov 19;8(11):1465. doi: 10.3390/cells8111465. PMID: 31752361; PMCID: PMC6912820.
123. Sun Y, Xiao Y, Sun H, Zhao Z, Zhu J, Zhang L, Dong J, Han T, Jing Q, Zhou J, Jing Z. miR-27a regulates vascular remodeling by targeting endothelial cells' apoptosis and interaction with vascular smooth muscle cells in aortic dissection. *Theranostics.* 2019 Oct 18;9(25):7961-7975. doi: 10.7150/thno.35737. PMID: 31695809; PMCID: PMC6831472.
124. Supriya M, Christopher R, Devi BI, Bhat DI, Shukla D, Kalpana SR. *Altered MicroRNA Expression in Intracranial Aneurysmal Tissues: Possible Role in TGF- β Signaling Pathway.* Cell Mol Neurobiol. 2021 Jun 29. doi: 10.1007/s10571-021-01121-3. Epub ahead of print. PMID: 34185228.
125. Šonka K, Slonková J. *Spánková apnoe dospělého věku.* Cesk Slov Neurol N 2008; 71/ 104(6): 643– 656
126. Šťásek J, Němec P, Vítovec J. *Summary of the 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Prepared by the Czech Society of Cardiology,* Cor et Vasa 57 (2015) e297–e319, <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010865015000466K>
127. Taïbi F, Metzinger-Le Meuth V, Massy ZA, Metzinger L. miR-223: *An inflammatory oncomiR enters the cardiovascular field.* Biochim Biophys Acta. 2014 Jul;1842(7):1001-9. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.03.005. Epub 2014 Mar 18. PMID: 24657505.
128. Telkoparan-Akillilar P, Cevik D. *Identification of miR-17, miR-21, miR-27a, miR-106b and miR-222 as endoplasmic reticulum stress-related potential biomarkers in circulation of patients with atherosclerosis.* Mol Biol Rep. 2021 Apr;48(4):3503-3513. doi: 10.1007/s11033-021-06352-7. Epub 2021 Apr 15. PMID: 33860430.
129. ThermoFisher T123-Technical bulletin. *Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios.* 2012. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/T123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdfK>

130. Timmis A, Vardas P, Townsend N, Torbica A, Katus H, De Smedt D, Gale CP, Maggioni AP, Petersen SE, Huculeci R, Kazakiewicz D, de Benito Rubio V, Ignatiuk B, Raisi-Estabragh Z, Pawlak A, Karagiannidis E, Treskes R, Gaita D, Beltrame JF, McConnell A, Bardinet I, Graham I, Flather M, Elliott P, Mossialos EA, Weidinger F, Achenbach S; Atlas Writing Group. *European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021*. Eur Heart J. 2022 Jan 7;ehab892. doi: 10.1093/eurheartj/ehab892. Epub ahead of print. PMID: 35016208.
131. Torres-Do Rego A, Barrientos M, Ortega-Hernández A, Modrego J, Gómez-Gordo R, Álvarez-Sala LA, Cachafeiro V, Gómez-Garre D. *Identification of a Plasma MicroRNA Signature as Biomarker of Subaneurysmal Aortic Dilatation in Patients with High Cardiovascular Risk*. J Clin Med. 2020 Aug 28;9(9):2783. doi: 10.3390/jcm9092783. PMID: 32872191; PMCID: PMC7565169.
132. Townsend N, Kazakiewicz D, Lucy Wright F, Timmis A, Huculeci R, Torbica A, Gale CP, Achenbach S, Weidinger F, Vardas P. *Epidemiology of cardiovascular disease in Europe*. Nat Rev Cardiol. 2022 Feb;19(2):133-143. doi: 10.1038/s41569-021-00607-3. Epub 2021 Sep 8. PMID: 34497402.
133. Treiber T, Treiber N, Meister G. *Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019 Jan;20(1):5-20. doi: 10.1038/s41580-018-0059-1. Erratum in: Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 Dec;19(12):808. Erratum in: Nat Rev Mol Cell Biol. 2019 May;20(5):321. PMID: 30228348.
134. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 Nucleic Acids Res. 49:D1 (2021) <https://www.uniprot.org>
135. ÚZIS 2019: Zdravotnická ročenka České republiky 2018 (<https://www.uzis.cz/index.php?pg=vystupy--knihovna&id=275>)
136. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. *A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 28;103(48):18255-60. doi: 10.1073/pnas.0608791103. Epub 2006 Nov 15. PMID: 17108080; PMCID: PMC1838739.
137. Waks JW, Buxton AE. *Risk Stratification for Sudden Cardiac Death After Myocardial Infarction*. Annu Rev Med. 2018 Jan 29;69:147-164. doi: 10.1146/annurev-med-041316-090046. PMID: 29414264.
138. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. *Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans*. Eur Heart J. 2010 Mar;31(6):659-66. doi: 10.1093/eurheartj/ehq013. Epub 2010 Feb 16. PMID: 20159880.

139. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q. *Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans*. Eur Heart J. 2010 Mar;31(6):659-66. doi: 10.1093/eurheartj/ehq013. Epub 2010 Feb 16. PMID: 20159880.
140. Wang W, Li T, Gao L, Li Y, Sun Y, Yao HC. *Plasma miR-208b and miR-499: Potential Biomarkers for Severity of Coronary Artery Disease*. Dis Markers. 2019 Nov 22;2019:9842427. doi: 10.1155/2019/9842427. PMID: 31885748; PMCID: PMC6893238.
141. Wang X, Lian Y, Wen X, Guo J, Wang Z, Jiang S, Hu Y. *Expression of miR-126 and its potential function in coronary artery disease*. Afr Health Sci. 2017 Jun;17(2):474-480. doi: 10.4314/ahs.v17i2.22. PMID: 29062343; PMCID: PMC5637033.
142. Welten SM, Goossens EA, Quax PH, Nossent AY. *The multifactorial nature of microRNAs in vascular remodelling*. Cardiovasc Res. 2016 May 1;110(1):6-22. doi: 10.1093/cvr/cvw039. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26912672.
143. Xiao Y, Zhao J, Tuazon JP, Borlongan CV, Yu G. *MicroRNA-133a and Myocardial Infarction*. Cell Transplant. 2019 Jul;28(7):831-838. doi: 10.1177/0963689719843806. Epub 2019 Apr 14. PMID: 30983393; PMCID: PMC6719504.
144. Xiaoyu L, Wei Z, Ming Z, Guowei J. *Anti-apoptotic Effect of MiR-223-3p Suppressing PIK3C2A in Cardiomyocytes from Myocardial Infarction Rat Through Regulating PI3K/Akt Signaling Pathway*. Cardiovasc Toxicol. 2021 Aug;21(8):669-682. doi: 10.1007/s12012-021-09658-x. Epub 2021 May 17. PMID: 33999393.J
145. Xie J, Sert Kuniyoshi FH, Covassin N, Singh P, Gami AS, Wang S, Chahal CA, Wei Y, Somers VK. *Nocturnal Hypoxemia Due to Obstructive Sleep Apnea Is an Independent Predictor of Poor Prognosis After Myocardial Infarction*. J Am Heart Assoc. 2016 Jul 27;5(8):e003162. doi: 10.1161/JAHA.115.003162. PMID: 27464791; PMCID: PMC5015271.
146. Xue S, Liu D, Zhu W, Su Z, Zhang L, Zhou C, Li P. *Circulating MiR-17-5p, MiR-126-5p and MiR-145-3p Are Novel Biomarkers for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction*. Front Physiol. 2019 Feb 18;10:123. doi: 10.3389/fphys.2019.00123. PMID: 30833907; PMCID: PMC6387945.
147. Yeghiazarians Y, Jneid H, Tietjens JR, Redline S, Brown DL, El-Sherif N, Mehra R, Bozkurt B, Ndumele CE, Somers VK. *Obstructive Sleep Apnea and Cardiovascular Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association*. Circulation. 2021 Jul 20;144(3):e56-e67. doi: 10.1161/CIR.0000000000000988. Epub 2021 Jun 21. PMID: 34148375.

148. Zafarová Z. *Aktuální témata kardiovaskulární prevence*. Vnitr Lek 2021, 67(6):372-377 DOI: 10.36290/vnl.2021.096
149. Zampetaki A, Willeit P, Tilling L, Drozdov I, Prokopi M, Renard JM, Mayr A, Weger S, Schett G, Shah A, Boulanger CM, Willeit J, Chowienczyk PJ, Kiechl S, Mayr M. *Prospective study on circulating MicroRNAs and risk of myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol. 2012 Jul 24;60(4):290-9. doi: 10.1016/j.jacc.2012.03.056. PMID: 22813605.
150. Zhang L, Ding H, Zhang Y, Wang Y, Zhu W, Li P. *Circulating MicroRNAs: Biogenesis and Clinical Significance in Acute Myocardial Infarction*. Front Physiol. 2020 Sep 3;11:1088. doi: 10.3389/fphys.2020.01088. PMID: 33013463; PMCID: PMC7494963.
151. Zhang W, Shang T, Huang C, Yu T, Liu C, Qiao T, Huang D, Liu Z, Liu C. *Plasma microRNAs serve as potential biomarkers for abdominal aortic aneurysm*. Clin Biochem. 2015 Oct;48(15):988-92. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.04.016. Epub 2015 Apr 25. PMID: 25916817.
152. Zhao J, Yu H, Yan P, Zhou X, Wang Y, Yao Y. *Circulating MicroRNA-499 as a Diagnostic Biomarker for Acute Myocardial Infarction: A Meta-analysis*. Dis Markers. 2019 May 2;2019:6121696. doi: 10.1155/2019/6121696. PMID: 31191754; PMCID: PMC6525911.
153. Zhong J, He Y, Chen W, Shui X, Chen C, Lei W. *Circulating microRNA-19a as a potential novel biomarker for diagnosis of acute myocardial infarction*. Int J Mol Sci. 2014 Nov 6;15(11):20355-64. doi: 10.3390/ijms151120355. PMID: 25383678; PMCID: PMC4264171.
154. Zhou SS, Jin JP, Wang JQ, Zhang ZG, Freedman JH, Zheng Y, Cai L. *miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges*. Acta Pharmacol Sin. 2018 Jul;39(7):1073-1084. doi: 10.1038/aps.2018.30. Epub 2018 Jun 7. PMID: 29877320; PMCID: PMC6289363.

11 Seznam publikací v příloze I

Originální práce:

1. Černá V, Ostašov P, Pitule P, Moláček J, Třeška V, Pešta M. *The Expression Profile of MicroRNAs in Small and Large Abdominal Aortic Aneurysms*. *Cardiol Res Pract*. 2019 Nov 29;2019:8645840. doi: 10.1155/2019/8645840. PMID: 31885906; PMCID: PMC6914980.
2. Hromádka M, Černá V, Pešta M, Kučerová A, Jarkovský J, Rajdl D, Rokyta R, Mořovská Z. *Prognostic Value of MicroRNAs in Patients after Myocardial Infarction: A Substudy of PRAGUE-18*. *Dis Markers*. 2019 Nov 3;2019:2925019. doi: 10.1155/2019/2925019. PMID: 31781298; PMCID: PMC6875251.
3. Mayer O Jr, Seidlerová J, Černá V, Kučerová A, Vaněk J, Karnosová P, Bruthans J, Wohlfahrt P, Cífková R, Pešta M, Filipovský J. *The low expression of circulating microRNA-19a represents an additional mortality risk in stable patients with vascular disease*. *Int J Cardiol*. 2019 Aug 15;289:101-106. doi: 10.1016/j.ijcard.2019.05.008. Epub 2019 May 6. PMID: 31085080.
4. Slouka D, Windrichova J, Rezackova H, Houfkova K, Kucera R, Cerna V, Kostlivi T, Topolcan O, Pesta M. *The potential of miR-499 plasmatic level as a biomarker of obstructive sleep apnea syndrome*. *Biomark Med*. 2021 Aug;15(12):1011-1019. doi: 10.2217/bmm-2020-0826. Epub 2021 Jul 22. PMID: 34289701.

Publikované reakce na dopisy:

5. Mayer O Jr, Černá V, Roučka P. *miR-133a and myocardial ischemia/reperfusion injury. Response to letter by Wang*. *Int J Cardiol*. 2020 Jan 15;299:255. doi: 10.1016/j.ijcard.2019.09.011. PMID: 31791542.
6. Mayer O Jr, Černá V. *Response to letter by Yu and Chen*. *Int J Cardiol*. 2020 Jan 1;298:120. doi: 10.1016/j.ijcard.2019.09.010. PMID: 31901261.

12 Seznam publikací v příloze II

1. Mareš Š, Filipovský J, Vlková K, Pešta M, Černá V, Hrabák J, Mlíková Seidlerová J, Mayer O. *A novel nonsense mutation in the β -subunit of the epithelial sodium channel causing Liddle syndrome.* Blood Press. 2021 Oct;30(5):291-299. doi: 10.1080/08037051.2021.1942785. Epub 2021 Jul 5. PMID: 34223773.
2. Mayer O, Seidlerová J, Černá V, Kučerová A, Karnosová P, Hronová M, Wohlfahrt P, Fuchsová R, Filipovský J, Cífková R, Topolčan O, Pešta M. *Serum Vitamin D Status, Vitamin D Receptor Polymorphism, and Glucose Homeostasis in Healthy Subjects.* Horm Metab Res. 2018 Jan;50(1):56-64. doi: 10.1055/s-0043-122144. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29183090.
3. Mayer O Jr, Seidlerová J, Kučera R, Kučerová A, Černá V, Gelžinský J, Mateřánková M, Mareš Š, Kordíková V, Pešta M, Topolčan O, Cífková R, Filipovský J. *Synergistic effect of sclerostin and angiotensin II receptor 1 polymorphism on arterial stiffening.* Biomark Med. 2020 Feb;14(3):173-184. doi: 10.2217/bmm-2019-0249. Epub 2020 Feb 14. PMID: 32057249.
4. Mayer O Jr, Seidlerová J, Wohlfahrt P, Filipovský J, Cífková R, Černá V, Kučerová A, Pešta M, Fuchsová R, Topolčan O, Jardon KMC, Drummen NEA, Vermeer C. *Synergistic effect of low K and D vitamin status on arterial stiffness in a general population.* J Nutr Biochem. 2017 Aug;46:83-89. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.04.010. Epub 2017 Apr 22. PMID: 28486172.
5. Parmar HS, Houdek Z, Pešta M, Černá V, Dvorač P, Hatina J. *Protective Effect of Aspirin Against Oligomeric A β 42 Induced Mitochondrial Alterations and Neurotoxicity in Differentiated EC P19 Neuronal Cells.* Curr Alzheimer Res. 2017;14(8):810-819. doi: 10.2174/1567205014666170203104757. PMID: 28164768.