

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

### **Laboratorní diagnostika microRNA u různých diagnostických skupin**

**Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.**

**Konzultant diplomové práce: doc. RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2024**

**Bc. Eliška Hrachovcová**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla srdečně poděkovat své konzultantce diplomové práce paní doc. RNDr. Pavlíně Kušnierové z Fakultní nemocnice v Ostravě za cenné rady a čas, který mi věnovala při zpracování experimentální i teoretické části práce. Dále také laborantovi Mgr. Dominikovi Štěpánovi za veškerou pomoc v laboratoři. Také děkuji vedoucí mé diplomové práce PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D. za odborné rady, konzultace, trpělivost, ochotu při zpracování práce. Obrovské díky patří mé rodině, která mě neustále podporovala během studia a hlavně to se mnou všechno prožívala. Moc si toho vážím, bez nich bych to nezvládla.

„Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 25. 4. 2024



## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**Student:** Bc. Eliška Hrachovcová

**Vedoucí diplomové práce:** PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

**Konzultant diplomové práce:** doc. RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Laboratorní diagnostika microRNA u různých diagnostických skupin

**Cíl práce:** Identifikace potenciálních miRNA cílů pro diferenciální diagnostiku pacientů s aterosklerózou a demencí. Porovnání exprese a zachytu miRNA ve vzorcích séra se vzorky mozkomíšního moku. Výběr vhodných miRNA v rámci diferenciální diagnostiky u pacientů s aterosklerózou a s demencí. Dále také výběr miRNA cílů s co nejnvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnotou pro následnou validační studii.

**Metody:** Pro identifikaci potenciálních miRNA byly přijaté vzorky centrifugovány, alikvotovány a skladovány při - 80°C. miRNA byla izolována pomocí kitu iCatcher Circulating cfRNA 1000 kit a izolátoru CatchGene. Poté byla provedena reverzní transkripce a amplifikace s detekcí. Data byla zpracována v Excelu a následně statisticky zpracována v programu GenEx pomocí Mann-Whitney testu.

**Výsledky:** Výsledky byly hodnoceny pro 2 skupiny pacientů: skupinu A (vzorky pacientů s Parkinsonovou nemocí a demencí) a skupina B (s aterosklerózou a demencí). Byla hodnocena čistota a koncentrace ve vzorcích séra a likvoru. Hodnotily se nejvhodnější endogenní kontroly pro sérum i likvor. Celkem bylo nalezeno 6 společných miRNA cílů pro obě skupiny. U pacientů byly některé miRNA statisticky významně upregulovány či downregulovány, konkrétně hsa-miR-23a-3p-TT-PRI, hsa-miR-30b-5p-TT-PRI, hsa-miR-142a-5p-TT-PRI, hsa-miR-146a-5p-TT-PRI, hsa-miR-29c-3p-TT-PRI, hsa-miR-151a-3p-TT-PRI.

**Závěr:** Získané výsledky této práce poukazují na miRNA, které by mohly být v budoucnu součástí diferenciální diagnostiky. Už teď můžeme s jistotou říci, že tyto miRNA představují velký krok k časně diagnostice těchto onemocnění. Výsledky této diplomové práce by mohly sloužit jako počáteční bod pro budoucí výzkum a vývoj v oblasti diagnostiky aterosklerózy a demence.

## **ABSTRACT**

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

**Student:** Bc. Eliška Hrachovcová

**Supervisor:** PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

**Consultant:** doc. RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Laboratory diagnostics of microRNAs in different diagnostic groups

**Background:** Identification of potential miRNA targets for differential diagnosis of patients with atherosclerosis and dementia. Comparison of miRNA expression and uptake in serum samples with cerebrospinal fluid samples. Selection of appropriate miRNAs for differential diagnosis in patients with atherosclerosis and dementia. Furthermore, the selection of miRNA targets with the most significant fold-change and also the lowest p-value for subsequent validation studies.

**Methods:** To identify potential miRNAs, the received samples were centrifuged, aliquoted and stored at - 80°C. miRNAs were isolated using the iCatcher Circulating cfRNA 1000 kit and the CatchGene isolator. Reverse transcription and amplification with detection were then performed. Data were processed in Excel and then statistically processed in GenEx using Mann-Whitney test.

**Results:** The results were evaluated for 2 groups of patients: group A (samples of patients with Parkinson's disease and dementia) and group B (with atherosclerosis and dementia). Purity and concentration in serum and liquor samples were assessed. The most appropriate endogenous controls for both serum and liquor were evaluated. A total of 6 common miRNA targets were found for both groups. In patients, some miRNAs were statistically significantly upregulated or downregulated, specifically hsa-miR-23a-3p-TT-PRI, hsa-miR-30b-5p-TT-PRI, hsa-miR-142a-5p-TT-PRI, hsa-miR-146a-5p-TT-PRI, hsa-miR-29c-3p-TT-PRI, hsa-miR-151a-3p-TT-PRI.

**Conclusions:** The results obtained in this work point to miRNAs that could be a part of differential diagnosis in the future. We can already say with confidence that these miRNAs represent a major step towards early diagnosis of these diseases. The results of this thesis could serve as a starting point for future research and development in the diagnosis of atherosclerosis and dementia.

## OBSAH

<b>1.</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>microRNA .....</b>	<b>2</b>
2.1	Klasifikace microRNA v systému nekódujících RNA.....	2
2.2	Klasifikace miRNA .....	3
2.3	Historie miRNA .....	3
2.4	Názvosloví miRNA.....	4
2.5	Životní cyklus miRNA .....	5
<b>3.</b>	<b>Využití microRNA v praxi.....</b>	<b>6</b>
<b>3.1</b>	<b>Ateroskleróza .....</b>	<b>6</b>
3.1.1	Definice aterosklerózy.....	6
3.1.2	Cévní stěna .....	6
3.1.3	Patogeneze aterosklerózy.....	7
3.1.4	Příznaky aterosklerózy.....	9
3.1.5	Rizikové faktory .....	9
3.1.6	Prevence a léčba.....	11
3.1.7	Uplatnění miRNA u aterosklerózy .....	12
3.1.8	Diagnostický význam miRNA u aterosklerózy .....	13
3.1.9	Terapeutický význam miRNA u aterosklerózy .....	15
<b>3.2</b>	<b>Demence (DEM) .....</b>	<b>17</b>
3.2.1	Definice onemocnění .....	17
3.2.2	Epidemiologie .....	17
3.2.3	Etiologie .....	18
<b>3.3</b>	<b>Typy demence a miRNA u onemocnění souvisejících s demencí.....</b>	<b>21</b>
3.3.1	Alzheimerova nemoc (AD) .....	21
3.3.2	Vaskulární demence (VD) .....	23
3.3.3	Demence s Lewyho tělísky (DLB).....	24
<b>4.</b>	<b>Metody detekce miRNA .....</b>	<b>26</b>
4.1	Northern Blotting (hybridizace RNA) .....	26
4.2	<i>In situ</i> hybridizace (FISH) .....	27
4.3	Microarrays .....	27
4.4	Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR).....	28
4.4.1	Two-Tailed PCR.....	29
<b>5.</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>31</b>
<b>6.</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>32</b>
6.1	Vzorky použité k analýze.....	32
6.2	Základní zpracování .....	33
6.3	Izolace miRNA .....	33

6.3.1	Postup pro vytvoření IC, izolace a alikvotace.....	34
6.3.2	Nastavení přístroje iCatcher 12.....	34
6.3.3	Použité reagensy.....	35
<b>6.4</b>	<b>Reverzní transkripce .....</b>	<b>35</b>
6.4.1	Postup pro přípravu RT master mixu a reverzní transkripci .....	36
<b>6.5</b>	<b>Amplifikace a detekce .....</b>	<b>38</b>
6.5.1	Postup pro přípravu PCR master mixu a amplifikaci s detekcí .....	38
<b>6.6</b>	<b>Zpracování dat.....</b>	<b>41</b>
6.6.1	Zpracovaná data skupina A - vzorky pacientů s Parkinsonovou nemocí a demencí	42
6.6.2	Zpracovaná data skupina B - vzorky pacientů s aterosklerózou a demencí.....	42
<b>6.7</b>	<b>Statistické zpracování.....</b>	<b>42</b>
<b>6.8</b>	<b>Interpretace výsledků .....</b>	<b>43</b>
<b>7.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>44</b>
<b>7.1</b>	<b>Výsledky skupiny A .....</b>	<b>44</b>
7.1.1	Hodnocení biologických matric a kvality izolace u skupiny A.....	44
7.1.2	miRNA screening: SÉRUM.....	46
7.1.3	miRNA screening: CSF .....	53
7.1.4	Shrnutí výsledků skupiny A .....	58
<b>7.2</b>	<b>Výsledky skupiny B .....</b>	<b>59</b>
7.2.1	Hodnocení biologických matric a kvality izolace u skupiny B.....	59
7.2.2	miRNA screening .....	61
7.2.3	Shrnutí výsledků skupiny B .....	67
<b>7.3</b>	<b>Porovnání exprese miRNA v séru a likvoru .....</b>	<b>68</b>
<b>7.4</b>	<b>Závěrečné vyhodnocení obou primárních screeningu pro identifikaci potenciálních miRNA cílů .....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>69</b>
<b>9.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>72</b>
<b>10.</b>	<b>Použité zkratky .....</b>	<b>73</b>
<b>11.</b>	<b>Seznam tabulek .....</b>	<b>75</b>
<b>12.</b>	<b>Seznam obrázků.....</b>	<b>76</b>
<b>13.</b>	<b>Seznam grafů .....</b>	<b>77</b>
<b>14.</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>78</b>
<b>Přílohy</b>	<b>.....</b>	<b>85</b>

# 1. Úvod

V současné době je microRNA hojně studována u řady onemocnění, protože představuje slibnou skupinu biomarkerů, které se dají využít k časně diagnostice, k predikci odpovědi na léčbu, při zachytu relapsu nebo při klasifikaci nádorů do molekulárních subtypů. MicroRNA jsou krátké nekódující molekuly RNA, které hrají důležitou roli ve vývoji organismů a podílejí se na mnoha biologických procesech. Identifikovány mohou být v nádorové tkáni, ve které slouží hlavně jako prognostické nebo prediktivní biomarkery, popřípadě zpřesňují molekulární klasifikaci nádorů. miRNA jsou detekovatelné také v tělních tekutinách, jako je krev, moč, sliny atd., zde slouží k časně diagnostice onemocnění nebo k odhalení relapsu. Jako potenciální biomarkery jsou molekuly miRNA považovány u onemocnění, jako je ateroskleróza nebo neurodegenerativní onemocnění. Ateroskleróza je onemocnění tepen doprovázené vytvářením tzv. aterosklerotických plátů uvnitř velkých tepen. Tepny zužují svůj vnitřní průměr, zvyšují svou tuhost a ztrácejí svou elasticitu. Ateroskleróza postihuje různé části těla, nejčastěji věnčité tepny, krční tepny a aortu. Aterosklerotické změny se mohou projevit již v dětství, s věkem toto onemocnění progreduje. Vedle toho, neurodegenerativní onemocnění představují rozsáhlou a heterogenní skupinu poruch, které se mohou klinicky projevit jako syndrom demence, nebo pohybová porucha, případně jako kombinace obou. Objevuje se spíše u starších osob. [1]

V úvodní části práce jsou popsány miRNA, jejich klasifikace, historie, názvosloví a životní cyklus. Další kapitola je věnována využití miRNA v praxi, a to zejména při hodnocení aterosklerózy a demence. Zmíněné jsou jak základní definice, tak etiologie a epidemiologie obou onemocnění. Následující kapitola je zaměřena na metody průkazu a stanovení miRNA různými metodami. V praktické části je potom rozebráno zpracování vzorku přes izolaci, reverzní transkripci a Two Tailed PCR, ale také amplifikace s detekcí. Následně je provedeno statistické zpracování a shrnuty výsledky.



## 2. microRNA

Molekuly microRNA (zkráceně miRNA) jsou malé jednovláknové nekódující endogenní RNA, které mají délku 21 až 23 nukleotidů. Geny pro miRNA zaujímají až 2 % celého genomu. Molekuly microRNA se vyskytují v rozsáhlém spektru biologických systémů a jsou přítomny v různých typech tkání a buněk. MiRNA mají klíčovou roli v regulaci buněčné syntézy proteinů. Jsou také využívány k řízení genové exprese, ovlivňují řadu biologických procesů (buněčný růst, proliferace, diferenciace, migrace, apoptóza, imunita, metabolismus), podílí se na udržení homeostázy a ovlivňují vývoj nádorových nebo jiných onemocnění. Hladiny miRNA se mění jak ve tkáních, tak v tělních tekutinách (v krvi, moči atd.) na základě vnějšího stimulu nebo při výskytu celé řady lidských onemocnění včetně rakoviny, diabetu nebo kardiovaskulárních chorob. [1], [2], [3], [4]

### 2.1 Klasifikace microRNA v systému nekódujících RNA

Nekódující RNA (ncRNA – non-coding RNA) je RNA, která neslouží jako matrice pro vznik bílkovin, ale má regulační funkci. Rozděluje se do 2 hlavních skupin podle délky:

- dlouhé ncRNA (lncRNA – long ncRNA) – mají délku 200 nt až 100 kb, působí na řadu fyziologických funkcí, slouží jako prekurzory krátkých ncRNA.
- krátké ncRNA (sncRNA – small ncRNA) – široká škála RNA, jako jsou například siRNA (small interfering RNA), snRNA (small nuclear RNA), podílí se na zrání mRNA, piRNA (Piwi-interacting RNA), které ovlivňují regulaci transpozonů, snoRNA (small nucleolar RNA), které se podílí na dozrávání ribozomální RNA, která je nezbytná pro vznik ribozomů, pasRNA (promoter associated small RNA) a v neposlední řadě microRNA, které se vážou na molekuly messengerové RNA (mRNA) a buď inhibují nebo aktivují překlad do bílkovin. [5], [6], [7]

## 2.2 Klasifikace miRNA

MiRNA můžeme klasifikovat podle několika kritérií, zahrnujících jejich původ, evoluční konzervaci, rodinné vztahy a také jejich úlohu v regulaci genové exprese. Zde jsou způsoby, jakými můžeme klasifikovat miRNA:

- Podle původu:
  - endogenní miRNA
  - exogenní miRNA
- Podle evoluční konzervace:
  - konzervované miRNA
  - nekonzervované miRNA
- Podle funkce v regulaci genové exprese:
  - aktivační miRNA
  - inhibiční miRNA
- Podle lokalizace:
  - cytoplazmatická miRNA
  - jaderná miRNA [8], [9]

## 2.3 Historie miRNA

Objev miRNA je krásným příkladem zásadního biologického objevu, který vzešel z usilovné spolupráce dvou týmů v laboratoři profesora Horvitze, nositele Nobelovy ceny za objevy regulace buněčného cyklu a apoptózy, v druhé polovině 80. let v Cambridgi. Na výzkumu pracovali dva studenti Victor Ambros a Gary Ruvkun, zabývali se studiem genů podílejících se na regulaci přechodu mezi jednotlivými stádii hlístice *Caenorhabditis elegans* (háďátka obecná). [5]

V roce 1993 byla V. Ambrosem objevena první microRNA v modelovém organismu *Drosophila melanogaster* (Octomilka obecná), která byla označena jako lin-4, a o 7 let později G. Ruvkun objevil druhou microRNA v tom samém organismu a nesla název let-7 (dlouze lethal-7, protože mutace v jejím genu jsou u háďátka letální). V roce 2000 bylo objeveno, že miRNA hrají důležitou roli v regulaci vývoje u drozofily. O dva roky později, tedy v roce 2002, díky neustálému nárustu počtu miRNA byla vytvořena databáze miRBase (tehdy microRNA Registry) zodpovídající za nomenklaturu genů microRNA. Nejnovější verze zahrnuje 38 589 vlásenkových prekurzorových microRNA a 48 860 zralých microRNA z 271 organismů. Z lidského genomu je 1917 vlásenkových prekurzorů microRNA a 2654 zralých microRNA. [5], [10], [11]

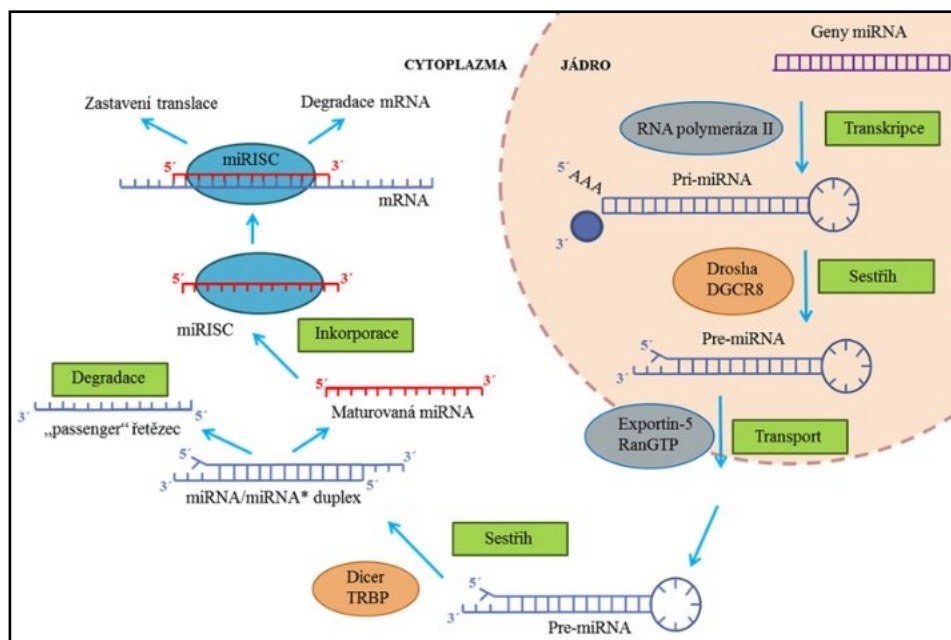
## 2.4 Názvosloví miRNA

Molekuly miRNA, mají stejně jako ostatní molekuly svoji nomenklaturu. Názvosloví je sestaveno ze tří částí (předpona, vnitřní část a číselná přípona). Začíná předponou, která je třípísmenná a vyjadřuje druh organismu, např. *hs* pro *Homo sapiens* nebo *cel* pro *C. elegans*. Vnitřní část se značí „miR“ s velkým písmenem „R“ odpovídá zralé formě miRNA, zatímco označení „mir“ s malým písmenem „r“ se využívá pro pre-miRNA (prekurzorové vlásenky). Dále následuje pomlčka a přiřazený číselný identifikátor, který často označuje pořadí pojmenování. Jako příklad může být uvedena mir-123 a mir-234, kde je patrné, že mir-123 byla pojmenována a patrně i nalezena dříve.[5], [10]

MiRNA, které mají téměř identické sekvence a liší se pouze v jednom nebo dvou nukleotidech, jsou od sebe odlišeny přidáním malého písmena, tímto příkladem je miR-123a a miR-123b, které jsou si blízce příbuzné. Pro rozlišení druhu jsou používány ještě tří nebo čtyřpísmenné předpony, takže např. u *Homo Sapiens* je tvar hsa-miR-101. Pokud z opačných ramen jedné pre-miRNA pocházejí dvě různé sekvence zralé miRNA, tak je k nim připojena přípona -3p nebo -5p. Dále se také používá značení ve formě hvězdičky, která symbolizuje nízkou hladinu exprese miRNA v porovnání s miRNA z druhého řetězce vlásenkové pre-miRNA. Například miR-123 a miR-123\* pochází z jedné vlásenkové pre-miRNA, ale mir-123 se bude nacházet v buňce v mnohem vyšší koncentraci. [5], [12]

## 2.5 Životní cyklus miRNA

Životní cyklus miRNA zahrnuje několik kroků, od jejich biogeneze až po účinky na buněčné procesy (Obrázek 1). Vzniká přepisem z deoxyribonukleové kyseliny (DNA) za pomoci enzymu RNA-polymerázy. Tímto přepisem dojde k vytvoření primární miRNA, která může být dlouhá i několik kb. Ta je následně v buněčném jádře zpracována prostřednictvím enzymového komplexu Drosha/DGCR8 a vznikne dvouvláknová ribonukleová kyselina (RNA) s vlásenkovou strukturou zvaná prekurzorová microRNA (pre-miRNA), která je dopravena z jádra do cytoplazmy za pomoci přenašeče Exportin-5/RanGTP. V cytoplazmě dojde ke stříhání pre-miRNA pomocí enzymu Dicer za vzniku zralé miRNA. Zralá miRNA je tvořena 2 vlákny, hlavním a doprovodným vláknem, které je po rozvinutí degradováno. Hlavní vlákno se využívá pro vytvoření miRISC (miRNA-indukovaný tlumící komplex), který vzniká připojením hlavního vlákna pomocí chaperonů HSP70/HSP90 ke komplexu s argonautovými proteiny. Vzniklá miRISC se následně naváže na mRNA a podle komplementarity dochází buď k degradaci (komplementarita bází je úplná) nebo k blokaci translace, a tím pádem i bloku vzniku bílkovin (komplementarita bází není úplná). [2], [13], [14], [15]



Obrázek 1: Biogeneze a funkce miRNA [4]

## 3. Využití microRNA v praxi

### 3.1 Ateroskleróza

Ateroskleróza je civilizační onemocnění, které provází lidstvo od nepaměti. První zmínky o ateroskleróze jsou ze starověkého Egypta, kde byly aterosklerotické léze nalezeny na egyptských mumiích. Nicméně od 20. století na základě nedostatku pohybu a nadbytku energie, ale hlavně prodlužování střední délky života a stárnutí populace, došlo k výraznému nárůstu výskytu aterosklerózy. [16], [17]

#### 3.1.1 Definice aterosklerózy

Ateroskleróza (ATS) je zánětlivé onemocnění velkých a středně velkých tepen, které se vyskytuje velice často, postihuje hlavně starší jedince. Je to jedna ze tří forem arteriosklerózy, která může začít již v dětství a s věkem postupně progredovat. Pojem „ateroskleróza“ vznikl z řeckých slov „athera“ neboli kaše a „skleros“ neboli tvrdý. Tato choroba je hlavní příčinou vysoké morbidity a mortality na kardiovaskulární onemocnění v průmyslově vyspělých zemích. Charakteristickým rysem je tvorba tzv. aterosklerotických plátů, které vznikají ukládáním lipidů do stěn tepen, což vede k chronickému zánětu, zúžení průsvitu, ztrátě elasticity a také ke kalcifikaci ve velkých tepnách. V postiženém místě dochází k tvorbě krevní sraženiny, což může vést k akutnímu tepennému uzávěru. Krevní sraženina se může také odtrhnout a být zanesena na jiné místo (tzv. embolie), kde dojde k ucpaní cévy. Rizikem tohoto onemocnění potom je ischemické poškození široké škály orgánů z důvodu sníženého prokrvení, mrtvice, nebo náhlé úmrtí. [16], [18], [19], [20]

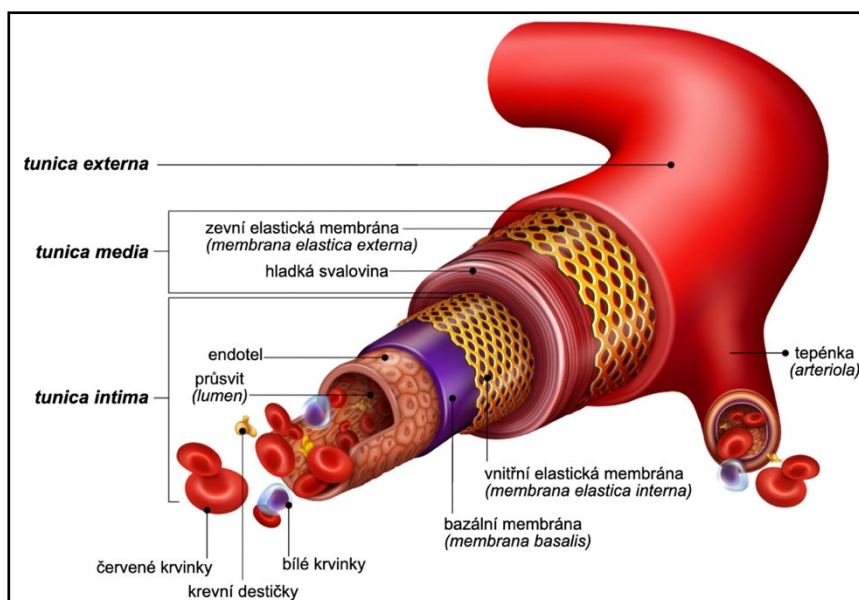
#### 3.1.2 Cévní stěna

Stěna tepny (Obrázek 2) je tvořena třemi vrstvami (*tunica intima*, *tunica media*, *tunica adventitia*), všechny se na ateroskleróze podílejí. Do aterosklerotického procesu je zapojena také řada buněk. Mezi hlavní buňky patří buňky endotelové, leukocyty a buňky hladké svaloviny.

- *Tunica intima* – je vnitřní vrstva, ve které jsou endotelové buňky. Ty fungují jako výstelka cévního řečiště a místo cévní homeostázy. Endotelové buňky mají

všechny stejný původ, a to embryonální. Poškození funkce endotelových buněk (endotelová dysfunkce) je první a zároveň nezbytný krok k rozvoji aterosklerózy.

- *Tunica media* – je prostřední vrstva, ve které jsou buňky hladké svaloviny a extracelulární matrix, která hojně obsahuje elastin a kolagen. Hlavní funkcí buněk hladké svaloviny je kontrakce a relaxace. Při patologických procesech v buňkách mohou migrovat z tunica media do tunica intima, ve které mohou způsobovat tvorbu hyperplastické aterosklerotické léze.
- *Tunica externa* – je často opomíjena. Skládá se z kolagenních vláken a je řídko osídlená buňkami. Nachází se zde hlavně fibroblasty a žírné buňky, které se také uplatňují v patogenezi aterosklerotických lézí. [16]



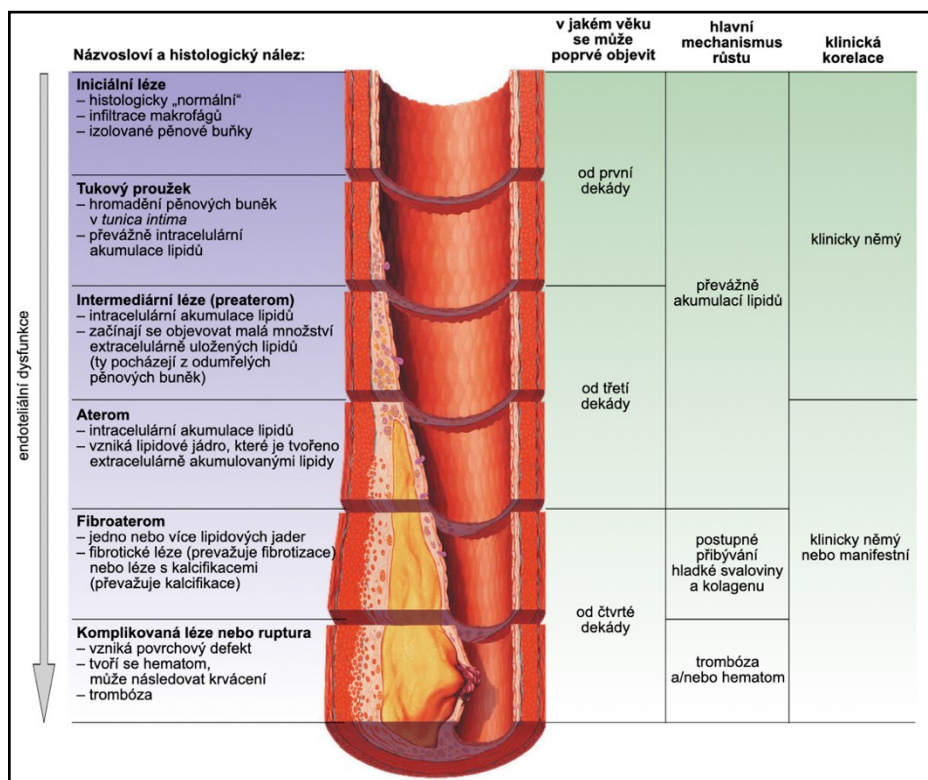
**Obrázek 2: Struktura stěny tepny [21]**

### 3.1.3 Patogeneze aterosklerózy

Ateroskleróza je multifaktoriální proces, který můžeme rozdělit do několika fází (iniciace, promoce, progrese, precipitace), které na sebe navazují a překrývají se (Obrázek 3). [16]

První fází je tzv. iniciace, kdy dojde k poškození endotelu a nastartování zánětlivé odpovědi. Poškození endotelu může být způsobeno např. mechanickými vlivy (poranění intimy), hemodynamickými vlivy (hypertenze) nebo zplodinami z cigaretového kouře,

které může být nenápadné. Poškození pak vede k aktivaci adhezních molekul a vazbě leukocytů na cévní stěnu. Z adhezních molekul se nejčastěji uplatňuje monocytární chemotaktický protein 1 (MCP-1) a vaskulární adhezní molekula 1 (VCAM-1), která je selektivní pro mononukleární leukocyty, lymfocyty a aktivované trombocyty. Monocyty se při průchodu endotelem aktivují a přeměňují na makrofágy. V poškozeném místě endotelu dochází k nahromadění krevních destiček a z nich k uvolnění růstového faktoru destiček (PDGF), který způsobuje migraci buněk hladké svaloviny z tunica media do tunica intima. Následuje fáze promoce, ve které dochází k průniku lipoproteinů (LDL, VLDL, cholesterol, estery cholesterolu) přes porušený endotel volně do intimy. Leukocyty a hladké svalové buňky pohlcují tyto lipidy a vznikají pěnové buňky. Po infiltraci pěnových buněk do intimy dochází k patologickému ztluštění intimy. Progrese je třetí fáze, kdy dochází k tvorbě komplexních plátů a jejich růstu, fibróze, trombóze a cévní remodelaci. Aterosklerotické léze jsou tvořeny z velké části extracelulární matrix (kolagen I, III a proteoglykany) z buněk hladké svaloviny. Produkce extracelulární matrix je ovlivněna růstovým faktorem PDGF a transformujícím růstovým faktorem (TGFβ). Poslední fází je precipitace, kdy dochází k akutním trombózám. [16], [22], [23]



**Obrázek 3 Vznik a progrese aterosklerózy [19]**

### 3.1.4 Příznaky aterosklerózy

Většina příznaků aterosklerózy se projeví až po ucpání cévy. Mezi nejčastější příznaky se řadí:

- bolest na hrudi
- bolest v noze, paži, nebo kdekoli jinde, kde je tepna ucpaná
- křeče v hýždí při chůzi
- pocit slabosti v rukou a nohou, zimnice
- dušnost, bolestivé pocity při dýchání
- únava
- zmatenost (dojde k tomu, pokud ucpání ovlivňuje krevní oběh v mozku)
- ztráta motorických nebo sensorických funkcí na jedné straně těla (dojde k tomu, pokud ucpání ovlivňuje krevní oběh v mozku) [24], [25]

### 3.1.5 Rizikové faktory

Rizikové faktory aterosklerózy můžeme rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné, ale také na známé klasické rizikové faktory a na nové. Do neovlivnitelných rizikových faktorů řadíme věk, pohlaví, genetické faktory a rodinná anamnéza. Do ovlivnitelných rizikových faktorů spadá nízká fyzická aktivita, diabetes mellitus, hypertenze, hyperlipidémie, nezdravá strava s vysokým obsahem tuku a kouření cigaret. Pro lepší přehled byla vytvořena Tabulka 1. [19], [26]

**Tabulka 1: Tradiční rizikové faktory aterosklerózy [26]**

neovlivnitelné		ovlivnitelné
věk	muži nad 45 let	dyslipidémie
	ženy nad 55 let	kouření cigaret, včetně expozice tabákovému kouři v prostředí
pohlaví		arteriální hypertenze
pozitivní rodinná anamnéza		porušená glukózová tolerance
		metabolický syndrom
genetické faktory		obezita s abdominální akumulací tuku
		aterogenní dieta
existující kardiovaskulární onemocnění		systemová zánětlivá onemocnění
		nízká fyzická aktivita



Mezi nové rizikové faktory můžeme zařadit například faktory lipidové, metabolické, zánětlivé nebo faktory hemokoagulace a fibrinolýzy. Pro lepší přehled byla vytvořena Tabulka 2. [27]

**Tabulka 2: Vybrané nové rizikové faktory aterosklerózy [27]**

typ faktoru	příklad
lipidové faktory	malé denzní LDL částice, lipoprotein (a), apolipoprotein B
metabolické faktory	homocystein
zánětlivé faktory	CRP, interleukin 6
faktory hemokoagulace a fibrinolýzy	fibrinogen, von Willebrandův faktor
oxidační stres	myeloperoxidáza
hormonální faktory	menopauza, adiponektin

- Lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) - jsou hlavní příčinou poškození stěny arterií. LDL částice mohou být modifikovány různě, tyto modifikace pak způsobují atherogenitu. Modifikace LDL může být oxidací, glykací (u diabetu), agregací, nebo reakcí s homocysteinem. Vlastnosti modifikovaného oxidovaného lipoproteinu s nízkou hustotou jsou: chemotaktický účinek na monocyty, umožňují indukci syntézy MCP-1 a faktoru stimulující kolonie makrofágů (M-CSF), podpora agregace trombocytů, cytotoxické účinky a mitogenní účinky na buňky hladké svaloviny.
- Myeloperoxidáza (MPO) – je enzym, který se vyskytuje v azurofilních granulích neutrofilů a v monocytárních lysozomech. Využívá se u fagocytózy, kdy produkty MPO se užívají na ničení bakterií nebo nádorových buněk. MPO je schopna modifikace HDL, což má za následek poruchu reverzního transportu cholesterolu.
- Homocystein – je kyselina 2-amino-4-merkaptomáselná, která vzniká jako meziprodukt při přeměně methioninu na cystein. Zvýšená koncentrace v plazmě způsobuje poruchu funkce endotelu, ovlivňuje také sílu stěny intimy a medie arterií. Hladinu homocysteinu můžeme snížit při užívání folátu, vitamínu B<sub>12</sub> a B<sub>6</sub>.

- C-reaktivní protein (CRP) – je reaktant akutní fáze zánětu, který se tvoří hlavně v játrech, ale i extrahepaticky. Je to citlivý ukazatel zánětu, ale také bylo zjištěno, že se může účastnit rozvoje, progresu a destabilizace aterosklerotické léze. Bylo prokázáno, že CRP vyvolává tvorbu MCP-1 a tkáňového faktoru. CRP je navíc ligandem pro oxidovaný LDL. [27], [28]

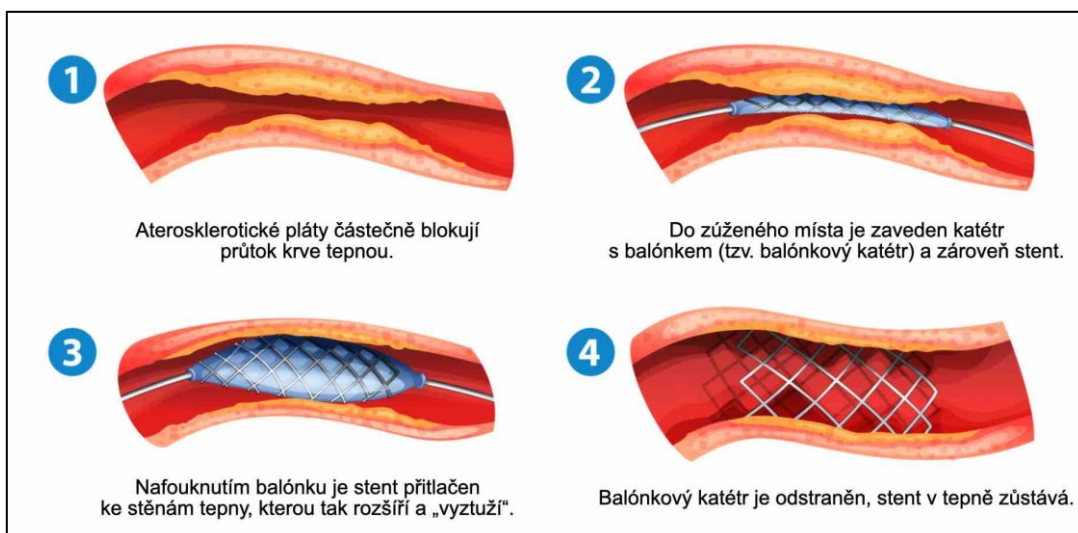
### 3.1.6 Prevence a léčba

Léčba a prevence spočívá ve změně životního stylu (aby došlo ke snížení množství konzumovaných tuků a cholesterolu), omezení kouření, zdravá strava, omezení konzumace alkoholu, vyhýbání se stresu a pravidelná pohybová aktivita. Lékař, kromě doporučení těchto výše zmíněných změn, také rozhoduje o užívání léků.

Mezi léky, které mohou zabránit zhoršení aterosklerózy můžeme zařadit:

- léky snižující hladinu cholesterolu, včetně statinů, fibrátů a niacinu
- inhibitory ACE (angiotenzin konvertující enzym) – snižují krevní tlak
- beta blokátory
- protidestičkové léky (př. Aspirin) – zabraňují srážení krve a ucpání tepen

Pokud je ATS v těžké formě, je nutný chirurgický zákrok. Mezi možné operace při léčbě ATS se řadí bypass, trombolytická léčba, kdy dochází k rozpuštění sraženiny vstříknutím léků do postižené tepny, nebo angioplastika (Obrázek 4), při které se využívá balóněk a katetr k rozšíření tepny, někdy dochází i k zavedení stentu, který udržuje tepnu otevřenou. Další možností je aterektomie, kdy dojde k odstranění plátu z tepny. [19], [24], [29]



**Obrázek 4: Angioplastika [19]**

### 3.1.7 Uplatnění miRNA u aterosklerózy

Do aterosklerotického procesu se zapojena široká škála miRNA. Ty ovlivňují jednotlivé patofyziologické procesy, jako je např. cévní remodelace, dysfunkce endotelových buněk (EC), infiltrace zánětlivých buněk, diferenciacie hladkého svalstva cév nebo metabolismus lipoproteinů a cholesterolu, který je řízen např. miR-27b, miR-33, miR-148a nebo miR-223. Všechny výše zmíněné miRNA směřují na mRNA proteinů podílejících se na transportu cholesterolu z tkání do jater. Pro lepší přehlednost byla vytvořena Tabulka 3. [7], [30]

**Tabulka 3: Přehled miRNA u aterosklerózy [7]**

název miRNA	charakteristika
miR-33	snižuje hladinu proteinu ABCA1 zodpovědného za transport cholesterolu z tkání do HDL, z jater do žluči
miR-27b	cílí na apolipoprotein B, který je velice důležitý pro vychytávání LDL v játrech a tvorbu VLDL a LDL
miR-148a	reguluje tvorbu LDL receptoru v játrech
miR-223	cílí na scavengerové receptory 1. typu třídy B (SRB1)

Změnou hladin výše uvedených miRNA u pokusných zvířat bylo dosaženo zajímavých výsledků. Bylo zjištěno, že blokáda miR-148a zapříčinila vzrůst clearance LDL částic v játrech. Blokáda miR-33 vyvolala zmenšení aterosklerotických plátů a zvýšení cirkulujícího HDL až o 50 %. V praxi se využívá tzv. „anti-sense terapie“, kdy lék Mipomersen funguje obdobně jako miR-27a, tzn. že v játrech se váže na mRNA pro apolipoprotein B a to zapříčiní snížení LDL, což eliminuje z dlouhodobého hlediska kardiovaskulární příhody u pacientů, kteří jsou léčeni. [7]

Dysfunkce endotelových buněk je dalším klíčovým krokem k rozvoji aterosklerózy. Schober a kolektiv prokázali, že miR-126-5p je rozhodující pro udržení proliferační rezervy EC v reakci na smykové napětí a že snížením hladiny miR-126-5p dochází ke snížení proliferační rezervy EC, což podporuje tvorbu plátu. Zvýšená permeabilita endotelových buněk vede k infiltraci zánětlivých buněk, ve které hraje důležitou roli miRNA-155. [30]

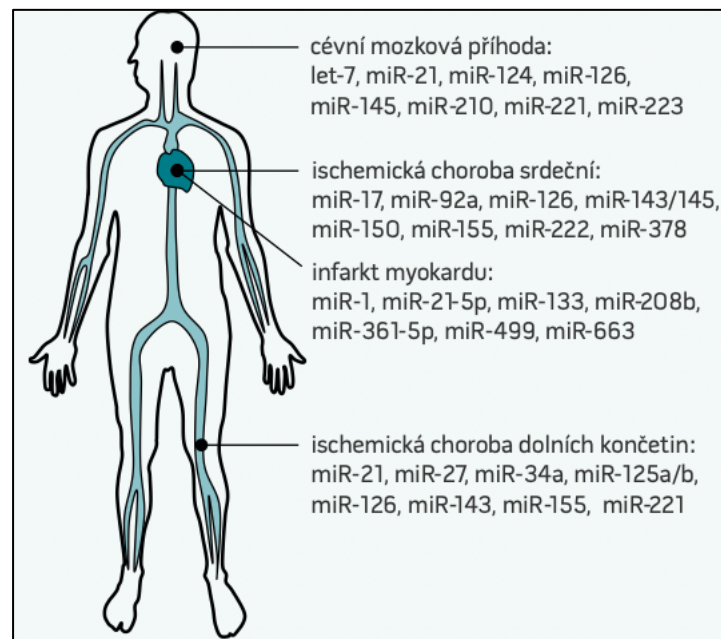
Přechod bílých krvinek do cévní stěny a zánět je další z příčin vzniku aterosklerózy. V regulaci zánětu se uplatňuje miR-223, která zabraňuje přestupu bílých krvinek do cévní stěny pomocí blokády intracelulární zánětlivé molekuly (ICAM-1), obdobně takto pracuje i miR-126. Další miRNA podílející se na korigování zánětu je miR-181b, která reguluje zánětlivou odpověď přímým ovlivněním kaskády nukleárního faktoru kappa B. Dokonce při zablokování miR-181b došlo ke zmenšení aterosklerotických plátů u pokusných zvířat. [7]

### **3.1.8 Diagnostický význam miRNA u aterosklerózy**

MiRNA, které v séru nebo tělních tekutinách cirkulují, jsou stabilní. Vědci předpokládají, že stabilita je dána přítomností stabilního proteinu Ago2 nebo Ago2 miRNA komplexem. Cirkulující miRNA jsou chráněny RNázami před degradací. [14]

Při akutním infarktu myokardu (AIM) a uzávěru koronárních tepen dochází k vyplavení miRNA, které se hojně nachází v srdci, jako je například miR-1, miR-133, miR-208 nebo miR-499. Hladiny těchto miRNA skvěle korelují s hladinami troponinu a poskytují nám tak informaci o poškození myokardu. Důležité je ale zdůraznit, že senzitivita a specificita těchto miRNA ve většině provedených studiích je stále nižší

než senzitivita a specifita troponinu. V praxi se miRNA jako diagnostické biomarkery AIM ještě nevyužívají, jelikož příprava i analýza je zdoluhavá, a to cca 3 hodiny. Příprava zahrnuje izolaci RNA, reverzní transkripci a poté polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase. Možné využití miRNA jako diagnostických či prognostických markerů aterosklerózy je znázorněno pomocí Obrázku 5. [18]



**Obrázek 5: Možné využití miRNA jako diagnostických či prognostických markerů aterosklerózy [31]**

Cirkulující miRNA můžeme použít jako predikční faktor dalšího vývoje stavu u pacientů po AIM, jelikož v krvi, která byla odebraná od pacienta v průměru po 18 dnech od AIM s ST elevacemi (STEMI), bylo možné zjistit zvýšené hladiny tří miRNA, a to miR-34a, miR-192 a miR-194. Tyto tři miRNA předpovídaly vznik srdečního selhání do jednoho roku od prodělání STEMI. [18]

K ověření opravdového potenciálu cirkulujících miRNA a změn v expresi miRNA je zapotřebí provést rozsáhlé studie na lidech. Studie, které se věnují diagnostice nemocí za pomoci miRNA již nejsou úplně na začátku, ale stále jsou omezeny malou velikostí vzorku, nebo také volbou vzorku kontrolního. Jako kontrolní vzorek se často užívají vzorky zdravých jedinců, nikoliv pacientů s podobnými klinickými potížemi. Další významnou komplikací je srovnání jednotlivých studií, jelikož je nedostatečná

standardizace postupů mezi jednotlivými laboratořemi, takže praktické využití miRNA v diagnostice AIM bude také možné až po sjednocení postupů. [31]

Problém při stanovení hladin miRNA může také nastat u pacientů, jimž byl před odběrem krve podán heparin, jelikož ten narušuje analýzu polymerázové řetězové reakce (PCR). Další nevýhodou, jak už bylo zmíněno, je doba analýzy miRNA. Důležité je také zjistit, zda cirkulující miRNA může být využita pro určení prognózy aterosklerotických onemocnění, a navíc, zda mohou být pro diagnostiku vhodné jiné, snadněji dostupné tělesné tekutiny, jako je moč nebo sliny. [14], [31]

### **3.1.9 Terapeutický význam miRNA u aterosklerózy**

Informace, které byly dosud zjištěny, poukazují, že mnohé miRNA mají vliv na rozvoj aterosklerózy, její progresi, ale také rozvoj jejích komplikací. Buněčné a molekulární procesy spojené s patofyziologií aterosklerózy jsou ovlivněny četnými miRNA, které lze proto použít jako diagnostické biomarkery a terapeutické cíle pro vývoj nových terapií se záměrem poskytnout pacientům lepší léčbu aterosklerózy. Proti narušené genové expresi a porušené funkci cév byla vytvořena terapeutika na bázi RNA a patří sem miRNA mimetika, inhibitory miRNA a antisense oligonukleotidy (anti-miRs) způsobující umlčení miRNA, která modifikuje specifické dráhy nebo snižuje dysregulovanou expresi. Antisense oligonukleotidy byly testovány i na myších, bylo vyzorováno, že došlo ke zpomalení progresu aterosklerotických plátů. Ze studií bylo zjištěno, že systémovým podáním anti-miRs, který byl cílený na miR-33a a miR-33b, došlo ke zvýšení jaterní exprese ABCA1, což mělo za následek trvalé zvýšení plazmatického HDL a snížení triglyceridů ve VLDL u afrických zelených opic. [14], [32]

Podobné výsledky přinesla i další studie provedená na primátech. Ukázalo se, že jednoduché systémové dodávání oligonukleotidu, např. uzamčené nukleové kyseliny (LNA)-anti-miR, působí účinně jako antagonistu exprese miR-122 v játrech. Dle studie toto vedlo k dlouhodobému a reverzibilnímu poklesu celkového cholesterolu v plazmě, aniž by byla zaznamenána toxicita v souvislosti s podáním LNA nebo histopatologické změny ve tkáních studovaných zvířat. Na základě dat získaných při použití těchto zvířecích modelů aterosklerotického onemocnění byla vyvinuta terapeutická metoda

využívající anti-miRs pro léčbu dyslipidemií, cílovými strukturami jsou pak proteiny, které mají podíl na syntéze, transportu nebo metabolismu lipoproteinů. [14]

Dalším terapeutickým přístupem je podávání inhibitorů miRNA. Například v aortální intimě a plazmě myši, kde byl deficit apolipoproteinu E, byla miR-181b výrazně regulována směrem dolů a systémové dodávání mimetik miR-181b vedlo k 2,3násobnému zvýšení exprese miR-181b, což významně potlačilo tvorbu aterosklerotické léze. Snížená exprese miR-181b je přisuzována pacientům s koronárním arteriálním onemocněním. [14]

Další způsob pro inhibici miRNA je použití miRNA houbiček (sponges) nebo návnadových transkriptů (decoy transkript), které zahrnují větší množství vazebných míst, které jsou komplementární k příslušné miRNA. Dle důkazů je možné říci, že tato metoda je do jisté míry stejně účinná jako technologie antisense. [14]

Díky experimentům *in vitro* a *in vivo*, které byly provedeny za užití specifických anti-miRs, mimetik RNA, došlo k objasnění úlohy miRNA a také zjištění potenciálního využití jako diagnostického nebo prognostického biomarkeru a také jako možného terapeutického cíle. Ačkoliv informace o poslání miRNA v kardiovaskulární patofyziologii jsou stále předběžné, bylo dosaženo významného pokroku ve vývoji RNA terapeutik pro léčbu aterosklerózy. Pozitivní výsledky v klinických studiích prokázal antisense oligonukleotidový lék Mipomersen, který byl vymezený k léčbě homozygotní familiární hypercholesterolemie a později byl agenturou Food and Drug Administration ve Spojených státech schválen. [14]

Při kvantifikaci miRNA pomocí kvantitativní real time PCR (qRT-PCR) chybí optimalizace analytických metod, což může mít za následek falešně pozitivní výsledky. Proto je zapotřebí velké množství další práce, aby se zjistilo, zda terapeutická manipulace s funkcí miRNA může skutečně představovat bezpečnou a účinnou léčbu aterosklerózy, kterou lze následně využívat v klinické praxi. [14]

## **3.2 Demence (DEM)**

Demence je onemocnění, které se vyskytuje asi u 1 % populace a roste s přibývajícím věkem. Ve věkové kategorii nad 65 let demencí trpí okolo 5,4 % populace. Toto onemocnění zasahuje jak do života nemocného, tak do jeho okolí. Osoby u kterých byla stanovena diagnóza demence, mají naději na dožití v průměru sedm až deset let. Jedinci trpící demencí mají narušenou psychiku, ale výrazně postižená je také jejich sociální role. Z ekonomického pohledu je toto onemocnění pro společnost velkým problémem, jelikož náklady na jednoho pacienta se odhadují na 525 000 Kč ročně. V dnešní době některou formou demence v ČR trpí až okolo 150 000 pacientů, avšak v roce 2050 je předpoklad, že jich bude neuvěřitelných 382 000. [33], [34]

### **3.2.1 Definice onemocnění**

Demence je syndrom charakterizovaný poruchou kognitivních funkcí, kam můžeme zařadit paměť, intelekt a motivaci. Narušené je ale také vnímání, myšlení, vyskytují se poruchy nálady nebo chování, které patří mezi nekognitivní funkce. U jedinců trpících demencí postupně dochází k patrnému zhoršování jejich stavu a schopnosti fungovat jak v sociální, tak pracovní sféře. Postupem času dochází ke ztrátě běžných dovedností, hygienických návyků, nebo např. schopnosti jíst příborem. Konečné stádium tohoto onemocnění nastává, když je pacient odkázán na péči z okolí a následkem pádů nebo jiných úrazů umírá. [33]

### **3.2.2 Epidemiologie**

Syndrom demence má mnoho forem. Mezi nejčastější formu demence můžeme zařadit Alzheimerovu nemoc (AD), která je příčinou 50 až 60 % případů. Dále je častá vaskulární demence (VD) nebo demence s Lewyho tělísky (DLB). Souhrn onemocnění vyvolávající demenci je v Tabulce 4. Každý typ demence má specifické příznaky a patologické změny v mozku. Veškerá neurodegenerativní onemocnění, která zapříčiňují demenci, jsou nevléčitelná, ale můžeme jejich průběh zpomalit, dokonce někdy i zastavit. [33]



**Tabulka 4: Onemocnění vyvolávající demenci [33]**

onemocnění	% zastoupení
Alzheimerova nemoc	50 – 60%
Vaskulární demence	5-10%
Demence s Lewyho tělísky	5-20%
Intrakraniální tumory	1-5%
Normotenzní hydrocefalus	1-5%
Huntingtonova nemoc	0,5 -2%
Demence u Parkinsonovy nemoci a jiných extrapyramidových onemocnění	1%
Farmaky podmíněná demence	1-3%
Trauma mozku	1-2%
Různé (jaterní selhání, hypotyreoidismus, neurosyfilis, Cushingův syndrom, epilepsie, Wilsonova choroba a další)	1-6%
Psychiatrická onemocnění maskující se jako demence (deprese, schizofrenie, konverzní poruchy, hypománie, nediagnostikované poruchy)	1-8%

### 3.2.3 Etiologie

Rizikové faktory, které ovlivňují vznik demence, můžeme rozdělit na faktory neovlivnitelné (věk, pohlaví a genetické činitele) a ovlivnitelné. Mezi ovlivnitelné faktory, které jsou zodpovědné za cca 40 % světového výskytu demence, patří nízké vzdělání, hypertenze, porucha sluchu, kouření, obezita, deprese, nízká fyzická aktivita, diabetes, nadměrná konzumace alkoholu, traumatické poranění mozku, sociální izolovanost nebo znečištění ovzduší. [35]

#### 3.2.3.1 Neovlivnitelné rizikové faktory

- Věk – čím je vyšší, tím se stupňuje riziko rozvoje demence. U dvou lidí ze sta se ve věkové kategorii 65 až 69 let vyskytuje demence. Každých pět let pak stoupá

riziko demence o dvojnásobek, takže v 90 letech se demence objeví u třiceti tří lidí ze sta. Věk je brán jako rizikový faktor z toho důvodu, že u starších lidí jsou častější zdravotní problémy, vyšší krevní tlak, kardiovaskulární onemocnění, slabší imunitní systém. Tyto zdravotní komplikace mohou zvyšovat riziko demence. [35]

- Pohlaví – naznačuje, že Alzheimerova choroba postihuje více ženy než muže. U vaskulární demence je tomu naopak. [35]
- Genetické faktory – jsou často spojovány se vznikem demence. Nejužívanější teorie, která objasňuje patogenezi Alzheimerovy choroby, je hypotéza amyloidní kaskády, kde jako hlavní spouštěč je označován beta-amyloid vznikající z transmembránového amyloidového prekurzorového proteinu (APP). Brzký nástup Alzheimerovy choroby, i když se týká menšího množství případů, může způsobit mutace genu presenilin 1 (PSEN1) a presenilin 2 (PSEN2). Starší dospělí postihuje tato choroba více, jelikož ti mají mnoho rizikových faktorů. V pozdějším rozvoji Alzheimerovy choroby je velmi důležitý gen APOE4 (apolipoprotein E4). Se zvyšujícím množstvím alel tohoto genu přímo úměrně roste riziko Alzheimerovy nemoci s opožděným nástupem z 20 % na 90 % a věk nástupu onemocnění klesá z 84 na 68 let. [35]

### **3.2.3.2 Ovlivnitelné rizikové faktory**

Na základě výzkumu v roce 2020 Livingston et al. určují 12 hlavních ovlivnitelných faktorů rozvoje demence. [35]

- Nižší vzdělání a riziko vzniku demence je často zkoumaným tématem. Matematicky regresní model předpokládá, že postupy, které přispívají ke zvýšení vzdělání ve společnosti, by mohly být tím nejúčinnějším nástrojem k prevenci Alzheimerovy choroby. [35]
- Vysoký krevní tlak – má vliv na kognitivní funkce a mění se v závislosti na věku. Hypotenze nebo excesivní redukce krevního tlaku však může také negativně ovlivnit kognitivní funkce, naznačují u starší skupiny lidí některé zdroje. [35]

- Sluchová ztráta a spojitost s rozvojem demence byla opakovaně potvrzena, ačkoliv není zřejmé, jakým způsobem při ztrátě sluchu dojde ke zvýšení rizika vzniku demence. Existuje několik možností. První z nich je založena na předpokladu, že absence sluchu směřuje k sociální izolaci, což je také jeden z rizikových faktorů. Druhá je založena na vlivu sluchové ztráty na kortikálním zpracování. [35]
- Kouření je rizikovým faktorem hlavně u lidí nad 65 let. Stupňuje riziko vzniku Alzheimerovy choroby, může zvýšit také riziko dalších typů demence, jako je vaskulární nebo nespecifikovaná. Pokud jedinec s kouřením přestane, dojde ke snížení rizika až na úroveň lidí, kteří nikdy nekouřili. Lidé nenesoucí gen APOE4 mají vyšší riziko vzniku demence, pokud kouří. Výzkumy poukazují také na to, že u kuřáků s demencí je vyšší mortalita. [35]
- Obezita a demence mají hodně stejných faktorů. Patří sem stavy, které vycházejí z obezity (hypertenze, kardiovaskulární onemocnění, diabetes s insulinovou rezistencí) a negativně mohou působit na mozek. Riziko demence stupňuje i vyšší body mass index (BMI) z důvodu přítomnosti některých sloučenin, které jsou odváděny tukovou tkání. Při porovnání rizika demence v závislosti na BMI bylo zjištěno, že pacienti s obezitou měli o 74 % vyšší riziko a pacienti s nadváhou o 35 % vyšší riziko než osoby s váhou normální. [35]
- Deprese v souvislosti s demencí může záviset na věku, ve kterém nastala první depresivní epizoda. V mladším věku je deprese dána do souvislosti s chronicitou, horším psychosociálním fungováním, kvalitou života a s větším množstvím genetických faktorů. Lidé zažívající více depresivních situací často opakovaně aktivují úroveň steroidů, která vede k poškození oblasti hipokampu. Jelikož deprese je zároveň rizikovým faktorem pro infarkt myokardu a cévní mozkovou příhodu, tak ty následně můžou směřovat k rozvoji demence. Příznaky deprese jsou hojně popisovány u Alzheimerovy nemoci, ale v brzké fázi je symptomatologie deprese popsána i u Huntingtonovy choroby nebo vaskulární demence. [35]
- Nízká fyzická aktivita také ovlivňuje demenci, to bylo již potvrzeno. Cvičení je chápáno jako prevence a zvýšením fyzické aktivity může dokonce dojít ke zvolnění patologických procesů a problémů s tímto onemocněním. Při zvýšení

fyzické aktivity jednice je možné předejít rozvoji syndromu demence, a to ve 3 % případech. [35]

- Diabetes mellitus – představuje vyšší riziko rozvoje demence, a to 1,5 až 2,5krát větší u starších lidí. Biologické mechanismy, které jsou s tímto spojovány, jsou: kardiovaskulární rizikové faktory, glukózový toxický a oxidační stres, hyperinzulinemie nebo zánět. [35]
- Sociální izolovanost – hraje roli v rozvoji demence stejně tak, jako nižší vzdělání. Z roku 2015 je potvrzeno, že jedinci, kteří se cítí osaměle nebo mají ojedinelý sociální kontakt, tak mají zvýšené riziko vzniku demence.
- Nadměrná konzumace alkoholu – hlavně dlouhodobá, je vztažena ke strukturním změnám v mozku. Dále je spojována s kognitivními změnami nebo se zvýšeným rizikem rozvoje různých druhů demence. Stanovení přesného prahu užívání alkoholu, kdy nastává narušení kognice, ať už vratné či nevratné, ještě nebylo určeno. [35]
- Traumatické poškození mozku (TPM), které je lehké, ale opakované, navyšuje riziko chronické traumatické encefalopatie, která je provázána s demencí. Pokud je jedno TPM těžké nebo středně těžké, zvyšuje se riziko rozvoje Alzheimerovy nemoci. [35]
- Znečištěné ovzduší – je celosvětový problém, který je spojován s mnoha nemocemi, jako je například: onemocnění srdce, cévní mozková příhoda, rakovina a současně i demence. Zvýšené riziko demence je na základě vdechování prachových částic, oxidu dusičitého, oxidu uhelnatého nebo oxidů dusíku. [35]

### **3.3 Typy demence a miRNA u onemocnění souvisejících s demencí**

#### **3.3.1 Alzheimerova nemoc (AD)**

Neurodegenerativní progresivní fatální onemocnění, které je nejčastější příčinou demence a bylo poprvé popsáno v roce 1906 německým neuropatologem Aloisem Alzheimerem. Postupem času dochází ke zhoršování kognitivních schopností, jako je například porucha krátkodobé paměti, řeči nebo pozornosti. Při onemocnění dochází

k zániku synapsí a rovněž ke snížení počtu neuronů ve dvou oblastech. V oblasti kůry mozkové a v oblasti bazálního telencefala, kde jsou zasaženy cholinergní neurony, což způsobuje úbytek acetylcholinu a následnou poruchu cholinergního systému. [33], [36], [37], [38]

Z histologického pohledu se v neuronech mozku vyskytují neurofibrilární klubka (tangles). Jejich mikroskopický vzhled připomíná plamínek nebo tenisovou raketu. V neurofibrilárních klubkách je obsažen hyperfosforylovaný tau-protein. Dále se v mozku extracelulárně vyskytuje beta-amyloid, který je zodpovědný za tvorbu senilního plaku, který se nachází hlavně v mozkové kůře, hipokampu, podkorové šedi i mozečku. Senilní plak se může vytvářet již v preklinickém stádiu AD. Beta-amyloid lze detekovat pomocí pozitronové emisní tomografie při využití speciálních ligandů (např. florbetapir, florbetaben, flutemetamol). Nevyléčitelné onemocnění je léčeno kombinací farmakologických a nefarmakologických přístupů. [33], [38], [39]

Identifikace miRNA, které se podílí na životaschopnosti neuronů, mohou poskytnout informace o patogenezi AD. V Tabulce 5 níže jsou uvedené vybrané podskupiny miRNA spojené s AD.

**Tabulka 5: Vybrané podskupiny miRNA spojené s AD [40]**

Alzheimerova nemoc
let-7i-5p
miR-15a-5p
miR-29c-3p
miR-590-5p
miR-194-5p
let-7g-5p
let-7d-5p

Rodina miRNA let-7 je údajně zodpovědná za regulaci proliferace a diferenciaci nervových kmenových buněk a vykazuje proapoptickou aktivitu v centrálním nervovém systému. Více studií, nezávisle na sobě, zjistilo, že významně zvýšená exprese let-7g-5p, ale i let-7d-5p je v krevních vzorcích u kohort pacientů s AD. Dalším objektem zkoumání bylo, zda neurotoxické transkripty let-7, které jsou v mozku, se dostávají do mozkomíšního moku a mohou být využity jako klinické biomarkery. Touto studií se zabýval Derkow et al. Informace z mozkomíšního moku pacientů s AD se porovnávaly s pacienty, kteří trpí frontotemporální demencí, ale také s pacienty, kteří mají velkou depresivní epizodu bez klinických nebo neurobiologických příznaků AD, a se zdravými kontrolami. V mozkomíšním moku byly objeveny rozdílné profily exprese rodiny let-7, s výjimkou zvýšených hladin let-7b a let-7e u pacientů s AD i velkou depresivní epizodou. Samostatná studie Sorensen et al. hodnotila mozkomíšní mok a krev pacientů trpících AD s jinými typy demence. Bylo objeveno celkem 52 miRNA v likvoru (CSF) u skoro všech pacientů. Při porovnání zdravých kontrol s pacienty s AD byly některé miRNA, konkrétně dvě (let-7i-5p a miR-15a-5p) regulovány směrem nahoru a jedna miR-29c-3p byla regulována směrem dolů. Výsledky ukazují, že abnormální aktivita let-7 miRNA může zprostředkovávat kognitivní patologii a patologii spojenou s demencí narušením kritických neuronálních signálních drah. [40], [41], [42]

### **3.3.2 Vaskulární demence (VD)**

Tento typ demence je druhý nejčastější typ související s věkem a celosvětově představuje závažný zdravotní problém. Vzniká na základě poruchy cévního oběhu v mozku, postupně vede k zhoršování intelektuálních funkcí. Poruchy cévního oběhu mohou vést k rozvoji cévních mozkových příhod (CMP) a pokud dojde k CMP, tak vaskulární demence se může rozvinout do 3 měsíců. Pro pacienty s vaskulární demencí je typické postižení hlavových nervů, hemiparéz a pyramidových iritačních jevů, také mozečkové příznaky, poruchy chůze, řeči nebo neschopnost vykonávat koordinované pohyby. K dalším příznakům můžeme zařadit i dočasné ochrnutí, zhoršené vidění nebo potíže s mluvením. [33], [43]

Dle odborníků můžeme rozdělit vaskulární demenci na mnoho typů:

- vaskulární demence při postižení velkých cév

- vaskulární demence při postižení drobných cév
- vaskulární demence vzniklá v důsledku ischemie nebo hypoperfuzi
- multifaktorová demence (opakované mozkové infarkty)
- vaskulární demence vzniklá po krvácení do mozku (vč. krvácení subarachnoidálního)

Pacienti jsou léčeni jak farmakologickými, tak nefarmakologickými postupy. Nefarmakologické postupy jsou velmi podobné jako u AD. Z farmakologického hlediska se používá například antikoagulanca a antiagregancia, která zamezují vzniku nových mozkových ischemií. [33], [44]

Studie, která zkoumala vzorky plazmy od pacientů trpících vaskulární demencí došla k závěru, že miR-29a-3p je při porovnání se zdravými kontrolami snížena a že hladiny miR-10b\* a miR-130b-3p byly ve vzorcích plazmy s vaskulární demencí také sníženy. [40]

### **3.3.3 Demence s Lewyho tělísky (DLB)**

Je to druhá nejčastější forma demence, která je na pomezí Parkinsonovy a Alzheimerovy nemoci a spíše se vyskytuje ve vyšším věku, a to ve věku 75 až 80 let. Z histologického hlediska je typický pro tento typ demence výskyt Lewyho tělísek v mozkových buňkách nemocného. Tělíška jsou eosinofilní sférické inkluze obsahující ve vysoké míře alfa-synuklein. [45]

Léčba tohoto onemocnění je symptomatická. U lehkých až středních demencí je nasazován inhibitor mozkových cholinesteráz, např. rivastigmin, který se používá k léčbě kognitivních poruch. Při výskytu deprese jsou podávány selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI – antidepressiva 3. generace), např. sertralin. Dále se také podávají antiparkinsonika a antipsychotika. Významná je ale také léčba nefarmakologická. [33], [45]

Jelikož DLB má společné charakteristické rysy s AD, může docházet k chybné diagnóze a chybné klinické péči. Studie Gaméze-Valera et al. zjišťovala, zda profily exprese miRNA z plazmy se mohou rozlišovat mezi AD, DLB a zdravými kontrolami.

Z celkových 238 zkoumaných miRNA bylo 6 miRNA u pacientů s AD v porovnání s pacienty s DLB a zdravými kontrolami regulováno směrem dolů. Sem se řadily tyto miRNA: hsa-miR-451a, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-126-3p, hsa-let-7i-5p a hsa-miR-151a-3p. U těchto miRNA je předpoklad, že by mohly zvýšit citlivost nebo přesnost diagnózy a eventuelně vést léčebné plány. [46]



## 4. Metody detekce miRNA

Pro časnou klinickou diagnostiku jsou důležité metody kvantifikace a vizualizace exprese miRNA. Tato práce je ale velmi náročná z důvodu krátké délky miRNA, vzájemné vysoké sekvenční homologii mezi členy rodiny a nízké koncentraci. K detekci miRNA se nejčastěji užívá metoda northern blotting, hybridizace *in situ* nebo různé modifikace qRT-PCR. Porovnání standardních technologií pro detekci miRNA je níže v Tabulce 6.[5], [47]

### 4.1 Northern Blotting (hybridizace RNA)

Jedná se o historicky nejstarší metodu, která je hojně užívaná i přesto, že je málo citlivá (na úrovni nanomolů), časově náročná a vyžaduje velké množství vzorků RNA. Využívá se jak k detekci zralé miRNA, tak k detekci jejich prekurzorů, protože při této metodě dochází k separaci jednotlivých molekul na základě jejich velikosti.

Princip metody je následující. Nejprve je vzorek RNA štěpen pomocí restriktivní endonukleázy, následně je separován podle velikosti pomocí elektroforézy v agarózovém či polyakrylamidovém gelu, dále denaturován a přenesen na nitrocelulózovou fólii nebo nylonovou membránu. Poté je fixován s následnou reakcí se sondami, které jsou značené, v minulosti radioaktivně pomocí  $^{32}\text{P}$  a dnes čím dál častěji jsou značené fluorescenčními nebo chemiluminiscenčními barvivy. Sondy, které jsou značené radioizotopy, pomáhají zvýšit citlivost. Následně dojde k promytí volné sondy a miRNA je detekována radioaktivním způsobem pomocí značených sond.

V posledních letech došlo k řešení problému s nízkou citlivostí a došlo ke zlepšení této metody. Začala se využívat LNA modifikovaná oligonukleotidová sonda. LNA obsahuje pevnou strukturu vytvořenou spojením 2' a 4' uhlíků na ribóze pomocí methylenové skupiny. Tyto LNA sondy mají vysokou teplotní stabilitu a lepší hybridizační vlastnosti. Takto modifikované sondy jsou výhodné hlavně tehdy, kdy je k dispozici pouze malé množství vzorku nebo hladina exprese zkoumaných miRNA je ve vzorku také nízká. [5], [47], [48]

## 4.2 *In situ* hybridizace (FISH)

Metoda, která byla pro detekci miRNA vyvinuta teprve nedávno. Umožňuje studovat prostorovou a časovou distribuci kandidátních miRNA na buněčné a subbuněčné úrovni. Běžné DNA a RNA se zde nevyužívají, vzhledem k nedokonalé vazebné afinitě k cílové miRNA. Používají se sondy LNA a RNA oligonukleotivové sondy konjugované s haptenem s navázaným fluoresceinem a vysoce specifickými podmínkami promývání s tetramethylamonium chloridem, které afinitu zvyšují a lze tak detekovat miRNA pomocí *in situ* hybridizace. [5]

## 4.3 Microarrays

Jedná se o čipovou technologii, která je nejrozšířenější metodou pro rychlou a výkonnou detekci miRNA, ale velmi drahou metodu. Funguje na principu hybridizace nukleových kyselin mezi cílovými molekulami a sondami. MiRNA z analyzovaného vzorku je značena fluorescenčními barvivy a hybridizována se sekvenčně specifickými miRNA oligonukleotidovými sondami, které mají většinou amino-modifikovaný 5'konec a jsou imobilizované na povrchu nosiče (čipu). Následně dochází k analýze fluorescenčního signálu, podle kterého může být vyhodnocena přítomnost miRNA, ale také jejich relativní množství. Hlavní výhodou je miniaturizace a možnost vyšetřit více vzorků najednou, což je vhodné pro klinické účely. Nevýhodou je vysoká cena fluorescenčních značek nebo koupě vysokorozlišovací kamery, ale také větší náchylnost k chybám. [5], [47]

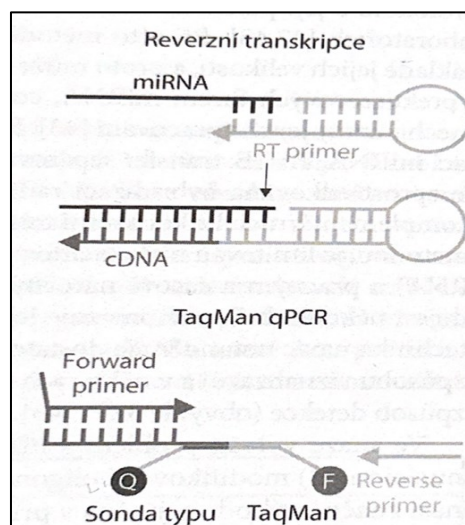
Jelikož každá metoda, která je uvedena výše, má svá pozitiva, ale i nevyhnutelné nedostatky, jsou vyvíjeny stále nové a nové technologie, které mají za cíl rychlejší analýzu, nižší cenu, zjednodušení pracovního postupu atd. Mezi ně patří například metody detekce miRNA na bázi nanomateriálů, detekce miRNA na základě amplifikace s posunem vlákna. [1], [47]

## 4.4 Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR)

Patří mezi nejrozšířenější techniky analýzy miRNA, jelikož hlavní výhodou RT-PCR je velmi vysoká citlivost a specifita. Je bezprostředně považována za zlatý standard a umožňuje detekci cílových miRNA až v attomolárním rozmezí (aM).

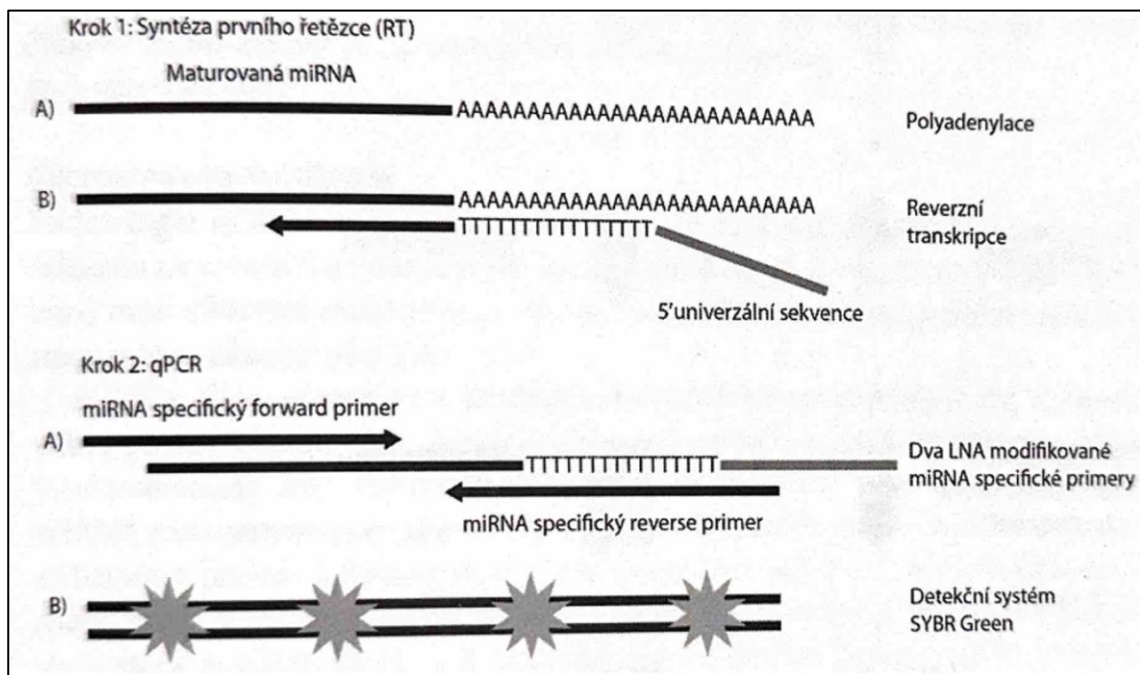
Kvantifikace molekul RNA zahrnuje tento následující postup. Nejprve se převede cílová miRNA do komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkripce (RT). Následně je cDNA amplifikována a kvantifikována pomocí PCR díky tepelně stabilní DNA polymeráze a dvojici primerů. Amplifikace se sleduje pomocí fluorescence v reálném čase. Avšak využití PCR metody na detekci miRNA vyžaduje užití modifikace z důvodu krátkých řetězců nukleotidů miRNA. Délky normálně užívaných primerů pro PCR jsou totožné jako délky vlastních maturovaných miRNA. Řešením by bylo použití kratších primerů, ale to není možné, jelikož mají nízkou teplotu tání v duplexu s miRNA. [5], [47], [48]

Aby se předešlo problémům, v současné době se hojně používají 2 metodické přístupy. První z nich je založen na využití tzv. stem-loop primeru (vlásečkový primer) při reverzní transkripci (Obrázek 6). Použití tohoto primeru způsobuje prodloužení maturované miRNA na délku, která umožňuje následnou amplifikaci pomocí jednoho specifického a jednoho univerzálního primeru, dále se využívá specifická TaqMan sonda, která je oligonukleotidová sonda značená na 5'konci reporterovým fluoroforem a na 3'konci tzv. zhášedčem. [5], [47], [48]



**Obrázek 6 Znárodnění detekce miRNA pomocí qRT-PCR s využitím stem-loop primeru a detekčního systému TaqMan. [5]**

Druhý metodický přístup, který je nejčastěji na trhu využíván, spočívá v polyadenylaci miRNA pomocí poly(A)-polymerázy, která nastává ještě před reverzní transkripcí (Obrázek 7). MiRNA se nejprve polyadenyluje na 3'konci, tímto dochází k umělému prodlužování templátu miRNA. Následně je provedena reverzní transkripce a tím dojde ke vzniku cDNA s obsahem 5'univerzální sekvence. Poté se provádí kvantifikace cDNA za pomoci dvou specifických LNA modifikovaných primerů. Pro detekci se využívají interkalační barviva SYBR green, které se vkládají mezi dvouvláknovou DNA (dsDNA). [5], [47], [48]

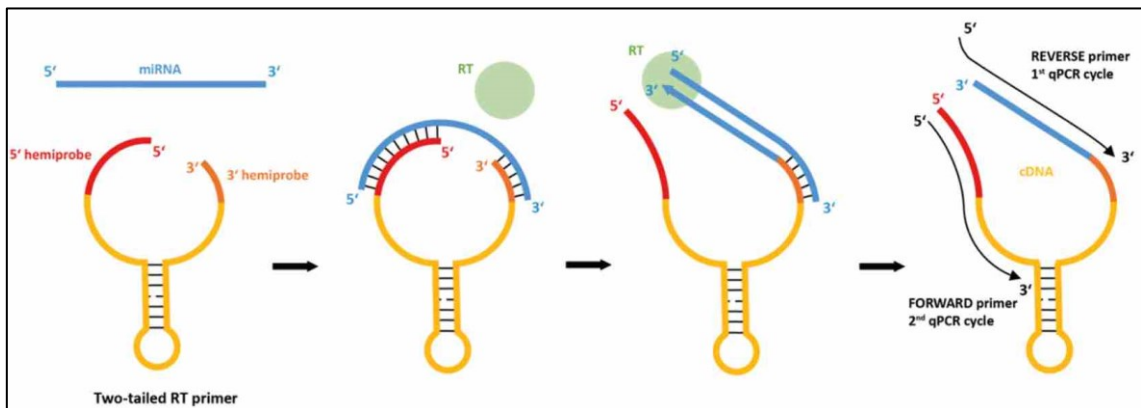


**Obrázek 7: Znárodnění qRT-PCR s využitím polyadenylace a detekce pomocí SYBR green [5]**

#### 4.4.1 Two-Tailed PCR

Jedná se o kvantitativní Two-Tailed polymerázovou řetězovou reakci (TT-qPCR). U TT-qPCR se používají místo jedné vazebné sondy dvě hemisondy, a to 3'hemisonda a 5'hemisonda (Obrázek 8). Tyto sondy se navážou na různé úseky miRNA a jsou sloučené pomocí vlásenky. Hemisondy jsou příliš krátké, aby se navázaly na miRNA samostatně, pokud je ovšem splněna komplementarita obou sond, vážou se kooperativně. Komplementární DNA, která vznikla reverzní transkripcí, je poté amplifikována metodou PCR za pomoci dvou sekvenčně specifických primerů

a detekována pomocí chemie SYBR green. Pro vyhodnocení se využívá křivka tání (melting curve), která se užívá také pro detekci nespecifických produktů. [49]



**Obrázek 8: TT-qPCR [50]**

Výhody TT-qPCR metody jsou: vysoká citlivost, detekce a kvantifikace miRNA v širokém spektru biologických materiálů (plazma, sérum, krev, mozkomíšní mok, synoviální tekutina, různé druhy tkání, atd.), velmi vysoká specifita, vysoká výkonnost při porovnání s jinými technikami RT-qPCR. Další výhodou Two-Tailed RT-qPCR je rychlé testování s celkovou dobou analýzy méně než 2,5 hodiny. TT-qPCR je standardizována pro celkovou kvantifikaci miRNA. [49], [50]

**Tabulka 6 Porovnání standardních technologií pro detekci miRNA [1]**

	<b>název metody</b>	<b>výhody</b>	<b>nevýhody</b>
<b>STANDARDNÍ TECHNOLOGIE</b>	Northern blotting	Nízká cena, komplexita vzorku	Nízká specifita, pracnost, radioaktivní značení
	RT-PCR	Robustnost, senzitivita	Drahé vybavení, drahé fluorescenční sondy
	FISH	Detekce <i>in situ</i>	Kvantifikace pouze vysoce školeným personálem
	Microarrays	Vysokokapacitní metoda	Náročné zpracování dat

## 5. Cíl práce

Cílem této diplomové práce byla identifikace potenciálních miRNA cílů pro diferenciální diagnostiku pacientů s aterosklerózou a demencí. Dále také srovnání expresního profilu mezi vzorky zdravých jedinců a patologickými vzorky pacientů trpících demencí nebo pacientů s aterosklerózou. Porovnání exprese a záchytu miRNA ve vzorcích séra se vzorky mozkomíšního moku. Výběr vhodných miRNA v rámci diferenciální diagnostiky u pacientů s aterosklerózou a s demencí. Dále také výběr miRNA cílů s co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnotou pro následnou validační studii.

## 6. Experimentální část

Experimentální část byla prováděna v laboratořích na Oddělení klinické biochemie ve Fakultní nemocnici v Ostravě. V této diplomové práci bylo zpracováno celkem 24 vzorků pacientů s Parkinsonovou nemocí (PD) a demencí (DEM) a 24 vzorků pacientů s aterosklerózou (ATS) a demencí (DEM). Všechny vzorky byly porovnávány s kontrolní skupinou, kterou byli zdraví jedinci. Pro řádnou normalizaci výsledků při měření miRNA bylo provedeno měření nejen samotných vzorků, ale také endogenních kontrol.

### 6.1 Vzorky použité k analýze

- **Skupina A** – vzorky pacientů s Parkinsonovou nemocí a demencí
  - Matrice vzorku: 12x sérum (S) a 12x likvor (CSF)
  - Počet vzorků: 24, 3xS + 3xCSF od pacienta s demencí, 3xS + 3xCSF od pacienta s Parkinsonovou nemocí, 6xS + 6xCSF kontrolní skupiny – zdraví jedinci (CTRL) viz. Tabulka 7

**Tabulka 7: Přehled pozitivních a negativních vzorků pacientů skupiny A**

Pozitivní vzorky	Negativní vzorky
Vzorek č. 20 – DEM (1x S, 1x CSF)	Vzorek č. 15 – CTRL (2x S, 2x CSF)
Vzorek č. 166 – DEM (1x S, 1x CSF)	Vzorek č. 90 – CTRL (2x S, 1x CSF)
Vzorek č. 272 – DEM (1x S, 2x CSF)	Vzorek č. 253 – CTRL (1x S, 1x CSF)
Vzorek č. 46 – PD (2x S, 2x CSF)	Vzorek č. 458 – CTRL (1x S, 1x CSF)
Vzorek č. 95 – PD (2x S, 2x CSF)	Vzorek č. 474 – CTRL (1x S, 1x CSF)
Vzorek č. 340 – PD (1x S, 2x CSF)	Vzorek č. 526 – CTRL (2x S, 1x CSF)

- **Skupina B** – vzorky pacientů s aterosklerózou a demencí
  - Matrice vzorků: 24x sérum (S) viz. Tabulka 8

**Tabulka 8: Seznam měřených vzorků pacientů skupiny B**

Seznam měřených vzorků
6x kontrolní skupina (15, 19, 20, 21, 22, 26)
6x ATS skupina (2, 5, 6, 8, 9, 11) – pacienti s aterosklerózou
6x DEM skupina (1, 13, 14, 17, 18, 25) – pacienti s demencí
6x ATS+DEM skupina (12, 23, 27, 28, 29, 30)

## 6.2 Základní zpracování

Všechny odebrané vzorky, ať už likvor nebo sérum, byly odeslány na Oddělení klinické biochemie. Po přijetí vzorku byly vzorky centrifugovány a následně alikvotovány do 2 mikrozkmavek o objemu 1000  $\mu$ l. Poté byly vzorky skladovány při  $-80^{\circ}\text{C}$  do doby analýzy.

## 6.3 Izolace miRNA

RNA byla izolována pomocí kitu iCatcher Circulating cfRNA 1000 Kit (Cat. No. AC20100-36, CatchGene) s využitím automatického izolátoru CatchGene. Kvalita izolátů RNA byla analyzována spektrofotometricky pomocí NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Veškeré vzorky a roztoky, které byly potřeba k izolaci, byly připraveny v laminárním boxu z důvodu čistoty a snížení kontaminace.

- **Skupina A**

- Vstupní objem S: 0,5 ml séra + 0,5 ml RNase free H<sub>2</sub>O
- Vstupní objem CFS: 0,5 ml likvoru + 0,5 ml RNase free H<sub>2</sub>O

- **Skupina B**

- Vstupní objem : 1 ml séra



### 6.3.1 Postup pro vytvoření IC, izolace a alikvotace

1. Jako první byla připravena dle postupu výrobce izolační interní kontrola (IC) neboli háďátko (syntetická cel-miR-54-3p-TT, kat. č. ZBOTTK0000253, BioVendor R&D), která slouží ke kontrole úspěšnosti izolace. K lyofilizovanému materiálu cel-miR-54-3p-TT bylo přidáno 100  $\mu$ l PCR vody. Po 15 minutách inkubace byla kontrola vortexována a následně centrifugována. Připravená IC měla koncentraci  $1 \times 10^9$  miRNA kopií/ $\mu$ l, byla stabilní 7 dní při 4°C.
2. Tento zásobní roztok IC o koncentraci  $1 \times 10^9$  miRNA kopií/ $\mu$ l bylo nutno naředit na pracovní koncentraci  $1 \times 10^7$  miRNA kopií/ $\mu$ l smícháním 10  $\mu$ l IC  $1 \times 10^9$  miRNA kopií/ $\mu$ l a 990  $\mu$ l PCR vody. Pracovní roztok byl připraven k okamžitému použití. 1  $\mu$ l IC  $10^7$  miRNA kopií/ $\mu$ l byl smíchán s 300  $\mu$ l pufru RCL1 na každý vzorek = pracovní roztok pufru RCL1.
3. K 1000  $\mu$ l vzorku séra/likvoru bylo přidáno 301  $\mu$ l pracovní roztok pufru RCL1. Vše bylo krátce zvortexováno, inkubováno při pokojové teplotě 3 minuty a centrifugováno.
4. V dalším kroku bylo nutno odstranit všechny přítomné proteiny přidáním 100  $\mu$ l RCL2. Následně byly vzorky zvortexovány a při 25°C inkubovány po dobu 1 minuty.
5. Posléze byly vzorky centrifugovány 3 minuty při 11 000 g (RCF).
6. V posledním kroku byl supernatant z odstředěného vzorku o objemu 1000  $\mu$ l smíchán s 1400  $\mu$ l isopropanolu a promíchán.
7. Takto připravené vzorky byly přesunuty do přístroje iCatcher12.

### 6.3.2 Nastavení přístroje iCatcher 12

Veškeré komponenty byly vloženy do přístroje podle návodu výrobce. Do modrého kontejneru, který byl součástí kitu, bylo napipetováno 21 ml 100% ethanolu a vloženo do přístroje. Dále byly vloženy stříkačky, eluční zkumavky, cartridge, sada

špiček, kolonky a nakonec připravené vzorky v červených kontejnerech. Následně byl zvolen izolační program AC20100 a eluční objem 30  $\mu$ l. Izolace trvala 1 h a 21 minut.



**Obrázek 9: Naplnění přístroje iCatcher 12 a iCatcher Circulating cfRNA 1000 Kit.**

Výsledným produktem byl izolát o objemu 30  $\mu$ l, k tomu bylo přidáno 10  $\mu$ l PCR vody. Vše bylo zvortexováno, rozalikvotováno po 5  $\mu$ l do 8 zkumavek. Vzniklé izoláty byly zamrazeny a skladovány při -80 °C a následně použity na reverzní transkripci.

### 6.3.3 Použité reagensie

Reagensie a chemikálie, které byly použity: PCR voda, syntetická cel-miR-54-3p-TT, pufr RCL1 a RCL2, isopropanol a bezvodý ethanol.

## 6.4 Reverzní transkripce

RNA byla analyzována pomocí produktů MIRXES: ID3EAL miRNA Knowledge Panel (1105264), ID3EAL miRNA qPCR Master Mix (1104206), ID3EAL cDNA Synthesis systém (1103103). Vzhledem k nízké koncentraci RNA izolátů, která je u analyzovaných matric na hranici detekce, byl do reakce RT využit maximální možný objem vzorku bez ředění.

- **Skupina A**

- miRNA Knowledge Panel obsahoval celkem 192 cílů (včetně kontrol), z toho 176 miRNA cílů pro screening. 5  $\mu$ l RNA izolátu bylo použito jako vstup do reverzní transkripce.

- **Skupina B**

- miRNA Knowledge Panel obsahoval celkem 384 cílů (včetně kontrol), z toho 352 miRNA cílů pro screening. 5  $\mu$ l RNA izolátu bylo použito jako vstup do reverzní transkripce.

#### 6.4.1 Postup pro přípravu RT master mixu a reverzní transkripci

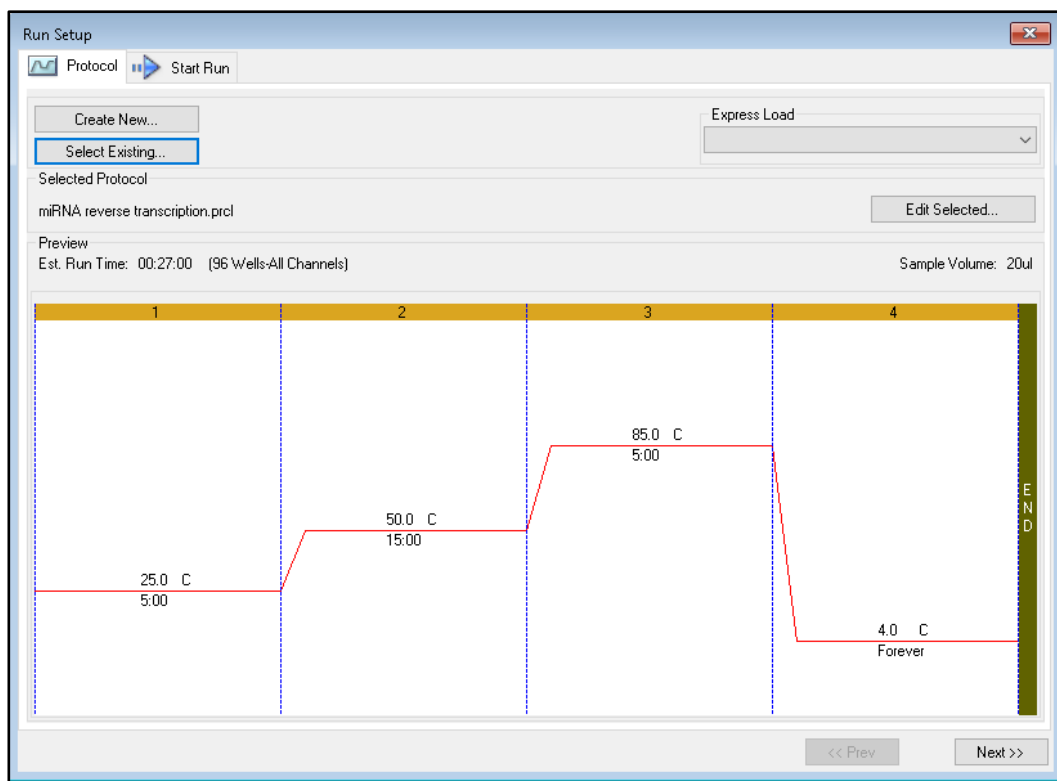
1. Příprava RT master mixu (RT MMX) o objemu 16  $\mu$ l pro 1 reakci – do mikrozkušavky bylo napipetováno 11,75  $\mu$ l PCR vody, 2  $\mu$ l RT MMX, 0,25  $\mu$ l RT primer miRNA a 2  $\mu$ l RT enzymu, který se musí uchovávat na ledu kvůli rychlé degradaci. Pro větší přehled byla vytvořena Tabulka 9, viz níže.
2. Směs RT MMX byla přepipetována po 16  $\mu$ l do každé jamky PCR destičky. K námi vytvořené směsi RT MMX bylo posléze přidáno 4  $\mu$ l vzorku / 4  $\mu$ l pozitivní kontroly / negativní kontroly (voda s enzymem nebo voda s miRNA).
3. Následně byla PCR destička překryta optickou fólií, která brání vypaření vzorku. Poté byla provedena centrifugace celé destičky.



**Obrázek 10: PCR destička potažena optickou fólií**

4. PCR destička byla vložena do termocycleru s již předdefinovaným programem pro reverzní transkripci (cca 30 min), výsledkem je vznik komplementární DNA. Protokol obsahoval několik fází:

- 1. fáze: 25°C 5 min
- 2. fáze: 50°C 15 min
- 3. fáze: 85°C 5 min
- 4. fáze: 4°C do doby vypnutí



**Obrázek 11: Program pro reverzní transkripci**

5. Následně bylo vše krátce centrifugováno a přidáno 80  $\mu$ l PCR vody, promícháno a uchováno při -20 °C (stabilita těchto vzorků cca 4 týdny). Takto připravená cDNA byla dále zpracována, viz postup níže.

**Tabulka 9: Protokol pro přípravu RT MMX**

<b>Reagencie</b>	<b>1 reakce [<math>\mu</math>l]</b>	<b>8 reakcí [<math>\mu</math>l]</b>
PCR voda	11,75	94
RT MMX	2	16
RT primer miRNA	0,25	2
RT Enzym	2	16
<b>celkem RT mastermixu</b>	<b>16</b>	<b>128</b>

## **6.5 Amplifikace a detekce**

Amplifikace s detekcí trvala cca 1 hodinu a 20 minut a výsledkem byla křivka tání a Ct hodnoty (Cycle of treshold). Všechny vzorky i kontroly byly analyzovány v triplicátu.

### **6.5.1 Postup pro přípravu PCR master mixu a amplifikaci s detekcí**

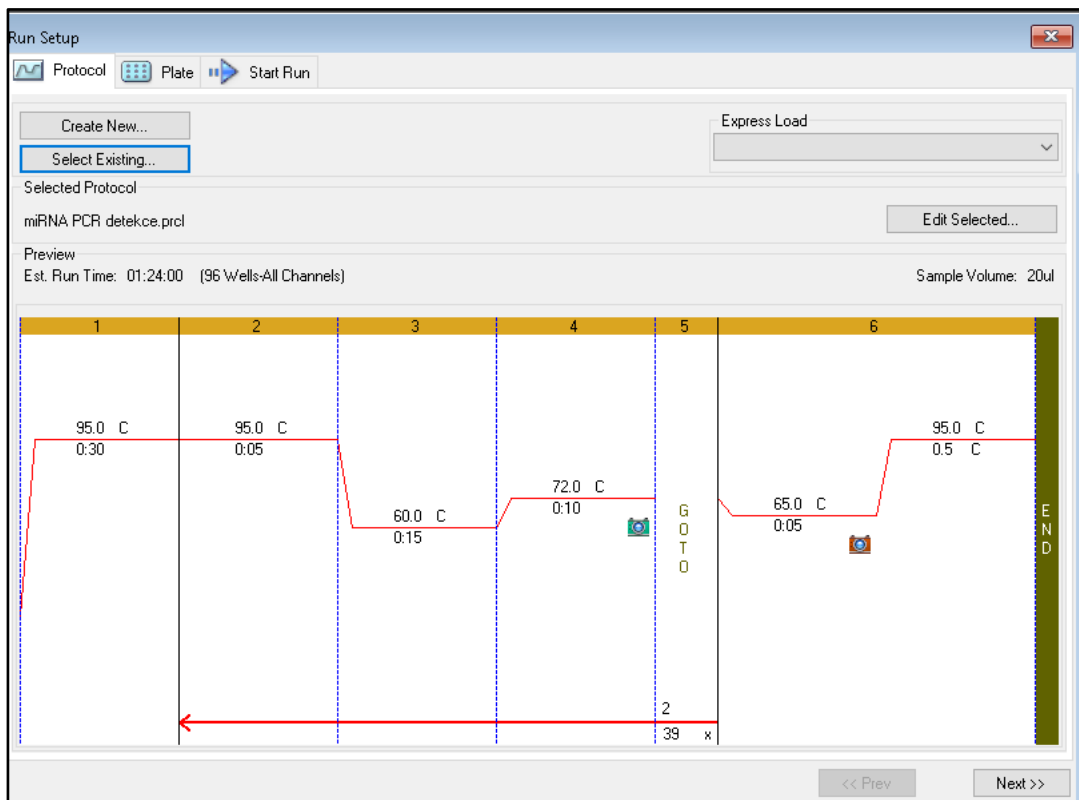
1. Příprava PCR master mix (PCR MMX) o objemu 16  $\mu$ l. PCR MMX pro 1 reakci – do zkumavky bylo napipetováno 5,2  $\mu$ l vody, 10  $\mu$ l PCR MMX, 0,4  $\mu$ l PCR primer F miRNA a 0,4  $\mu$ l PCR primer R miRNA. Vše bylo dodáno výrobcem BioVendor R&D, kat. č. ZBORDTTPCR150. Pro větší přehled byla vytvořena Tabulka 10, viz níže.
2. Směs PCR MMX byla přepipetována po 16  $\mu$ l do jednotlivých jamek PCR destičky podle počtu vzorků zvolených k analýze. Posléze byly přidány 4  $\mu$ l vzorků přešpané cDNA reverzní transkripcí / 4  $\mu$ l pozitivní kontroly / 4  $\mu$ l negativních kontrol (1 - PCR voda s enzymem, 2 – PCR voda s miRNA, 3 - PCR voda).
3. Všechny vzorky byly pipetovány v tripletu.
4. PCR deska byla přelepená optickou fólií, centrifugována a vložena do termocycleru s přednastaveným protokolem, kde proběhla samostatná PCR reakce.



**Obrázek 12: Termocycler s PCR destičkou**

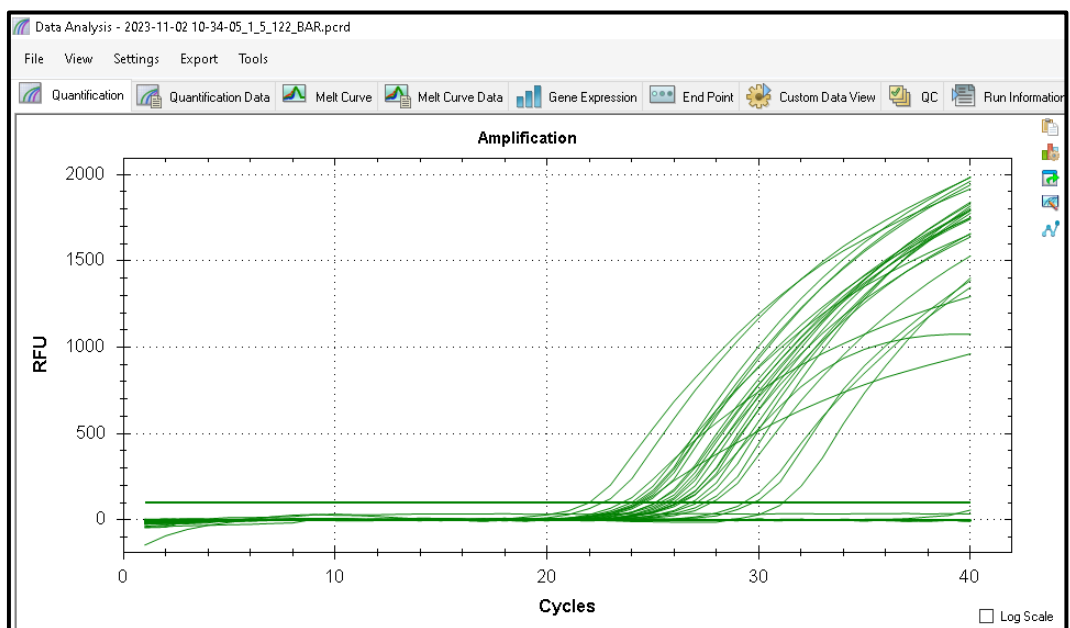
5. Protokol byl složen z několika fází, které se 40x zopakovaly. Fáze byly následující:

- 1. fáze: DENATURACE - 95°C, doba trvání 5s
- 2. fáze: ANNEALING - 60°C, doba trvání 15s
- 3. fáze: ELONGACE - 72°C, doba trvání 10s



**Obrázek 13: Program pro amplifikaci a detekci ve formě grafického znázornění jednotlivých kroků, který byl 40x zopakován.**

6. Výsledkem byla tzv. křivka tání (melting curve), která se následně statisticky vyhodnotila.



**Obrázek 14: Výsledná křivka tání v programu Bio-Rad CFX Maestro**

**Tabulka 10: Protokol pro vytvoření PCR MMX**

Reagencie	1 reakce [ $\mu$ l]	8 reakcí [ $\mu$ l]
PCR voda	5,2	41,6
PCR MMX	10	80
PCR primer F miRNA	0,4	6,4
PCR primer R miRNA	0,4	6,4
<b>celkem PCR mastermixu</b>	16	128

## 6.6 Zpracování dat

Základní zpracování výsledků a vyhodnocení bylo provedeno pomocí Microsoft Excel souboru (Data analysis template). Zdrojová data z měření (Ct hodnoty) pro každý vzorek a miRNA cíl byla zpracována dle následujícího postupu:

- Jako validní hodnoty byly vyhodnoceny pouze miRNA cíle změřené v rozmezí Ct 9–35.
- Hodnoty Ct byly normalizovány na Interplate control (normalizace na technickou variabilitu u měření více PCR běhů).
- Hodnoty byly normalizovány na RNA spike-in kontrolu (normalizace na technickou variabilitu u měření více RT).
- Do následné statistické analýzy pro výběr endogenní kontroly byly zahrnuty pouze miRNA cíle, které byly detekovány u všech vzorků dané skupiny, ostatní cíle byly vyřazeny z analýzy.
- Do následné statistické analýzy jednotlivých klinických skupin byly zahrnuty pouze miRNA cíle, které byly detekovány u min. 5 vzorků dané skupiny, ostatní cíle byly vyřazeny z analýzy.
- Hodnoty byly normalizovány na Global Mean (geometrický průměr všech změřených hodnot pro daný vzorek, normalizace biologické variability mezi vzorky).



### 6.6.1 Zpracovaná data skupina A - vzorky pacientů s Parkinsonovou nemocí a demencí

Celkem bylo pro matrici sérum po základním zpracování dat analyzováno 138 miRNA cílů. 38 cílů bylo vyřazeno z důvodů nízké exprese u analyzovaných vzorků. Celkem bylo pro matrici CSF po základním zpracování dat analyzováno 47 miRNA cílů. 129 cílů bylo vyřazeno z důvodů nízké exprese u analyzovaných vzorků.

### 6.6.2 Zpracovaná data skupina B - vzorky pacientů s aterosklerózou a demencí

Pro skupinu B bylo využito k analýze pouze sérum (oproti skupině A). Celkem bylo pro skupinu ATS po základním zpracování dat analyzováno 227 miRNA cílů. 125 cílů bylo vyřazeno z důvodů nízké exprese u analyzovaných vzorků. Celkem bylo pro skupinu DEM po základním zpracování dat analyzováno 186 miRNA cílů. 166 cílů bylo vyřazeno z důvodů nízké exprese u analyzovaných vzorků. Celkem bylo pro skupinu ATS+DEM po základním zpracování dat analyzováno 207 miRNA cílů. 145 cílů bylo vyřazeno z důvodů nízké exprese u analyzovaných vzorků.

## 6.7 Statistické zpracování

Statistická analýza byla provedena v programu GenEx. Srovnání biologických skupin bylo provedeno pomocí neparametrického Mann-Whitney testu. Hodnoty rozdílů v expresi (fold-change) mezi jednotlivými skupinami byly zpracovány v Microsoft Excel, podle vzorce:

$$\text{Mean difference } (\Delta\Delta Ct) = \text{Average } (A) - \text{Average } (B)$$

kde A je biologická skupina 1

B je biologická skupina 2

a následně:  $\text{Fold} - \text{change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

pokud je fold-change < 1, potom:  $\text{Fold} - \text{change final} = \frac{-1}{2 - \Delta\Delta Ct}$

Výsledkem srovnání skupin je očekávaný Fold-change mezi skupinami a hodnota  $p$ , která udává míru spolehlivosti výsledku. Avšak vzhledem k nižšímu počtu vzorků jsou statistické metody značně omezeny. Výsledky byly interpretovány s ohledem na tyto nedostatky.

## 6.8 Interpretace výsledků

Jako významné byly označeny miRNA cíle s fold-change  $> 1,5x$  (tzn. min 50% rozdílem mezi skupinami) a zároveň  $p$ -hodnotou  $< 0,05$  (Bonferroniho korekce pro mnohonásobné stanovení zanedbána). Vzhledem k malému počtu srovnání, lze významné cíle pro následnou validaci vybrat i mimo tato kritéria s ohledem na znalost problematiky (např. dle literární rešerše). Pro výběr endogenní kontroly z naměřených dat byly využity nástroj GeNorm a Normfinder, z nichž byly jednotlivé výsledky srovnány a pro každou matici vybráno 5 nejlepších potenciálních endogenních kontrol.

## 7. Výsledky

### 7.1 Výsledky skupiny A

#### 7.1.1 Hodnocení biologických matric a kvality izolace u skupiny A

Před zahájením analýzy metodou RT-qPCR bylo provedeno měření celkové koncentrace (total RNA) a čistota RNA izolovaná z dodaných vzorků na přístroji NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

Roztok nukleových kyselin se spektrofotometricky vyhodnocuje při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci nukleové kyseliny, absorbance při 280 nm odráží její čistotu, tj. míru přítomnosti proteinů.

#### **Koncentrace RNA**

Pro výpočet koncentrace se vychází z následujících vztahů: Při vlnové délce 260 nm je absorbance vzorku rovna 1, pokud je v měřeném roztoku RNA o koncentraci 40 µg/ml.

#### **Čistota RNA**

Poměr absorbancí A260/A280, poskytuje informaci o čistotě roztoku. Čistá RNA obvykle vykazuje hodnotu tohoto poměru okolo 2. Pokud hodnota poměru je výrazně nižší, je roztok kontaminován proteiny či fenolem. K hodnocení čistoty vzorku RNA lze využít poměr A260nm/A230nm. Poměr absorbancí by měl být vyšší než 2,0. Nižší hodnoty značí kontaminaci.

**Tabulka 11: Analýza kvality izolace pro skupinu A**

označení	Zdroj	eluční objem	koncentrace ng/ $\mu$ l	260/280	260/230	etiologie
272 S1	Sérum	30 ul	<b>19,1</b>	<b>0,75</b>	<b>0,16</b>	demence
20 S1	Sérum	30 ul	<b>7,3</b>	<b>0,7</b>	<b>0,12</b>	demence
166 S1	Sérum	30 ul	<b>14,2</b>	<b>0,74</b>	<b>0,13</b>	demence
46 S1+ S2	Sérum	30 ul	<b>10,1</b>	<b>0,74</b>	<b>0,17</b>	parkinson
95 S1+ S2	Sérum	30 ul	<b>12,8</b>	<b>0,75</b>	<b>0,18</b>	parkinson
90 S1+ S2	Sérum	30 ul	<b>9,2</b>	<b>0,72</b>	<b>0,15</b>	kontrola
15 S1+ S2	Sérum	30 ul	<b>11,3</b>	<b>0,93</b>	<b>0,24</b>	kontrola
340 S4	Sérum	30 ul	<b>15,9</b>	<b>0,73</b>	<b>0,14</b>	parkinson
474 S1	Sérum	30 ul	<b>35,1</b>	<b>0,86</b>	<b>0,17</b>	kontrola
458 S1	Sérum	30 ul	<b>13,2</b>	<b>0,83</b>	<b>0,21</b>	kontrola
253 S4	Sérum	30 ul	<b>18,5</b>	<b>0,77</b>	<b>0,15</b>	kontrola
526 S1+ S2	Sérum	30 ul	<b>13,7</b>	<b>0,73</b>	<b>0,14</b>	kontrola
272 L1+ L2	Likvor	30 ul	<b>2,9</b>	<b>1,3</b>	<b>0,24</b>	demence
20 L1	Likvor	30 ul	<b>3,3</b>	<b>1,5</b>	<b>0,21</b>	demence
166 L1	Likvor	30 ul	<b>3,5</b>	<b>1,5</b>	<b>0,27</b>	demence
46 L1+ L2	Likvor	30 ul	<b>16,3</b>	<b>0,84</b>	<b>0,13</b>	parkinson
95 L1+ L2	Likvor	30 ul	<b>3,7</b>	<b>1,39</b>	<b>0,31</b>	parkinson
90 L1	Likvor	30 ul	<b>2,9</b>	<b>1,5</b>	<b>0,42</b>	kontrola
15 L1+ L2	Likvor	30 ul	<b>2,9</b>	<b>1,62</b>	<b>0,17</b>	kontrola
340 L1+ L2	Likvor	30 ul	<b>5,1</b>	<b>1,32</b>	<b>0,28</b>	parkinson
474 L1	Likvor	30 ul	<b>4,6</b>	<b>1,27</b>	<b>0,29</b>	kontrola
458 L1	Likvor	30 ul	<b>2,9</b>	<b>1,38</b>	<b>0,36</b>	kontrola
253 L4	Likvor	30 ul	<b>6,7</b>	<b>1,16</b>	<b>0,38</b>	kontrola
526 L1	Likvor	30 ul	<b>3</b>	<b>1,46</b>	<b>0,33</b>	kontrola

V Tabulce 11 jsou uvedeny hodnoty čistoty a koncentrace RNA izolované ze vzorků sér a likvoru. Koncentrace total RNA izolované ze séra byla v průměru 3x vyšší než u RNA izolované ze vzorků likvoru. RNA izolovaná z likvoru zároveň vykazuje přibližně 2x vyšší čistotu izolátu než sérum.

## 7.1.2 miRNA screening: SÉRUM

### 7.1.2.1 SÉRUM: DEM vs. kontroly

Tabulka 12: Výběr výsledků pro sérum DEM vs. kontroly

miRNA	průměr DEM	průměr KONTROLY	mean difference	fold-change final (DEM vs. KONTROLY)	p-hodnota
hsa-miR-497-5p	1,52	2,47	-0,96	1,94	0,05
hsa-miR-328-3p	2,48	3,18	-0,70	1,62	0,03*
hsa-miR-4732-3p	3,35	3,98	-0,63	1,55	0,05
hsa-miR-185-5p	-1,48	-2,07	0,59	-1,50	0,05
hsa-miR-142a-5p	-2,14	-2,81	0,66	-1,58	0,03*
hsa-miR-195-5p	4,41	3,61	0,79	-1,73	0,03*
hsa-miR-143-3p	-0,15	-0,97	0,82	-1,76	0,05
hsa-miR-196b-5p	5,34	4,40	0,93	-1,91	0,03*
hsa-miR-140-3p	2,74	1,61	1,13	-2,19	0,05
hsa-miR-144-3p	-2,99	-4,31	1,32	-2,50	0,05
hsa-miR-151a-3p	-0,75	-0,23	-0,52	1,43	0,03*
hsa-miR-199a-3p	-2,25	-1,82	-0,43	1,34	0,03*
hsa-miR-423-3p	-0,15	0,25	-0,40	1,32	0,03*
hsa-miR-30b-5p	-0,60	-0,37	-0,23	1,17	0,03*
hsa-miR-324-5p	2,53	2,11	0,42	-1,34	0,05
hsa-let-7i-5p	-0,87	-1,33	0,46	-1,38	0,05
hsa-miR-324-3p	1,69	1,20	0,49	-1,41	0,05
hsa-miR-29c-3p	-2,65	-3,19	0,53	-1,45	0,03*

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

down-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

\* p-hodnota <0,05

V Tabulce 12 jsou uvedeny miRNA cíle doporučené pro další výběr pro validační studii. Nejlepším výsledkem je co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnota.

### 7.1.2.2 SÉRUM: Parkinson vs. kontroly

**Tabulka 13: Výběr výsledků pro sérum Parkinson vs. kontroly**

miRNA	průměr PARKINSON	průměr KONTROLY	mean difference	Fold-change final (PAKINSON vs. KONTROLY)	p-hodnota
hsa-miR-4732-3p	3,01	3,98	-0,97	<b>1,96</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-222-3p	-5,89	-5,05	-0,84	<b>1,79</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-133a-3p	-3,23	-2,49	-0,74	<b>1,67</b>	0,05
hsa-miR-625-5p	-3,23	-2,53	-0,69	<b>1,62</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-199a-5p	-2,56	-1,89	-0,68	<b>1,60</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-155-5p	2,27	2,84	-0,56	<b>1,48</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-320c	-2,02	-1,49	-0,53	<b>1,44</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-142a-5p	-1,85	-2,81	0,95	<b>-1,94</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-224-5p	-8,21	-7,69	-0,52	<b>1,44</b>	0,05
hsa-miR-127-3p	3,99	4,50	-0,51	<b>1,43</b>	0,05
hsa-miR-340-5p	0,37	0,00	0,37	<b>-1,29</b>	<b>0,03*</b>

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

down-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

\* p-hodnota <0,05

V Tabulce 13 jsou uvedeny miRNA cíle doporučené pro další výběr pro validační studii. Nejlepším výsledkem je co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnota.

### 7.1.2.3 SÉRUM: Pacienti (DEM + Parkinson) vs. kontroly

**Tabulka 14: Výběr výsledků pro sérum pacienti vs. kontroly**

miRNA	průměr PACIENTI	průměr KONTROLY	mean difference	fold-change final (PACIENTI vs. KONTROLY)	p-hodnota
hsa-miR-4732-3p	3,18	3,98	-0,80	<b>1,75</b>	<b>0,01*</b>
hsa-miR-497-5p	1,74	2,47	-0,74	<b>1,67</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-122-5p	-2,65	-1,94	-0,71	<b>1,64</b>	p>0,05
hsa-miR-616-3p	5,20	5,91	-0,70	<b>1,63</b>	p>0,05
hsa-miR-199a-5p	-2,54	-1,89	-0,65	<b>1,57</b>	<b>0,02*</b>
hsa-miR-19a-3p	-4,87	-4,23	-0,64	<b>1,56</b>	p>0,05
hsa-miR-139-3p	3,64	4,28	-0,64	<b>1,56</b>	p>0,05
hsa-miR-222-3p	-5,68	-5,05	-0,63	<b>1,55</b>	0,05
hsa-miR-625-5p	-3,13	-2,53	-0,60	<b>1,51</b>	0,05
hsa-miR-99a-5p	0,86	1,45	-0,59	<b>1,51</b>	p>0,05
hsa-miR-28-3p	-3,03	-2,46	-0,58	<b>1,49</b>	0,05
hsa-miR-181a-5p	-1,83	-1,35	-0,49	<b>1,40</b>	0,05
hsa-miR-224-5p	-8,16	-7,69	-0,48	<b>1,39</b>	0,05
hsa-miR-151a-3p	-0,61	-0,23	-0,38	<b>1,30</b>	0,05
hsa-miR-152-3p	2,24	2,60	-0,36	<b>1,28</b>	0,05
hsa-miR-30b-5p	-0,59	-0,37	-0,22	<b>1,16</b>	0,05
hsa-miR-340-5p	0,32	0,00	0,31	<b>-1,24</b>	0,05
hsa-miR-29c-3p	-2,72	-3,19	0,47	<b>-1,39</b>	0,05
hsa-miR-195-5p	4,20	3,61	0,58	<b>-1,50</b>	<b>0,01*</b>
hsa-miR-185-5p	-1,46	-2,07	0,62	<b>-1,54</b>	0,05
hsa-miR-196b-5p	5,11	4,40	0,70	<b>-1,63</b>	<b>0,02*</b>
hsa-miR-142a-5p	-2,00	-2,81	0,81	<b>-1,75</b>	<b>0,01*</b>

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

down-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

\* p-hodnota <0,05

V Tabulce 14 jsou uvedeny miRNA cíle doporučené pro další výběr pro validační studii. Nejlepším výsledkem je co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnota.

#### 7.1.2.4 SÉRUM: DEM vs. Parkinson

**Tabulka 15: Výběr výsledků pro sérum DEM vs. Parkinson**

miRNA	průměr DEM	průměr PARKINSON	mean difference	fold-change	fold-change final (DEM vs. PARKINSON)	p-hodnota
hsa-miR-409-3p	1,18	2,50	-1,32	2,50	<b>2,50</b>	0,19
hsa-miR-495-3p	1,81	2,90	-1,10	2,14	<b>2,14</b>	0,66
hsa-miR-374b-5p	-1,04	-0,02	-1,01	2,02	<b>2,02</b>	0,08
hsa-miR-330-3p	4,24	5,18	-0,94	1,92	<b>1,92</b>	0,19
hsa-let-7f-5p	1,85	2,77	-0,92	1,89	<b>1,89</b>	0,19
hsa-miR-339-5p	2,17	3,07	-0,90	1,87	<b>1,87</b>	0,08
hsa-miR-487b-3p	2,82	3,72	-0,90	1,86	<b>1,86</b>	0,66
hsa-miR-28-5p	2,38	3,16	-0,78	1,72	<b>1,72</b>	0,08
hsa-miR-30c-5p	-0,69	0,05	-0,74	1,67	<b>1,67</b>	0,08
hsa-miR-122-5p	-3,02	-2,28	-0,74	1,67	<b>1,67</b>	0,66
hsa-miR-191-5p	-2,41	-1,67	-0,74	1,67	<b>1,67</b>	0,19
hsa-miR-199b-3p	-2,46	-1,73	-0,72	1,65	<b>1,65</b>	0,38
hsa-miR-337-5p	2,87	3,56	-0,69	1,61	<b>1,61</b>	0,66
hsa-miR-32-5p	3,54	4,22	-0,68	1,60	<b>1,60</b>	0,38
hsa-miR-328-3p	2,48	3,15	-0,67	1,59	<b>1,59</b>	0,66
hsa-miR-199a-3p	-2,25	-1,61	-0,64	1,56	<b>1,56</b>	0,08
hsa-miR-326	1,52	2,12	-0,60	1,52	<b>1,52</b>	0,08
hsa-miR-21-3p	4,08	4,67	-0,59	1,50	<b>1,50</b>	0,08
hsa-miR-140-3p	2,74	2,11	0,63	0,65	<b>-1,54</b>	0,38
hsa-miR-1285-5p	0,88	0,23	0,64	0,64	<b>-1,56</b>	0,66
hsa-miR-424-5p	-0,52	-1,18	0,66	0,63	<b>-1,58</b>	0,38
hsa-miR-15b-3p	1,77	1,10	0,68	0,63	<b>-1,60</b>	0,38
hsa-miR-451a	-9,67	-10,36	0,69	0,62	<b>-1,62</b>	0,66



hsa-miR-133a-3p	-2,51	-3,23	0,72	0,61	<b>-1,65</b>	0,38
hsa-miR-616-3p	5,59	4,82	0,76	0,59	<b>-1,70</b>	0,19
hsa-miR-1290	-6,95	-7,71	0,76	0,59	<b>-1,70</b>	0,38
hsa-miR-627-5p	4,35	3,56	0,79	0,58	<b>-1,73</b>	0,19
hsa-miR-92a-3p	-3,10	-3,95	0,85	0,56	<b>-1,80</b>	0,38
hsa-miR-1224-3p	5,00	4,10	0,90	0,54	<b>-1,86</b>	0,19
hsa-miR-1285-3p	5,96	4,68	1,27	0,41	<b>-2,42</b>	0,19

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

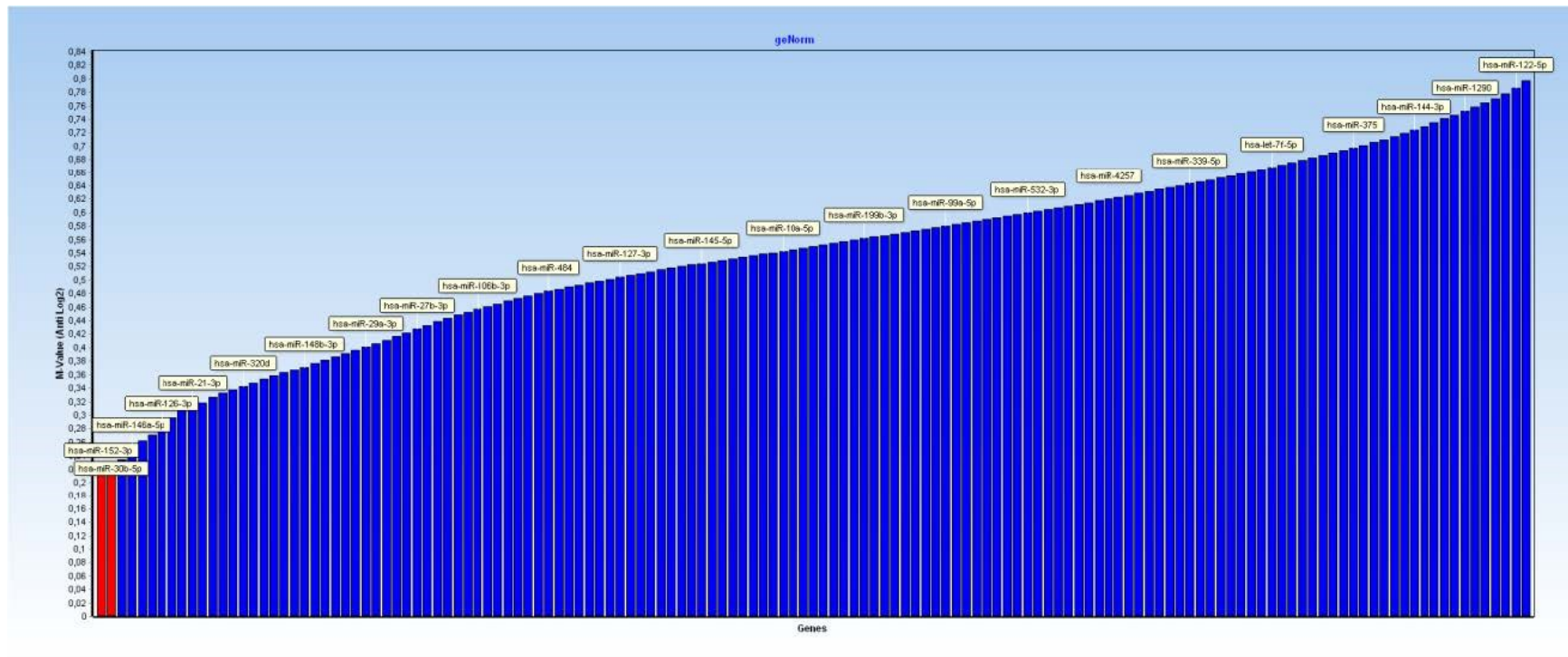
down-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

\* p-hodnota <0,05

V Tabulce 15 jsou uvedeny miRNA cíle doporučené pro další výběr pro validační studii. Nejlepším výsledkem je co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnota. Výsledky neobsahují žádné statisticky významné výsledky, zejména z důvodu srovnání velmi málo vzorků (3+3). Vzhledem k tomu, že se jedná o screening individuálních vzorků, následná reprodukovatelnost uvedených dat může být omezená.

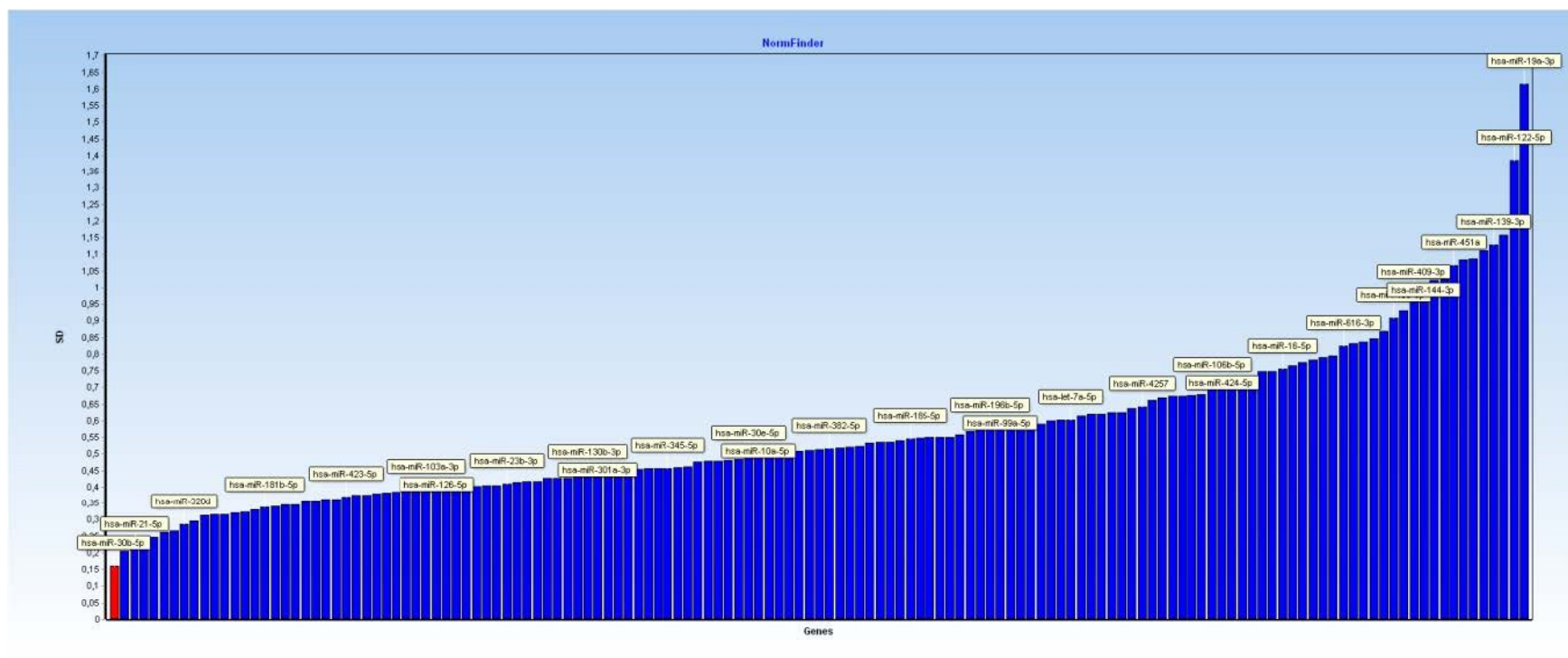
### 7.1.2.5 Endogenní kontroly – sérum

Pro výběr endogenní kontroly z naměřených dat byly využity nástroje GeNorm a Normfinder.



**Graf 1: GeNorm histogram pro endogenní kontroly (sérum) - skupina A**

Výše přiložené grafické znázornění 1 vyjadřuje četnost M hodnoty (M-value AntiLog2 –pro analýzu byly použity Cq hodnoty) pro jednotlivé miRNA. Červeně jsou znázorněny miRNA s nejnižší M hodnotou – nejvhodnější endogenní kontroly.



**Graf 2: Normfinder histogram pro endogenní kontroly (sérum) - skupina A**

Výše přiložený Graf 2 ukazuje četnost směrodatné odchylky (SD) pro jednotlivé miRNA. Červeně jsou znázorněny miRNA s nejnižší SD – nejvhodnější endogenní kontroly.

**Tabulka 16: Výběr nejvhodnějších endogenních miRNA pro normalizaci vzorků sér**

Gene Name	Pořadí GeNorm	Pařadí NormF	Součet pořadí
hsa-miR-30b-5p	2	1	3
hsa-miR-26a-5p	3	4	7
hsa-miR-22-5p	6	2	8
hsa-miR-152-3p	1	9	10
hsa-miR-146b-5p	5	5	10
hsa-miR-146a-5p	4	7	11
hsa-miR-423-3p	8	11	19
hsa-miR-126-3p	7	15	22
hsa-miR-320d	15	8	23
hsa-miR-374a-5p	13	12	25

Celkem bylo pro výběr endogenní kontroly pro matici sérum analyzováno 141 miRNA cílů. Pořadová čísla z aplikací GeNorm a Normfinder byla sečtena, přičemž v tabulce 16 je uvedeno 10 miRNA cílů s nejnižším součtem pořadí – potenciálně nejvhodnější endogenní kontroly. Pro další výběr pro validační studii je doporučeno přihlídnout zejména ke koncentraci dané miRNA ve studované matici.

### 7.1.3 miRNA screening: CSF

#### 7.1.3.1 CSF: DEM vs. kontroly

**Tabulka 17: Výběr výsledků pro CSF DEM vs. kontroly**

miRNA	průměr DEMENCE	průměr KONTROLY	mean difference	fold-change final (demence vs. kontroly)	p-hodnota
hsa-miR-125b-5p	1,09	2,29	-1,19	2,29	0,70
hsa-miR-320c	1,96	2,57	-0,61	1,52	0,37
hsa-miR-122-5p	4,46	3,87	0,59	-1,50	0,05*
hsa-miR-409-3p	3,09	2,31	0,78	-1,71	0,25

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

down-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

\* p-hodnota <0,05

V Tabulce 17 jsou uvedeny miRNA cíle doporučené pro další výběr pro validační studii. Nejlepším výsledkem je co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnota. Uvedená data neobsahují statisticky významné výsledky, co může být zapříčiněno i nižším počtem vzorků v skupině.

### 7.1.3.2 CSF: Parkinson vs. kontroly

**Tabulka 18: Výběr výsledků pro CSF Parkinson vs. kontroly**

miRNA	průměr PARKINSON	průměr KONTROLY	mean difference	fold-change final (PARKINSON vs. KONTROLY)	p-hodnota
hsa-miR-148b-3p	2,30	3,09	-0,79	<b>1,73</b>	0,16

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

Nepodařilo se najít významný rozdíl mezi skupinami Parkinson a kontroly. V Tabulce 18 je uvedena miR-148-3p, která vykazuje rozdíl více než 1,5x, ale s velmi nízkou spolehlivostí výsledku.

### 7.1.3.3 CSF: Pacienti (DEM + Parkinson) vs. kontroly

**Tabulka 19: Výběr výsledků pro CSF pacienti (DEM+Parkinson) vs. kontroly**

miRNA	průměr PACIENTI	průměr KONTROLY	mean difference	fold-change final (PACIENTI vs. KONTROLY)	p-hodnota
hsa-miR-125b-5p	1,66	2,29	-0,63	<b>1,55</b>	p> 0,05
hsa-miR-224-5p	-8,85	-8,68	-0,17	<b>1,12</b>	<b>0,045*</b>
hsa-miR-122-5p	4,28	3,87	0,40	<b>-1,32</b>	<b>0,045*</b>

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

down-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

\* p-hodnota <0,05

V Tabulce 19 jsou uvedeny miRNA cíle doporučené pro další výběr pro validační studii. Nejlepším výsledkem je co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnota.

#### 7.1.3.4 CSF: DEM vs. Parkinson

**Tabulka 20: Výběr výsledků pro CSF DEM vs. Parkinson**

miRNA	průměr PARKINSON	průměr DEM	mean difference	fold-change final (PARKINSON vs. DEMENCE)	p-hodnota
hsa-miR-409-3p	1,78	3,09	-1,31	<b>2,47</b>	p>0,05
hsa-miR-487b-3p	3,62	4,67	-1,05	<b>2,07</b>	p>0,05
hsa-miR-148b-3p	2,30	3,23	-0,94	<b>1,91</b>	p>0,05
hsa-miR-425-3p	3,74	4,32	-0,59	<b>1,50</b>	p>0,05
hsa-miR-320c	3,04	1,96	1,08	<b>-2,11</b>	p>0,05
hsa-miR-125b-5p	2,22	1,09	1,12	<b>-2,18</b>	p>0,05

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

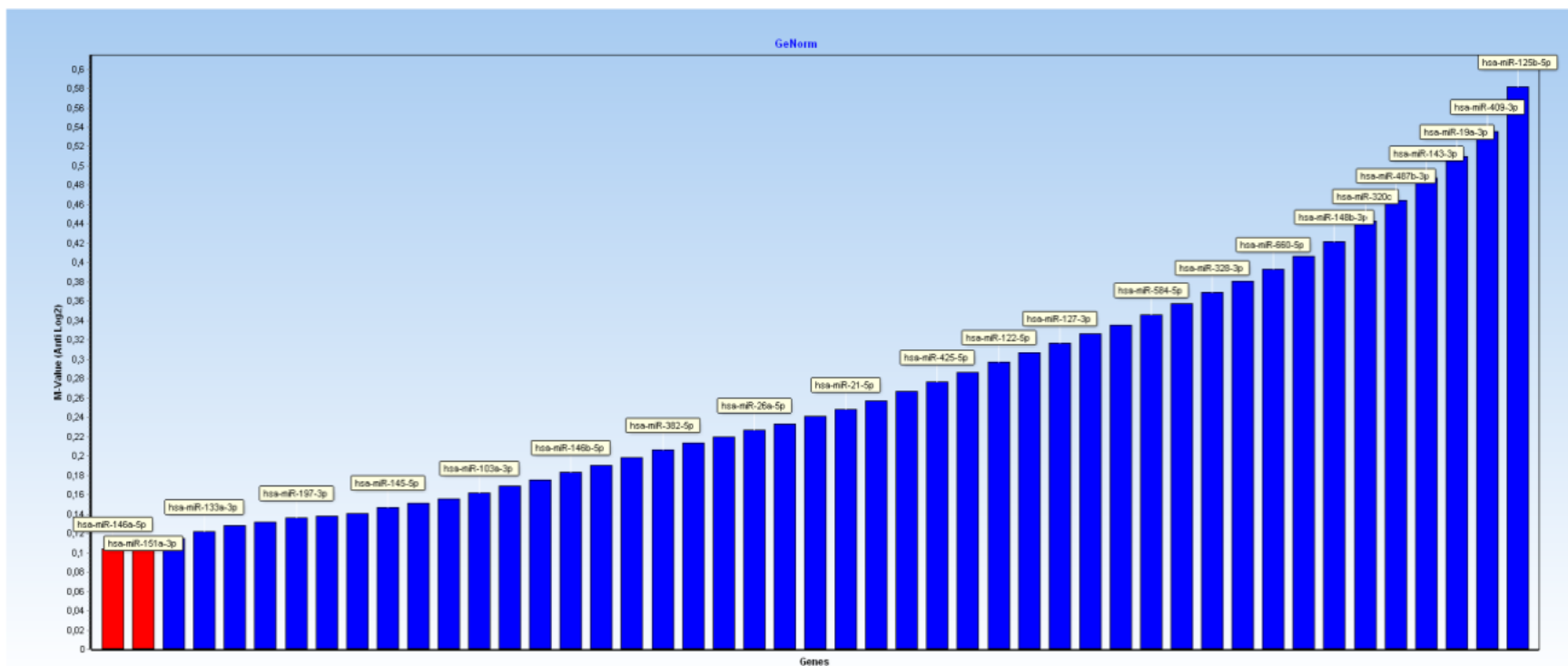
down-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

\* p-hodnota <0,05

V Tabulce 20 jsou uvedeny miRNA cíle doporučené pro další výběr pro validační studii. Nejlepším výsledkem je co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnota. Výsledky neobsahují žádné statisticky významné výsledky, zejména z důvodu srovnání velmi málo vzorků (3+3).

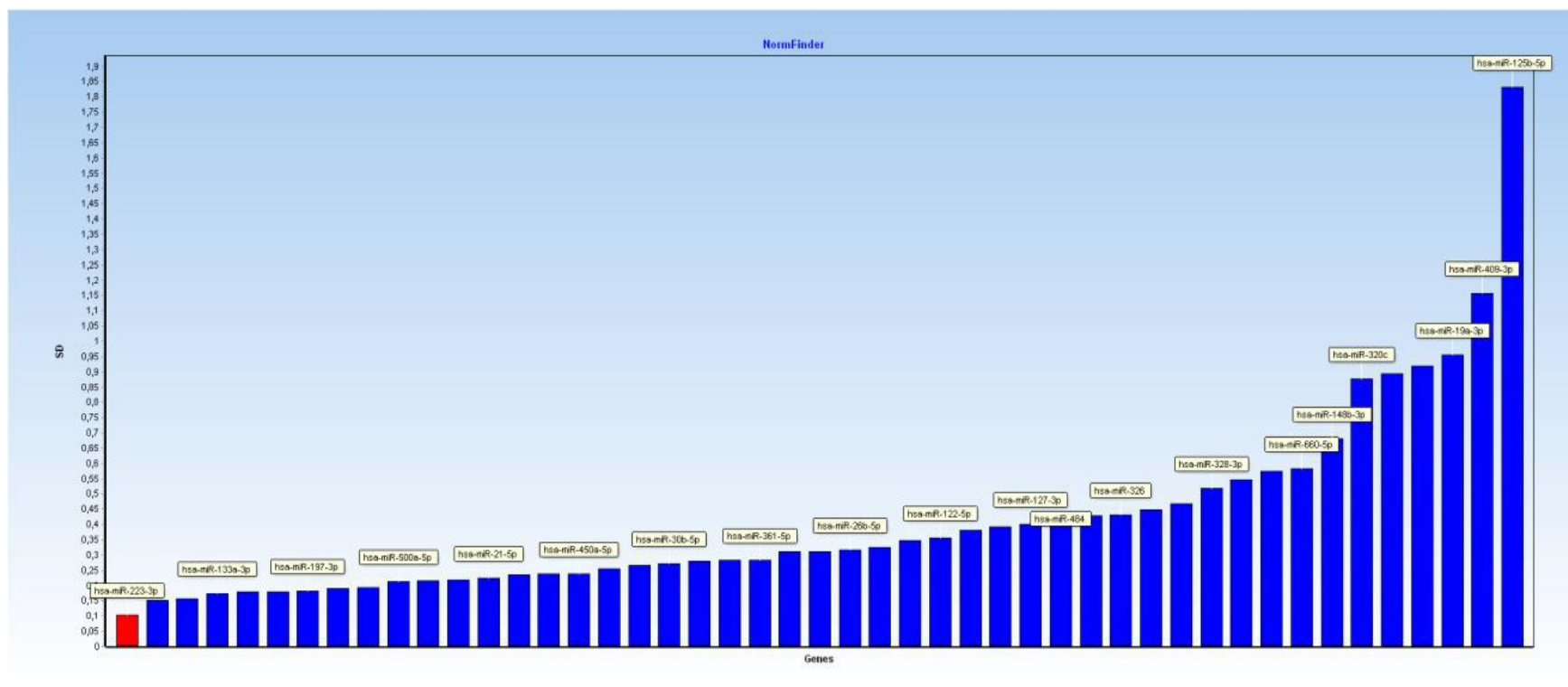
### 7.1.3.5 Endogenní kontroly – CSF

Pro výběr endogenní kontroly z naměřených dat byly opět využity nástroje GeNorm a Normfinder.



**Graf 3: GeNorm histogram pro endogenní kontroly (CSF) - skupina A**

Grafu 3 vyjadřuje četnost M hodnoty (M-value AntiLog2-pro analýzu byly použity Cq hodnoty) pro jednotlivé miRNA. Červeně jsou znázorněny miRNA s nejnižší M hodnotou – nejvhodnější endogenní kontroly.



**Graf 4: Normfinder histogram pro endogenní kontroly (CSF) - skupina A**

Výše vyobrazený Graf 4 vyjadřuje četnost SD pro jednotlivé miRNA. Červeně jsou znázorněny miRNA s nejnižší SD – nejvhodnější endogenní kontroly.



**Tabulka 21: Výběr nejvhodnějších endogenních miRNA pro normalizaci vzorků CSF**

Gene Name	Pořadí GeNorm	Pařadí NormF	Součet pořadí
hsa-miR-151a-3p	2	2	4
hsa-miR-223-3p	3	2	5
hsa-miR-133a-3p	4	4	8
hsa-miR-146a-5p	1	8	9
hsa-miR-625-5p	5	6	11
hsa-miR-224-5p	9	3	12
hsa-miR-197-3p	7	7	14
hsa-miR-28-3p	6	9	15
hsa-miR-500a-5p	8	10	18
hsa-miR-15b-5p	15	5	20

Celkem bylo pro matrici CSF po základním zpracování dat analyzováno 47 miRNA cílů. Pořadová čísla z aplikací GeNorm a Normfinder byla sečtena, přičemž v Tabulce 21 je uvedeno 10 miRNA cílů s nejnižším součtem pořadí – potenciálně nejvhodnější endogenní kontroly. Pro další výběr pro validační studii je doporučeno přihlédnout zejména ke koncentraci dané miRNA ve studované matrici.

#### **7.1.4 Shrnutí výsledků skupiny A**

Byla provedena izolace biologických vzorků s následným stanovením čistoty a koncentrace RNA. Byl proveden screening miRNA 24 vzorků pomocí miRNA Biofluid Knowledge Panelu 192 cílů. Podařilo se vyhodnotit a vybrat relevantní miRNA pro následné měření klinického souboru vzorků pro jednotlivé matrice (sérum, likvor). Bylo provedena analýza stanovených miRNA pro využití daného cíle jako endogenní kontroly. Všechny analyzované miRNA byla seřazeny dle vhodnosti pro normalizaci klinického souboru vzorků pro jednotlivé matrice (sérum, likvor). Pro každou matrici bylo navrženo 5 endogenních kontrol (v tabulkách zeleně označené).

## 7.2 Výsledky skupiny B

### 7.2.1 Hodnocení biologických matric a kvality izolace u skupiny B

Před zahájením analýzy metodou RT-qPCR bylo provedeno měření celkové koncentrace (total RNA) a čistota RNA izolovaná z dodaných vzorků na přístroji NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific).

#### Koncentrace RNA

Pro výpočet koncentrace se vychází z následujících vztahů: Při vlnové délce 260 nm je absorbance roztoku rovna 1, pokud je v měřeném roztoku RNA o koncentraci 40 $\mu$ g/ml.

**Tabulka 22: Analýza kvality izolace pro skupinu B**

označení	eluční objem	Koncentrace ng/ $\mu$ l	zdroj	etiologie
2/S1-S3	30 ul	120,2	sérum	1 (ATS)
5/S1-S3	30 ul	181,7	sérum	1 (ATS)
6/S1-S3	30 ul	117,1	sérum	1 (ATS)
8/S1-S3	30 ul	119,1	sérum	1 (ATS)
9/S1-S3	30 ul	82,7	sérum	1 (ATS)
11/S1-S3	30 ul	114,6	sérum	1 (ATS)
12/S1-S3	30 ul	73,6	sérum	2 (DEM+ATS)
23/ S1-S3	30 ul	82,0	sérum	2 (DEM+ATS)
27/ S1-S3	30 ul	101,6	sérum	2 (DEM+ATS)
28/ S1-S3	30 ul	111,9	sérum	2 (DEM+ATS)
29/ S1-S3	30 ul	45,1	sérum	2 (DEM+ATS)
30/ S1-S3	30 ul	43,0	sérum	2 (DEM+ATS)
1/S1-S3	30 ul	101,1	sérum	3 (DEM)
13/S1-S3	30 ul	115,5	sérum	3 (DEM)
14/S1-S3	30 ul	105,2	sérum	3 (DEM)
17/S1-S3	30 ul	74,2	sérum	3 (DEM)
18/S1-S3	30 ul	87,2	sérum	3 (DEM)
25/ S1-S3	30 ul	100,4	sérum	3 (DEM)

15/S1-S3	30 ul	85,3	sérum	4 (KONTROLY)
19/ S1-S3	30 ul	76,4	sérum	4 (KONTROLY)
20/ S1-S3	30 ul	95,4	sérum	4 (KONTROLY)
21/ S1-S3	30 ul	124,1	sérum	4 (KONTROLY)
22/ S1-S3	30 ul	118,4	sérum	4 (KONTROLY)
26/ S1-S3	30 ul	134,5	sérum	4 (KONTROLY)

V Tabulce 22 jsou uvedeny spektrofotometricky určené hodnoty koncentrace RNA izolované ze vzorků sér. Pro výslednou koncentraci miRNA jsou údaje orientační.

## 7.2.2 miRNA screening

### 7.2.2.1 ATS vs. kontrolní skupina

Tabulka 23: Výběr výsledků pro sérum ATS vs. kontrolní skupina

miRNA	průměr ATS	průměr KONTROLY	mean difference	fold-change final (ATS vs. KONTROLY)	p-hodnota
hsa-let-7e-5p	-4,7	-1,7	-3,0	7,9	0,045*
hsa-miR-28-5p	-2,6	-0,8	-1,8	3,4	0,07
hsa-miR-382-5p	0,4	1,9	-1,5	2,8	0,02*
hsa-miR-200c-3p	1,9	1,1	0,8	-1,8	0,07
hsa-miR-185-5p	1,5	0,5	1,0	-2,0	0,08
hsa-miR-140-5p	0,2	-1,0	1,2	-2,3	0,07
hsa-miR-30e-5p	-0,8	-2,0	1,2	-2,3	0,08
hsa-miR-301a-3p	1,1	-0,2	1,2	-2,3	0,01*
hsa-miR-29b-3p	-1,1	-2,4	1,3	-2,4	0,09
hsa-miR-143-3p	-0,5	-1,8	1,3	-2,5	0,02*
hsa-miR-20a-5p	-2,9	-4,2	1,3	-2,5	0,01*
hsa-miR-323a-3p	0,5	-0,9	1,4	-2,7	0,09
hsa-miR-223-3p	-7,0	-8,5	1,5	-2,8	0,03*
hsa-miR-122-5p	0,5	-1,0	1,5	-2,8	0,04*
hsa-miR-17-5p	-3,6	-5,1	1,5	-2,8	0,045*
hsa-miR-582-5p	4,1	2,5	1,6	-3,0	0,08
hsa-miR-20b-5p	0,7	-1,0	1,7	-3,2	0,02*
hsa-miR-106a-5p	-1,9	-3,7	1,7	-3,3	0,01*

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

down-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

\* p-hodnota <0,05

V Tabulce 23 jsou uvedeny miRNA cíle doporučené pro další výběr pro validační studii. Nejlepším výsledkem je co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-value.

## 7.2.2.2 DEM vs. kontrolní skupina

**Tabulka 24: Výběr výsledků pro sérum DEM vs. kontrolní skupina**

miRNA	průměr DEM	průměr KONTROLY	mean difference	fold-change final (DEM vs. KONTROLY)	p-hodnota
hsa-miR-1202	0,1	2,0	-1,88	<b>3,7</b>	0,17
hsa-miR-188-5p	1,5	2,9	-1,42	<b>2,7</b>	0,13
hsa-miR-410-3p	2,3	3,6	-1,35	<b>2,5</b>	0,13
hsa-miR-885-5p	0,4	1,7	-1,33	<b>2,5</b>	0,09
hsa-miR-192-5p	0,2	1,5	-1,28	<b>2,4</b>	<b>0,01*</b>
hsa-miR-376c-3p	1,0	2,3	-1,21	<b>2,3</b>	0,07
hsa-miR-222-3p	-0,7	0,2	-0,91	<b>1,9</b>	0,07
hsa-miR-335-5p	-1,5	-0,6	-0,86	<b>1,8</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-15a-5p	-6,4	-5,5	-0,82	<b>1,8</b>	<b>0,01*</b>
hsa-miR-23a-3p	-4,7	-3,9	-0,79	<b>1,7</b>	0,07
hsa-miR-146a-5p	-2,6	-1,8	-0,78	<b>1,7</b>	0,07
hsa-miR-425-5p	-2,4	-1,7	-0,71	<b>1,6</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-30d-5p	-4,0	-3,3	-0,70	<b>1,6</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-1260a	-1,8	-1,1	-0,69	<b>1,6</b>	<b>0,03*</b>
hsa-miR-19b-3p	-7,4	-6,7	-0,65	<b>1,6</b>	<b>0,02*</b>
hsa-miR-499a-5p	3,3	3,2	0,13	-1,1	<b>0,03*</b>
hsa-miR-1-3p	1,5	1,1	0,39	-1,3	<b>0,045*</b>
hsa-miR-602	1,3	0,0	1,27	<b>-2,4</b>	<b>0,04*</b>
hsa-miR-425-3p	0,6	-0,7	1,30	<b>-2,5</b>	<b>0,045*</b>
hsa-miR-200c-3p	2,9	1,1	1,76	<b>-3,4</b>	<b>0,045*</b>
hsa-miR-27a-3p	-1,4	-3,5	2,04	<b>-4,1</b>	0,07
hsa-let-7d-5p	2,6	0,6	2,05	<b>-4,1</b>	0,17
hsa-miR-93-5p	1,5	-0,8	2,27	<b>-4,8</b>	0,07
hsa-miR-151a-3p	0,1	-2,7	2,77	<b>-6,8</b>	<b>0,01*</b>
hsa-miR-539-5p	3,3	0,3	3,00	<b>-8,0</b>	<b>0,02*</b>
hsa-miR-328-3p	1,6	-1,8	3,41	<b>-10,6</b>	0,17
hsa-let-7e-5p	1,9	-1,8	3,63	<b>-12,4</b>	<b>0,045*</b>
hsa-miR-373-3p	2,6	-1,7	4,28	<b>-19,5</b>	0,13

hsa-miR-298	0,6	-4,8	5,32	<b>-40,1</b>	0,08
hsa-miR-504-5p	2,2	-3,7	5,88	<b>-58,7</b>	<b>0,01*</b>

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

down-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

\* p-hodnota <0,05

V Tabulce 24 jsou uvedeny miRNA cíle doporučené pro další výběr pro validační studii. Nejlepším výsledkem je co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnota.

### 7.2.2.3 Pacienti (ATS+DEM) vs. kontrolní skupina

**Tabulka 25: Výběr výsledků pro sérum pacienti (ATS+DEM) vs. kontrolní skupina**

miRNA	průměr ATS+DEM	průměr KONTROLY	mean difference	fold-change final (ATS+DEM vs. KONTROLY)	p-hodnota
hsa-miR-345-5p	-0,5	1,2	-1,67	<b>3,2</b>	0,06
hsa-miR-765	1,9	3,4	-1,55	<b>2,9</b>	0,06
hsa-miR-29c-3p	-3,2	-1,8	-1,37	<b>2,6</b>	<b>0,01*</b>
hsa-miR-22-5p	0,6	1,9	-1,26	<b>2,4</b>	<b>0,01*</b>
hsa-miR-424-5p	-0,4	0,7	-1,15	<b>2,2</b>	0,08
hsa-miR-185-5p	-0,5	0,6	-1,07	<b>2,1</b>	0,08
hsa-miR-145-5p	-0,1	0,6	-0,71	<b>1,6</b>	0,07
hsa-miR-223-5p	1,6	0,9	0,73	<b>-1,7</b>	0,09
hsa-miR-34b-3p	3,5	2,8	0,76	<b>-1,7</b>	0,09
hsa-miR-330-3p	2,3	1,4	0,92	<b>-1,9</b>	0,08
hsa-miR-1271-5p	3,2	2,1	1,08	<b>-2,1</b>	0,12
hsa-miR-373-3p	0,4	-1,5	1,94	<b>-3,8</b>	0,24
hsa-miR-574-3p	-1,8	-3,8	1,99	<b>-4,0</b>	0,23
hsa-miR-93-5p	1,9	-0,7	2,53	<b>-5,8</b>	0,12
hsa-miR-151a-3p	0,6	-2,6	3,12	<b>-8,7</b>	<b>0,01*</b>

up-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

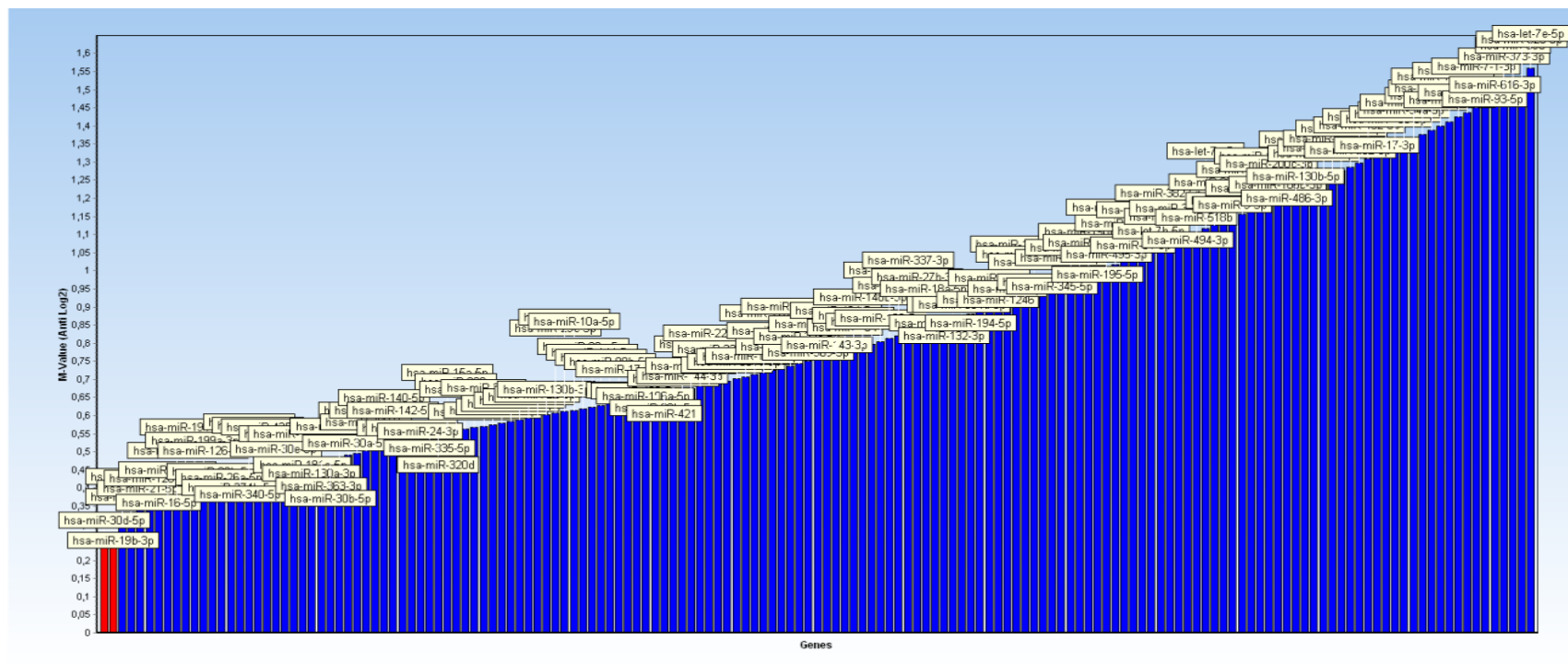
down-regulace u pacientů s demencí (více než 1,5x)

\* p-hodnota <0,05

V Tabulce 24 jsou uvedeny miRNA cíle doporučené pro další výběr pro validační studii. Nejlepším výsledkem je co nejvýraznější fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnota.

### 7.2.2.4 Endogenní kontroly

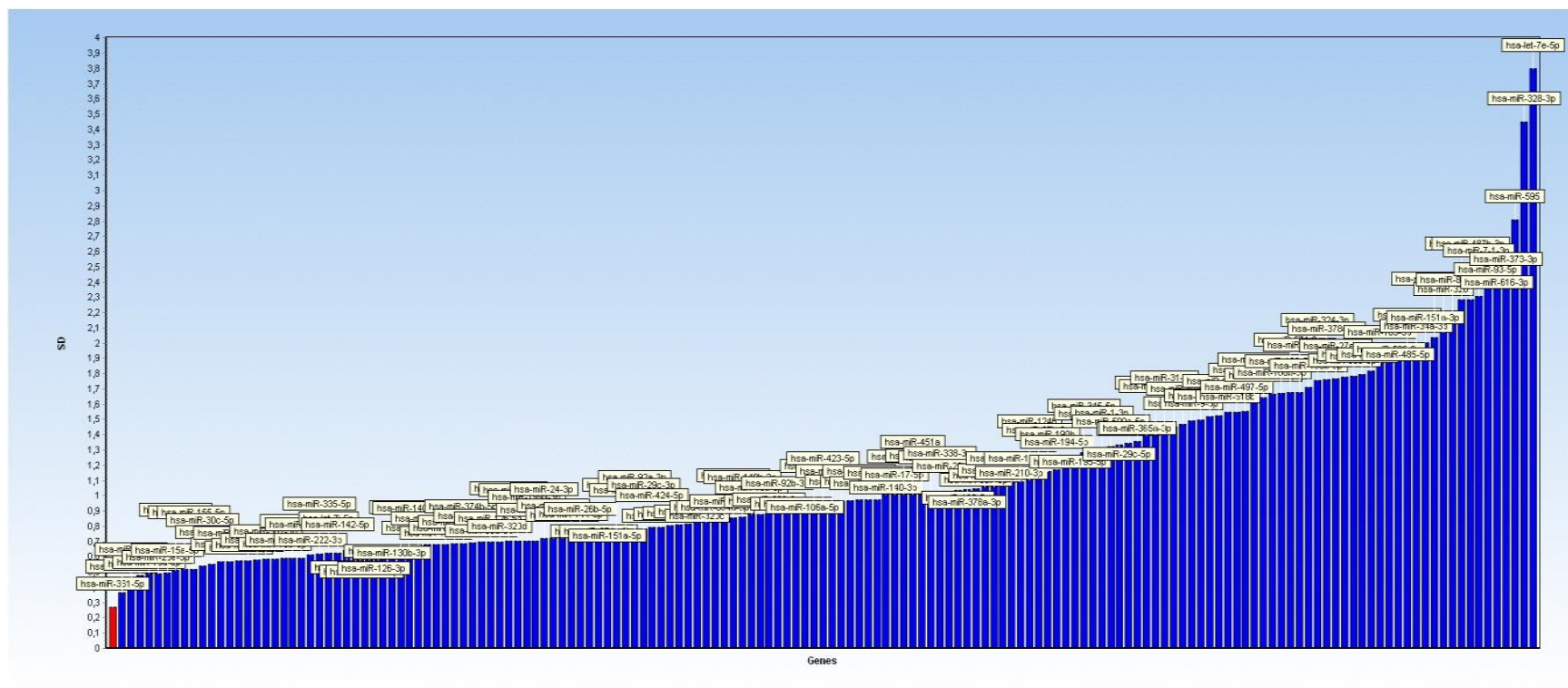
Pro výběr endogenní kontroly z naměřených dat byly využity nástroje GeNorm a Normfinder.



**Graf 5: GeNorm histogram pro endogenní kontroly - skupina B**

Výše zobrazený Graf 5 vyjadřuje četnost M hodnoty (M-value AntiLog2 – pro analýzu byly použity Cq hodnoty) pro jednotlivé miRNA. Červeně jsou znázorněny miRNA s nejnižší M hodnotou – nejvhodnější endogenní kontroly.





**Graf 6: Normfinder histogram pro endogenní kontroly - skupina B**

Výše uvedený Graf 6 vyjadřuje četnost SD pro jednotlivé miRNA. Červeně jsou znázorněny miRNA s nejnižší SD – nejvhodnější endogenní kontroly.

**Tabulka 26: Výběr nejvhodnějších endogenních miRNA pro normalizaci vzorků sér**

Gene Name	pořadí GeNorm	pořadí NormF	součet pořadí
hsa-miR-21-5p	4	15	19
hsa-miR-15b-5p	3	19	22
hsa-let-7i-5p	2	25	27
hsa-miR-30d-5p	1	28	29
hsa-miR-340-5p	15	14	29
hsa-miR-423-3p	29	2	31
hsa-miR-361-5p	30	1	31
hsa-miR-26a-5p	13	22	35
hsa-miR-363-3p	24	16	40
hsa-miR-23a-3p	34	6	40

Celkem bylo pro výběr endogenní kontroly pro matrici sérum analyzováno 159 miRNA cílů. Pořadová čísla z aplikací GeNorm a Normfinder byla sečtena, přičemž v tabulce 26 je uvedeno 10 miRNA cílů s nejnižším součtem pořadí – potenciálně nejvhodnější endogenní kontroly. Pro další výběr pro validační studii je doporučeno přihlídnout zejména ke koncentraci dané miRNA ve studované matrici.

### **7.2.3 Shrnutí výsledků skupiny B**

Byla provedena izolace biologických vzorků s následným stanovením čistoty a koncentrace RNA. Jako vstupní materiál byl použit 1 ml séra, čímž bylo dosaženo vyšších výtěžků RNA ve finálním izolátu. Použitím automatického izolátoru byl zajištěn standardizovaný postup přípravy vzorku. Byl proveden screening miRNA 24 vzorků pomocí miRNA Knowledge Panelu 384 cílů. Podařilo se vyhodnotit a vybrat relevantní miRNA pro následné měření klinického souboru vzorků pro matrici sérum. Byla provedena analýza stanovených miRNA pro využití daného cíle jako endogenní kontroly. Všechny analyzované miRNA byla seřazeny dle vhodnosti pro normalizaci klinického souboru vzorků. Bylo navrženo 5 endogenních kontrol (v tabulce výše zeleně označené).

### 7.3 Porovnání exprese miRNA v séru a likvoru

V rámci skupiny A byly porovnávány 2 biologické materiály (sérum a likvor). Bylo zjištěno, že miRNA analýza v likvoru nevedla k výběru relevantních miRNA, jelikož nebylo mnoho statisticky významných miRNA, které by umožňovaly rozlišit diagnostické skupiny mezi sebou. Tudíž ze studie vyplývá, že vhodnějším materiálem pro validační studii je sérum, nikoliv likvor.

### 7.4 Závěrečné vyhodnocení obou primárních screeningu pro identifikaci potenciálních miRNA cílů

Na základě primárního screeningu byly pro validační studii vybrány miRNA cíle s nejvýraznějším fold-change a zároveň co nejnižší p-hodnotou. Jednalo se o tyto miRNA cíle:

- ze skupiny A: **hsa-miR-23a-3p-TT-PRI, hsa-miR-30b-5p-TT-PRI, hsa-miR-142a-5p-TT-PRI, hsa-miR-146a-5p-TT-PRI, hsa-miR-29c-3p-TT-PRI, hsa-miR-151a-3p-TT-PRI.**
- ze skupiny B: **hsa-miR-17-5p-TT-PRI, hsa-miR-20a-5p-TT-PRI, hsa-miR-22-5p-TT-PRI, hsa-miR-23a-3p-TT-PRI, hsa-miR-29c-3p-TT-PRI, hsa-miR-30b-5p-TT-PRI, hsa-miR-106a-5p-TT-PRI, hsa-miR-122-5p-TT-PRI, hsa-miR-142-5p-TT-PRI, hsa-miR-146a-5p-TT-PRI, hsa-miR-151a-3p-TT-PRI, hsa-miR-223-3p-TT-PRI.**

Na základě srovnání obou prvotních expresních profilů bylo nalezeno 6 miRNA cílů společných pro obě skupiny. Výše zvýrazněné miRNA cíle lze použít pro odlišení pacientů s demencí a zdravých kontrol.

## 8. Diskuse

Od objevení miRNA uplynulo již spousta let, zájem o studium miRNA nadále roste a v poslední době dochází k velkým pokrokům.

V mé diplomové práci jsem se zaměřila na studium miRNA ve spojení s demencí a aterosklerózou. Byly identifikovány miRNA cíle k odlišení několika diagnostických skupin - pacienti byli rozděleni do skupiny A a B. Bylo zjištěno, že některé z vybraných miRNA jsou vysoce exprimovány jak u pacientů s aterosklerózou, tak u pacientů s demencí.

V rámci naší práce u skupiny A byly porovnávány 2 biologické materiály (sérum a likvor). Bylo zjištěno, že miRNA analýza v likvoru nevedla k výběru relevantních miRNA, jelikož nebylo mnoho statisticky významných miRNA, které by umožňovaly rozlišit diagnostické skupiny mezi sebou. Tudíž ze studie vyplývá, že vhodnějším materiálem pro validační studii je sérum, nikoliv likvor.

Z výsledků naší studie např. vyplývá, že hsa-miR-23a-3p-TT-PRI byla upregulována u pacientů s demencí. Dle studie Sabirzhanov B. et al. bylo prokázáno, že snížené hladiny miR-23a-3p mohou odrážet poškození neuronální DNA v reakci na oxidační stres. Dále bylo prokázáno, že tato miRNA přispívá k posttraumatickému úbytku neuronů. [51]

Studie Brennan S. et al. zjistila, že hsa-miR-30b-5p-TT-PRI je rozdílně exprimovaná u jednotlivých neurodegenerativních onemocnění (ND). Tato miRNA byla velmi často downregulována v séru nebo plazmě u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou (ALS), Parkinsonovou nemocí (PD) a Alzheimerovou chorobou (AD), avšak u pacientů s roztroušenou sklerózou (RS) byla upregulována.[52] V našich výsledcích miR-30b-5p-TT-PRI nebyla rozdílně exprimována u pacientů s demencí a Parkinsonovou chorobou. Dále studie uvádí, že tato miRNA je první, která sjednocuje všechny 4 neurodegenerativní onemocnění (PD, AD, RS a ALS) a mohla by být možným biomarkerem. Také bylo prokázáno, že koreluje s neurofibrilárními klubky v mozkomíšním moku u pacientů s AD a PD. [52] Studie Zhang H. et al. odhalila, že miR-30b-5p cílí na lehké řetězce neurofilament a předpokládá se, že tato miRNA má neuroprotektivní účinky po traumatickém poranění mozku.[53]

Studie Sierksma A. et al. [54], studie Wu Yuquan et al. [55] a studie Brennan S. et al. [52] se zabývají výzkumem AD a demence. Zatímco studie Sierksma uvádí, že miR-146a-5p je upregulována u pacientů s AD a demencí, což je v případě AD potvrzeno i studií Wu Yuquan, tak studie Brennan říká, že hsa-miR-146a je downregulována u pacientů s AD. Z našich výsledků vyplývá, že tato miRNA je upregulována pouze u pacientů s demencí, což odpovídá výsledkům studie Sierksma. Dále se studie Sierksma zabývala i miR-142a-5p, která byla u pacientů s AD upregulována, zatímco v naší studii byla tato miRNA downregulována jak u pacientů s demencí, tak s PD. Studie Sierksma byla prováděna na myších, proto mohou být naše výsledky odlišné. Liší se také výsledky studie Brennan a Sierksma, jelikož jeden zkoumal miR-146a-5p a druhý pouze hsa-miR-146a.[52], [54], [55]

Dále ve studii Wu Yuquan et al. bylo prokázáno, že miR-29c-3p se může podílet na vzniku a rozvoji Alzheimerovy choroby. Dle studie miR-29c-3p byla u pacientů s AD nižší než u zdravých kontrol. V našich výsledcích byla miR-29c-3p upregulována jak u demence, tak aterosklerózy. Tyto miRNA (miR-146a-5p a hsa-miR-29c-3p-TT-PRI) v séru můžou sloužit jako kandidáti neinvazivní biomarkery AD a v budoucnu mohou být užitečné pro diagnostiku a léčbu AD. [55]

Dle našeho výzkumu byly molekuly hsa-miR-17-5p-TT-PRI u pacientů s aterosklerózou sníženy při porovnání se zdravými kontrolami, avšak dle studie Telkoparan-Akillilar P. et al., ve které byly hladiny exprese miRNA měřeny metodou RT-PCR, miR-17 byly významně zvýšeny u pacientů s aterosklerózou při porovnání s kontrolami. [56] Stejně tak studie Karere G.M. et al. [57] uvádí, že miR-17-5p, ale také miR-146a-5p, jsou upregulovány v lézích s tukovými proužky a fibrózními pláty. Tyto miRNA jsou základem iniciace a progresu časně aterosklerózy, což bylo jasně potvrzeno i studií Tan L. et al..[58] Kromě toho bylo zjištěno studií Huang S. et al. [59], že miR-17-5p je cirkulujícím biomarkerem koronární aterosklerózy.

Dále studie Huang S. et al. ukázala, že miR-146a-5p snižuje zánět v endotelových buňkách a redukuje aterosklerózu u myší.[59] V naší práci je hsa-miR-146a-5p-TT-PRI upregulována, ale u pacientů s demencí.

Studie Guo J. et al. pomocí myší a lidských buněk objevila novou miRNA miR-23a-3p spojenou s ATS. miR-23a-3p byla v obou modelech downregulována, což bylo potvrzeno pomocí qPCR. [60] V naší diplomové práci byla tato miRNA zvýšena pouze u pacientů s demencí.

Další zkoumanou miRNA, která souvisí s aterosklerózou, je miR-223-3p, která byla u pacientů s aterosklerózou v naší práci downregulována. Studie You D. et al. uvádí, že miR-223-3p je spojena s vyšší celkovou mírou přežití, což naznačuje, že miR-223-3p by mohla být vynikajícím diagnostickým markerem pro aterosklerózu. Hladina exprese miR-223-3p byla zvýšena jak v karotických tepnách, tak v séru pacientů s aterosklerózou. Avšak bylo zjištěno, že hladina exprese miR-223-3p v nestabilním plátu je snižená při porovnání se stabilním plátem, což naznačuje, že miR-223-3p má hodnotu, kterou je třeba dále zkoumat. Obecně lze ze studie říci, že miR-223-3p zabraňuje rozvoji ATS.[61] [61]

Další miRNA, která je spojována v naší diplomové práci jak s neurodegenerativní chorobou, tak aterosklerózou, je miR-151a-3p-TT-PRI. Tato miRNA je downregulována jak u aterosklerózy, tak u demence. Dle studie Wang H. et al. bylo zjištěno, že tato miRNA miR-151-3p vykazuje vysokou senzitivitu a specificitu pro diagnostiku intrakraniálního aneuryzmatu. [62][62]

Poslední miRNA, kterou zdiskutujeme v mé diplomové práci, je hsa-miR-22-5p-TT-PRI, pojí se jak s aterosklerózou, tak demencí, a její hodnoty jsou upregulovány. Bylo zjištěno, že tato cirkulující miRNA může sloužit jako nový slibný diagnostický biomarker pro časnou diagnostiku AIM dle studie Li H. et al.. [63]

Přestože v literatuře existuje mnoho informací o cirkulujících miRNA, stále je zapotřebí vědeckého zkoumání a zjišťování více spojitostí s neurodegenerativními onemocněními a aterosklerózou. Bylo by vhodné do budoucna více prozkoumat některé specifické miRNA, které již nyní ukazují potenciál v diagnostice u uvedených pacientů.

## 9. Závěr

Diplomová práce cituje širokou škálu publikací zabývajících se miRNA ve spojitosti s aterosklerózou a demencí. Hlavním cílem diplomové práce byla identifikace potenciálních miRNA cílů pro diferenciální diagnostiku pacientů s aterosklerózou a demencí. Diagnostika miRNA je v dnešní době hojně studovaná, ale ještě není součástí běžné rutinní praxe.

Pomocí TT-qPCR byla sledována exprese jednotlivých miRNA a byly vybrány ty nejvhodnější miRNA pro validační studii. Porovnávány byly vzorky jak zdravých jedinců, tak vzorky patologické od pacientů, kteří trpěli demencí a/nebo aterosklerózou. Porovnávány byly také miRNA ve vzorcích séra se vzorky mozkomíšního moku, přičemž bylo zjištěno, že sérum je daleko vhodnější materiál pro analýzu.

U pacientů s aterosklerózou i demencí byly statisticky významně upregulovány nebo downregulovány tyto miRNA: hsa-miR-29c-3p-TT-PRI, hsa-miR-22-5p-TT-PRI a hsa-miR-151a-3p-TT-PRI, které by bylo vhodné do budoucna dále více prozkoumat.

U pacientů pouze s aterosklerózou byly ovlivněny tyto miRNA: hsa-miR-20a-5p-TT-PRI, hsa-miR-17-5p-TT-PRI, hsa-miR-106a-5p-TT-PRI, hsa-miR-122-5p-TT-PRI, hsa-miR-223-3p-TT-PRI.

V případě demence je důležité sledovat miRNA, které v našem výzkumu vyšly statisticky významně, a to: hsa-miR-23a-3p-TT-PRI, hsa-miR-30b-5p-TT-PRI, hsa-miR-142a-5p-TT-PRI, hsa-miR-146a-5p-TT-PRI, hsa-miR-29c-3p-TT-PRI, hsa-miR-151a-3p-TT-PRI.

Vzhledem k často rozdílným výsledkům našeho šetření a studií jiných pracovišť by bylo vhodné se zaměřit na prozkoumání různých kombinací miRNA z důvodu poskytnutí komplexnějších informací o patologických stavech a hledat také další spojitosti mezi miRNA a onemocněními. Je patrné, že miRNA představují velký krok k včasné diagnostice těchto onemocnění. Výsledky této diplomové práce by mohly sloužit jako počáteční bod pro budoucí výzkum a vývoj v oblasti diagnostiky aterosklerózy a demence.

## 10. Použité zkratky

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
AD	alzheimer's disease (Alzheimerova nemoc)
AIM	akutní infarkt myokardu
ALS	amyotrofická laterální skleróza
APOE4	apolipoprotein E4
ATS	ateroskleróza
BMI	body mass index
<i>C. Elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	complementary DNA (komplementární DNA k RNA)
CMP	cévní mozková příhoda
CRP	C-reactive protein (C reaktivní protein)
CSF	cerebrospinal fluid (likvor)
Ct	cycle of treshold (cyklus prahu)
DEM	demence
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DLB	Lewy-s Bodies Demention (demence s Lewyho tělísky)
EC	endothelial cells (endotelové buňky)
HDL	high density lipoprotein (lipoprotein s vysokou hustotou)
IC	interní kontrola
LDL	low density lipoprotein (lipoproteiny s nízkou hustotou)
LNA	locked nukleic acid (uzamčená nukleová kyselina)
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1(monocytární chemotaktický protein 1)
MPO	myeloperoxidáza
miRNA	microRNA
miRISC	miRNA indukovaný tlumící komplex
mRNA	messenger RNA (mediátorová ribonukleová kyselina)
ND	neurodegenerativní onemocnění
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PCR MMX	PCR master mix
PD	Parkinson's disease (Parkinsonova nemoc)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (růstový faktor z destiček)
Primer F	forward primer
Primer R	reverse primer
qRT-PCR	kvantitativní real time PCR
RNA	ribonukleová kyselina
RS	roztroušená skleróza
RT	reverzní transkripce
RT MMX	RT master mix
RT-PCR	real time PCR (PCR v reálném čase)



S	sérum
SD	směrodatná odchylka
STEMI	akutní infarkt myokardu s ST elevacemi
TPM	traumatické poškození mozku
TT-qPCR	Two-Tailed polymerázová řetězová reakce
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (vaskulární adhezivní molekula 1)
VD	Vascular dementia (vaskulární demence)
VLDL	very low density lipoproteins (lipoprotein s velmi nízkou hustotou)

## 11. Seznam tabulek

Tabulka 1: Tradiční rizikové faktory aterosklerózy [26] .....	9
Tabulka 2: Vybrané nové rizikové faktory aterosklerózy [27].....	10
Tabulka 3: Přehled miRNA u aterosklerózy [7] .....	12
Tabulka 4: Onemocnění vyvolávající demenci [33].....	18
Tabulka 5: Vybrané podskupiny miRNA spojené s AD [40].....	22
Tabulka 6 Porovnání standardních technologií pro detekci miRNA [1] .....	30
Tabulka 7: Přehled pozitivních a negativních vzorků pacientů skupiny A .....	32
Tabulka 8: Seznam měřených vzorků pacientů skupiny B .....	33
Tabulka 9: Protokol pro přípravu RT MMX .....	38
Tabulka 10: Protokol pro vytvoření PCR MMX.....	41
Tabulka 11: Analýza kvality izolace pro skupinu A.....	45
Tabulka 12: Výběr výsledků pro sérum DEM vs. kontroly .....	46
Tabulka 13: Výběr výsledků pro sérum Parkinson vs. kontroly .....	47
Tabulka 14: Výběr výsledků pro sérum pacienti vs. kontroly .....	48
Tabulka 15: Výběr výsledků pro sérum DEM vs. Parkinson .....	49
Tabulka 16: Výběr nejvhodnějších endogenních miRNA pro normalizaci vzorků sér .....	53
Tabulka 17: Výběr výsledků pro CSF DEM vs. kontroly.....	53
Tabulka 18: Výběr výsledků pro CSF Parkinson vs. kontroly.....	54
Tabulka 19: Výběr výsledků pro CSF pacienti (DEM+Parkinson) vs. kontroly.....	54
Tabulka 20: Výběr výsledků pro CSF DEM vs. Parkinson .....	55
Tabulka 21: Výběr nejvhodnějších endogenních miRNA pro normalizaci vzorků CSF .....	58
Tabulka 22: Analýza kvality izolace pro skupinu B .....	59
Tabulka 23: Výběr výsledků pro sérum ATS vs. kontrolní skupina.....	61
Tabulka 24: Výběr výsledků pro sérum DEM vs. kontrolní skupina .....	62
Tabulka 25: Výběr výsledků pro sérum pacienti (ATS+DEM) vs. kontrolní skupina.....	64
Tabulka 26: Výběr nejvhodnějších endogenních miRNA pro normalizaci vzorků sér .....	67

## 12. Seznam obrázků

Obrázek 1: Biogeneze a funkce miRNA [4].....	5
Obrázek 2: Struktura stěny tepny [21].....	7
Obrázek 3 Vznik a progrese aterosklerózy [19] .....	8
Obrázek 4: Angioplastika [19] .....	12
Obrázek 5: Možné využití miRNA jako diagnostických či prognostických markerů aterosklerózy [31] .....	14
Obrázek 6 Znázornění detekce miRNA pomocí qRT-PCR s využitím stem-loop primeru a detekčního systému TaqMan. [5] .....	28
Obrázek 7: Znázornění qRT-PCR s využitím polyadenylace a detekce pomocí SYBR green [5] ..	29
Obrázek 8: TT-qPCR [47] .....	30
Obrázek 9: Naplnění přístroje iCatcher 12 a iCatcher Circulating cfRNA 1000 Kit. ....	35
Obrázek 10: PCR destička potažena optickou fólií.....	36
Obrázek 11: Program pro reverzní transkripci.....	37
Obrázek 12: Termocycler s PCR destičkou .....	39
Obrázek 13: Program pro amplifikaci a detekci ve formě grafického znázornění jednotlivých kroků, který byl 40x zopakován. ....	40
Obrázek 14: Výsledná křivka tání v programu Bio-Rad CFX Maestro .....	40

## 13. Seznam grafů

Graf 1: GeNorm histogram pro endogenní kontroly (sérum) - skupina A .....	51
Graf 2: Normfinder histogram pro endogenní kontroly (sérum) - skupina A .....	52
Graf 3: GeNorm histogram pro endogenní kontroly (CSF) - skupina A.....	56
Graf 4: Normfinder histogram pro endogenní kontroly (CSF) - skupina A.....	57
Graf 5: GeNorm histogram pro endogenní kontroly - skupina B .....	65
Graf 6: Normfinder histogram pro endogenní kontroly - skupina B.....	66

## 14. Použitá literatura

- [1] BARTOŠÍK, M. a L. JIRÁKOVÁ. Current Methods of microRNA Analysis. *Klinická onkologie* [online]. 2018, **31**(2), 93-101 [cit. 2024-02-07]. ISSN 0862495X. Dostupné z: doi:10.14735/amko20182S93
- [2] MicroRNA - What it is and How it Works. *The James The Ohio State University comprehensive cancer center* [online]. 2023 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: <https://cancer.osu.edu/microna>
- [3] DALMAY, T. *MicroRNA Detection and Target Identification*. Second edition. Humana Press, 2023. ISBN 9781071629826.
- [4] LAHOVÁ, V., Kizeka, K., ŠMERKOVÁ, M., VACULOVÍČOVÁ a R. KIZEKA. MiRNA: Od biogeneze po využití v lékařství. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* [online]. 2015, **2**(4), 54 [cit. 2024-02-28]. ISSN 2336-3940. Dostupné z: [https://web2.mendelu.cz/af\\_239\\_nanotech/J\\_Met\\_Nano/0114/mirna-biogeneze-lekarstvi.html](https://web2.mendelu.cz/af_239_nanotech/J_Met_Nano/0114/mirna-biogeneze-lekarstvi.html)
- [5] SLABÝ, O. a M. SVOBODA. *MikroRNA v onkologii*. Praha: Galén, 2012. ISBN 978-807-2625-871.
- [6] MORÁŇOVÁ, L. a M. BARTOŠÍK. Long Non-Coding RNAs – Current Methods of Detection and Clinical Applications. *Klinická Onkologie* [online]. 2019, **32**(3), 65-71 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: doi:10.14735/amko20193S65
- [7] NOVÁK J., MirkoRNA v kardiologii - přehled pro klinickou praxi. *Kardiologická Revue - Interní medicína* [online]. 2016, **18**(4), 258-267 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: <https://www.kardiologickarevue.cz/casopisy/kardiologicka-revue/2016-4/mikrorna-v-kardiologii-prehled-pro-klinickou-praxi-59908>
- [8] O'BRIEN, J. A., V. H. L. NGUYEN a Ch. PENG. Overview on miRNA classification, biogenesis, and functions. *MicroRNA in Human Malignancies* [online]. 2022, 3-20 [cit. 2024-02-07]. ISBN 9780128222874. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-822287-4.00027-X
- [9] NIELSEN, C. B., N. SHOMRON, R. SANDBERG, E. HORNSTEIN, J. KITZMAN a C. BURGE. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* [online]. 2007, **13**(11), 1894-1910 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: doi:10.1261/rna.768207

- [10] KOZOMARA, A., M. BIRGAOANU a S. GRIFFITHS-JONES. MiRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research* [online]. 2019, **47**(D1), D155-D162 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gky1141
- [11] SEMPERE, L. F. Celebrating 25 Years of MicroRNA Research: From Discovery to Clinical Application: From Discovery to Clinical Application. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(8), 1987 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20081987
- [12] VAN DER KOLK, J.H., A. PACHOLEWSKA a V. GERBER. The role of microRNAs in equine medicine: a review. *Veterinary Quarterly*[online]. 2015, **35**(2), 88-96 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: doi:10.1080/01652176.2015.1021186
- [13] NOVÁK, J. a M. SOUČEK. MikroRNA a vnitřní lékařství: od patofyziologie k novým diagnostickým a terapeutickým postupům. *Vnitřní lékařství* [online]. 2016, **62**(6), 477-485 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: <https://www.casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2016/06/11.pdf>
- [14] CHUROV, A., V. SUMMERHILL, A. GRECHKO, V. OREKHOVA a A. OREKHOV. MicroRNAs as Potential Biomarkers in Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(22), 5547 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20225547
- [15] MATSUYAMA, H. a H. I. SUZUKI. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(1), 132 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21010132
- [16] TUKA, V. *Preventivní kardiologie pro praxi*. NOL - nakladatelství odborné literatury, 2018. ISBN 978-809-0392-960.
- [17] ZATLOUKALOVÁ, A., M. ROUBEC, D. ŠKOLOUDÍK, P. AMBROZ, O. MACHACZKA, J. JANOUTOVÁ a V. JANOUT. Atherosclerosis and dementia. *Profese online* [online]. 2020, **13**(1), 17-21 [cit. 2024-02-28]. Dostupné z: doi:10.5507/pol.2020.007
- [18] NOVÁK, J. MikroRNA v kardiologii - přehled pro klinickou praxi. *Kardiologická Revue - Interní medicína* [online]. 2016, **18**(4), 258-267 [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: <https://www.kardiologickarevue.cz/casopisy/kardiologicka-revue/2016-4/mikrorna-v-kardiologii-prehled-pro-klinickou-praxi-59908>

- [19] Ateroskleróza. *NZIP-národní zdravotnický informační portál* [online]. [cit. 2024-02-07]. ISSN 2695-0340. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1527-ateroskleróza>
- [20] JEBARI-BENSLAIMAN, S., U. GALICIA-GARCÍA, A. LARREA-SEBAL, J. R. OLAETXEA, I. ALLOZA, K. VANDENBROECK, A. BENITO-VICENTE a C. MARTÍN. Pathophysiology of Atherosclerosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(6), 3346 [cit. 2024-02-28]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23063346
- [21] Tepny. *Národní zdravotnický informační portál* [online]. [cit. 2024-02-29]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/768>
- [22] MAČÁK, J., J. MAČÁKOVÁ a J. DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie. 2.*, doplněné vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3530-6.
- [23] GUTIERREZ, J., T. TURAN, B. HOH a M. CHIMOWITZ. Intracranial atherosclerotic stenosis: risk factors, diagnosis, and treatment. *The Lancet Neurology* [online]. 2022, **21**(4), 355-368 [cit. 2024-02-29]. Dostupné z: doi:10.1016/S1474-4422(21)00376-8
- [24] WHITWORTH, G. Atherosclerosis: Symptoms, Causes, Diagnosis and Treatment. *Healthline* [online]. 2023 [cit. 2024-02-29]. Dostupné z: <https://www.healthline.com/health/atherosclerosis#outlook>
- [25] TOHIROVA, J. a F. SHERNAZAROV. Atherosclerosis: causes, symptoms, diagnosis, treatment and prevention. *International scientific journal* [online]. 2022, **1**(5), 7-12 [cit. 2024-02-29]. ISSN 2181-3337. Dostupné z: doi:10.5281/zenodo.6988810
- [26] VRABLÍK, M. Ateroskleróza: od etiologie po možnosti ovlivnění. *Vnitřní lékařství* [online]. 2015, **61**(11), 925-931 [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2015/11/02.pdf>
- [27] ŽÁK, Aleš a J. *Ateroskleróza: nové pohledy*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3052-3.
- [28] MASOPUST, J. Patogeneze aterosklerózy. *Medicína, nemoci a studium na 1. LF UK* [online]. [cit. 2024-02-29]. Dostupné z: <https://www.stefajir.cz/files/Atero.pdf>
- [29] ZHI, W., Y. LIU, X. WANG a H. ZHANG. Recent advances of traditional Chinese medicine for the prevention and treatment of atherosclerosis. *Journal of Ethnopharmacology* [online]. 2023, **301** [cit. 2024-02-29]. ISSN 0378-8741. Dostupné z: doi:10.1016/j.jep.2022.115749
- [30] ROMAINE, S., M. TOMASZEWSKI, G. CONDORELLI a N. SAMANI. MicroRNAs in cardiovascular disease: an introduction for clinicians. *Heart* [online]. 2015, 2015-05-25, **101**(12), 921-928 [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: doi:10.1136/heartjnl-2013-305402

- [31] NOVÁK, J. a M. SOUČEK. Význam mikroRNA v patofyziologii aterosklerózy a jejich možné klinické využití. *Athero Review*[online]. 2016, **1**(3), 144-150 [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/athero-review/2016-3/vyznam-mikrorna-v-patofyziologii-aterosklerozy-a-jejich-mozne-klinicke-vyuziti-59405>
- [32] KARÁSEK, D. Biologická léčba dyslipidemií. *Vnitřní lékařství* [online]. 2021, **67**(4), 206-211 [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: <https://casopisvnitrnilekarstvi.cz/pdfs/vnl/2021/04/03.pdf>
- [33] KAŇOVSKÝ, P. a A. BÁRTKOVÁ. *Speciální neurologie*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2020. ISBN 978-80-244-5611-9.
- [34] KISVETROVÁ, H. *Demence a kvalita života*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2020. ISBN 978-80-244-5709-3.
- [35] HLAVÁČOVÁ, S. Přehled rizikových faktorů vzniku demence. *Listy klinické logopedie* [online]. 2022, **6**(2), 27-33 [cit. 2024-02-29]. Dostupné z: doi:10.36833/lkl.2022.024
- [36] Alzheimerova choroba. *Česká alzghaimerovská společnost* [online]. 2015 [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: <https://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba/>
- [37] ZVĚŘOVÁ, M. *Alzheimerova demence*. Praha: Grada Publishing, 2017. Psyché (Grada). ISBN 978-80-271-0561-8.
- [38] BOUŠOVÁ, I. *Neurodegenerace*. Hradec Králové: Katedra biochemických věd, Farmaceutická Fakulta, Karlova Univerzita, 2022, Studijní materiál pro předmět klinická biochemie a patobiochemie , 1. ročník oboru Bioanalytické laboratorní diagnostiky ve zdravotnictví
- [39] KNOPMAN, D. S., H. AMIEVA, R. C. PETERSEN, G. CHÉTELAT, D. M. HOLTZMAN, B. T. HYMAN, R. A. NIXON a D. T. JONES. Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers* [online]. 2021, **7**(1) [cit. 2024-02-29]. Dostupné z: doi:10.1038/s41572-021-00269-y
- [40] BLOUNT, G. S., L. COURSEY a J. KOCERHA. MicroRNA Networks in Cognition and Dementia. *Cells* [online]. 2022, **11**(12), 1882 [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: doi:10.3390/cells11121882
- [41] DERKOW, K., S. M. LEHMANN, B. PARK, et al. An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration.: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nature Neuroscience* [online]. 2012, **15**(6), 827-835 [cit. 2024-04-26]. Dostupné z: doi:10.1038/nn.3113



- [42] SØRENSEN, S. S., A. NYGAARD a T. CHRISTENSEN. MiRNA expression profiles in cerebrospinal fluid and blood of patients with Alzheimer's disease and other types of dementia – an exploratory study. *Translational Neurodegeneration* [online]. 2016, **5**(6) [cit. 2024-04-26]. ISSN 2047-9158. Dostupné z: doi:10.1186/s40035-016-0053-5
- [43] BIR, S. C., M. W. KHAN, V. JAVALKAR, E. G. TOLEDO a R. E. KELLEY. Emerging Concepts in Vascular Dementia: A Review. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* [online]. 2021, **30**(8) [cit. 2024-02-29]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2021.105864
- [44] Vaskulární demence. *NZIP-národní zdravotnický informační portál* [online]. [cit. 2024-02-07]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1315-vaskularni-demence>
- [45] PEŠLOVÁ, E. a M. BRÁZDIL. Demence s Lewyho tělísky s klinickým obrazem sporadické Creutzfeldtovy-Jakobovy choroby. *Neurologie pro praxi* [online]. 2017, **18**(6), 415-421 [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2017/06/12.pdf>
- [46] GÁMEZ-VALERO, A., J. CAMPDELACREU, D. VILAS, et al. Exploratory study on microRNA profiles from plasma-derived extracellular vesicles in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Translational Neurodegeneration* [online]. 2019, **8**(31) [cit. 2024-04-26]. ISSN 2047-9158. Dostupné z: doi:10.1186/s40035-019-0169-5
- [47] YE, J., M. XU, X. TIAN, S. CAI a S. ZENG. Research advances in the detection of miRNA. *Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2019, **9**(4), 217-226 [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpha.2019.05.004
- [48] JET, T., G. GINES, Y. RONDELEZ a V. TALY. Advances in multiplexed techniques for the detection and quantification of microRNAs. *Chemical Society Reviews* [online]. 2021, **50**(6), 4141-4161 [cit. 2024-02-08]. Dostupné z: doi:10.1039/D0CS00609B
- [49] ANDROVIC, P., L. VALIHRACH, J. ELLING, R. SJOBACK a M. KUBISTA. Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Research* [online]. 2017, **45**(15), e144 [cit. 2024-03-01]. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkx588
- [50] Two-Tailed qPCR. *BioVendor R&D* [online]. 2017 [cit. 2024-03-01]. Dostupné z: <https://www.biovendor.com/two-tailed-qpcr#two-tailed-qpcr-advantages>
- [51] SABIRZHANOV, B., O. MAKAREVICH, J. BARRETT, I. L. JACKSON, A. I. FADEN a B. A. STOICA. Down-Regulation of miR-23a-3p Mediates Irradiation-Induced Neuronal Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(10), 3695 [cit. 2024-03-14]. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21103695

- [52] BRENNAN, S., M. KEON, B. LIU, Z. SU a N. K. SAKSENA. Panoramic Visualization of Circulating MicroRNAs Across Neurodegenerative Diseases in Humans. *Molecular Neurobiology* [online]. 2019, **56**(11), 7380-7407 [cit. 2024-03-15]. Dostupné z: doi:10.1007/s12035-019-1615-1
- [53] ZHANG, H., D. WANG, J. TONG, J. FANG a Z. LIN. MiR-30b-5p attenuates the inflammatory response and facilitates the functional recovery of spinal cord injury by targeting the NEFL/mTOR pathway. *Brain and Behavior* [online]. 2022, **12**(12), e2788 [cit. 2024-03-15]. Dostupné z: doi:10.1002/brb3.2788
- [54] SIERKSMA, A., A. LU, E. SALTA, et al. Deregulation of neuronal miRNAs induced by amyloid- $\beta$  or TAU pathology. *Molecular Neurodegeneration* [online]. 2018, **13**(1), 54 [cit. 2024-03-15]. Dostupné z: doi:10.1186/s13024-018-0285-1
- [55] WU, Y., J. XU, J. XU, J. CHENG, D. JIAO, C. ZHOU, Y. DAI a Q. CHEN. Lower Serum Levels of miR-29c-3p and miR-19b-3p as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* [online]. 2017, **242** (2), 129-136 [cit. 2024-03-15]. Dostupné z: doi:10.1620/tjem.242.129
- [56] TELKOPARAN-AKILLILAR, P. a D. CEVIK. 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 *Molecular Biology Reports* [online]. 2021, **48**(4), 3503-3513 [cit. 2024-03-17]. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-021-06352-7
- [57] KARERE, G. M., J. P. GLENN, G. LI, A. KONAR, J. L. VANDEBERG a L. A. COX. Potential miRNA biomarkers and therapeutic targets for early atherosclerotic lesions. *Scientific Reports* [online]. 2023, **13**(1), 3467 [cit. 2024-03-17]. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-023-29074-1
- [58] TAN, L., L. LIU, Z. JIANG a X. HAO. Inhibition of microRNA-17-5p reduces the inflammation and lipid accumulation, and up-regulates ATP-binding cassette transporter A1 in atherosclerosis. *Journal of Pharmacological Sciences* [online]. 2019, **139**(4), 280-288 [cit. 2024-03-17]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphs.2018.11.012
- [59] HUANG, S., G. ZHAO, X. PENG a W. YE. The Pathogenic Role of Long Non-coding RNA H19 in Atherosclerosis via the miR-146a-5p/ANGPTL4 Pathway. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* [online]. 2021, 2021-11-8, **8** [cit. 2024-03-17]. Dostupné z: doi:10.3389/fcvm.2021.770163

- [60] GUO, J., H. MEI, Z. SHENG, Q. MENG, M. M. VÉNIANT a H. YIN. Hsa-miRNA-23a-3p promotes atherogenesis in a novel mouse model of atherosclerosis. *Journal of Lipid Research* [online]. 2020, **61**(12), 1764-1775 [cit. 2024-03-17]. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.RA120001121
- [61] YOU, D., Q. QIAO, K. ONO, et al. MiR-223-3p inhibits the progression of atherosclerosis via down-regulating the activation of MEK1/ERK1/2 in macrophages. *Aging* [online]. 2022, 2022-02-28, **14**(4), 1865-1878 [cit. 2024-03-17]. Dostupné z: doi:10.18632/aging.203908
- [62] WANG, H., L. WANG, Y. TAN, Ch. FANG, Ch. LI a L. ZHANG. Identification of miRNAs Involved in Intracranial Aneurysm Rupture in Cigarette-Smoking Patients. *Neurology and Therapy* [online]. 2023, **12**(6), 2101-2119 [cit. 2024-03-17]. ISSN 2193-8253. Dostupné z: doi:10.1007/s40120-023-00547-9
- [63] LI, H., P. ZHANG, F. LI, G. YUAN, X. WANG, A. ZHANG a F. LI. Plasma miR-22-5p, miR-132-5p, and miR-150-3p Are Associated with Acute Myocardial Infarction. *BioMed Research International* [online]. 2019, 1-13 [cit. 2024-03-17]. Dostupné z: doi:10.1155/2019/5012648

## **Přílohy**

- Žádost o sběr dat pro studijní účely
- Prohlášení o mlčenlivosti

## **PŘÍLOHY**

## Příloha č. 1

Fakultní nemocnice Ostrava  
17. listopadu 1790/5, 708 52 Ostrava-Poruba

## Žádost o sběr dat pro studijní účely

Jméno a příjmení, titul:	Bc. Eliška Hrachovcová
Kontaktní údaje:	733 208 716 , email: elhra@seznam.cz
Jste zaměstnancem FNO?	<input type="checkbox"/> ANO <input checked="" type="checkbox"/> NE
Pokud ano, na jakém pracovišti ve FNO pracujete:	
Pokud jste zaměstnancem jiné organizace než FNO, uveďte jaké?	
Název vysoké / vyšší odborné školy	<input type="checkbox"/> Ostravská univerzita <input type="checkbox"/> Jiná vysoká / vyšší odborná škola
Název fakulty:	Adresa jiné vysoké / vyšší odborné školy: Univerzita Karlova Akademika Heyrovského 1203/8
Název studovaného oboru:	Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy Bioanalytická laboratorní diagnostika se zdravotnictvím
Ročník studia:	2. ročník
Sběr dat je za účelem	<input type="checkbox"/> bakalářské práce <input type="checkbox"/> absolventské práce <input checked="" type="checkbox"/> diplomové práce <input type="checkbox"/> rigorózní práce <input type="checkbox"/> dizertační práce <input type="checkbox"/> jiný typ práce: upřesnění jiného typu práce:
Název práce:	Laboratorní diagnostika microRNA u různých diagnostických skupin
Jméno a příjmení vedoucího odborné práce:	
Název pracoviště FNO, kde má být sběr dat proveden:	Oddělení klinické biochemie
Termín zahájení a ukončení sběru dat:	od 1. 12. 2023 až únor 2024

Datum: 22.12.2023

Hrachovcová  
podpis žadateledoc.RNDr. Pavlína Kušnierová, Ph.D.  
podpis vedoucího odborné práce nebo ved. katedryVyjádření FNO:  souhlasím  nesouhlasím

Datum:

d. 1. 2024

FAKULTNÍ NEMOCNICE OSTRAVA  
PhDr. Andrea Polanská, MBA  
náměstkyňe ředitele pro ošetrovatelskou péči  
17. listopadu 1790/5, 708 52 Ostrava-Poruba  
podpis a razítko

## Povinné přílohy žádosti:

1. Potvrzení o studiu

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA  
Akademika Heyrovského 1203

500 05 Hradec Králové  
datum, razítko a podpis studijního oddělení  
ICO 00216205 SIC 200216205

2. Stručná anotace odborné práce
3. V případě dotazníkového šetření vzor dotazníku, v případě rozhovoru návrh otázek

Žádost potvrzenou studentem i vedoucím odborné práce zašlete ve 2 originálech pro nelékařské obory na sekretariát náměstkyňe pro ošetrovatelskou péči, nebo pro lékařské obory na sekretariát náměstka pro léčebnou péči, Fakultní nemocnice Ostrava (Domov sester), 17. listopadu 1790/5, 708 52 Ostrava-Poruba.

## Příloha č. 2

Žádost o sběr dat pro studijní účely

### Prohlášení o mlčenlivosti

Já (jméno, příjmení)

Eliška Hrachovcová

datum narození

26. 10. 1999

se zavazuji zachovávat úplnou mlčenlivost o všech informacích, které jsem získal v souvislosti se sběrem dat ve Fakultní nemocnici Ostrava za účelem popsáním na str. 1 tohoto tiskopisu. Jedná se zejména o tyto informace:

1. Všechny informace týkající se osobních údajů pacientů:
  - a. jméno pacienta,
  - b. zdravotní stav pacienta,
  - c. hospitalizace/ambulantní péče ve FNO,
  - d. jiné.
2. Informace o zdravotnickém zařízení, klinice, ústavu, centru, odděleních, na kterých sběr dat probíhal.

Dále se zavazuji neposkytovat žádné informace o Fakultní nemocnici Ostrava sdělovacím prostředkům, prostřednictvím sociálních sítí, apod..

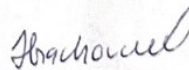
Jsem si vědom(a), že patientská data mohou čerpat pouze z dat pacientů, kteří k tomu udělili souhlas (viz záznam v „Prohlášení pacienta/zákonného zástupce – zdravotní služby: hospitalizace/ambulantní péče“).

Jsem si vědom(a), že získána data mohou ve své práci použít pouze v anonymní podobě, tzn. konkrétní pacient nesmí být žádným způsobem identifikovatelný.

Jsem si vědom(a), že povinnost mlčenlivosti nezaniká ukončením mé činnosti ve FNO.

Porušení výše uvedených zásad může být důvodem odebrání souhlasu ke sběru dat, rovněž může mít za následek důsledky plynoucí z porušení platné legislativy jak v rovině trestněprávní, tak v rovině občanskoprávní.

V Ostravě dne: 22. 12. 2023

  
podpis