

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2020**

**Pavla Šoffrová**



FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

**Pavla Šoffrová**

Studijní obor: Zdravotní laborant (5345R020)

**IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN Z PLAZMY PRO  
ÚČELY KVANTITATIVNÍ ANALÝZY**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

PLZEŇ 2020

# ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Pavla ŠOFFROVÁ**  
Osobní číslo: **Z17B0101P**  
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Izolace nukleových kyselin z plazmy pro účely kvantitativní analýzy**  
Zadávající katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

### Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

### Seznam doporučené literatury:

- BROWN, Terence Austen. KLONOVÁNÍ GENŮ A ANALÝZA DNA. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007, 408 s. ISBN 978-80-244-1719-6.
- KOČÁREK, Eduard. MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE V MEDICÍNĚ. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007, 218 s. ISBN 978-80-7013-450-4.
- ŘEHOUT, Václav, ČÍTEK, Jindřich a Lenka SÁKOVÁ. Genetika I.: Úvod do studia genetiky. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2000. ISBN 80-7040-405-1.
- FORETOVÁ, Lenka. Co jsou to geny a jak fungují? [online]. In.: Masarykův onkologický ústav [cit. 2019-05-27]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/co-jsou-geny-a-jak-funguji/t2354>
- CARDONA-MONZONÍS, Alejandro a Jesús BELTRÁN-GARCÍA. Epigenetic biomarkers in cardiovascular disease [online]. 2018;3:24 [cit. 2019-05-27]. DOI:10.21037/jlpm.2018.0204.

Vedoucí bakalářské práce:

**Doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.**

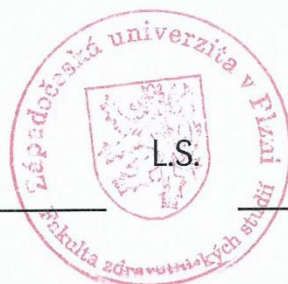
Katedra záchranářství, diagnostických oborů  
a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **18. června 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2020**



**PhDr. Lukáš Štich**  
děkan



**Mgr. Stanislava Reichertová**  
vedoucí katedry

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité prameny jsem uvedla v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 30. 4. 2020.

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Šoffrová Pavla

Katedra: Katedra záchranářství a teoretických oborů

Název práce: Izolace nukleových kyselin z plazmy pro účely kvantitativní analýzy

Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Počet stran – číslované: 56

Počet stran – nečíslované: 44

Počet příloh: 4

Počet titulů použité literatury: 57

Klíčová slova: Kardiovaskulární onemocnění, mikroRNA, izolace, plazma

### **Souhrn:**

Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda je možné použít plazmu získanou z plné krve (odebrané do zkumavky K<sub>3</sub>EDTA) pro izolaci nukleových kyselin (RNA) v dostatečném množství a dostatečné čistotě tak, aby bylo možno provést stanovení biomarkerů ze skupiny mikroRNA u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním.

Pro izolaci byly použity soupravy firmy Qiagen (Hilden, Německo). Parametry izolované RNA (koncentrace a čistota) byly měřeny na přístroji Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Waltham, USA).

## **Abstract**

Surname and name: Šoffrová Pavla

Department: Department of Paramedical Rescue Work and Technical Specialization

Title of thesis: Isolation of nucleic acid for quantitative analysis from plasma

Consultant: doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D.

Number of pages – numbered: 56

Number of pages – unnumbered: 44

Number of appendices: 4

Number of literature items used: 57

Keywords: Cardiovascular diseases, microRNA, isolation, plasma

### Summary:

The main aim of this thesis was to find out, if it is possible to use plasma of a whole blood (collected to K<sub>3</sub>EDTA tube) for isolation of nucleic acids (RNA) in sufficient quantity and quality for setting biomarkers from group of microRNAs in patients with cardiovascular diseases.

The kits from Qiagen (Hilden, Deutschland) were used for isolation. Parametres of isolated RNA (concentration and purity) were measured on a Nanodrop 1000 instrument (Thermo Fisher Scientific Waltham, USA).



## **Předmluva**

Pro léčbu pacientů s kardiovaskulárními chorobami (KVO) využívá lékař nejen výsledky oboru zobrazovacích metod, ale také hodnoty markerů získanými laboratorními stanoveními. Přestože některé biomarkery jsou v diagnostice KVO nezastupitelné a jejich přínos je zásadní (např. troponin), existují místa v diagnostice, prognóze a predikci KVO, kde jsou třeba pro správné rozhodnutí klinika doplňující informace a stávající biomarkery je neposkytují. Z toho důvodu jsou v současnosti zkoumány nové biomarkery, zejména ze skupiny nekódujících RNA. Nejlepším zdrojem pro stanovení těchto biomarkerů je periferní krev. S tímto koresponduje cíl této práce. Zjistit výtěžnost a čistotu RNA izolované z plazmy získané z plné krve pacientů s KVO (zkumavka K<sub>3</sub>EDTA) soupravou firmy Qiagen. Práce byla provedena na Ústavu Biologie, LF v Plzni UK, který úzce spolupracuje s Kardiologickou klinikou FN a LF Plzeň. Na základě informovaného souhlasu poskytli pacienti hospitalizovaní na této klinice vzorek plné krve pro provedení této práce a navazujícího výzkumu.

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala panu doc. RNDr. Martinu Peštovi, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné připomínky, odborné rady a vstřícnost. Dále bych ráda poděkovala paní RNDr. Kateřině Houfkové za ochotu a čas, který mi věnovala při zpracovávání praktické části práce a Ondřeji Bauerovi za pomoc s praktickou částí práce.

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	13
SEZNAM TABULEK .....	14
SEZNAM ZKRATEK .....	16
ÚVOD.....	18
TEORETICKÁ ČÁST .....	19
1 KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ.....	19
1.1 Formy ischemické choroby srdeční .....	19
1.1.1 Akutní forma ischemické choroby srdeční.....	19
1.1.2 Chronická ischemická choroba srdeční .....	20
1.2 Rizikové faktory vzniku kardiovaskulárních onemocnění .....	21
1.3 Genetika kardiovaskulárních onemocnění .....	22
2 MARKERY KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ .....	23
2.1 Troponin.....	23
2.2 Myoglobin.....	23
2.3 Natriuretické peptidy .....	23
2.4 Kreatinkináza .....	24
2.5 Laktátdehydrogenáza .....	24
3 NOVÉ MARKERY OVĚŘOVANÉ V DIAGNOSTICE – MIKRORNA.....	25
3.1 MikroRNA .....	25
3.1.1 Geny pro mikroRNA .....	25
3.1.2 Kanonický model biogeneze mikroRNA .....	26
3.1.3 Stabilita a regulace mikroRNA.....	27
3.2 MikroRNA spojené s rizikovými faktory KVO .....	28
3.2.1 MikroRNA ve vztahu ke kouření .....	28
3.2.2 MikroRNA ve vztahu k hyperlipidemií.....	29
3.3 MikroRNA podle KVO onemocnění .....	31
3.3.1 MikroRNA ve vztahu k akutnímu infarkt myokardu .....	32
3.3.2 MikroRNA ve vztahu k srdečnímu selhání .....	34
3.3.3 MikroRNA ve vztahu k hypertenzi .....	35
3.3.4 MikroRNA ve vztahu k mrtvici.....	37
4 METODY IZOLACE MIKRORNA .....	39
4.1 Izolace pomocí souprav .....	40
5 METODY STANOVENÍ MIKRORNA.....	42
5.1 Stanovení jednotek mikroRNA.....	42
5.1.1 Kvantitativní real – time PCR .....	42

5.2	Stanovení stovek až tisíců mikroRNA.....	43
5.2.1	MiRNA microarray .....	43
5.2.2	Next generation sequencing.....	43
	PRAKTICKÁ ČÁST .....	44
6	CÍL A ÚKOLY PRÁCE .....	44
6.1	Hlavní cíl.....	44
6.2	Dílčí cíle.....	44
7	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY .....	45
8	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	46
9	METODIKA PRÁCE .....	47
10	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ .....	49
10.1	Celkové výsledky (všechny izolované a měřené vzorky).....	49
10.1.1	Měření absorbance při 260 nm .....	50
10.1.2	Měření absorbance při 280 nm .....	51
10.1.3	Poměr absorbancí 260/280 nm .....	52
10.1.4	Získaná koncentrace v ng/ $\mu$ L .....	53
10.1.5	Celková výtěžnost RNA .....	54
10.2	Výsledky opakovaně izolovaných vzorků.....	55
10.2.1	Měření absorbance při 260 nm .....	56
10.2.2	Měření absorbancí při 280 nm.....	58
10.2.3	Poměr absorbancí 260/280 nm .....	60
10.2.4	Získaná koncentrace v ng/ $\mu$ L .....	62
10.2.5	Celková výtěžnost RNA .....	64
10.3	Opakovaně měřené vzorky.....	66
10.3.1	Měření absorbance při 260 nm .....	66
10.3.2	Měření absorbance při 280 nm .....	67
10.3.3	Poměr absorbancí 260/280 nm .....	68
10.3.4	Získaná koncentrace v ng/ $\mu$ L .....	69
10.3.5	Celková výtěžnost RNA .....	70
	DISKUZE .....	71
	ZÁVĚR.....	73
	SEZNAM LITERATURY .....	74
	SEZNAM PŘÍLOH .....	82
	PŘÍLOHY .....	83
	Příloha A – Veškerá naměřená data všech izolovaných vzorků.....	83
	Příloha B: Tabulka hodnot prvních izolací u opakovaně izolovaných vzorků.....	100
	Příloha C: Tabulka hodnot druhých izolací u opakovaně izolovaných vzorků.....	100

Příloha D: Tabulka hodnot opakovaně měřených vzorků .....	101
---	-----

## **SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1: Postup izolace pomocí soupravy QIAGEN miRNeasy Serum/Plasma Kit. .... 39

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Změněná exprese mikroRNA v plazmě při rizikových faktorech kardiovaskulárního onemocnění.....	24
Tabulka 2: Obvyklá mikroRNA v plazmě při kardiovaskulárních onemocněních.....	27
Tabulka 3: Zjištěné hodnoty sledovaných údajů všech izolovaných a měřených vzorků..	46
Tabulka 4: Hodnoty sledovaných údajů všech izolovaných a měřených vzorků při absorpční 260 nm .....	46
Tabulka 5: Hodnoty sledovaných údajů všech izolovaných a měřených vzorků při absorpční 280 nm.....	47
Tabulka 6: Hodnoty sledovaných údajů všech izolovaných a měřených vzorků při poměru absorpční 260/280 nm.....	48
Tabulka 7: Hodnoty sledovaných údajů koncentrací v ng/ $\mu$ L všech izolovaných a měřených vzorků.....	49
Tabulka 8: Hodnoty sledovaných údajů celkových výtěžností RNA v ng všech izolovaných a měřených vzorků.....	50
Tabulka 9: Mediánové hodnoty sledovaných údajů získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.....	51
Tabulka 10: Mediánové hodnoty sledovaných údajů získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.....	51
Tabulka 11: Hodnoty sledovaných údajů získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření absorpce při 260 nm.....	52
Tabulka 12: Hodnoty sledovaných údajů získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření absorpce při 260 nm.....	53
Tabulka 13: Hodnoty sledovaných údajů získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření absorpce při 280 nm.....	54
Tabulka 14: Hodnoty sledovaných údajů získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření absorpce při 280 nm.....	55
Tabulka 15: Hodnoty sledovaných údajů získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření poměru absorpční 260/280 nm.....	56
Tabulka 16: Hodnoty sledovaných údajů získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření poměru absorpční 260/280 nm.....	57
Tabulka 17: Hodnoty sledovaných údajů zjištěné koncentrace v ng/ $\mu$ L získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.....	58

Tabulka 18: Hodnoty sledovaných údajů zjištěné koncentrace v ng/μL získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.....	59
Tabulka 19: Hodnoty sledovaných údajů zjištěné celkové výtěžnosti RNA v ng získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.....	60
Tabulka 20: Hodnoty sledovaných údajů zjištěné celkové výtěžnosti RNA v ng získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.....	61
Tabulka 21: Mediánové hodnoty sledovaných údajů opakovaně měřených vzorků.....	62
Tabulka 22: Hodnoty sledovaných údajů opakovaně měřených vzorků při absorbanci 260 nm.....	62
Tabulka 23: Hodnoty sledovaných údajů opakovaně měřených vzorků při absorbanci 280 nm.....	63
Tabulka 24: Hodnoty sledovaných údajů opakovaně měřených vzorků při poměru absorbancí 260/280 nm.....	64
Tabulka 25: Hodnoty získané koncentrace v ng/μL u opakovaně měřených vzorků.....	65
Tabulka 26: Hodnoty celkové výtěžnosti RNA v ng u opakovaně měřených vzorků.....	66

## SEZNAM ZKRATEK

AIM.....	Akutní infarkt myokardu
APO-E.....	Apoenzym E
BNP.....	Natriuretický peptid B
CeRNA.....	Competing endogenous RNA
CMP.....	Cévní mozková příhoda
DEPC.....	Diethyl pyrokarbonát
dsRNA.....	Dvouvláknová RNA
EKG.....	Elektrokardiografie
FN.....	Fakultní nemocnice
FXR1 protein.....	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1
ICHS.....	Ischemická choroba srdeční
HDL.....	High density lipoprotein
HSPD1.....	Heat Shock Protein Family D Member 1
kb.....	kilobáze
K <sub>3</sub> EDTA.....	Draselná sůl etylendiaminotetraoctové kyseliny
KVO.....	Kardiovaskulární onemocnění
LDL.....	Low density lipoprotein
LF.....	Lékařská fakulta
mmHg.....	Milimetry rtuťového sloupce
mmol.....	milimol
miRNA.....	MikroRNA
mRNA.....	Messenger RNA



MSTN ..... Gen pro myostatin

ncRNA ..... Nekódující ribonukleová kyselina

ng ..... Nanogram

nm ..... Nanometr

NSTEMI..... Infarkt myokardu bez ST elevací

NT-proBNP ..... Hormonálně neaktivní fragment prohormonu proBNP

PDCD4..... Programmed Cell Death 4

LF..... Lékařská fakulta

qRT-PCR..... Kvantitativní real-time PCR

RNA..... Ribonukleová kyselina

RT real-time PCR..... Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase

STEMI ..... Infarkt myokardu s ST elevacemi

UK..... Univerzita Karlova

XRN2..... 5'-3' exoribonukleáza 2

3' UTR..... 3' nepřekládaná oblast

μL..... Mikrolitr

## ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá izolacemi nukleových kyselin, konkrétně izolací RNA obohacené frakcí mikroRNA z plazmy plné krve (odebrané do zkumavky K<sub>3</sub>EDTA) získané z Kardiologické kliniky FN a LF Plzeň.

V teoretické části se práce zabývá kardiovaskulárními onemocněními (KVO), rizikovými faktory jejich vzniku a molekulárně genetickým podkladem vývoje kardiovaskulárních onemocnění. Neopomím ani klasické biomarkery nezastupitelné v současné diagnostice kardiovaskulárních chorob. Tyto biomarkery se však ukazují v určitých oblastech diagnostiky kardiovaskulárních onemocnění nedostačující, například odhalení rizika náhlé srdeční smrti. Z toho důvodu je zde snaha nalézt biomarkery, které budou spolehlivé, časně diagnostikovatelné, jejich koncentrace bude korelovat s tíží onemocnění, budou schopné predikovat vývoj onemocnění a vyplní místa, kde klasické biomarkery odpovídají nedostatečně. Jako vhodné biomarkery kardiovaskulárních onemocnění se ukazují mikroRNA, 22 nukleotidů dlouhé jednovláknové struktury regulující genovou expresi. Ve vztahu ke KVO bylo nalezeno několik konkrétních mikroRNA, které se objevují v krvi pacientů při onemocnění a jsou označovány jako kardiospecifické. Tyto konkrétní mikroRNA lze rozdělit na mikroRNA, vyplavovaná ve vztahu k rizikovému chování jedince a na mikroRNA, jež se vyplavují do krve při konkrétním kardiovaskulárním onemocnění. Další kapitoly popisují metody, kterými je možné izolovat RNA a následně stanovit hladiny mikroRNA.

Praktická část obsahuje popis postupu izolace RNA z plazmy plné krve pomocí soupravy firmy Qiagen, kterou jsem použila, dále prezentuji naměřené hodnoty výtěžku a čistoty z 503 izolovaných vzorků. V poslední části jsou diskutovány možnosti využití izolované RNA o uvedených čistotách pro kvantitativní stanovení metodami molekulární biologie.

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 KARDIOVASKULÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ

Kardiovaskulární onemocnění (KVO) jsou celosvětově jednou z hlavních příčin úmrtí (Zhou et al., 2018). Navíc jsou příčinou vzniku mnoha typů invalidit, tzn. jsou celospolečensky závažným problémem. Pacienti postižení KVO často umírají náhle bez možnosti poskytnutí zdravotní péče (Býma a Hradec, 2018). Racek et al. (1999) uvádí, že nejčastější příčinou KVO je ateroskleróza a její komplikace, mezi něž patří ischemická choroba srdeční (ICHS), cévní mozková příhoda (CMP) nebo ischemická onemocnění dolních končetin. Ateroskleróza vzniká na základě kombinace změn metabolismu lipidů a zánětlivé reakce organismu (Libby et al., 2002). Průběh této nemoci je pomalý a projevuje se v pokročilém stádiu (Býma a Hradec, 2018). Rizikové faktory aterosklerózy je možné rozdělit na ovlivnitelné a neovlivnitelné. Mezi neovlivnitelné patří věk, genetická zátěž a ve spojitosti s ní i rodinná anamnéza a pohlaví, konkrétně u mužů je větší pravděpodobnost vzniku KVO. Naopak kouření nebo vysoký krevní tlak a diabetes mellitus jsou faktory, které jsou ovlivnitelné. Právě ovlivnitelné faktory a životospráva jsou hlavní činitelé, na které může být zaměřena prevence (Racek et al., 2006).

Ischemická choroba srdeční je jedno z nejčastějších onemocnění v rozvinutých zemích a je příčinou asi 40% úmrtí z kardiálních příčin. Při ischemické chorobě srdeční dochází ke snížení nebo až k zástavě zásobování myokardu krví. Ischemie se projevuje jak v klidu, tak při zvýšených potřebách kyslíku. Onemocnění se může projevovat jak asymptomaticky, tak může dojít k náhlé smrti srdeční. ICHS může mít akutní průběh nebo podobu chronického onemocnění. Nejčastějším důvodem vzniku ischemické choroby srdeční je ateroskleróza. Léčba je směřována k tlumení nebo zmírnění dalšího rozvoje aterosklerózy a tlumení symptomů ICHS (Hradec a Býma, 2007).

### 1.1 Formy ischemické choroby srdeční

#### 1.1.1 Akutní forma ischemické choroby srdeční

Akutní forma ICHS zahrnuje akutní koronární syndromy. Mezi tyto syndromy je řazena nestabilní angina pectoris, která je charakteristická nestabilním aterosklerotickým plátem, v němž dojde k ruptuře a vzniku krevní sraženiny. Následkem tohoto děje dochází k zúžení tepny. Při diagnostice nestabilní anginy pectoris je potřeba vyloučit akutní infarkt

myokardu, který lze prokázat či vyloučit pomocí laboratorního stanovení troponinů. Nestabilní angina pectoris bezprostředně ohrožuje pacienta na životě a je důležité, aby byla pacientovi okamžitě zajištěna hospitalizace na koronární jednotce (Hradec a Býma, 2007).

Akutní infarkt myokardu (AIM) je řazený mezi akutní formy ICHS, Hradec & Býma (2007) definuje AIM jako: „*Akutní infarkt myokardu je ložisková ischemická nekróza srdečního svalu, která vzniká náhlým uzávěrem věnčité tepny zásobující příslušnou oblast.*“ Tepna se uzavírá trombem, který vznikl prasknutím aterosklerotického plátu. K ischemické nekróze dochází velmi časně po ucpání věnčité tepny – průměrný čas je odhadován na 20 až 30 minut. Akutní infarkt myokardu se rozděluje na NSTEMI a STEMI. Pro NSTEMI je typická nepřítomnost elevací ST oblasti na elektrokardiografii (EKG) a naopak STEMI má tyto elevace na EKG přítomné. Za typické příznaky onemocnění jsou považovány svíravé bolesti na hrudi vystřelující do ramen a levé ruky. Dalšími doprovodnými příznaky jsou úzkostné stavy, dušnost a vegetativními projevy, jež zahrnují nauzeu a bledost. AIM je diagnostikován pomocí EKG, odebrání pacientovi anamnézy a laboratorního vyšetření, kdy dochází ke stanovení troponinu T nebo I, který se následně posuzuje spolu se změnami EKG nebo spolu s anamnézou (Hradec a Býma, 2007).

### **1.1.2 Chronická ischemická choroba srdeční**

Za jeden z typů chronické ischemické choroby srdeční je považována asymptomatická ICHS. Jedná se o onemocnění, které se nijak neprojevuje, ale může být objeveno při monitorování EKG, které je prováděno za jiným účelem. Riziko vzniku akutních problémů u tohoto onemocnění je velmi nízké, avšak zvyšuje riziko vzniku akutního onemocnění a je důvodem k preventivním opatřením (Hradec a Býma, 2007).

Dalším stavem chronické ICHS je stav po prodělaném akutním infarktu myokardu, kdy jsou pacienti bezprostředně ohroženi vznikem dalšího kardiovaskulárního onemocnění. Velmi důležité je pacienta po AIM ještě před propuštěním do domácího ošetřování vyšetřit a určit, zda je jeho riziko návratu kardiovaskulárního problému vysoké nebo nízké. Pacient s vysokým rizikem poté musí dodržovat preventivní opatření (Hradec a Býma, 2007).

Angina pectoris se projevuje bolestí na hrudi objevující se, když dochází k vystavení pacienta fyzické zátěži, stresu nebo chladu. Projevy jsou popisovány jako pocit tíhy, pálení, svírání a vystřelování do dolní čelisti a do horní levé končetiny. Potíže trvají několik minut a po aplikaci nitroglycerinu velmi rychle ustupují. Bolesti jsou způsobeny přechodnou ischemií srdeční svaloviny nebo stenózou věnčité tepny. Ischemie se nemusí vždy

projevovat bolestí, může být i bezbolestná. V takovém případě ji nazýváme jako „němou ischemii“, kterou je možné pozorovat jen na EKG. Avšak stejně jako bolestivé, tak i nebolestivé ischemie mají stejný prognostický význam (Hradec a Býma, 2007).

## **1.2 Rizikové faktory vzniku kardiovaskulárních onemocnění**

Kardiovaskulární onemocnění vzniká souhrou několika rizikových faktorů (Cífková et al., 2005). Mezi základní rizikové faktory patří obezita, kouření, hypertenze a dyslipidemie (Cífková et al., 2011). Kromě již zmíněných mezi tyto faktory patří podle Racka et al. (2006) i diabetes mellitus.

Za obezitu je podle WHO považováno BMI vyšší nebo rovno 30 kg/m<sup>2</sup> (Cífková et al., 2011). Jedná se o chronické a velmi závažné onemocnění, které je nejčastěji způsobeno vyšším energetickým příjmem, než jaký tělo potřebuje. Kromě životního stylu patří mezi faktory vzniku i genetické faktory spojené s onemocněními a zevní životní prostředí. Obezita negativně ovlivňuje pravděpodobnost vzniku kardiovaskulárního onemocnění (Hlúbik, 2002).

Kouření je považováno za faktor mající vliv na morfologii a funkci kardiovaskulárního ústrojí. Vlivem kouření dochází k endoteliální dysfunkci, vzniku zánětu, hemostáza přestává fungovat, zvyšuje se potřeba kyslíku, dochází ke vzniku inzulínové rezistence a objevují se poruchy v lipidovém metabolismu. Tyto změny mají za následek vznik aterosklerózy, která je považována za hlavní důvod vzniku kardiovaskulárních onemocnění (Golán, 2007).

Jako hypertenze je označován krevní tlak, který je vyšší než 140/90 mmHg (Cífková et al., 2011). U pacientů s hypertenzí je potřeba posuzovat nejen tlak, ale i poškození cílových orgánů a jejich kardiovaskulární riziko. Podle těchto kritérií následně dochází k volbě farmakologické léčby (Cífková et al., 2005).

Dalším z rizikových faktorů je dyslipidemie. Jedná se o stav, kdy je celkový cholesterol v krvi vyšší nebo roven 5 mmol/L. Zároveň je za dyslipidémii považován i stav, kdy je HDL cholesterol nižší než 1 mmol/L u mužů a 1,2 mmol/L u žen. Krom toho je sledována hladina LDL cholesterolu, která by neměla být vyšší nebo rovna 3 mmol/L a hodnota triacylglycerolů by neměla přesahovat 1,7 mmol/L (Cífková et al., 2011).

Celkové riziko vzniku KVO se posuzuje pomocí tabulek SCORE, které pracují s věkem, pohlavím, systolickým tlakem, kuřáckými návyky a celkovým cholesterolem nebo poměrem mezi cholesterolem celkovým a HDL cholesterolem (Cífková et al., 2005).

U diabetiků se ateroskleróza objevuje až 4x častěji než u osob, jež diabetem netrpí. Diabetes mellitus II. typu je spojován s metabolickým syndromem, který má vliv na vznik kardiovaskulárního onemocnění, ale riziko se nevyhýbá ani diabetikům I. typu (Pelikánová, 2011).

### **1.3 Genetika kardiovaskulárních onemocnění**

Od 80. let minulého století probíhá intenzivní výzkum na poli identifikace genů, jejichž alely jsou zodpovědné nebo jsou asociovány s rozvojem KVO. V průběhu let byly použity 2 principy výzkumu – genetická asociace a vazebná analýza. Bylo identifikováno několik genů s mendelovskou dědičností, jejichž kauzální mutace mají vliv na fenotyp KVO (např. geny Apo-E, MSTN, HSPD1, PDCD4). Díky vazebné analýze, popř. sekvenování DNA, se podařilo tyto geny nalézt a identifikovat jejich mutace ve vztahu ke kardiovaskulárním chorobám. Byl identifikován gen pro LDLR u pacienta trpícího homozygotní familiární hypercholesterolemií, kde byla nalezena delece 5 kb, které eliminovaly několik exonů. Dále byl lokalizován gen pro hypertrofickou kardiomyopatii a jako příčina onemocnění byla určena mutace v těžkém řetězci beta kardiálního myozinu. Kardiovaskulární onemocnění se objevují i u některých genetických syndromů, například Marfanova syndromu nebo u některých vrozených srdečních chorob (Kathiresan a Srivastava, 2012).

Kromě uvedených nemocí s mendelistickou dědičností mezi jejichž fenotyp patří KVO se předpokládá, že u většiny pacientů se silným podílem genetické složky rozvoje KVO se tento znak rozvíjí na základě polygenní dědičnosti. To znamená, že u jedinců s rozvojem tohoto onemocnění na polygenním základě došlo ke zdědění většího množství rizikových alel genů podílejících se na rozvoji např. hypertenze nebo aterosklerózy a následně dochází k rozvoji KVO (Kathiresan a Srivastava, 2012; Cambien a Tiret, 2007).

## **2 MARKERY KARDIOVASKULÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ**

### **2.1 Troponin**

Troponiny jsou spojovány se stanovením akutního infarktu myokardu. Troponinový komplex se spolu s tropomyozinem podílí na regulaci kontrakce srdečního svalu. V lidském těle se objevují 3 typy troponinů – troponin T, troponin I a troponin C. Vzhledem k odlišnostem v primární struktuře troponinu T a I ve svalu myokardu a svalu kosterním lze pomocí laboratorních testů zjistit, zdali je poškozený myokard, nebo zdali uvolněný troponin pochází z kosterního svalstva. Výhodou stanovení troponinu je vysoká specifita pro sval myokardu. Metoda je schopná velmi dobře odhalit nemoc a je citlivá, díky čemuž je možné odhalit i malé poškození srdeční svaloviny. Bylo zjištěno, že nárůst koncentrace troponinů velmi dobře koreluje s velikostí poškození srdeční svaloviny. Výhodou a současně nevýhodou je pomalý nárůst koncentrace. Koncentrace troponinů začíná vzrůstat po 3 – 4 hodinách od vzniku prvních potíží. Je tedy možné akutní infarkt myokardu diagnostikovat až později, avšak pro včasnou diagnostiku je potřeba najít jiné biomarkery, které prodlevu mít nebudou (Racek et al., 2006).

### **2.2 Myoglobin**

Myoglobin je podle Racka et al. (2006) považován za nový test významný pro diagnostiku infarktu myokardu. Jedná se o bílkovinu vyskytující se v cytoplazmě a objevující se v krvi pacienta velmi brzy po infarktu myokardu. Tato doba je stanovena na rozmezí mezi třiceti minutami a dvěma hodinami, neboť se do krve dostává přímo. Jedná se o velmi malou molekulu, která je schopna procházet glomerulem, proto se ze všech markerů infarktu myokardu ztrácí z těla pacienta nejrychleji. Zpomalení ztrát těchto molekul močí je pozorováno u pacientů a renální insuficiencí. Nevýhodou stanovení tohoto klasického markeru KVO je shodná struktura myoglobinu z kosterního a srdečního svalu.

### **2.3 Natriuretické peptidy**

Natriuretické peptidy jsou hormony vylučované myokardem, které mají roli v odolnosti kardiovaskulárního systému vůči tlaku a objemovému přetížení. Tyto peptidy jsou spojovány se srdečním selháváním. V běžné klinické praxi se stanovuje BNP (brain natriuretic peptid) a NT-proBNP (N-terminální propeptid BNP). BNP se objevuje v krvi ve zvýšené koncentraci během několika minut. NT – proBNP se objevuje spolu s BNP, neboť vzniká odštěpením z preprohormonu proBNP při soudobém uvolnění BNP. (Zima, 2017)

## **2.4 Kreatinkináza**

Kreatinkináza je považována za časný marker infarktu myokardu. Tento enzym je ve velkém množství obsažen v kosterní svalovině, což snižuje specifčnost jeho stanovení. Z toho důvodu je potřeba mít na paměti, že zvýšená koncentrace kreatinkinázy vždy neznamená infarktové postižení myokardu, ale může poukazovat i na problém týkající se kosterní svaloviny (Racek et al., 2006).

## **2.5 Laktátdehydrogenáza**

Laktátdehydrogenáza je biochemický marker infarktu myokardu, který stoupá ze všech zmíněných markerů nejdéle. Nejvyšší koncentrace enzymu se v séru objevuje druhý až třetí den po ischemii myokardu. Zvýšenou hladinu je poté možné u pacienta pozorovat ještě 2 týdny. Stanovení tohoto markeru je velmi nespecifické, neboť se enzym vyskytuje ve všech tkáních. Pokud dojde k rozhodnutí, že se laktátdehydrogenáza bude stanovovat, je vhodné tento marker užít v pozdním období, kdy dojde ke zvýšení koncentrace v krvi, avšak ta se od normálních hodnot nijak výrazně neliší (Racek et al., 2006).



## **3 NOVÉ MARKERY OVĚŘOVANÉ V DIAGNOSTICE – MIKRORNA**

Přes zásadní přínos již používaných markerů jako je troponin, myoglobin, kreatin-kináza, laktátdehydrogenáza a natriuretické peptidy, je snaha nalézt další markery, které by vyplnily místo v diagnostice kardiovaskulárních chorob, kde stávající markery nejsou dostatečné. Jejich nedostatečnost je způsobena malými rozdíly mezi patologickými a fyziologickými hodnotami koncentrací a v mnohých případech dochází k velké prodlevě mezi vznikem onemocnění a uvolněním diagnostického markeru do krve.

### **3.1 MikroRNA**

MikroRNA (miRNA) jsou nekódující, 20–22 nukleotidů dlouhé, jednovláknové endogenní RNA, které mají schopnost regulovat genovou expresi (Sayed et al., 2014). Přestože jsou mikroRNA regulátory, tak i ony podléhají regulaci, jak na úrovni genové exprese, tak na úrovni jejich biogeneze (Slabý et al., 2012). Dosud bylo objeveno více než 2 500 lidských mikroRNA, u kterých se předpokládá, že jsou schopny regulovat stovky až tisíce genů (Buie et al., 2016). Je známo, že mikroRNA regulují třetinu všech genů u savců (Silva et al., 2018). Slabý et al. (2012) dokonce zmiňují, že mikroRNA mají potenciál regulovat více než polovinu lidských genů. MikroRNA jsou zapojena do mnoha dějů, mezi něž patří proliferace, sekrece, dále se účastní buněčného cyklu a apoptózy, migrace, diferenciaci, excitace a stárnutí (Sayed et al., 2014). Slabý et al. (2012) ještě zmiňují jejich roli v imunitním systému, nádorové transformaci a regulaci kmenových buněk. Byla zjištěna souvislost mezi expresí mikroRNA a mnoha onemocněními (Silva et al., 2018).

#### **3.1.1 Geny pro mikroRNA**

Geny pro mikroRNA jsou umístěny intergenově a jsou velmi vzdálené od známých a dobře definovaných transkripčních jednotek. Intergenová mikroRNA má transkripty o délce 3–4 kb, které jsou jasně vymezeny pomocí startujícího nukleotidu a pomocí poly(A)signálu (Slabý et al., 2012).

Padesát procent celkové mikroRNA tvoří intergenová mikroRNA v podobě klastrů. Uvnitř těchto shluků mohou být mikroRNA spřízněny, což ukazuje na vznik klastru pomocí duplikace genů. Pokud geny spřízněny nejsou, jde s velkou pravděpodobností o geny, které jsou funkčně spřízněné, nebo o geny mající stejné signální dráhy. Tyto klastry jsou buď

přepisovány jako polycistronní primární transkripty na jeden promotor, nebo jako monocistronní, kde má každá mikroRNA svůj promotor (Slabý et al., 2012).

Zhruba 40 % z celkové mikroRNA tvoří intronová mikroRNA. Nachází se v intronových oblastech genů pro kódující RNA, nebo v genech pro nekódující RNA. Intronové mikroRNA nacházející se v genomu, jak v klastech, tak samostatně, jsou přepisovány z promotoru hostitelského genu a zpracovávány klasickou cestou (Slabý et al., 2012).

Speciální situaci tvoří miRtrony, což jsou mikroRNA mající introny, které mají identickou sekvenci jako pre-miRNA se sestřihovými místy na obou koncích (Slabý et al., 2012).

Za nejvzácnější skupinu mikroRNA jsou považována exonová mikroRNA, kterou je možné nalézt na přechodu mezi intronem a exonem v genu pro nekódující RNA. MikroRNA jsou přepisovány z promotoru hostitelského genu a maturace těchto miRNA dokáže způsobit inaktivaci tohoto transkriptu (Slabý et al., 2012).

### **3.1.2 Kanonický model biogeneze mikroRNA**

MikroRNA jsou tvořeny z nekódujících transkriptů (Kumary et al., 2018). Geny kódující miRNA mají své vlastní promotory a přepis probíhá pomocí polymerázy II do primární miRNA (Slabý et al., 2012; Kumary et al., 2018). Tyto primární transkripty jsou sestřihovány na struktury, jež se podobají vlásence a jsou složeny zhruba ze sedmdesáti nukleotidů. Tímto sestřihem vzniká pre-miRNA, která se spojuje s ribonukleázou Drosha a proteinem Prosha, který váže dsRNA. Takto vzniklý multiproteinový komplex se označuje jako mikroprocesor (Slabý et al., 2012). Pre-miRNA jsou transportovány do cytoplazmy pomocí exportinu 5 (Slabý et al., 2012; Buie et al., 2016). Exportin 5 dokáže rozeznat 3' konec, který má dvounukleotidový přesah vytvořený endonukleázou Dicer. Tento přesah umožní rozvinutí miRNA na dva řetězce – na „guide strand“ a „passenger strand“. „Guide strand“ je včleněn do multiproteinového RISC komplexu, jehož centrální část je tvořena proteiny argonaut (1–4). „Passenger strand“ (miRNA\*) je degradován, protože geny pro miRNA jsou schopné vytvořit pouze jeden dominantní řetězec miRNA. Je známo, že poměr miRNA/miRNA\* se liší mezi tkáněmi nebo při nádorové transformaci. Tento poměr je regulován dostupností mRNA (Slabý et al., 2012).

MikroRNA, která byla zapojena do RISC komplexu, se navazuje na 3' UTR místa na mRNA, která regulují transport, účinnost translace, stabilitu a lokalizaci. Na 3' UTR oblast se napojuje mRNA spolu s regulačními proteiny, díky čemuž je umožněna dynamická regulace (Slabý et al., 2012).

MikroRNA mají schopnost inhibovat expresi genu na úrovni translace. Úplná komplementarita mezi miRNA a mRNA způsobuje degradaci mRNA. Naopak u neúplné komplementarity dochází k zabránění translace. Tento jev se objevuje u většiny živočišných buněk (Slabý et al., 2012).

Později bylo objeveno, že miRNA dokáže translaci nejen inhibovat, ale i aktivovat. Tento děj byl objeven u komplexu RISC v přítomnosti proteinu FXR1 při hladovění a zastavě buněčného cyklu (Slabý et al., 2012).

### **3.1.3 Stabilita a regulace mikroRNA**

MikroRNA je obecně považována za stabilní molekulu. Bylo zjištěno, že poločas miRNA v orgánech a liniích buněk je i několik hodin nebo dnů. Odbourávání probíhá pomocí endonukleázy XRN2 ve směru 5'–3'. Tento mechanismus není univerzální pro všechny miRNA, neboť mnoho z nich funguje na principu „on – off“, což znamená, že je pro ně velmi důležitý mnohem aktivnější a flexibilnější metabolismus (Slabý et al., 2012).

Obecný mechanismus regulace miRNA nebyl dosud objeven, avšak existuje předpoklad, že miRNA jsou regulovány pomocí blokace vazebných míst přítomných na mRNA. Tento děj je uskutečňován pomocí RNA–vazebných proteinů (Slabý et al., 2012).

Dalším úroveň regulace genové exprese probíhá v interakci miRNA s mRNA komplementárními úseky, nekódující RNA nebo pseudogeny. Dochází k ději, kdy kompetující endogenní RNA (ceRNA) reguluje hladinu transkriptu tím, že soutěží o vazbu s miRNA, která transkript posttranskripčně reguluje. Všechny transkripty mají jen jedno vazebné místo pro jednu miRNA a díky tomu se vytváří kompetenční síť ceRNA. U každé mRNA je možné najít její kompetenční síť a určit, jaké bude mít vlastnosti (Slabý et al., 2012).

## 3.2 MikroRNA spojené s rizikovými faktory KVO

*Tabulka 1: Změněná exprese mikroRNA v plazmě při rizikových faktorech kardiovaskulárního onemocnění (Buie et al., 2016).*

Rizikový faktor	Druh miRNA	Expese
Kouření tabáku	miR-126-3p	Zvýšená expese
	miR-126-5p	Zvýšená expese
	miR-223	Zvýšená expese
Hyperlipidemie	miR-122	Zvýšená expese
	miR-33a/b	Nezměněno

### 3.2.1 MikroRNA ve vztahu ke kouření

Expozice lidského organismu vůči tabáku je hlavním rizikovým faktorem vzniku kardiovaskulárního onemocnění, konkrétně ischemické choroby srdeční (Buie et al., 2016). V cigaretovém kouři se vyskytuje přes 4 800 chemických látek, které přispívají ke vzniku kardiovaskulárního onemocnění (Hoffmann et al., 2001; Buie et al., 2016).

Několik studií ukázalo, že kouření může přispět ke vzniku kardiovaskulárního onemocnění prostřednictvím změn v expresi mikroRNA. Díky těmto změnám nejsou mikroRNA schopny ochránit endoteliální bariéry před poničením pomocí zabránění cévní propustnosti a změny proliferace a produkce oxidu dusnatého (Buie et al., 2016).

#### **MiR-126**

V plazmě kuřáků a osob s kardiovaskulárním onemocněním byly objeveny zvýšené hladiny miR-126 a miR-126-5p (Buie et al., 2016). MiR-126 hraje roli ve vývoji cév a angiogenezi. Pokud dojde ke vzniku delece v miR-126, cévy se při vývoji nedokážou správně formovat (Buie et al., 2016; Li et al., 2016). Li et al. (2016) uvádí, že byla objevena snížená regulace u pacientů postižených infarktem myokardu. Velikost snížení regulace se mezi pacienty s kardiovaskulárními onemocněními liší, což je s velkou pravděpodobností způsobeno rozdílnou závažností onemocnění.

MiR-126-5p je možné detekovat v plazmě kuřáků (Buie et al., 2016). Li et al. (2016) uvádí, že snížená regulace této mikroRNA souvisí s vážností kardiovaskulárního onemocnění. Bylo zjištěno, že stupeň exprese byl výrazně nižší u pacientů s mnohočetným postižením věnčitých tepen oproti zdravým kontrolám. Avšak po zaměření na pacienty s jednostrannou ischemickou chorobou srdeční došlo ke zjištění, že se exprese oproti zdravým kontrolám téměř neliší. Kromě snížené regulace miR-126-5p způsobené kouřením, o které se zmiňuje Buie et al. (2016), ještě Li et al. (2016) dodávají, že snížená exprese může být způsobena i dislipidemií, diabetem nebo stárnutím. MiR-126-5p se dá využít jako biomarker pro kardiovaskulární onemocnění u pacientů se stabilní anginou pectoris (Li et al., 2016).

MiR-126-3p je cirkulující miRNA, která je uvolňovaná u kuřáků, je spojována s endoteliální disfunkcí a zánětem. Bylo zjištěno, že množství miR-126-3p je sníženo u pacientů s diabetem 2. typu oproti zdravým kontrolám. Snížené hodnoty byly objeveny i u pacientů s diabetem, kteří v minulosti prodělali akutní infarkt myokardu (Olivieri et al., 2015).

### **miR-223**

Gen pro miR-223 je umístěn na X chromozomu na lokusu v oblasti q12 (Buie et al., 2016). MiR-223 je spojována se zvýšenou expresí u kuřáků a je považována za prognostický marker smrti zapříčiněné srdečním selháním (Buie et al., 2016; Schulte, 2015). Tato mikroRNA hraje roli v proliferaci, remodelaci a migraci v rámci buněk hladké svaloviny v cévách. Proliferace buněk je charakteristická pro vznik aterosklerózy. Tento proces může být zapříčiněn zvýšenou expresí cirkulující miR-223 (Buie et al., 2016).

### **3.2.2 MikroRNA ve vztahu k hyperlipidemii**

HDL a LDL cholesterol jsou považovány za nejvýznamnější rizikové faktory vzniku kardiovaskulárního onemocnění. MiR-122 a miR-33 a/b jsou mikroRNA, které jsou spojovány s lipidovým metabolismem (Gao et al., 2012).

### **miR-122**

MiR-122 má schopnost regulovat geny, které ovlivňují oxidaci a syntézu mastných kyselin. Bylo zjištěno, že pokud dojde k umlčení miR-122, dojde k vzrůstu hladiny HDL i LDL cholesterolu v plazmě. Ve srovnání s kontrolními vzorky je exprese miR-122 u pacientů s hyperlipidemií zvýšena. Byla prokázána korelace mezi vzrůstem hladiny miR-122 v plazmě a závažností kardiovaskulárního onemocnění. Vyšší hladina miR-122 v plazmě

může být považována za rizikový faktor ischemické choroby srdeční. Na rozdíl od výše zmíněných příčin zvýšení koncentrace této miRNA byl u pacientů s akutním infarktem myokardu pozorován pokles hodnot exprese v plazmě oproti zdravým jedincům (Gao et al., 2012).

### **miR–33 a/b**

MiR–33 má dvě izoformy – miR–33a a miR–33b, které jsou schopny ovlivňovat geny spojené s lipidovým metabolismem a metabolismem HDL cholesterolu (Gao et al., 2012; Rotllan et al., 2016). Krom toho také regulují geny, které jsou zapojeny v oxidaci mastných kyselin (Rotllan et al., 2016). Buie et al. (2016) uvádí, že se miR–33a/b v plazmě vyskytuje, ale v nezměněné expresi, avšak Gao et al. (2012) říkají, že se miR – 33a/b v plazmě vůbec nevyskytuje.

### 3.3 MikroRNA podle KVO onemocnění

Některá mikroRNA jsou spojená s kardiovaskulárními onemocněními

Tabulka 2: Obvyklá mikroRNA v plazmě při kardiovaskulárních onemocněních (Sayed et al., 2014)

Druh onemocnění	Druh mikroRNA	Exprese
Akutní infarkt myokardu	miR-208b	Zvýšená exprese
	miR-499	Zvýšená exprese
	miR-1	Zvýšená exprese
	miR-133	Zvýšená exprese
	miR-30a	Zvýšená exprese
	miR-150	Snížená exprese
	Let-7b	Snížená exprese
	miR-126	Snížená exprese
Srdeční selhání	miR-423	Zvýšená exprese
	miR-18b	Zvýšená exprese
	miR-499	Zvýšená exprese
	miR-103	Snížená exprese
	miR-142	Snížená exprese
	miR-26b	Zvýšená exprese
Hypertenze	miR-296	Snížená exprese
	miR-133b	Snížená exprese
	miR-625	Snížená exprese
	miR-1236	Snížená exprese

	Let-7e	Zvýšená exprese
	Hcmv-miR-UL112	Zvýšená exprese
	miR-605	Zvýšená exprese
	miR-623	Zvýšená exprese
	miR-516b	Zvýšená exprese
	miRb-132	Zvýšená exprese
Mrtvice	miR-21	Zvýšená exprese
	miR-221	Snížená exprese
	miR-30a	Snížená exprese
	miR-126	Snížená exprese

### 3.3.1 MikroRNA ve vztahu k akutnímu infarktu myokardu

MiR-1, miR-133a, miR-208a/b a miR-499 bývají označovány jako kardiospecifické mikroRNA (Chistiakov et al., 2016).

#### **MiR-208b**

Zvýšená hladina exprese miR-208b je považována za marker infarktu myokardu a ukázalo se, že u infarktu bez ST elevací (NSTEMI) jsou efektivnějším ukazatelem (Zhou, 2017; Li, 2015). MiR-208 je kromě infarktu spojována i s přestavbou levé komory srdeční, ke které dochází po prodělání infarktu (Zhou, 2017). Hodnoty miR-208b v plazmě pacientů, u kterých dochází k remodelaci tkáně, jsou vyšší než u pacientů bez remodelace. Zvýšené hodnoty této mikroRNA jsou též spojeny se zvýšeným rizikem vzniku srdečního selhání. Vegter et al. (2016) říkají, že pokud dojde k aplikaci pomocného zařízení pro levou komoru, koncentrace miR-208 a s ní i miR-1 a miR-499 se v plazmě pacientů se srdečním selháváním sníží. MiR-208b má velký potenciál stát se biomarkerem přestavby levé komory srdeční u pacientů, kteří prodělali infarkt myokardu (Lv et al., 2014). Corsten et al. (2010) ještě ve svém výzkumu dokazují, že hodnoty miR-208 jsou v plazmě zvýšené při akutní fázi virové myokarditidy a korelují se závažností onemocnění.



### **MiR-499**

Bylo zjištěno, že u pacientů s akutním infarktem myokardu je koncentrace miR-499 10x vyšší než u kontrolních vzorků, kde je tato mikroRNA téměř nedetekovatelná. U pacientů, kteří prodělali akutní infarkt myokardu s ST elevacemi (STEMI), byla zjištěna vyšší koncentrace miR-499 než u pacientů bez ST elevací (NSTEMI). Hladina miR-499 vzrůstá v prvních hodinách po vzniku akutního infarktu myokardu. Bylo zjištěno, že pacienti, kteří prodělávají bolest na hrudi po dobu kratší než 3 hodiny, mají 93% pravděpodobnost, že je miR-499 zvýšena (Devaux et al., 2012). Tato kardiospecifická mikroRNA má velký potenciál stát se biomarkerem akutního infarktu myokardu (Oliviery, 2013).

### **MiR - 1**

MiR-1 je spojena s akutním infarktem myokardu. Pacienti postižení touto chorobou mají v plazmě zvýšené množství této mikroRNA. Bylo zjištěno, že největší množství miR-1 v plazmě, je kolem 9. dne po prodělání akutního infarktu myokardu. Poté koncentrace v průběhu času klesá, ale i po půl roce jsou hodnoty stále vyšší než u člověka, který AIM neprodělal. Mnoho studií také ukázalo, že je miR-1 začleněna i v procesu remodelace tkáně. MiR-1 je považována za biomarker akutního infarktu myokardu, ale není schopna předpovědět dlouhodobý vývoj tohoto onemocnění (Grabmaier, 2017). Tato mikroRNA je krom AIM spojena i se srdeční hypertrofií (Leung et al., 2017).

### **MiR-133**

MiR-133 je spojována s akutním infarktem myokardu, kde je její exprese v plazmě zvýšená (Sayed et al., 2014). Tato miRNA je také spojována se srdeční hypertrofií, kde vystupuje jako klíčový regulátor. Díky této vlastnosti by bylo možné ji použít k terapeutickým účelům týkajících se kardiovaskulárních onemocnění (Carè et al., 2007).

### **MiR-30**

MiR-30 podléhá zvýšené expresi u pacientů s akutním infarktem myokardu (Sayed et al., 2014). Forma miR-30a byla v minulosti spojována s hypertrofií srdeční svaloviny. Bylo zjištěno, že při srovnání vzorků plazmy pacientů s akutním infarktem myokardu a kontrolními vzorky, odebranými během 4 hodin od začátku projevů infarktu, se množství miR-30a mezi vzorky nelišilo. Avšak při měření po 4, 8 a 12 hodinách byl u pacientů s infarktem viditelný vzrůst miR-30, kdy po 12 hodinách vzrostla koncentrace miRNA v plazmě 10,48x.

Nejvyšší zjištěné hodnoty byly po 8 hodinách a korelovaly s koncentrací kardiálního tropoinu (Long et al., 2012).

### **miR–150**

MiR–150 je spojována s akutním infarktem myokardu, při kterém je její množství v plazmě postižených výrazně vyšší než u zdravých jedinců, díky čemuž je možné ho považovat za potencionální biomarker tohoto onemocnění. Bylo zjištěno, že tato mikroRNA má vyšší diagnostickou hodnotu u jedinců s NSTEMI infarktem myokardu. MiR–150 je možné považovat za brzký biomarker, neboť její koncentrace byla zvýšena maximálně 24 hodin od prvních projevů onemocnění (Zhang, 2015). Devaux et al. (2013) ještě uvádí, že je tato mikroRNA v malém cirkulujícím množství ukazatelem remodelace levé komory srdeční.

### **Let–7b**

Let–7b se v plazmě pacientů s akutním infarktem myokardu exprimuje ve sníženém množství. Jeden z výzkumů ukazuje, že při náběru po 4, 8, 12, 24, 48 a 72 hodinách a po jednom týdnu od začátku příznaků infarktu myokardu dochází ke snižování koncentrace o 96 %, 93 %, 94 %, 99 %, 99,5 %, 97,7 % a 97,4 % oproti zdravým kontrolním vzorkům (Long et al., 2012).

### **MiR–126**

MiR–126, která již byla zmíněno v souvislosti s kouřením, se objevuje v plazmě pacientů s akutním infarktem myokardu. Avšak v tomto případě je pozorována snížená exprese této mikroRNA (Sayed et al., 2014).

## **3.3.2 MikroRNA ve vztahu k srdečnímu selhání**

### **miR–423**

MiR–423–5p z rodiny miR–423 je spojována se srdečním selháním. Bylo zjištěno, že u pacientů, kteří prodělávají tuto událost, je vyšší množství miR–423–5p v plazmě oproti pacientům s jiným důvodem ztráty dechu a kontrolním vzorkům. Z toho je vyvozováno, že by miR–423–5P mohla být velmi dobrým diagnostickým biomarkerem selhávání srdce (Sayed et al., 2014). Naopak Ellis et al. (2014) ve svém výzkumu zjistili, že se při ROC analýze koncentrace miR–423–5p u postižených srdečním selháním oproti kontrolním vzorkům neliší. Srdeční selhání je spojováno s dilatační kardiomyopatií, která selhání předchází. MiR–

423–5p je v tomto případě také ve zvýšené koncentraci a koreluje s NT–proBNP. Díky tomuto faktu je možné miR–423–5p využít jako biomarker srdečního selhání, které je způsobeno dilatační kardiomyopatií (Fan et al., 2013).

#### **miR–18b**

MiR–18b je v plazmě zvýšená u pacientů se selháním srdce (Sayed et al., 2014).

#### **miR–499**

MiR–499 se u pacientů se selháním srdce objevuje ve zvýšeném množství (Vegter et al., 2016). Tato miRNA je také spojována s ischemií myokardu (Leung et al., 2017).

#### **MiR–103**

MiR–103 je u pacientů se selháním srdce méně exprimována než u zdravých osob. Tento typ mikroRNA není spojen jen se selháním srdce, ale i s lipidovým a pyruvátovým metabolismem a s odpovědí na hypoxii (Ellis et al., 2014).

#### **miR–142**

MiR–142–3p je spojována se srdečním selháním, při kterém se u pacientů objevuje snížená exprese této mikroRNA oproti zdravým jedincům (Vegter et al., 2016).

#### **miR–26b**

MiR–26b se objevuje v plazmě pacientů se srdečním selháním a podléhá zvýšené expresi (Sayed et al., 2014).

### **3.3.3 MikroRNA ve vztahu k hypertenzi**

#### **MiR–296**

Sayed et al. (2014) a Cengiz et al. (2015) říkají, že exprese miR–296–5p u pacientů s hypertenzí je významně snížena. Bylo zjištěno, že u pacientů trpících syndromem bílého pláště je zvýšená exprese miR–296 v plazmě. Dále bylo zjištěno, že miR–296–5p negativně koreluje se systolickým a diastolickým tlakem za 24 hodin (Cengiz et al., 2015).

### **miR–133b**

MiR–133b je spojována s pulmonální hypertenzí, která vede k mnoha úmrtím způsobeným pravostranným selháním srdce. U pacienti postižených tímto onemocněním je výrazně zvýšená exprese této mikroRNA. Bylo zjištěno, že u těžkých stavů onemocnění se objevuje zřetelnější zvýšení než u pacientů s lehčí formou onemocnění (Wei et al., 2013).

### **miR–625**

MiR–625 je spojována s esenciální hypertenzí (Natekar et al. 2014). Její hodnoty jsou měřitelné v plazmě, kde je u nemocných trpících hypertenzí nalezena snížená exprese této mikroRNA (Natekar et al. 2014; Sayed et al., 2014).

### **miR–1236**

MiR–1236 se stejně jako miR–625 spojována s esenciální hypertenzí (Natekar et al., 2014).

### **Let–7e**

Let–7e se vyskytuje u pacientů s hypertenzí, u kterých dochází ke zvýšení exprese této mikroRNA (Sayed et al. 2014, Romaine et al., 2016). Bylo zjištěno, že v plazmě u hypertenzních pacientů je 1,7x vyšší exprese Let–7e než u kontrolních vzorků. Stejně testování provedeno i u mononukleárních krevních buněk a nebyl zde pozorován rozdíl v expresi u pacientů a kontrolních vzorků (Bao et al., 2013).

### **Hcmv–miR–UL112**

Tento typ mikroRNA se objevuje v plazmě pacientů, kteří trpí esenciální hypertenzí, ve zvýšeném množství oproti zdravým jedincům (Sayed et al., 2014). Podle Li et al. (2011) se zvýšená exprese tohoto mikroRNA u zdravého pacienta dá považovat za faktor, který zvyšuje riziko vzniku esenciální hypertenze.

### **miR–605**

U pacientů s hypertenzí se objevuje vyšší exprese miR–605 než u kontrolních vzorků (Sayed et al., 2014). Avšak zvýšená exprese nekoreluje se systolickým ani diastolickým tlakem. Naopak korelace je zřejmá mezi tímto mikroRNA a hladinou cholesterolu pacientů.

MiR–605 nesouvisí tolik s esenciální hypertenzí, ale spíše s dyslipidemií (Badawy et al., 2018).

### **MiR–623**

Badawy et al. (2018) provedli výzkum, kde zkoumali vztah mezi expresí miRNA–623 a esenciální hypertenzí. Bylo dokázáno, že se u pacientů s hypertenzí objevuje mnohonásobně vyšší exprese této miRNA. Zároveň byla zjištěna negativní korelace mezi sérovou koncentrací HDL cholesterolu a koncentrací miRNA–623. Badawy et al. (2018) se shodují s názorem Sayeda et al. (2014), že je exprese miRNA–623 zvýšena u pacientů s hypertenzí. Avšak Badawy et al. (2018) poukazují na to, že zvýšená exprese mikroRNA je způsobena spíše dyslipidemií, která s hypertenzí souvisí.

### **MiR–516b**

Tato mikroRNA se vyskytuje v plazmě pacientů, kteří trpí esenciální hypertenzí, kde podléhá zvýšené expresi (Sayed, 2014).

### **MiR–132**

Tento typ mikroRNA se vyskytuje v patientské plazmě ve zvýšeném množství, pokud trpí esenciální hypertenzí (Sayed et al., 2014).

## **3.3.4 MikroRNA ve vztahu k mrtvici**

### **MiR–21**

MiR–21 se objevuje v plazmě pacientů s mrtvicí ve zvýšeném množství oproti zdravým kontrolám (Sayed et al., 2014). Výzkumy ukazují i na spojitost této mikroRNA s vývojem ischemické cévní mozkové příhody (Xiang et al., 2017).

### **MiR–221**

Sørensen et al. (2014) stejně jako Sayed et al. (2014) konstatují, že je miR–221 detekována u pacientů postižených mrtvicí ve zvýšené koncentraci. Peng et al. (2020) ve své práci uvádí, že tato mikroRNA má potenciál stát se terapeutickým cílem při léčbě cévní mozkové příhody, která je způsobena ischemií.

### **MiR–30a**

MiR–30a se vyskytuje v plazmě pacientů s cévní mozkovou příhodou ve sníženém množství. Výzkumy ukazují, že je tato mikroRNA detekovatelná ve sníženém množství ještě 24 týdnů po cévní mozkové příhodě. MiR–30a má potenciál stát se biomarkerem cévní mozkové příhody (Long et al., 2013).

### **MiR–126**

Tato mikroRNA se objevuje v plazmě pacientů s cévní mozkovou příhodou způsobenou ischemií stejně jako miR–30a. U pacientů s tímto onemocněním je detekováno ve sníženém množství oproti zdravým kontrolním vzorkům. Snížené množství této miRNA je možné v plazmě detekovat ještě 24 týdnů po cévní mozkové příhodě (Long et al. 2013).

## 4 METODY IZOLACE MIKRORNA

Pro molekulárně biologickou detekci biomarkerů z rodiny ncRNA je klíčová izolace těchto nukleových kyselin. Dříve se pro izolaci nukleových kyselin používaly biochemické metody založené na separaci pomocí organických látek. Konkrétně fenolu, chloroformu a ethanolu (Slabý et al., 2015). Tyto metody mají jednu obrovskou nevýhodu a tou je jejich časová náročnost, díky které byly v rutinní praxi nahrazeny kity založenými na izolaci nukleových kyselin na SO<sub>2</sub> filtrech (doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D., *in verb*).

Nejčastěji je izolována celková RNA, která zahrnuje mRNA, tRNA, rRNA a krátké typy RNA. Pokud je potřeba, je možné izolovat jen mRNA, která tvoří pouze 1 – 5 % celkové RNA (Labguide).

V současnosti je RNA izolována pomocí dvou metodických přístupů. První je založen na schopnosti nukleových kyselin navázat se na SiO<sub>2</sub>. Dochází k lýzi vzorku a zachycení nukleových kyselin na vrstvě SiO<sub>2</sub> na kolonce. Dochází k proplachování a následně k uvolnění čisté nukleové kyseliny do roztoku, který má nízkou iontovou sílu (Slabý et al., 2015).

Druhý přístup, ne tak hojně využívaný, je založen na použití magnetických kuliček, které se díky specifickým anti–NK protilátkám navazují na nukleové kyseliny. Kuličky jsou propláchnuty ve speciálních proplachovacích roztocích s využitím magnetu a následně jsou nukleové kyseliny eluovány do speciálního roztoku (Slabý et al., 2015).

Průša (1998) uvádí ještě možnost izolace RNA pomocí ultracentrifugace v CsCl, která proběhne po poničení buněčných membrán pomocí guanidinthiokyanátu a fenolu v nízkém pH prostředí. Tento metodický přístup se však v praxi téměř nepoužívá.

V současnosti jsou velice často používány kity pro izolaci od firem Qiagen, Abbott, Roche Cobas, Macherey–Nagel nebo Siemens. Laboratoře, jež zpracovávají velké množství vzorků stejného typu volí právě tyto kity, které jsou standardizované a je možné jejich použití automatizovat. Tyto soupravy bývají validovány přímo na použití konkrétního typu PCR (Slabý et al. 2015).

Senzitivita molekulárně biologických metod detekce miRNA je velmi ovlivněna již právě při izolaci nukleových kyselin. Vstupní objemy vzorku jsou od 50 µL do 1 400 µL a výsledný objem eluátu se pohybuje od 25 do 200 µL. Platí pravidlo, že čím větší je poměr

mezi objemem vstupního vzorku a eluátu, tím více nukleových kyselin bude ve vzorku. Tím se zvyšuje pravděpodobnost nalezení hledané struktury (Slabý et al., 2015).

#### **4.1 Izolace pomocí souprav**

Pro izolaci našeho souboru krví pacientů s KVO byla vybrána souprava miRNeasy Serum/Plasma Kit od firmy Qiagen (Hilden, Německo). Souprava je používána k izolaci obohacené RNA z plazmy, séra a jiných tělních tekutin, jež neobsahují buňky. Pokud dochází k izolaci RNA a DNA současně, je vhodné přidat enzym DNázu. Není nutné používat čerstvé vzorky, ale lze použít i zmražené, avšak je nutné, aby nebyly rozmrazovány více než jednou (Qiagen, 2016).

Tato technologie je velmi dobře zavedená zejména pro izolaci DNA z plné krve a je ideální pro izolaci více vzorků najednou. Pokud je potřeba, je možné tuto technologii zcela zautomatizovat (Qiagen, 2016).

Izolace RNA je spojena s problémem aktivity RNáz, které se do vzorku nejčastěji dostávají z vlastního izolovaného vzorku. Kromě toho se mohou do vzorku dostat z prachových částic nebo rukou, proto je velmi důležité používat latexové nebo vinylové rukavice bez pudru. Dále je také vhodné vzorky zavírat víčky vždy, když je to možné a pracovat co nejrychleji. Dodržování těchto pravidel dokážeme aktivitu ribonukleáz eliminovat. Dalším z bezpečnostních postupů je používání jednorázových plastových zkumavek, které jsou „RNase-free“ a není potřeba žádné ošetření k odstranění těchto enzymů. Skleněné nádoby podléhají pečlivému očištění pomocí detergentu – dojde k „vypálení“ v autoklávu při více než 240 °C po dobu nejméně 4 hodin. Pokud není možné použít vypalování, je možné skleněné pomůcky ponořit do 0,1% diethyl pyrokarbonátu (DEPC) na 12 hodin při 37 °C a poté použít autokláv nebo sklo zahřát na 100 °C na 15 minut. Tímto úkonem dojde k odstranění zbytkového DEPC (Qiagen, 2016).

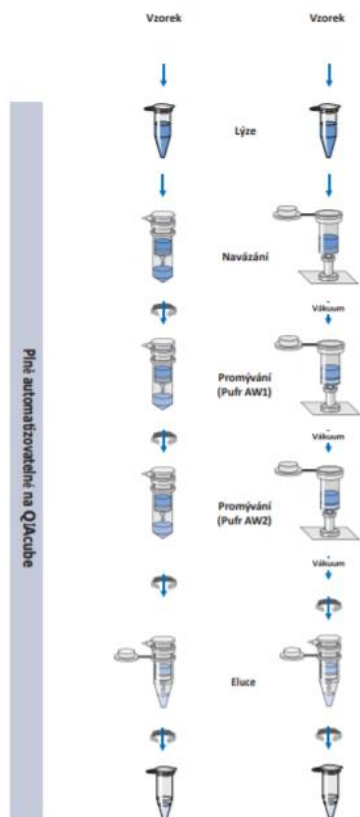
Stejně jako plastový a skleněný materiál musí být proti RNázám ošetřeny i roztoky. Používá se stejně jako u nádob DEPC v 0,1% koncentraci. Jedná se velmi silný inhibitor RNáz, avšak není schopen jejich absolutní inaktivace. Problémem je použití velmi nestabilního DEPC spolu s tris pufry, díky nimž se přeměňuje na oxid uhličitý a ethanol (Qiagen, 2016).

Vzorek se nejdříve zlyzuje při podmínkách, které dovolí silnou denaturaci. Tento úkon zajistí inaktivaci RNáz. Dále je potřeba upravit vlastnosti pufrů tak, aby měly ideální



vlastnosti a dokázaly umožnit vazbu RNA na membránu po umístění vzorku na kolonku. RNA se váže na kolonku a kontaminanty jsou odstraněny pomocí dvou různých pufrů. Získaná kvalitní RNA je eluována ve speciálním pufru, který neobsahuje RNázy. Takto připravená RNA je vhodná, jak pro okamžité použití, tak i pro skladování (Qiagen, 2016).

Obrázek 1: Postup izolace pomocí soupravy QIAGEN miRNeasy Serum/Plasma Kit.



## 5 METODY STANOVENÍ MIKRORNA

Při stanovování miRNA je velmi důležité zvolit metodu podle toho, zda chceme stanovit jen několik mikroRNA, nebo velký počet mikroRNA. V současnosti je zlatým standardem stanovení jedné až desítek miRNA pomocí kvantitativní RT-PCR (doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D., *in verb*).

### 5.1 Stanovení jednotek mikroRNA

Pro stanovení malého počtu mikroRNA je možné použít mnoho metod, jako jsou northern blot, in situ hybridizace nebo kvantitativní RT real-time PCR (Slabý et al., 2012).

#### 5.1.1 Kvantitativní real-time PCR

Kvantitativní RT-PCR může mít různé modifikace a je velmi často užívanou metodou pro stanovení malého počtu miRNA. Krom možnosti mnohých modifikací je nespornou výhodou tohoto stanovení vysoká citlivost (Slabý et al., 2012).

Pokud stanovujeme mikroRNA pomocí qRT-PCR, je potřeba tuto metodu modifikovat, protože vlákno mikroRNA je příliš krátké pro standardní postup, kdy jsou primery stejně dlouhé jako maturované miRNA. Z tohoto důvodu vzniklo několik postupů, které jsou založeny na prodloužení templátu miRNA při reverzní transkripci nebo je možné chemicky modifikovat běžné primery, které jsou díky tomuto postupu specifitější u homogenních miRNA (Slabý et al., 2012).

V současné době se používají dva postupy stanovení miRNA pomocí qRT-PCR. Prvním z nich je postup firmy Life Technologies, který je založený na použití vlásenkového primeru během reverzní transkripce. Tento postup vede k prodloužení miRNA na takovou velikost, díky které je možné amplifikaci provést pomocí jednoho univerzálního, jednoho specifického primeru a jedné specifické sondy založené na detekčním systému TaqMan. Assaye jsou schopné od sebe odlišit mikroRNA, které se liší, byť jen v jediném nukleotidu (Slabý et al., 2012).

Druhou možností stanovení mikroRNA je metoda založená na polyadenylaci mikroRNA, která probíhá ještě před reverzní transkripcí. RNA, jež je obohacena o krátké RNA je přepsána do cDNA, která je pomocí specifických primerů kvantifikována (Slabý et al., 2012).

## **5.2 Stanovení stovek až tisíců mikroRNA**

Vysokokapacitní analýzy umožňují detekovat veškeré mikroRNA, které je přítomné v buňkách vzorku (Slabý et al., 2012).

### **5.2.1 MiRNA microarray**

MiRNA microarray technologie je založena na hybridizaci, kdy jsou miRNA sondy přichyceny na podložní sklo. Poté dochází k hybridizaci miRNA, která je předem označena fluorescenční barvou, spolu se sondami, které jsou imobilizovány na určených pozicích. Poté je možné pomocí fluorescenčního signálu vyhodnocovat přítomnost miRNA a jejich množství (Slabý et al., 2012).

### **5.2.2 Next generation sequencing**

Sekvenování nové generace má v současné době své nezastupitelné místo ve výzkumu a praxi. Hlavní myšlenka tohoto postupu je masivní paralelní sekvenování, při kterém dochází k sekvenování velkého množství molekul (Krejčí et al., 2015). Výhodou sekvenování nové generace je fakt, že nám nenabízí pouze informaci o sekvenci nukleotidů, ale i informace o absolutním množství miRNA (Slabý et al., 2012). Nevýhodou je v současnosti vyšší cena oproti předchozím metodám (doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D., *in verb*).

# PRAKTICKÁ ČÁST

## 6 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

### 6.1 Hlavní cíl

Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda je možné použít plazmu získanou z plné krve (odebrané do zkumavky K<sub>3</sub>EDTA) pro izolaci nukleových kyselin (RNA) a získat dostatečné množství a čistotu RNA pro stanovení biomarkerů ze skupiny miRNA u pacientů s KVO v dostatečném množství tak, aby bylo možno provést stanovení biomarkerů ze skupiny miRNA u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním.

Pro izolaci byla použita souprava firmy QIAGEN miRNeasy Serum/Plasma Kit (Hilden, Německo). Parametry izolované RNA (koncentrace a čistota) byly měřeny na přístroji Nanodrop 1000 od Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

### 6.2 Dílčí cíle

1. Izolovat celkovou RNA s obohacenou frakcí miRNA z plazmy plné krve (zkumavka K<sub>3</sub>EDTA) pacientů s kardiovaskulárním onemocněním.
2. Změřit koncentraci celkové RNA a vypočítat výtěžek.
3. Vyhodnotit čistotu izolované RNA.

## **7 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY**

Molekuly miRNA využitelné jako biomarkery kardiovaskulárních onemocnění by neměly být přítomné v krvi zdravých osob, nebo přítomny pouze v minimální hladině. Aby byly tyto biomarkery užitečné, je nutné abychom byli schopni je izolovat z plné krve již při jejich velice nízké koncentraci. Z toho důvodu je důležité, aby byl výtěžek izolačních metod co nejvyšší a čistota, resp. kvalita, izolovaných miRNA dostačující pro analytické metody. Dále v textu jsou uvedeny minimální hodnoty výtěžků a ideální hodnoty čistoty pro stanovení miRNA z plazmy metodami založenými na RT real-time PCR. S tímto problémem koresponduje i hlavní cíl mé bakalářské práce.

## **8 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU**

Pro bakalářskou práci bylo použito 503 vzorků plazmy připravených z plné krve pacientů Kardiologické kliniky FN a LF Plzeň. Jednalo se o muže i ženy, kteří jsou pacienti této kliniky z důvodu kardiovaskulárního onemocnění. Vzorky byly odebrány osobám, které v minulosti prodělaly KVO a u kterých tak existuje pravděpodobnost recidivy tohoto onemocnění.

Tyto vzorky byly anonymizovány a následně izolovány na Ústavu biologie Lékařské fakulty v Plzni. U 508 izolovaných vzorků (u pěti vzorků byla izolace provedena 2x) bylo provedeno celkem 521 spektrofotometrických stanovení koncentrace izolované RNA. Vzorky u nichž bylo podezření na nesprávný průběh měření (kyveta nebyla zcela zasunuta), bylo měření opakováno.

## 9 METODIKA PRÁCE

Byl použit standardní postup pro izolaci miRNA ze séra/plazmy kolonkovou metodou pomocí QIAGEN miRNeasy Serum/Plasma Kit.

1. Plazmu rozmrazit a 30 s pečlivě vortexovat. Následně umístit do centrifugy a stočit 10 min. při 11 000 otáčkách a 4°C.
2. Do 1,5 ml *epe* odebrat 200 µL plazmy a přidat pětinasobné množství (tj. 1 mL) QIAzol Lysis Reagent.
3. Následně 30 s míchat na vortexu a 5 min. nechat stát při pokojové teplotě.
4. Do vzorku přidat 3,5 µL naředěné miRNeasy Serum/Plasma Spike – In Control.
5. Přidat chloroform v objemu vstupního vzorku plazmy – 200 µL, nabrat kubíkovou pipetou. Vše pečlivě a prudce 20 s vortexovat.
6. Vzorky nechat inkubovat cca 3 minuty při pokojové teplotě.
7. Zkumavky umístit do centrifugy vychlazené na 4 °C a centrifugovat při 14 000 otáčkách po dobu 15 minut.
8. Do 2 ml *epe* přenést 650 µL vrchní vrstvy vzorku. Pečlivě odebrat bez mezifáze. K 650 µL přidat 975 µL (1,5 násobek) 100% ethanolu.
9. Horní fázi kapalného obsahu zkumavku spolu s ethanolem promíchat.
10. Na kolonku, která je umístěna na 2 ml *epe* bez víčka, přenést 550 µL vzorku. Následně vzorek centrifugovat při 10 000 otáčkách 30 s při pokojové teplotě. Přefiltrovaný vzorek vylít, *epe* usušit a znovu na původní kolonku napipetovat 550 µL vzorku.
11. Filtrování proběhne 3x – dokud není všechen vzorek přefiltrován.
12. Napipetovat 700 µL RWT na kolonku a centrifugovat při 10 000 otáčkách na 30 s při pokojové teplotě. Odpad byl po profiltrování vylít a *epe* usušit.
13. Na kolonku přidat 500 µL RPE, centrifugovat při 10 000 otáčkách po dobu 30 s při pokojové teplotě. Odpad vylít a *epe* usušit.

14. Přidat 500  $\mu\text{L}$  80% ethanolu a centrifugovat při 10 000 otáčkám po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Kolonku nevytlívat, nahýbat, *epe* vyhodit.
15. Kolonky přemístit na čisté 2 ml *epe* a centrifugovat – „sušit“, při maximálních otáčkách 5 minut při pokojové teplotě.
16. Kolonku přemístit na 1,5 ml *epe* s víčky, do kolonky napipetovat 25  $\mu\text{L}$  RNase-free vody. Pipetovat přesně na střed membrány. Kolonky nechat 5 minut stát při pokojové teplotě a následně 75 s centrifugovat při maximálních otáčkách.
17. Eluát zpět napipetovat na membránu kolonky a znovu zcentrifugovat za stejných podmínek.
18. Koncentrace miRNA následně změřit na přístroji Nanodrop 1 000. Jedná se o spektrofotometrické stanovení, kdy je přístroj propojen s počítačem, kam jsou přenášeny výsledky. Následně naměřené hodnoty vzorků přepsat do excelu, vypočítat potřebné hodnoty.



## 10 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Naměřené hodnoty vzorků byly rozděleny do několika skupin a poté byly v těchto skupinách určeny střední hodnoty. Sledovala se absorbance při 260 nm a 280 nm. Tyto hodnoty umožňují určit koncentraci izolované RNA a poměr těchto absorbancí určuje čistotu vzorku. Chemikálie použité pro izolaci vzorků a některé látky obsažené v izolovaných vzorcích (např. hemoglobin) absorbují záření v uvedených vlnových délkách zejména při 280 nm. Proto poměr těchto hodnot ukazuje na čistotu izolovaného vzorku. V ideálním případě by měla být čistota rovna 2, ale hodnoty od 1,8 do 2 jsou dostačující. Pokud jsou získané hodnoty čistoty nižší než 1,8, je zřejmé, že je vzorek kontaminovaný např. proteiny (Zvárová et al., 2012). Neznamena to však, že by tento vzorek nemohl být použit pro stanovení biomarkerů, zejména pokud je ve vzorku dostatečná koncentrace miRNA (více než 15 ng/μL) (doc. RNDr. Martin Pešta, Ph.D., *in verb*).

Dále byla sledována koncentrace RNA v ng/μL, která byla měřena spektrofotometrem Nanodrop 1000, který dokáže tuto koncentraci stanovit v objemu jednoho μL. Následně byla tato koncentrace přepočítána na celkovou koncentraci celého roztoku v ng, který byl v objemu 25 μL.

U každé z výše sledovaných hodnot byla vždy vypočítána pomocí programu Excel střední hodnota, kolik vzorků mělo vyšší a nižší hodnotu než střední a následně byla přepočítána na procenta, bylo určeno, jaká hodnota výsledku byla nejnižší (minimum) a nejvyšší (maximum).

Ve výsledkové části zabývající se čistotou vzorků bylo také, kromě výše zmíněných hodnot, zjišťováno, kolik vzorků není dostatečně čistých, kolik vzorků má hodnotu čistoty mezi 1,8 – 2 a kolik vzorků má čistotu vyšší než 2. Tyto hodnoty byly následně přepočítány na procenta.

Ve výsledkové části pojednávající o výtěžnosti je kromě výše zmíněných sledovaných hodnot uvedeno, kolik vzorků má hodnotu vyšší než 15 ng/μL, což je ideální výsledek, a kolik vzorků má výtěžnost nižší než 15 ng/μL. Tyto hodnoty byly přepočítány na procenta.

### 10.1 Celkové výsledky (všechny izolované a měřené vzorky)

Pro izolaci RNA bylo použito 503 vzorků. Bylo provedeno 508 izolací a 521 izolací z tohoto materiálu. Tabulka obsahuje 508 měření, u opakovaných hodnot měření byla vzata poslední hodnota měření.

Tabulka 3: Zjištěné hodnoty sledovaných údajů všech izolovaných a měřených vzorků.

Sledované hodnoty	Zjištěný medián hodnot
Měření absorbance při 260 nm	0,4185
Měření absorbance při 280 nm	0,287
Poměr absorbance 260/280 nm	1,47
Získaná koncentrace v ng/μL	16,985 ng/μL
Celková výtěžnost	424,625 ng
Množství vzorku	25 μL

#### 10.1.1 Měření absorbance při 260 nm

Tabulka 4: Hodnoty sledovaných údajů všech izolovaných a měřených vzorků při absorbanci 260 nm.

	Získané hodnoty	Procentuální hodnocení
Medián	0,4185	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	0	0 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	254	50 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	254	50 %
Minimální hodnota	0,189	
Maximální hodnota	2,101	

Medián všech hodnot měřených při 260 nm byl 0,4185. Pomocí programu Excel bylo zjištěno množství vzorků, které se shodují s výsledkem mediánu veškerých měření absorbance při 260 nm. Následně byly výsledky přepočítány na procentuální zhodnocení a bylo zjištěno, že se 50 % výsledků pohybuje pod hodnotou mediánu. Zbýlých 50 % výsledků je vyšších než medián. Žádný z výsledků se neshodoval s vypočteným mediánem hodnot. Minimální hodnota absorbance byla 0,189 a naopak nejvyšší 2,101.

### 10.1.2 Měření absorbance při 280 nm

*Tabulka 5: Hodnoty sledovaných údajů všech izolovaných a měřených vzorků při absorbanci 280 nm.*

	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	0,287	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	3	0,59 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	252	49,61 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	253	49,80 %
Minimální hodnota	0,111	
Maximální hodnota	1,438	

Medián hodnot absorbance zjištěný při 280 nm byl 0,287. Ze všech měření tvořilo 49,61 % výsledků skupinu s nižší hodnotou, než byla hodnota mediánu. Tato skupina obsahovala 252 vzorků. Naopak vyšší hodnoty, než medián, byly zjištěny u 253 vzorků, které tvořily 49,80 %. Hodnota mediánu se shodovala se třemi výsledky, které tvořily 0,59 % vzorků. Nejnižší naměřená hodnota je 0,111 a naopak nejvyšší 1,438.

### 10.1.3 Poměr absorbancí 260/280 nm

Tabulka 6: Hodnoty sledovaných údajů všech izolovaných a měřených vzorků při poměru absorbancí 260/280 nm.

	Získané hodnoty	Procentuální hodnocení
Medián	1,47	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	16	3,15 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	239	47,05 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	253	49,80 %
Minimální hodnota	0,67	
Maximální hodnota	2,9	
Počet vzorků, jejichž čistota byla pod 1,8	493	97,04 %
Počet vzorků, jejichž čistota byla od 1,8 do 2,0	12	2,36 %
Počet vzorků, jejichž čistota byla vyšší než 2,0	3	0,59 %

Hodnota mediánu zjištěná u poměru absorbancí 260/280 nm byla 1,47. Nižší výsledky, než je mediánová hodnota, byly zjištěny u 239 vzorků, které tvořily 47,05 % a vyšší výsledky byly zjištěny u 253 vzorků, které tvořily 49,80 % případů. Bylo nalezeno 16 vzorků, které měly hodnotu odpovídající mediánu. Tyto vzorky tvořily 3,15 %. Nejnižší hodnota v souboru výsledků je 0,67 a nejvyšší 2,9. Vzorky jejichž čistota byla nižší než 1,8 bylo 493 a tvořily 97,04 %. Zbýlých 15 vzorků bylo vyšších než 1,8. Dvanáct z nich se pohybovalo v rozmezí hodnot 1,8–2,0. Tyto vzorky tvořily 2,36 %. Zbýlé 3 vzorky měly hodnotu čistoty vyšší než 2 a tvořily 0,59 %.

#### 10.1.4 Získaná koncentrace v ng/ $\mu$ L

Tabulka 7: Hodnoty sledovaných údajů koncentrací v ng/  $\mu$ L všech izolovaných a měřených vzorků.

	Získané hodnoty	Procentuální hodnocení
Medián	16,985 ng/ $\mu$ L	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	0	0 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	254	50 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	254	50 %
Minimální hodnota	7,55 ng/ $\mu$ L	
Maximální hodnota	84,06 ng/ $\mu$ L	
Počet vzorků s výtěžností nižší než 15 ng/ $\mu$ L	184	36,22 %
Počet vzorků s výtěžností vyšší než 15 ng/ $\mu$ L	324	63,78 %

Zjištěná koncentrace mediánu byla 16,985 ng/ $\mu$ L. Nižší koncentrace byly zjištěny u 254 vzorků a tvořily 50 %. Vyšší koncentrace byly též zjištěny u 254 vzorků, jež tvořily 50 %. Žádný z výsledků se neshodoval s mediánem. Minimální naměřená hodnota je 7,55 ng/ $\mu$ L a maximální hodnota je 84,06 ng/ $\mu$ L.

Počet vzorků, u kterých byla výtěžnost nižší než 15 ng/ $\mu$ L byl 184 a tvořil 36,22 %. Naopak vyšší výtěžnost byla zaznamenána u 334 vzorků, které tvořily 63,78 %.

### 10.1.5 Celková výtěžnost RNA

Tabulka 8: Hodnoty sledovaných údajů celkových výtěžností RNA v ng všech izolovaných a měřených vzorků.

	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	424,625 ng	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	0	0 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	254	50 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	254	50 %
Minimální hodnota	188,75 ng	
Maximální hodnota	2101,5 ng	

Celková výtěžnost RNA ze vzorků tvořila podle mediánu 424,625 ng. Stejně jako u koncentrace vztažené na 1  $\mu\text{L}$  i u celkové výtěžnosti byly výsledky s nižší hodnotou ve stejném procentuálním zastoupení a to u 254 vzorků, které tvoří 50 %. Vyšší hodnoty byly zjištěny také u 254 vzorků, které tvořily 50 %. Žádný ze vzorků se nerovnal hodnotě mediánu. Minimální hodnota byla 188,75 ng a maximální hodnota byla 2101,5 ng.

## 10.2 Výsledky opakovaně izolovaných vzorků

Tabulka 9: Mediánové hodnoty sledovaných údajů získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.

Sledované hodnoty první izolace	Zjištěný medián hodnot
Měření absorbance při 260 nm	1,103
Měření absorbance při 280 nm	0,922
Poměr absorbancí 260/280 nm	1,395
Získaná koncentrace v ng/μL	44,11 ng/μL
Celková výtěžnost	1102,75 ng
Množství vzorku	25 μL

Tabulka 10: Mediánové hodnoty sledovaných údajů získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.

Sledované hodnoty druhé izolace	Zjištěný medián hodnot
Měření absorbancí při 260 nm	0,352
Měření absorbancí při 280 nm	0,23
Poměr absorbancí 260/280 nm	1,53
Získaná koncentrace v ng/μL	14,07 ng/μL
Celková výtěžnost	351,75 ng
Množství vzorku	25 μL

Při první izolaci bylo použito 5 vzorků, ale bylo provedeno 6 měření, neboť byl vzorek č. 17113 měřen dvakrát. Proto bylo počítáno se šesti hodnotami. Naopak u izolace stejných vzorků, jejichž izolace byla provedena podruhé, se každý vzorek měřil pouze jednou, proto jsme pracovali jen s pěti hodnotami.

### 10.2.1 Měření absorbance při 260 nm

Tabulka 11: Hodnoty sledovaných údajů získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření absorbance při 260 nm.

První izolace	Získané hodnoty	Procentuální hodnocení
Medián	1,103	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	0	0 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	3	50 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	3	50 %
Minimální hodnota	0,66	
Maximální hodnota	1,517	

Při první izolaci byla naměřena vyšší hodnota absorbance při 260 nm než medián u 3 výsledků, které tvořily 50 %. Zbylé 3 vzorky, které také tvořily 50 % výsledků, měly nižší hodnoty, než byl medián. Medián vzorků zjištěný po první izolaci byl 1,103. Žádný ze vzorků neodpovídal hodnotě mediánu. Minimální hodnota byla 0,66 a maximální hodnota byla 1,517.



*Tabulka 12: Hodnoty sledovaných údajů získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření absorbance při 260 nm.*

<b>Druhá izolace</b>	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	0,352	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	1	20 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	2	40 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	2	40 %
Minimální hodnota	0,237	
Maximální hodnota	0,839	

Stejně jako u první izolace, i u byly vzorky rozděleny stejnoměrně. V tomto případě tvořily nižší hodnoty 40 %, stejně jako vyšší hodnoty. Jeden ze vzorků se svou hodnotou shodoval s mediánem a tvořil 20 %. Medián vzorků po druhé izolaci se s výsledkem 0,352 od první izolace velmi lišil. Minimální hodnota výsledků byla 0,237 a nejvyšší byla 0,839.

### 10.2.2 Měření absorbancí při 280 nm

Tabulka 13: Hodnoty sledovaných údajů získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření absorbance při 280 nm.

<b>První izolace</b>	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	0,922	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	0	0 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	3	50 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	3	50 %
Minimální hodnota	0,74	
Maximální hodnota	1,345	

Při měření vzorků při 280 nm bylo zjištěno, že se pro první izolaci vzorky rozdělily na polovinu. Výsledky byly ve dvou případech vyšší než medián a tvořily 50 %. Nižší hodnoty byly zjištěny také u dvou vzorků, které tvořily 50 %. Medián měřených vzorků při 280 nm byl 0,922. Minimální hodnota výsledku byla 0,74 a maximální byla 1,345.

Tabulka 14: Hodnoty sledovaných údajů získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření absorbance při 280 nm.

<b>Druhá izolace</b>	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	0,23	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	1	20 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	2	40 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	2	40 %
Minimální hodnota	0,162	
Maximální hodnota	0,539	

U druhé izolace bylo zjištěno, že vyšší absorbance, než je medián, se vyskytovala u dvou vzorků, které tvořily 40 % a nižší výsledky byly také zastoupeny dvěma vzorky, jež tvořily 40 %. Medián vzorků měřených absorbancí při 280 nm byl 0,23 a jeden ze vzorků měl stejnou hodnotu, tvořil tak 20 % výsledků. Minimální zjištěná hodnota byla 0,162 a maximální zjištěná hodnota byla 0,539.

### 10.2.3 Poměr absorbancí 260/280 nm

Tabulka 15: Hodnoty sledovaných údajů získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření poměru absorbancí 260/280 nm.

První izolace	Získané hodnoty	Procentuální hodnocení
Medián	1,395	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	0	0 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	3	50 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	3	50 %
Minimální hodnota	0,67	
Maximální hodnota	1,43	
Počet vzorků, jejichž čistota byla pod 1,8	6	100 %
Počet vzorků, jejichž čistota byla od 1,8 do 2,0	0	0 %
Počet vzorků, jejichž čistota byla vyšší než 2,0	0	0 %

Při sledování poměru absorbancí 260/280 nm bylo u první izolace zjištěno, že 3 vzorky tvořící 50 % měly vyšší hodnotu, než je medián. Zbylé 3 vzorky, které tvořily také 50 % měly nižší hodnoty než medián vzorků, který byl 1,395. Minimální hodnota výsledku byla 0,67 a maximální 1,43. Všechny měřené vzorky měly čistotu nižší než 1,8.

Tabulka 16: Hodnoty sledovaných údajů získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků při měření poměru absorbancí 260/280 nm.

<b>Druhá izolace</b>	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	1,53	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	1	20 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	2	40 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	2	40 %
Minimální hodnota	1,46	
Maximální hodnota	1,8	
Počet vzorků, jejichž čistota byla pod 1,8	4	80 %
Počet vzorků, jejichž čistota byla od 1,8 do 2,0	1	20 %
Počet vzorků, jejichž čistota byla vyšší než 2,0	0	0 %

Při druhé izolaci byly 2 vzorky nižší než hodnota mediánu a tvořily 40 %. Vyšších hodnot, než je medián, dosáhly 2 vzorky, které tvořily 40 %. Jeden ze vzorů se shodoval s mediánem a tvořil 20 %. Medián výsledků byl 1,53. Minimální hodnota byla 1,46 a maximální hodnota 1,8. Čistota vzorků pod 1,8 byla zjištěna u 4 vzorků, které tvořily 80 %. U jednoho vzorku byla zjištěna hodnota 1,8 a tvořil 20 %.

#### 10.2.4 Získaná koncentrace v ng/ $\mu$ L

Tabulka 17: Hodnoty sledovaných údajů zjištěné koncentrace v ng/ $\mu$ L získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.

První izolace	Získané hodnoty	Procentuální hodnocení
Medián	44,11 ng/ $\mu$ L	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	0	0 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	3	50 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	3	50 %
Minimální hodnota	26,41 ng/ $\mu$ L	
Maximální hodnota	60,7 ng/ $\mu$ L	
Počet vzorků s výtěžností nižší než 15 ng/ $\mu$ L	0	0 %
Počet vzorků s výtěžností vyšší než 15 ng/ $\mu$ L	6	100 %

Pokud se zaměříme na získanou koncentraci v jednom  $\mu$ L zjistíme, že při první izolaci měly 3 vzorky, které tvořily 50 % nižší hodnotu, než jaká je hodnota mediánu a 50 % mělo vyšší hodnotu než medián výsledků, který byl 44,11. Minimální zjištěná hodnota byla 26,41 ng/ $\mu$ L a maximální hodnota byla 60,7 ng/ $\mu$ L. Všechny vzorky měly výtěžnost vyšší než 15.

Tabulka 18: Hodnoty sledovaných údajů zjištěné koncentrace v ng/μL získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.

<b>Druhá izolace</b>	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	14,07 ng/μL	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	1	20 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	2	40 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	2	40 %
Minimální hodnota	9,5 ng/μL	
Maximální hodnota	33,54 ng/μL	
Počet vzorků s výtěžností nižší než 15 ng/μL	3	60 %
Počet vzorků s výtěžností vyšší než 15 ng/μL	2	40 %

U druhé izolace bylo zjištěno, že nižší hodnota, než medián, byla naměřena u 2 vzorků, které tvořily 40 %. Vzorky s hodnotou vyšší, než je medián také tvořily 40 %. Medián hodnot byl 14,07 ng/μL a shodoval se s jedním z výsledků, který tvořil 20 %. Minimální naměřená hodnota byla 9,5 ng/μL a maximální hodnota byla 33,54 ng/μL. Při provedení druhé izolace byla výtěžnost 60 % vzorků nižší než 15 ng/μL. Zbýlých 40 % bylo vyšších než 15 ng/μL.

### 10.2.5 Celková výtěžnost RNA

Tabulka 19: Hodnoty sledovaných údajů zjištěné celkové výtěžnosti RNA v ng získaných při první izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.

První izolace	Získané hodnoty	Procentuální hodnocení
Medián	1102,75 ng	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	0	0 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	3	50 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	3	50 %
Minimální hodnota	660,25 ng	
Maximální hodnota	1517,7 ng	

Výsledky celkové výtěžnosti RNA se shodovaly s naměřenými hodnotami koncentrace v ng vztažených na jeden  $\mu\text{L}$ . Při první izolaci byly 3 vzorky tvořící 50 % výsledků vzorků nižších, než byla hodnota mediánu. Stejně tak 50 % vzorků bylo vyšších než medián hodnot, který byl určen na 1102,75 ng, minimální naměřená hodnota byla 660,25 ng a nejvyšší hodnota byla 1517,7 ng.



Tabulka 20: Hodnoty sledovaných údajů zjištěné celkové výtěžnosti RNA v ng získaných při druhé izolaci z opakovaně izolovaných vzorků.

<b>Druhá izolace</b>	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	351,75 ng	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	1	20 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	2	40 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	2	40 %
Minimální hodnota	237,5 ng	
Maximální hodnota	838,5 ng	

Při druhé izolaci bylo 40 % výsledků, tvořených dvěma vzorky, nižších, než byla hodnota mediánu. Stejně jako nižších, i vyšších výsledků bylo 40 %. Medián hodnot byl určen na 351,75 ng a jeden ze vzorků, který tvořil 20 % se s ním shodoval. Minimální naměřená hodnota byla 237,5 ng a nejvyšší hodnota byla 838,5 ng.

### 10.3 Opakovaně měřené vzorky

Tabulka 21: Mediánové hodnoty sledovaných údajů opakovaně měřených vzorků.

Sledované hodnoty	Zjištěný medián hodnot
Měření absorbance při 260 nm	0,521
Měření absorbance při 280 nm	0,35
Poměr absorbancí 260/280 nm	1,45
Získaná koncentrace v ng/ $\mu$ L	24,37 ng/ $\mu$ L
Celková výtěžnost	609,25 ng
Množství vzorku	25 $\mu$ L

#### 10.3.1 Měření absorbance při 260 nm

Tabulka 22: Hodnoty sledovaných údajů opakovaně měřených vzorků při absorbanci 260 nm.

	Získané hodnoty	Procentuální hodnocení
Medián	0,521	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	1	4 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	12	48 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	12	48 %
Minimální hodnota	0,256	
Maximální hodnota	2,577	

Bylo zjištěno množství vzorků, které se shodují s výsledkem mediánu veškerých měření absorbance při 260 nm. Bylo zjištěno, že se 48 % výsledků, které tvořilo 12 vzorků, pohybuje pod hranicí hodnoty mediánu, stejně tak, jako nad touto hodnotou. Jeden z výsledků měření se shodoval s vypočteným mediánem hodnot a tvořil 4 %.

Medián opakovaných vzorků byl 0,521. Minimální hodnota vyskytující se ve výsledcích byla 0,256 a maximální hodnota byla 2,577.

### 10.3.2 Měření absorbance při 280 nm

*Tabulka 23: Hodnoty sledovaných údajů opakovaně měřených vzorků při absorbanci 280 nm.*

	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	0,35	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	1	4 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	12	48 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	12	48 %
Minimální hodnota	0,183	
Maximální hodnota	1,917	

Hodnota mediánu absorbance zjištěná při 280 nm byla 0,35. Ze všech měření tvořilo 48 % výsledků skupinu s nižší hodnotou než medián. Vyšší hodnoty než hodnoty mediánu, byly zjištěny u 12 výsledků, které také tvořily 48 %. Hodnota mediánu se shodovala s jedním z výsledků. Medián vzorků byl 0,35. Minimální hodnota byla 0,183 a nejvyšší byla 1,917.

### 10.3.3 Poměr absorbancí 260/280 nm

Tabulka 24: Hodnoty sledovaných údajů opakovaně měřených vzorků při poměru absorbancí 260/280 nm.

	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	1,45	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě medián	2	8 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	12	48 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	11	44 %
Minimální hodnota	1,29	
Maximální hodnota	1,86	
Počet vzorků, jejichž čistota byla pod 1,8	24	96 %
Počet vzorků, jejichž čistota byla od 1,8 do 2,0	1	4 %
Počet vzorků, jejichž čistota byla vyšší než 2,0	0	0 %

Hodnota mediánu zjištěná u poměru 260/280 nm byla 1,45. Nižší výsledky, než je medián, mělo 12 vzorků a tvořilo 48 %. Vyšší výsledky byly zjištěny u 11 vzorků, které tvořily 44 %. Jedna z hodnot se shodovala s mediánem a tvořila 8 %. Medián byl 1,45. Minimální zjištěná hodnota byla 1,29 a maximální hodnota byla 1,86. Čistota nižší než 1,8 byla zjištěna u 96 % vzorků. Vzorek, který byl vyšší než 1,8 a nižší než 2,0 tvořil 4 %.

### 10.3.4 Získaná koncentrace v ng/μL

Tabulka 25: Hodnoty získané koncentrace v ng/μL u opakovaně měřených vzorků.

	Získané hodnoty	Procentuální hodnocení
Medián	24,37 ng/μL	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	1	4 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	12	48 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	12	48 %
Minimální hodnota	10,79 ng/μL	
Maximální hodnota	103,06 ng/μL	
Počet vzorků s výtěžností nižší než 15 ng/μL	4	16 %
Počet vzorků s výtěžností vyšší než 15 ng/μL	21	84 %

Zjištěný medián koncentrace byl 24,37 ng/μL. Nižší koncentrace byly zjištěny u 12 vzorků, které tvořily 48 %. Vyšší koncentrace byla také zjištěna ve 48 % případů. Medián se shodoval s jednou z naměřených koncentrací a tvořil 4 %. Nejnižší hodnota byla 10,79 ng/μL a nejvyšší 103,06 ng/μL. Minimální a maximální hodnota se v tomto případě svými hodnotami velmi odlišovaly. Nižší výtěžnost než 15 ng/μL měly 4 vzorky tvořící 16 %. Naopak vyšší výtěžnost než 15 ng/μL mělo 21 vzorků, které tvořily 84 %.

### 10.3.5 Celková výtěžnost RNA

Tabulka 26: Hodnoty celkové výtěžnosti RNA v ng u opakovaně měřených vzorků.

	<b>Získané hodnoty</b>	<b>Procentuální hodnocení</b>
Medián	609,25 ng	
Počet vzorků odpovídajících hodnotě mediánu	1	4 %
Počet vzorků s nižší hodnotou, než je medián	12	48 %
Počet vzorků s vyšší hodnotou, než je medián	12	48 %
Minimální hodnota	269,75 ng	
Maximální hodnota	2576,5 ng	

Celková výtěžnost RNA ze vzorků tvořila podle mediánu 609,25 ng. Stejně jako u koncentrace vztažené na 1  $\mu$ L i u celkové výtěžnosti byly výsledky s nižší hodnotou ve stejném procentuálním zastoupení jako vyšší hodnoty. Obě skupiny byly tvořeny 12 vzorky a tvořily 48 %. Jeden ze vzorků se rovnal hodnotě mediánu a tvořil 4 %. Minimální hodnota byla 269,75 ng a maximální byla 2576,5 ng.

## DISKUZE

Zvolená souprava pro izolace miRNA firmy Qiagen je v současnosti zřejmě nejpoužívanějším metodickým přístupem pro izolace miRNA z tkání. V případě plazmy, kdy izolované vzorky obsahují daleko méně miRNA než v případě tkání, je vlastní izolační postup komplikovanější a vyžaduje přesné provedení všech kroků izolačního postupu. Velmi důležitá je také pečlivost laboratorního pracovníka, který práci provádí, protože je potřeba pipetovat roztoky přímo na kolonky a při odpipetování horní fáze obsahu zkumavky nesmí být napipetována zároveň mezifáze (prostřední vrstva vzorku, která vznikne po centrifugaci). V současnosti se ve stále více laboratořích zavádí automatizované postupy izolace DNA, avšak v případě izolace miRNA z plazmy a FPPE bločků stále zůstává manuální postup tzv. sázkou na jistotu.

Za velkou výhodou tohoto metodického postupu lze považovat jeho reprodukovatelnost. Přes mnoho bodů izolačního postupu je každý krok velmi dobře definován a velmi jasně vysvětlitelný. Díky tomu je metodický postup vhodný nejen pro izolaci nukleových kyselin ve výzkumných genetických laboratořích, ale je možné ho zavést i v klinických laboratořích. Nevýhodou tohoto metodického postupu je jeho časová náročnost. Celý laboratorní postup, izolace 10 vzorků, zabere dvě a půl hodiny. To může být v určitých případech limit pro využití v klinických laboratořích, kdy je třeba mít výsledek co nejdříve hotový. Předpokládá se však, že až budou identifikovány miRNA, které by mohly být využitelné v klinické praxi, bude dostupný i krátký automatizovaný protokol pro jejich izolaci.

Zjistili jsme, že během osmihodinové pracovní doby je možné provést izolaci 40 vzorků plazmy z plné krve (zkumavka K<sub>3</sub>EDTA), pokud je laboratorní pracovník zručný a zapracovaný. Vzorky je ideální izolovat po deseti, protože laboratorní pracovník neztrácí přehled o vzorcích a doby stání pro první a poslední vzorkem se příliš neliší.

Limitem tohoto metodického postupu je práce s plazmou z plné krve (obsahuje pouze nízkou koncentraci mikroRNA), ze které je RNA izolována. Izolovaná RNA je obohacena o frakci mikroRNA, nejedná se čistě o mikroRNA. Proto je vzhledem k nízkým koncentracím molekul mikroRNA, které tvoří jen frakci celkové RNA, důležité získat alespoň 200  $\mu$ L vstupního objemu plazmy pro dostatečný výtěžek mikroRNA.

Pro měření koncentrace získané RNA je vhodné použít spektrofotometr, který dokáže změřit koncentraci v 1  $\mu$ L. Kromě speciálního spektrofotometru není potřeba žádné

speciální laboratorní vybavení. Pro metodický postup je potřeba pouze souprava pro izolaci nukleových kyselin, automatické pipety se špičkami, 80% a 100% ethanol a centrifuga s volitelným zchlazením na 4°C.

Při analýze veškerých získaných dat byl medián čistoty vzorků 1,47. Vyšší hodnota než 1,8 byla zjištěna u 15 vzorků, z nichž 3 měly hodnotu čistoty vyšší než 2,0. Nejnižší hodnota čistoty byla 0,67 a 95% percentil byl určen na hodnotu 1,3. V ideálním případě by se čistota izolované RNA získaná z poměru 260/280 nm měla pohybovat v rozmezí 1,8–2. Nižší hodnota čistoty byla pravděpodobně způsobena slabou hemolýzou plné krve, ze které byla plazma pro izolaci získána.

Dle zkušenosti pracovníků laboratoře molekulární genetiky Ústavu biologie LF Plzeň, je možno i vzorky s hodnotou čistoty 1,3 použít pro metodu RT real-time PCR.

Druhou sledovanou hodnotou byla průměrná výtěžnost vzorků. V ideálním případě by měla být výtěžnost vyšší než 15 ng/μL. Toto kritérium splnilo 324 vzorků. Zbylých 184 mělo nižší hodnoty výtěžku než 15 ng/μL. Nižší výtěžek lze vysvětlit stářím vzorků. Izolované vzorky nebyly čerstvě získané, ale byly zamražené v mrazicím boxu na -70°C. Z tohoto důvodu došlo pravděpodobně k zisku nižších hodnot výtěžku. Nejnižší hodnota výtěžku byla 7,55 ng/μL. Vzhledem k tomu, že se izolované RNA následně vkládalo do RT real-time PCR, ve kterém je pro reverzní transkripci ideální vložit RNA v množství 5 ng/μL, bylo možné veškeré izolované vzorky použít pro tuto analýzu.

Z důvodu atypického průběhu křivky grafu měření čistoty byly některé vzorky opakovaně izolovány a izolací bylo provedeno celkem 508. Celkově bylo provedeno 521 spektrofotometrických stanovení. U vzorků, u kterých byla změřená nižší koncentrace – 20 ng/μL a méně, bylo provedeno opakované stanovení koncentrace pro zvýšení přesnosti.

RNA byla po izolaci použita pro stanovení mikroRNA pomocí RT real-time PCR soupravy firmy Life Technologies (Carlsbad, USA), díky které byla ověřena amplifikace cílových mikroRNA.



## ZÁVĚR

Hlavním cílem bylo zjistit, zda se dá plazma plné krve (odebraná do zkumavky obsahující K<sub>3</sub>EDTA) použít pro izolaci nukleových kyselin (RNA) v dostatečném množství tak, aby bylo možno provést stanovení biomarkerů ze skupiny miRNA u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním. Hlavními sledovanými výsledky byla čistota a výtěžnost RNA. Vzorky by měly odpovídat čistotě 1,8 – 2,0. Toto kritérium splnilo velmi malé procento vzorků, konkrétně 13 vzorků z veškerých měření, tzn. 2,5 % všech izolovaných vzorků. Vyšší hodnotu než 2 mělo 0,57 % vzorků. Takto nízké procento vzorků, které odpovídaly ideálním hodnotám, je pravděpodobně způsobeno malým množstvím hemolýzy, ke které došlo v ostatních vzorcích plné krve, ze kterých byla plazma získána.

Z 508 vzorků byl medián výtěžku 16,985 ng/μL. Medián čistoty byl 1,47 a 95% percentil byl 1,3. Vyšší hodnota než 1,8 byla zjištěna u 15 vzorků, z nichž 3 měly hodnotu čistoty vyšší než 2,0. Nejnižší hodnota čistoty byla 0,67 a 95% percentil byl určen na hodnotu 1,3.

Dle zkušenosti pracovníků laboratoře molekulární genetiky Ústavu biologie LF Plzeň je možno i vzorky s hodnotou čistoty 1,3 použít metodu RT real-time PCR.

Druhou sledovanou hodnotou byla průměrná výtěžnost vzorků. V ideálním případě by měla být výtěžnost alespoň vyšší než 15 ng/μL. Toto kritérium splnilo 324 vzorků. Zbylých 184 mělo nižší hodnoty výtěžku než 15 ng/μL. Nejnižší hodnota výtěžku byla 7,55 ng/μL.

Metodou stanovení mikroRNA na Ústavu biologie Lékařské fakulty v Plzni, kde byla práce provedena, je metoda RT real-time PCR. Protože do reverzní transkripce je ideální vložit 5 ng/μL RNA, můžeme říci, že uvedený postup izolace RNA z plazmy a skladování vzorků, je pro tento způsob kvantitativního stanovení zkoumaných mikroRNA u pacientů s kardiovaskulárními chorobami vhodný.

## SEZNAM LITERATURY

ASCHERMANN, Michael, Aleš LINHART a Helena BRODSKÁ. Laboratorní diagnostika v kardiologii. ZIMA, Tomáš. *Laboratorní diagnostika*. 3. doplněné vydání. Praha: Galén, 2017, s. 19. ISBN 978-80-7492-062-2.

BADAWY, Heba K., Dina M. ABO-ELMATTY a Noha M. MESBAH. Association between serum microRNA-605 and microRNA-623 expression and essential hypertension in Egyptian patients. *Meta Gene* [online]. 2018, 16 [cit. 2020-04-25]. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2018.01.011>. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2214540018300124#!>

BAO, Mei-Hua, Xing FENG a Yi-Wen ZHANG et al. Let-7 in Cardiovascular Diseases, Heart Development and Cardiovascular Differentiation from Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2013, 14(11) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/14/11/23086/htm>

BUIE, Joy N. Jones, Andrew J. GOODWIN a James A. COOK et al. The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors. *Atherosclerosis* [online]. 2016, 254 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: [https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(16\)31393-4/full-text](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(16)31393-4/full-text)

BÝMA, Svatopluk a Jaromír HRADEC. Prevence kardiovaskulárních onemocnění: Doporučené diagnostické a terapeutické postupy pro všeobecné praktické lékaře. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, 2018. ISBN 978-80-86998-95-4.

CAMBIEN, François a Laurence TIRET. Genetics of Cardiovascular Diseases: From Single Mutations to the Whole Genome. *Circulation* [online]. 2007, 116(15) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.661751>

CARÈ, Alessandra, Daniele CATALUCCI a Federica FELICETTI et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature Medicine* [online]. 2007, 13(613–618) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nm1582>

CENGIZ, Mahir, Omer Faruk KARATAS a Erkan KOPARIR et al. Differential Expression of Hypertension-Associated MicroRNAs in the Plasma of Patients With White Coat Hypertension. *Medicine (Baltimore)* [online]. 2015, 94(13) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4554020/>

CÍFKOVÁ, Renata, Svatopluk BÝMA a Richard ČEŠKA ET AL. Prevence kardiovaskulárních onemocnění v dospělém věku: Společné doporučení českých odborných společností. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2005 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/kbm/kbm-2005-13-4-212-224.pdf>

CÍFKOVÁ, Renata, Jan BRUTHANS a Věra ADÁMKOVÁ ET AL. Prevalence základních kardiovaskulárních rizikových faktorů v české populaci v letech 2006–2009. Studie Czech post-MONICA. *Cor Vasa* [online]. 2011, 53(4-5) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://pdfs.semanticscholar.org/a4cb/a76597db2b64a2de75be548903adee4a4b34.pdf>

CORSTEN, Maarten F., Robert DENNERT a Sylvia JOCHEMS et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease. *Circulation: Cardiovascular Genetics* [online]. 2010, 3(6) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIRCGENETICS.110.957415>

DEVAUX, Yvan, Melanie VAUSORT a Gerry P. MCCANN et al. MicroRNA-150: A Novel Marker of Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *Circulation: Genomic and Precision Medicine* [online]. 2013, 6(3) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/circgenetics.113.000077>

DEVAUX, Yvan, Mélanie VAUSORT a Emeline GORETTI et al. Use of Circulating MicroRNAs to Diagnose Acute Myocardial Infarction. *Clinical Chemistry* [online]. 2012, 58(3) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/58/3/559/5620606>

ELLIS, Katrina L., Vicky A. CAMERON a Richard W. TROUGHTON et al. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *European Journal of Heart Failure* [online]. 2014, 15(10) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1093/eurjhf/hft078>

FAN, Kuan-Lu, Hai-Feng ZHANG a Jie SHEN et al. Circulating microRNAs levels in Chinese heart failure patients caused by dilated cardiomyopathy. *Indian Heart Journal* [online]. 2013, 65(1) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0019483212003239#!>

GAO, Wei, Hui-Wei HE a Ze-Mu WANG et al. Plasma levels of lipometabolism-related miR-122 and miR-370 are increased in patients with hyperlipidemia and associated with coronary artery disease. *Lipids in Health and Disease* [online]. 2012, 11(55) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-11-55>

GOLÁŇ, Lubor. VLIV KOUŘENÍ NA MORFOLOGII A FUNKCI LIV KOUŘENÍ NA MORFOLOGII A FUNKCI KARDIOVASKULÁRNÍHO APARÁTU. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2007, 9(9) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2007/09/06.pdf>

GRABMAIER, U., S. CLAUSS a L. GROSS et al. Diagnostic and prognostic value of miR-1 and miR-29b on adverse ventricular remodeling after acute myocardial infarction - The SITAGRAMI-miR analysis. *International Journal of Cardiology* [online]. 2017, 244 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28663047>

HLÚBIK, Pavel. OBEZITA – ZÁVAŽNÝ PROBLÉM SOUČASNOSTI. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2002 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2002/07/02.pdf>

HOFFMANN, D., I. HOFFMANN a K. EL-BAYOUMY. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2001, 14(7) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11453723>

HRADEC, Jaromír a Svatopluk BÝMA. Ischemická choroba srdeční: Doporučený diagnostický a léčebný postup pro všeobecné praktické lékaře. Praha: Společnost všeobecného lékařství ČLS JEP Centrum doporučených postupů pro praktické lékaře, 2007. ISBN 80-86998-14-2.

CHISTIYAKOV, D. A., A. N. OREKHOV a Y. V. BOBRYSHV. Cardiac-specific miRNA in cardiogenesis, heart function, and cardiac pathology (with focus on myocardial infarction). *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [online]. 2016, 94 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27056419>

Izolace RNA. In: Labguide [online]. [cit. 2020-03-14]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin/izolace-rna/>

KATHIRESAN, Sekar a Deepak SRIVASTAVA. Genetics of Human Cardiovascular Disease. *Cell* [online]. 2012, 148(6) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3319439/?fbclid=IwAR11EITAROW8-yZ2IpMcyF2ZfxsYzaSylGLeViz3h8vog67YVjCWNp1YxSY>

KREJČÍ, A., P. MÜLLER a B. VOJTĚŠEK. Bioinformatika a sekvenování nové generace. *Klinická onkologie* [online]. 2015, 28, 91-96 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/196.pdf#page=91>

KUMARI, Reena, Sandeep KUMAR a Ravi KANT. Role of circulating miRNAs in the pathophysiology of CVD: As a potential biomarker. *Gene reports* [online]. 2018, 13 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452014418301249?via%3Dihub#!>

LEUNG, Alexander A., Stella S. DASKALOPOULOU a Kaberi DASGUPTA. Hypertension Canada's 2017 Guidelines for Diagnosis, Risk Assessment, Prevention, and Treatment of Hypertension in Adults. *Canadian Journal of Cardiology* [online]. 2017, 33(5) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: [https://www.onlinecjc.ca/article/S0828-282X\(17\)30110-1/full-text#%20](https://www.onlinecjc.ca/article/S0828-282X(17)30110-1/full-text#%20)

LIBBY, Peter, Paul M. RIDKER a Attilio MASERI. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* [online]. 2002, 105(9) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/hc0902.104353>

LI, S., J. ZHU a W. ZHANG et al. Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation* [online]. 2011, 124(2) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21690488>

LI, Chencheng, Xiaonan CHEN a Junwen HUANG et al. Clinical impact of circulating miR-26a, miR-191, and miR-208b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *European Journal of Medical Research* [online]. 2015, 20(58) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://eurjmedres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40001-015-0148-y>

LI, H. Y., X. ZHAO a Y. Z. LIU et al. Plasma MicroRNA-126-5p is Associated with the Complexity and Severity of Coronary Artery Disease in Patients with Stable Angina Pectoris. *Cellular Physiology and Biochemistry* [online]. 2016, 39(3) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27497911>

LONG, Guangwen, Feng WANG a Quanlu DUAN et al. Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b Associated with Acute Myocardial Infarction. *Plos One* [online]. 2012 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0050926>

LONG, Guangwen, Feng WANG a Huaping LI et al. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. *BMC Neurology* [online]. 2013, 13 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840584/>

LV, Pin, Mingxia ZHOU a Jing HE et al. Circulating miR-208b and miR-34a Are Associated with Left Ventricular Remodeling after Acute Myocardial Infarction. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, 15(4) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/1422-0067/15/4/5774>

NATEKAR, Aniket, Randi L. OLDS a Meghann W. LAU et al. Elevated blood pressure: Our family's fault? The genetics of essential hypertension. *World Journal of Cardiology* [online]. 2014, 6(5) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4062117/>

OLIVIERI, Fabiola, Roberto ANTONICELLI a Maria LORENZI et al. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* [online]. 2013, 167(2) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167527312000939#!>

OLIVIERI, Fabiola, Liana SPAZZAFUMO a Massimiliano BONAFÈ et al. MiR-21-5p and miR-126a-3p levels in plasma and circulating angiogenic cells: relationship with type 2 diabetes complications. *Oncotarget* [online]. 2015, 6(34) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4742111/>

PELIKÁNOVÁ, Terezie. Diabetes mellitus a kardiovaskulární onemocnění. *Cor Vasa* [online]. 2011, 53(4-5) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.e-core-tvasa.cz/pdfs/cor/2011/04/07.pdf>

PENG, Han, Hua YANG a Xin XIANG et al. MicroRNA-221 participates in cerebral ischemic stroke by modulating endothelial cell function by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway. *Experimental and therapeutic medicine* [online]. 2020, 19(1) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6913279/>

PRŮŠA, Richard, Jan LÁNY a Jan VEJVALKA et al. Izolace a purifikace nukleových kyselin. In: Multimediální učebnice DNA diagnostiky [online]. 1998 [cit. 2020-03-14]. Dostupné z: <http://kolweb.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa2.htm>

QIAGEN. QIAamp® Viral RNA Mini uživatelská příručka: Pro purifikaci virové RNA z plazmy, séra, bezbuněčných tělních tekutin a supernatantu buněčných kultur [online]. 2016 [cit. 2020-03-14]. Dostupné z: [https://www.dynex.cz/data/machines/5290452906\\_qiaamp\\_viral\\_rna\\_mini\\_kit\\_cz.pdf](https://www.dynex.cz/data/machines/5290452906_qiaamp_viral_rna_mini_kit_cz.pdf)

RACEK, Jaroslav et al. Klinická biochemie. Druhé, přepracované vydání. Praha: Galén, 2006. ISBN 8072623249.

ROMAINE, Simon P. R., Fadi J. CHARCHAR a Nilesh J. SAMANI et al. Circulating microRNAs and hypertension — from new insights into blood pressure regulation to biomarkers of cardiovascular risk. *Current Opinion in Pharmacology* [online]. 2016, 27 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471489216000023#!>

ROTLAN, Noemi, Nathan PRICE a Paramita PATI et al. MicroRNAs in lipoprotein metabolism and cardiometabolic disorders. *Atherosclerosis* [online]. 2016, 246 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: [https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(16\)30025-9/fulltext#%20](https://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(16)30025-9/fulltext#%20)

SAYED, Ali Sheikh Md, Ke XIA a Umme SALMA et al. Diagnosis, Prognosis and Therapeutic Role of Circulating miRNAs in Cardiovascular Diseases. *Heart, Lung and Circulation* [online]. 2014, 23(6) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1443950614000304#!>

SCHULTE, Christian, Simon MOLZ a Sebastian APPELBAUM et al. MiRNA-197 and miRNA-223 Predict Cardiovascular Death in a Cohort of Patients with Symptomatic Coronary Artery Disease. *Plos One* [online]. 2015 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0145930>

SILVA, Debora Cristina Pereira, Felipe Demani CARNEIRO a Kelly Costa ALMEIDA et al. Role of miRNAs on the Pathophysiology of Cardiovascular Diseases. *Sociedade Brasileira de cardiologia* [online]. 2018, 111(5) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0066-782X2018001700738](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2018001700738)

SLABÝ, Ondřej a Marek SVOBODA et al. MIKRORNA V ONKOLOGII. Galén, 2012. ISBN 9788072625871.

SLABÝ, Ondřej et al. Molekulární diagnostika. Molekulární medicína. Praha: Galén, 2015, s. 365. ISBN 978-80-7492-121-6.

SØRENSEN, Sofie Sølvsten, Ann-Britt NYGAARD a Ming-Yuan NIELSEN et al. MiRNA Expression Profiles in Cerebrospinal Fluid and Blood of Patients with Acute Ischemic Stroke. *Translational Stroke Research* [online]. 2014, 5 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12975-014-0364-8>

VEGTER, Eline L., Peter van der MEER a Leon J. de WINDT et al. MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy. *European Journal of Heart Failure* [online]. 2016, 18(5) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://online-library.wiley.com/doi/full/10.1002/ejhf.495>

WEI, Chuanyu, Heather HENDERSON a Christopher SPRADLEY et al. Circulating miRNAs as Potential Marker for Pulmonary Hypertension. *Plos One* [online]. 2013 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0064396>



XIANG, Yang, Jing GUO a You-Fan PENG ET AL. Association of miR-21, miR-126 and miR-605 gene polymorphisms with ischemic stroke risk. *Oncotarget* [online]. 2017, 8(56) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5707057/>

ZHANG, Rui, Chao LAN a Hui PEI ET AL. Expression of circulating miR-486 and miR-150 in patients with acute myocardial infarction. *BMC Cardiovascular Disorders* [online]. 2015, 15(51) [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://bmccardiovascdisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12872-015-0042-0#>

ZHOU, Shan-shan, Jing-peng JIN a Ji-qun WANG ET AL. Review Article Open Access Published: 07 June 2018 miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica* [online]. 2018, 39 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/aps201830>

ZHOU, Q., S. SCHÖTTERL a D. BACKES ET AL. Inhibition of miR-208b improves cardiac function in titin-based dilated cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology* [online]. 2017 [cit. 2020-04-26]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28065693>

ZVÁROVÁ, Jana, Ivan MAZURA a Běla BENDLOVÁ ET AL. *Biomedicínská informatika: Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2150-0.

## **SEZNAM PŘÍLOH**

- Příloha A – Veškerá naměřená data všech izolovaných vzorků
- Příloha B – Tabulka hodnot prvních izolací u opakovaně izolovaných vzorků
- Příloha C – Tabulka hodnot druhých izolací u opakovaně izolovaných vzorků
- Příloha D – Tabulka hodnot opakovaně měřených vzorků

## PŘÍLOHY

### Příloha A – Veškerá naměřená data všech izolovaných vzorků

Tabulka 27: Veškerá naměřená data všech vzorků, která byla získána při všech měřeních a izolacích.

číslo vzorku	A 260 nm	A 280 nm	Poměr A 260/280	c [ng/μL]	celková výtěžnost [ng]	Objem [μl]
17001	1,394	0,883	1,58	55,77	1394,25	25
17002	1,041	0,676	1,54	41,62	1040,5	25
17003	0,94	0,621	1,51	37,59	939,75	25
17004	0,947	0,615	1,54	37,88	947	25
17005	1,384	0,877	1,58	55,35	1383,75	25
17006	0,62	0,426	1,46	24,82	620,5	25
17007	0,823	0,562	1,46	32,92	823	25
17008	0,297	0,183	1,62	11,89	297,25	25
17009	1,245	0,859	1,45	49,79	1244,75	25
17010	0,323	0,22	1,47	12,93	323,25	25
17011	1,601	0,992	1,61	64,03	1600,75	25
17012	0,385	0,266	1,45	15,4	385	25
17013	0,25	0,192	1,31	10	250	25
17014	0,476	0,312	1,53	19,04	476	25
17015	0,357	0,261	1,37	14,29	357,25	25
17016	0,435	0,292	1,49	17,41	435,25	25
17017	0,334	0,232	1,44	13,38	334,5	25
17018	0,394	0,302	1,3	15,74	393,5	25
17019	0,389	0,292	1,33	15,55	388,75	25
17020	0,449	0,31	1,45	17,94	448,5	25
17021	0,449	0,314	1,43	17,94	448,5	25
17022	0,643	0,443	1,45	25,74	643,5	25
17023	0,401	0,277	1,45	16,04	401	25
17024	0,892	0,604	1,48	35,69	892,25	25
17025	0,511	0,352	1,45	20,44	511	25

17026	0,784	0,549	1,43	31,34	783,5	25
17027	0,519	0,325	1,6	20,77	519,25	25
17028	0,589	0,386	1,52	23,57	589,25	25
17029	0,718	0,449	1,6	28,74	718,5	25
17030	0,315	0,227	1,38	12,58	314,5	25
17031	1,274	0,793	1,61	50,98	1274,5	25
17032	0,589	0,372	1,58	23,57	589,25	25
17033	0,562	0,376	1,5	22,5	562,5	25
17034	0,425	0,283	1,5	17,01	425,25	25
17035	0,899	0,65	1,38	35,96	899	25
17036	0,625	0,403	1,55	25,01	625,25	25
17037	0,382	0,256	1,49	15,27	381,75	25
17038	0,658	0,45	1,46	26,32	658	25
17039	0,305	0,195	1,56	12,19	304,75	25
17040	0,344	0,226	1,52	13,75	343,75	25
17041	0,834	0,508	1,64	33,36	834	25
17042	0,651	0,45	1,45	26,04	651	25
17043	0,648	0,596	1,09	25,93	648,25	25
17044	0,366	0,238	1,54	14,62	365,5	25
17045	1,498	0,922	1,63	59,93	1498,25	25
17046	1,147	0,687	1,67	45,9	1147,5	25
17047	0,659	0,414	1,59	26,37	659,25	25
17048	0,322	0,226	1,43	12,89	322,25	25
17049	0,456	0,289	1,58	18,24	456	25
17050	0,665	0,431	1,54	26,6	665	25
17051	1,471	0,941	1,56	58,86	1471,5	25
17052	1,276	0,834	1,53	51,04	1276	25
17053	0,463	0,296	1,56	18,5	462,5	25
17054	1,032	0,65	1,59	41,28	1032	25
17055	0,613	0,435	1,41	24,53	613,25	25
17056	0,477	0,317	1,51	19,06	476,5	25
17057	0,721	0,48	1,5	28,85	721,25	25

17058	0,643	0,449	1,43	25,72	643	25
17059	0,728	0,496	1,47	29,13	728,25	25
17060	0,803	0,555	1,45	32,13	803,25	25
17061	0,256	0,143	1,79	10,23	255,75	25
17062	0,372	0,232	1,6	14,86	371,5	25
17063	0,507	0,305	1,66	20,3	507,5	25
17064	0,217	0,114	1,91	8,7	217,5	25
17065	0,493	0,275	1,79	19,71	492,75	25
17066	0,65	0,372	1,75	26,01	650,25	25
17067	0,291	0,166	1,75	11,64	291	25
17068	1,29	0,827	1,56	51,59	1289,75	25
17069	0,507	0,259	1,96	20,26	506,5	25
17070	0,36	0,204	1,76	14,39	359,75	25
17071	1,247	0,743	1,68	49,87	1246,75	25
17072	0,538	0,358	1,5	21,54	538,5	25
17073	0,644	0,432	1,49	25,75	643,75	25
17074	0,541	0,324	1,67	21,62	540,5	25
17075	0,43	0,26	1,66	17,21	430,25	25
17076	0,271	0,178	1,52	10,83	270,75	25
17077	0,397	0,24	1,66	15,89	397,25	25
17078	0,402	0,258	1,55	16,07	401,75	25
17079	0,494	0,316	1,57	19,77	494,25	25
17080	0,723	0,43	1,68	28,92	723	25
17081	1,257	0,791	1,59	50,3	1257,5	25
17082	0,676	0,46	1,47	27,06	676,5	25
17083	1,19	0,749	1,59	47,6	1190	25
17084	0,771	0,526	1,47	30,83	770,75	25
17085	0,646	0,403	1,6	25,83	645,75	25
17086	0,599	0,394	1,52	23,96	599	25
17087	0,998	0,654	1,53	39,93	998,25	25
17088	0,302	0,185	1,64	12,09	302,25	25
17089	0,605	0,379	1,59	24,21	605,25	25

17090	0,575	0,347	1,66	22,99	574,75	25
17091	0,371	0,221	1,68	14,82	370,5	25
17092	0,73	0,473	1,54	29,2	730	25
17093	0,47	0,328	1,44	18,82	470,5	25
17094	0,479	0,287	1,67	19,16	479	25
17095	2,101	1,438	1,46	84,06	2101,5	25
17096	0,432	0,298	1,45	17,29	432,25	25
17097	0,446	0,28	1,59	17,85	446,25	25
17098	0,524	0,362	1,45	20,95	523,75	25
17099	0,685	0,464	1,48	27,42	685,5	25
17100	1,362	0,992	1,37	54,5	1362,5	25
17101	0,729	0,481	1,52	29,18	729,5	25
17102	0,954	0,625	1,53	38,18	954,5	25
17103	0,733	0,498	1,47	29,32	733	25
17104	0,678	0,429	1,58	27,12	678	25
17105	0,41	0,266	1,54	16,41	410,25	25
17106	0,469	0,293	1,6	18,78	469,5	25
17107	0,503	0,322	1,56	20,13	503,25	25
17108	0,383	0,26	1,48	15,33	383,25	25
17109	0,571	0,368	1,55	22,84	571	25
17110	0,475	0,298	1,59	19,01	475,25	25
17111	0,298	0,183	1,63	11,93	298,25	25
17112	0,401	0,264	1,52	16,05	401,25	25
17113	1,513	1,072	1,41	60,53	1513,25	25
17113	0,325	0,181	1,8	13,02	325,5	25
17114	0,402	0,258	1,56	16,09	402,25	25
17115	0,385	0,25	1,54	15,4	385	25
17116	1,526	1,043	1,46	61,03	1525,75	25
17117	0,335	0,231	1,45	13,42	335,5	25
17118	0,436	0,267	1,63	17,45	436,25	25
17119	1,099	0,766	1,43	43,95	1098,75	25
17119	0,237	0,162	1,46	9,5	237,5	25

17120	1,107	0,772	1,43	44,27	1106,75	25
17120	0,839	0,539	1,56	33,54	838,5	25
17121	0,583	0,382	1,53	23,32	583	25
17122	0,526	0,353	1,49	21,03	525,75	25
17123	0,332	0,268	1,24	13,3	332,5	25
17124	0,48	0,364	1,32	19,2	480	25
17125	0,397	0,294	1,35	15,88	397	25
17126	0,53	0,419	1,26	21,21	530,25	25
17127	0,426	0,293	1,46	17,05	426,25	25
17128	0,389	0,275	1,41	15,56	389	25
17129	0,906	1,345	0,67	36,23	905,75	25
17129	0,352	0,23	1,53	14,07	351,75	25
17130	0,66	0,74	0,89	26,41	660,25	25
17130	0,757	0,516	1,47	30,3	757,5	25
17131	0,313	0,182	1,72	12,54	313,5	25
17132	0,366	0,231	1,58	14,65	366,25	25
17133	0,242	0,146	1,66	9,69	242,25	25
17134	0,691	0,408	1,69	27,62	690,5	25
17135	0,345	0,211	1,63	13,8	345	25
17136	0,487	0,332	1,47	19,5	487,5	25
17137	0,989	0,596	1,66	39,57	989,25	25
17138	0,289	0,185	1,56	11,54	288,5	25
17139	0,598	0,364	1,64	23,93	598,25	25
17140	0,592	0,362	1,64	23,7	592,5	25
17141	0,428	0,277	1,54	17,13	428,25	25
17142	0,519	0,319	1,63	20,77	519,25	25
17143	0,339	0,195	1,74	13,57	339,25	25
17144	0,365	0,253	1,44	14,6	365	25
17145	0,529	0,33	1,6	21,15	528,75	25
17146	0,272	0,165	1,65	10,86	271,5	25
17147	0,506	0,309	1,64	20,24	506	25
17148	0,386	0,264	1,46	15,45	386,25	25

17149	0,442	0,285	1,55	17,68	442	25
17150	0,379	0,226	1,67	15,14	378,5	25
17151	0,429	0,228	1,88	17,17	429,25	25
17152	0,338	0,18	1,88	13,51	337,75	25
17153	0,384	0,244	1,57	15,36	384	25
17154	0,315	0,2	1,57	12,58	314,5	25
17155	0,256	0,149	1,72	10,22	255,5	25
17156	0,341	0,209	1,63	13,62	340,5	25
17157	0,305	0,198	1,54	12,21	305,25	25
17158	0,339	0,21	1,61	13,56	339	25
17160	0,508	0,328	1,55	20,34	508,5	25
17161	0,327	0,215	1,52	13,08	327	25
17162	0,441	0,273	1,61	17,66	441,5	25
17163	0,239	0,181	1,32	9,54	238,5	25
17164	0,254	0,162	1,56	10,16	254	25
17165	0,303	0,223	1,36	12,13	303,25	25
17166	0,352	0,226	1,56	14,09	352,25	25
17167	0,289	0,201	1,44	11,57	289,25	25
17168	0,356	0,212	1,68	14,23	355,75	25
17169	0,312	0,222	1,41	12,48	312	25
17170	0,283	0,19	1,49	11,33	283,25	25
17171	0,44	0,298	1,48	17,58	439,5	25
17172	0,435	0,305	1,43	17,41	435,25	25
17173	0,356	0,244	1,46	14,24	356	25
17174	0,278	0,173	1,61	11,12	278	25
17175	0,322	0,21	1,54	12,9	322,5	25
17176	0,323	0,195	1,66	12,92	323	25
17177	0,418	0,265	1,57	16,71	417,75	25
17178	0,378	0,244	1,55	15,12	378	25
17179	0,385	0,254	1,51	15,39	384,75	25
17180	0,285	0,203	1,4	11,39	284,75	25
17181	0,356	0,244	1,46	14,26	356,5	25



17182	0,765	0,542	1,41	30,59	764,75	25
17183	0,405	0,32	1,27	16,2	405	25
17184	1,889	1,304	1,45	75,57	1889,25	25
17185	0,588	0,44	1,34	23,52	588	25
17186	0,649	0,47	1,38	25,96	649	25
17187	0,845	0,607	1,39	33,81	845,25	25
17188	0,563	0,425	1,32	22,52	563	25
17189	0,511	0,358	1,43	20,45	511,25	25
17190	0,79	0,551	1,43	31,62	790,5	25
17191	0,27	0,183	1,48	10,79	269,75	25
17192	0,502	0,35	1,43	20,06	501,5	25
17193	1,274	0,886	1,44	50,96	1274	25
17194	0,38	0,264	1,44	15,18	379,5	25
17195	0,731	0,512	1,43	29,25	731,25	25
17196	0,593	0,349	1,7	23,7	592,5	25
17197	0,38	0,224	1,7	15,21	380,25	25
17198	0,287	0,181	1,59	11,48	287	25
17199	0,351	0,266	1,32	14,05	351,25	25
17200	0,364	0,276	1,32	14,56	364	25
17201	0,603	0,407	1,48	24,13	603,25	25
17202	0,393	0,273	1,44	15,72	393	25
17203	0,392	0,27	1,46	15,7	392,5	25
17204	0,406	0,257	1,58	16,24	406	25
17205	0,556	0,372	1,5	22,23	555,75	25
17206	0,289	0,185	1,57	11,56	289	25
17207	0,387	0,261	1,49	15,5	387,5	25
17208	0,388	0,261	1,49	15,51	387,75	25
17209	0,302	0,192	1,57	12,09	302,25	25
17210	0,384	0,275	1,4	15,35	383,75	25
17211	0,68	0,449	1,52	27,22	680,5	25
17212	0,516	0,341	1,51	20,64	516	25
17213	0,335	0,211	1,58	13,38	334,5	25

17214	0,328	0,212	1,55	13,13	328,25	25
17215	0,382	0,236	1,62	15,27	381,75	25
17216	0,691	0,427	1,62	27,62	690,5	25
17217	0,708	0,463	1,53	28,31	707,75	25
17218	0,463	0,289	1,6	18,54	463,5	25
17219	0,347	0,241	1,44	13,88	347	25
17220	0,372	0,256	1,45	14,88	372	25
17241	0,851	0,6	1,42	34,03	850,75	25
17242	0,401	0,282	1,42	16,05	401,25	25
17243	0,533	0,373	1,43	21,32	533	25
17244	0,62	0,412	1,5	24,79	619,75	25
17245	1,102	0,75	1,47	44,08	1102	25
17246	0,369	0,22	1,67	14,75	368,75	25
17247	0,499	0,346	1,44	19,95	498,75	25
17248	0,572	0,37	1,54	22,86	571,5	25
17249	0,466	0,325	1,43	18,63	465,75	25
17250	0,645	0,412	1,56	25,78	644,5	25
17251	0,366	0,218	1,68	14,64	366	25
17252	0,328	1,136	2,41	13,13	328,25	25
17253	0,856	0,51	1,68	34,24	856	25
17254	0,988	0,576	1,71	39,51	987,75	25
17255	0,468	0,224	2,09	18,71	467,75	25
17256	0,468	0,235	1,99	18,71	467,75	25
17257	0,324	0,112	2,9	12,96	324	25
17258	0,674	0,371	1,82	26,95	673,75	25
17259	0,403	0,208	1,94	16,13	403,25	25
17260	0,808	0,441	1,83	32,34	808,5	25
17261	0,457	0,304	1,5	18,27	456,75	25
17262	0,328	0,212	1,55	13,11	327,75	25
17263	0,381	0,241	1,58	15,24	381	25
17264	0,357	0,238	1,5	14,27	356,75	25
17265	0,317	0,202	1,57	12,69	317,25	25

17266	0,358	0,238	1,5	14,31	357,75	25
17267	0,425	0,312	1,36	16,98	424,5	25
17268	0,425	0,283	1,5	16,99	424,75	25
17269	0,326	0,237	1,38	13,05	326,25	25
17270	0,615	0,431	1,43	24,59	614,75	25
17271	0,268	0,182	1,48	10,72	268	25
17272	0,637	0,454	1,4	25,46	636,5	25
17273	0,411	0,297	1,38	16,43	410,75	25
17274	0,325	0,215	1,51	13,01	325,25	25
17275	0,275	0,199	1,38	11	275	25
17276	0,613	0,453	1,35	24,53	613,25	25
17277	0,338	0,228	1,48	13,52	338	25
17278	0,316	0,218	1,45	12,66	316,5	25
17279	0,336	0,225	1,49	13,43	335,75	25
17280	0,357	0,23	1,55	14,29	357,25	25
17281	0,321	0,202	1,59	12,85	321,25	25
17282	0,325	0,217	1,5	13	325	25
17283	0,308	0,202	1,53	12,33	308,25	25
17284	0,555	0,371	1,5	22,22	555,5	25
17285	0,312	0,232	1,35	12,49	312,25	25
17286	0,256	0,181	1,42	10,26	256,5	25
17287	0,268	0,191	1,41	10,73	268,25	25
17288	0,312	0,223	1,4	12,5	312,5	25
17289	0,263	0,177	1,48	10,52	263	25
17290	0,244	0,161	1,52	9,75	243,75	25
17291	0,263	0,211	1,25	10,51	262,75	25
17292	0,246	0,196	1,26	9,85	246,25	25
17293	0,298	0,21	1,42	11,93	298,25	25
17294	0,291	0,209	1,39	11,64	291	25
17295	0,426	0,309	1,38	17,04	426	25
17296	0,385	0,266	1,45	15,42	385,5	25
17297	0,518	0,33	1,57	20,71	517,75	25

17298	0,382	0,269	1,42	15,3	382,5	25
17299	0,409	0,298	1,37	16,35	408,75	25
17300	0,498	0,355	1,4	19,92	498	25
17301	0,37	0,301	1,23	14,79	369,75	25
17302	0,365	0,249	1,47	14,61	365,25	25
17303	0,381	0,271	1,4	15,22	380,5	25
17304	0,313	0,189	1,66	12,5	312,5	25
17305	0,259	0,18	1,44	10,37	259,25	25
17306	0,293	0,194	1,51	11,73	293,25	25
17307	0,398	0,264	1,51	15,94	398,5	25
17308	0,334	0,222	1,5	13,36	334	25
17309	0,312	0,216	1,44	12,46	311,5	25
17310	0,3	0,209	1,43	11,99	299,75	25
17311	0,391	0,273	1,43	15,66	391,5	25
17312	0,389	0,272	1,43	15,56	389	25
17313	0,707	0,494	1,43	28,27	706,75	25
17314	0,476	0,329	1,45	19,06	476,5	25
17315	0,355	0,259	1,37	14,2	355	25
17316	0,388	0,261	1,49	15,51	387,75	25
17317	0,334	0,218	1,53	13,36	334	25
17318	0,302	0,211	1,43	12,1	302,5	25
17319	0,493	0,362	1,36	19,72	493	25
17320	0,38	0,252	1,5	15,19	379,75	25
17321	0,404	0,297	1,36	16,17	404,25	25
17322	0,48	0,346	1,39	19,2	480	25
17323	0,419	0,306	1,37	16,78	419,5	25
17324	0,376	0,26	1,44	15,03	375,75	25
17325	0,45	0,323	1,39	18	450	25
17326	0,49	0,327	1,5	19,59	489,75	25
17327	0,506	0,362	1,4	20,26	506,5	25
17328	0,393	0,255	1,54	15,71	392,75	25
17329	0,463	0,334	1,39	18,52	463	25

17330	0,353	0,257	1,37	14,12	353	25
17331	0,31	0,179	1,73	12,4	310	25
17332	0,262	0,155	1,69	10,49	262,25	25
17333	0,583	0,376	1,55	23,31	582,75	25
17334	0,357	0,217	1,65	14,28	357	25
17335	0,304	0,19	1,6	12,15	303,75	25
17336	1,258	0,153	1,68	10,34	258,5	25
17337	0,323	0,199	1,62	12,9	322,5	25
17338	0,282	0,18	1,56	11,28	282	25
17339	0,31	0,18	1,72	12,4	310	25
17340	0,278	0,156	1,79	11,11	277,75	25
17341	0,345	0,225	1,53	13,79	344,75	25
17342	0,461	0,295	1,56	18,43	460,75	25
17343	0,323	0,216	1,49	12,92	323	25
17344	0,518	0,369	1,4	20,7	517,5	25
17345	0,391	0,279	1,4	15,63	390,75	25
17346	0,415	0,283	1,47	16,61	415,25	25
17347	0,852	0,593	1,44	34,07	851,75	25
17348	0,305	0,177	1,73	12,2	305	25
17349	0,757	0,522	1,45	30,3	757,5	25
17350	0,618	0,421	1,47	24,7	617,5	25
17351	0,356	0,253	1,41	14,24	356	25
17352	0,344	0,238	1,44	13,76	344	25
17353	0,435	0,287	1,48	17,01	425,25	25
17354	0,354	0,231	1,53	14,17	354,25	25
17355	0,268	0,167	1,6	10,71	267,75	25
17356	0,262	0,173	1,51	10,46	261,5	25
17357	0,277	0,192	1,45	11,09	277,25	25
17358	0,239	0,135	1,77	9,54	238,5	25
17359	0,309	0,205	1,51	12,34	308,5	25
17360	0,33	0,227	1,46	13,2	330	25
17361	0,301	0,205	1,47	12,05	301,25	25

17362	0,345	0,231	1,49	13,8	345	25
17363	0,274	0,169	1,62	10,96	274	25
17364	0,24	0,147	1,64	9,59	239,75	25
17365	0,398	0,313	1,27	15,91	397,75	25
17366	0,299	0,218	1,37	11,94	298,5	25
17367	0,368	0,278	1,32	14,73	368,25	25
17368	0,355	0,25	1,42	14,21	355,25	25
17369	0,272	0,202	1,35	10,89	272,25	25
17370	0,433	0,339	1,28	17,3	432,5	25
17371	0,3	0,224	1,34	12,01	300,25	25
17372	0,415	0,326	1,27	16,6	415	25
17373	0,257	0,174	1,47	10,29	257,25	25
17374	0,361	0,269	1,34	14,45	361,25	25
17375	0,342	0,262	1,31	13,67	341,75	25
17376	0,27	0,19	1,42	10,81	270,25	25
17377	0,257	0,184	1,4	10,3	257,5	25
17378	0,32	0,237	1,35	12,82	320,5	25
17379	0,544	0,368	1,48	21,75	543,75	25
17380	0,246	0,194	1,27	9,83	245,75	25
17381	0,327	0,234	1,4	13,07	326,75	25
17382	0,31	0,213	1,46	12,4	310	25
17383	0,284	0,216	1,31	11,35	283,75	25
17384	0,382	0,267	1,43	15,28	382	25
17385	0,332	0,255	1,3	13,27	331,75	25
17386	0,299	0,214	1,4	11,95	298,75	25
17387	0,286	0,197	1,45	11,44	286	25
17388	0,392	0,263	1,49	15,66	391,5	25
17389	0,3	0,214	1,4	11,99	299,75	25
17390	0,345	0,233	1,48	13,81	345,25	25
17391	0,602	0,427	1,41	24,08	602	25
17392	0,295	0,219	1,35	11,8	295	25
17393	0,381	0,274	1,39	15,23	380,75	25

17394	0,283	0,224	1,27	11,32	283	25
17395	0,312	0,225	1,39	15,62	390,5	25
17396	0,529	0,337	1,57	26,45	661,25	25
17397	0,213	0,111	1,92	10,64	266	25
17398	0,405	0,26	1,56	20,26	506,5	25
17399	0,236	0,147	1,6	11,81	295,25	25
17400	0,325	0,22	1,48	16,25	406,25	25
17401	0,418	0,273	1,53	20,91	522,75	25
17402	0,393	0,266	1,48	19,63	490,75	25
17403	0,252	0,157	1,61	12,61	315,25	25
17404	0,218	0,15	1,45	10,89	272,25	25
17405	0,211	0,161	1,31	8,46	211,5	25
17406	0,543	0,374	1,45	21,71	542,75	25
17407	0,507	0,358	1,42	20,27	506,75	25
17408	0,318	0,223	1,43	12,73	318,25	25
17409	0,302	0,238	1,27	12,09	302,25	25
17410	0,374	0,251	1,49	14,95	373,75	25
17411	0,379	0,291	1,3	15,14	378,5	25
17412	0,304	0,236	1,29	12,18	304,5	25
17413	0,222	0,161	1,38	8,88	222	25
17414	0,332	0,229	1,45	13,29	332,25	25
17415	0,463	0,324	1,43	18,52	463	25
17416	0,449	0,354	1,27	17,94	448,5	25
17417	0,827	0,573	1,44	33,09	827,25	25
17418	0,73	0,501	1,46	29,19	729,75	25
17419	0,734	0,501	1,46	29,36	734	25
17420	0,473	0,332	1,42	18,92	473	25
17421	0,413	0,294	1,4	16,51	412,75	25
17422	0,416	0,294	1,42	16,66	416,5	25
17423	0,55	0,393	1,4	22,02	550,5	25
17424	0,441	0,321	1,37	17,65	441,25	25
17425	0,452	0,34	1,33	18,09	452,25	25

17426	0,598	0,461	1,3	23,92	598	25
17427	0,547	0,407	1,34	21,88	547	25
17428	0,261	0,199	1,31	10,45	261,25	25
17429	0,546	0,386	1,41	21,85	546,25	25
17430	0,46	0,331	1,39	18,41	460,25	25
17431	0,394	0,281	1,4	15,77	394,25	25
17432	0,36	0,282	1,28	14,4	360	25
17433	0,363	0,234	1,55	14,54	363,5	25
17434	0,425	0,288	1,48	17	425	25
17435	0,511	0,353	1,45	20,45	511,25	25
17436	0,464	0,32	1,45	18,58	464,5	25
17437	0,396	0,286	1,38	15,85	396,25	25
17438	0,429	0,313	1,37	17,15	428,75	25
17439	0,594	0,407	1,46	23,75	593,75	25
17440	0,337	0,253	1,33	13,48	337	25
17441	0,494	0,343	1,44	19,74	493,5	25
17442	0,44	0,317	1,39	17,61	440,25	25
17443	0,526	0,361	1,45	21,03	525,75	25
17444	0,412	0,302	1,36	16,5	412,5	25
17445	0,996	0,728	1,37	39,83	995,75	25
17446	0,563	0,434	1,3	22,52	563	25
17447	0,659	0,506	1,3	26,37	659,25	25
17448	0,454	0,329	1,38	18,16	454	25
17449	0,722	0,488	1,48	28,88	722	25
17450	0,731	0,502	1,42	28,54	713,5	25
17451	0,648	0,469	1,38	25,91	647,75	25
17452	0,692	0,472	1,47	27,67	691,75	25
17453	0,332	0,239	1,38	13,26	331,5	25
17454	0,269	0,185	1,45	10,76	269	25
17455	0,53	0,371	1,43	21,2	530	25
17456	0,449	0,32	1,4	17,96	449	25
17457	0,481	0,352	1,36	19,23	480,75	25



17458	0,582	0,466	1,25	23,29	582,25	25
17459	0,73	0,497	1,47	29,18	729,5	25
17460	0,544	0,381	1,43	21,78	544,5	25
17461	0,406	0,282	1,44	16,22	405,5	25
17462	0,71	0,477	1,49	28,39	709,75	25
17463	0,629	0,455	1,38	25,16	629	25
17464	0,653	0,459	1,42	26,1	652,5	25
17465	0,323	0,227	1,42	12,93	323,25	25
17466	0,368	0,268	1,37	14,71	367,75	25
17467	1,294	0,86	1,51	51,78	1294,5	25
17468	1,528	0,992	1,54	61,1	1527,5	25
17469	0,878	0,58	1,51	35,11	877,75	25
17470	0,475	0,362	1,45	18,99	474,75	25
17471	0,551	0,362	1,52	22,02	550,5	25
17472	0,515	0,352	1,46	20,6	515	25
17473	0,404	0,277	1,46	16,17	404,25	25
17474	0,286	0,201	1,42	11,42	285,5	25
17475	0,539	0,394	1,37	21,54	538,5	25
17476	0,737	0,535	1,38	29,47	736,75	25
17477	0,63	0,447	1,41	25,19	629,75	25
17478	0,36	0,269	1,34	14,41	360,25	25
17479	0,57	0,406	1,41	22,81	570,25	25
17480	0,418	0,291	1,43	16,7	417,5	25
17481	0,726	0,518	1,4	29,05	726,25	25
17482	0,297	0,203	1,47	11,89	297,25	25
17483	0,789	0,564	1,4	31,58	789,5	25
17484	0,521	0,372	1,4	20,83	520,75	25
17485	0,711	0,452	1,57	28,43	710,75	25
17486	0,499	0,317	1,57	19,96	499	25
17487	0,758	0,498	1,52	30,3	757,5	25
17488	0,544	0,342	1,59	21,77	544,25	25
17517	0,713	0,438	1,63	28,51	712,75	25

17520	0,674	0,416	1,62	26,95	673,75	25
17521	0,473	0,287	1,65	18,92	473	25
17522	1,064	0,653	1,63	42,56	1064	25
17523	0,502	0,311	1,62	20,09	502,25	25
17524	0,461	0,282	1,63	18,42	460,5	25
17525	0,806	0,519	1,55	32,23	805,75	25
17526	0,751	0,498	1,51	30,05	751,25	25
17527	0,406	0,267	1,52	16,25	406,25	25
17528	0,639	0,397	1,61	25,54	638,5	25
17529	0,599	0,391	1,53	23,95	598,75	25
17530	0,504	0,316	1,6	20,16	504	25
17531	0,468	0,288	1,62	18,7	467,5	25
17532	0,597	0,393	1,52	23,86	596,5	25
17533	0,529	0,337	1,57	21,17	529,25	25
17534	0,494	0,303	1,63	19,76	494	25
17535	0,619	0,472	1,31	24,74	618,5	25
17536	0,339	0,235	1,44	13,57	339,25	25
17537	0,534	0,38	1,4	21,35	533,75	25
17538	0,739	0,526	1,4	29,56	739	25
17539	0,593	0,435	1,37	23,73	593,25	25
17540	0,411	0,283	1,45	16,43	410,75	25
17541	1,011	0,721	1,4	40,43	1010,75	25
17542	0,502	0,364	1,38	20,09	502,25	25
17543	0,411	0,294	1,4	16,43	410,75	25
17544	0,386	0,247	1,4	13,83	345,75	25
17545	0,268	0,188	1,43	10,72	268	25
17546	0,189	0,124	1,52	7,55	188,75	25
17547	0,316	0,221	1,43	12,63	315,75	25
17548	0,278	0,182	1,53	11,14	278,5	25
17549	0,3	0,211	1,42	11,99	299,75	25
17550	0,403	0,272	1,48	16,13	403,25	25
17551	0,279	0,216	1,29	11,15	278,75	25

17552	0,215	0,141	1,53	8,6	215	25
17553	0,341	0,242	1,41	13,63	340,75	25
17554	0,33	0,229	1,44	13,21	330,25	25
17001	1,394	0,883	1,58	55,77	1394,25	25
17002	1,041	0,676	1,54	41,62	1040,5	25
17003	0,94	0,621	1,51	37,59	939,75	25
17004	0,947	0,615	1,54	37,88	947	25
17005	1,384	0,877	1,58	55,35	1383,75	25
17006	0,62	0,426	1,46	24,82	620,5	25
17007	0,823	0,562	1,46	32,92	823	25
17008	0,297	0,183	1,62	11,89	297,25	25
17009	1,245	0,859	1,45	49,79	1244,75	25
17010	0,323	0,22	1,47	12,93	323,25	25
17011	1,601	0,992	1,61	64,03	1600,75	25
17012	0,385	0,266	1,45	15,4	385	25
17013	0,25	0,192	1,31	10	250	25

*Zdroj: Vlastní*

## **Příloha B: Tabulka hodnot prvních izolací u opakovaně izolovaných vzorků**

*Tabulka 28: Tabulka získaných hodnot vzorků, které byly opakovaně izolované – první izolace.*

<b>číslo vzorku</b>	<b>A 260 nm</b>	<b>A 280 nm</b>	<b>Poměr A 260/280</b>	<b>c [ng/μL]</b>	<b>celková výtěžnost [ng]</b>	<b>Objem [μl]</b>
17113	1,517	1,098	1,38	60,7	1517,5	25
17113	1,513	1,072	1,41	60,53	1513,25	25
17119	1,099	0,766	1,43	43,95	1098,75	25
17120	1,107	0,772	1,43	44,27	1106,75	25
17129	0,906	1,345	0,67	36,23	905,75	25
17130	0,66	0,74	0,89	26,41	660,25	25

*Zdroj: Vlastní*

## **Příloha C: Tabulka hodnot druhých izolací u opakovaně izolovaných vzorků**

*Tabulka 29: Tabulka získaných hodnot vzorků, které byly opakovaně izolované – druhá izolace.*

<b>číslo vzorku</b>	<b>A 260 nm</b>	<b>A 280 nm</b>	<b>Poměr A 260/280</b>	<b>c [ng/μL]</b>	<b>celková výtěžnost [ng]</b>	<b>Objem [μl]</b>
17113	0,325	0,181	1,8	13,02	325,5	25
17119	0,237	0,162	1,46	9,5	237,5	25
17120	0,839	0,539	1,56	33,54	838,5	25
17129	0,352	0,23	1,53	14,07	351,75	25
17130	0,757	0,516	1,47	30,3	757,5	25

*Zdroj: Vlastní*

## Příloha D: Tabulka hodnot opakovaně měřených vzorků

Tabulka 30: Tabulka získaných hodnot vzorků, které byly opakovaně spektrofotometricky měřené.

číslo vzorku	A 260 nm	A 280 nm	Poměr A 260/280	c [ng/μL]	celková výtěžnost [ng]	Objem [μl]
17030	2,577	1,917	1,34	103,06	2576,5	25
17030	0,315	0,227	1,38	12,58	314,5	25
17038	1,236	0,851	1,45	49,46	1236,5	25
17038	0,658	0,45	1,46	26,32	658	25
17039	2,121	1,533	1,38	84,84	2121	25
17039	0,305	0,195	1,56	12,19	304,75	25
17106	0,433	0,251	1,72	17,32	433	25
17106	0,469	0,293	1,6	18,78	469,5	25
17113	1,517	1,098	1,38	60,7	1517,5	25
17113	1,513	1,072	1,41	60,53	1513,25	25
17125	0,397	0,294	1,35	15,88	397	25
17125	2,182	1,573	1,39	87,27	2181,75	25
17128	1,44	0,957	1,5	57,59	1439,75	25
17128	0,389	0,275	1,41	15,56	389	25
17184	2,387	1,633	1,46	95,46	2386,5	25
17184	2,162	1,449	1,49	86,47	2161,75	25
17184	1,889	1,304	1,45	75,57	1889,25	25
17191	0,256	0,199	1,29	12,81	320,25	25
17191	0,27	0,183	1,48	10,79	269,75	25

Zdroj: vlastní