

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Doktorský studijní program
Fyziologie a patologická fyziologie

Studium regulace regenerace jater za využití metod molekulární genetiky
Regulation of liver regeneration as assessed by means of molecular genetics

MUDr. David Rychtmoc

Školitelka: prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Školitel konzultant: RNDr. Martin Bunček, Ph.D.

Hradec Králové, 2014

Obhajoba dne:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 24. 1. 2014

Tato práce by nemohla vzniknout bez velké vstřícnosti a podpory mé školitelky ve chvílích beznaděje. Poděkování patří v první řadě jí, prof. MUDr. Zuzaně Červinkové, CSc. Od počátku studia byli se mnou při řešení mnoha obtíží RNDr. Martin Bunček, Ph.D. a PharmDr. Antonín Libra, Ph.D., bez nichž bych experimenty nedokázal provést a vyhodnotit. Lidsky i odborně má velkou zásluhu na této práci Mgr. Lenka Hubálková. Ostatní spolupracovnice a kolegové z Ústavu fyziologie Lékařské fakulty v Hradci Králové a z GENERI BIOTECH s.r.o. v různých chvílích přispěli svými důležitými díly k tomu, že jsem po oněch sedm let nacházel sílu jít dál. Všem vám děkuji a zůstávám vděčný.

Mimo obě školící pracoviště mne nejvíce odborně ovlivnili a inspirovali následující autoři (*pleno titulo*): Nad'a Johanisová, Zdeňka Jordánová, Jan Keller, Pavel Kosatík, Petr Piřha, John Quackenbush, Benilton Carvalho, Roslin Russel Apostolos N. Kandilis, Tony Hunter, Oscar Rueda, Natalie Thorne, Gabriella Rustici, Angela Goncalves a Carl Honoré.

Práci věnuji MUDr. Josefu Havlíčkovi[†].

OBSAH

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	7
2 ÚVOD.....	10
3 TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 Regenerace jater: používané modely a organizmy.....	10
3.2 Modely regenerace jater s chirurgickými inzulty.....	13
3.2.1. Regenerace jater vyvolaná podvazem větve <i>vena portae</i>	13
3.2.2. Regenerace jater vyvolaná parciální hepatektomií.....	13
3.3 Modely regenerace jater s toxickými inzulty	14
3.4 Přehled regenerace jater po jednotlivých fázích.....	15
3.4.1 Iniciační regenerace jater	17
3.4.2 Proliferační fáze regenerace jater	26
3.4.3 Terminační fáze regenerace jater.....	35
3.5 DNA microarrays – vývoj a současný stav	43
4 CÍLE PRÁCE.....	46
5 METODIKY	46
5.1 Laboratorní potkani	46
5.2 2/3 parciální hepatektomie u dospělých potkanů	47
5.3 Biochemická stanovení	48
5.4 Hmotnosti regenerujících jater v průběhu regenerace.....	48
5.5 Molekulárně biologické metody.....	49
5.5.1. Výroba DNA čipů.....	51
5.5.2. Příprava biologických vzorků pro studii	52
5.5.3. Izolace a značení RNA z biologických vzorků.....	52
5.5.4. Hybridizace značených vzorků na DNA čipy	58
5.5.5. Snímání obrazové informace z DNA čipů po proběhlé hybridizaci.....	63
5.5.6. Kvantifikace obrazové informace.....	67
5.5.7. Normalizace a integrace dat	68
5.5.8. Analýza dat o genové expresi	73
5.5.9. Formulování nové hypotézy o biologickém ději na základě vyhodnocených dat	75
5.5.10. Real-time PCR – příprava kvantifikačních systémů a vzorků cDNA	78
5.5.11. Provedení kvantifikačních PCR reakcí.....	79

5.5.12. Interpretace výsledků qPCR	80
6 VÝSLEDKY	81
6.1 Provedené hepatektomie	81
6.2 Biochemická stanovení	81
6.3 Hmotnostní parametry	82
6.4 Microarray analýzy – provedené hybridizace	84
6.5 Microarray analýzy – vyhodnocení dat	86
6.6 Real-time PCR – provedená stanovení	90
6.7 Real-time PCR – vyhodnocení dat	94
7 DISKUSE	96
8 ZÁVĚRY	107
Dedikace	108
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	109

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

aaRNA	aminoallyl-aRNA
ADP	adenosindifosfát
ALP	alkalická fosfatáza
AMP	adenosinmonofosfát
AMPK	adenosinmonofosfátem aktivovaná protein kináza
AP-1	aktivovaný protein 1 (c-Fos/c-Jun) (transkripční faktor)
aRNA	<i>anti-sense RNA</i>
ATP	adenosintrifosfát
BHQ	<i>black hole quencher</i> (druh zhášedce)
BM	bazální membrána
BSA	sérový bovinní albumin
Btg	(gen kódující) <i>B-cell translocation gene protein</i>
Cdk	cyklin-dependentní kináza
C/EBP α	<i>CCAAT enhancer binding protein alfa</i>
C/EBP β	<i>CCAAT enhancer binding protein beta</i>
C3aR	receptor (Kupfferových buněk) pro aktivovanou třetí složku komplementu
C5aR	receptor (Kupfferových buněk) pro aktivovanou pátou složku komplementu
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CAR	<i>constitutive androstane receptor</i>
CCD	<i>charge-coupled device(s)</i>
Cdk1	cyklin-dependentní kináza 1
cDNA	<i>copy DNA</i>
CK-19	cytokeratin 19
c-Met	(gen kódující) prekurzor receptoru pro růstový faktor hepatocytů
c-Myc	(gen kódující) protoonkogen Myc
Cnn1	<i>calponin 1, basic, smooth muscle</i>
CNS	centrální nervový systém
CPT-I	karnitin palmitoyltransferáza 1
CT	počítačová tomografie
DEG(s)	gen(y) se změněnou expresí
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dT	deoxythymidin
ECM	mezibuněčná hmota
Efnb1	<i>ephrin-B1</i>
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor
eIF-4F	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
EMFO	extramitochondriální oxidace mastných kyselin
F2	protrombin
F26BP	fruktóza-2,6-bisfosfát
FGF	růstový faktor fibroblastů
FoxM1	<i>forkhead box M1</i>

FRET	<i>Förster's (fluorescence) resonance energy transfer</i>
FU	<i>fluorescence unit</i>
FXR	<i>farnesoid X-activated receptor</i>
GAL	<i>generic array list</i>
GGT	gama-glutamyltransferáza
GPR	<i>GenePix result</i>
GSH	redukovaný glutathion
GUI	<i>graphic user interface</i>
HB-EGF	epidermální růstový faktor vázající heparin
HGF	růstový faktor hepatocytů
HIF1 α	<i>hypoxia-induced factor 1α</i>
Hippo	<i>serine/threonine-protein kinase hippo</i>
HK	Hradec Králové
HSCs	jaterní hvězdicové buňky
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IGF-I	inzulinu podobný růstový faktor I
IL-1 β	interleukin 1 beta
IL-6	interleukin 6
ILK	kináza spojená s integriny
JAK	<i>Janus kinase</i>
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
Ki-67	<i>antigen identified by monoclonal antibody Ki 67</i>
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
LF	lékařská fakulta
logFC	logaritmovaný poměr fluorescenčních intenzit
LPS	lipopolysacharid
LSECs	endoteliální buňky jaterních sinusoid
LSF	<i>late simian virus 40 factor</i> (transkripční faktor)
LXR	receptor oxysterolů (<i>člen rodiny jaderných receptorů</i>)
MAPK	mitogeny aktivovaná protein kináza
MB	<i>megabyte</i>
MDM2	<i>E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2</i>
miRNA	mikro ribonukleové kyseliny
MK	mastné kyseliny
MMP	matrix metaloproteáza
MR	magnetická rezonance
mRNA	informační (<i>messenger</i>) RNA
Mst1	<i>hepatocyte growth factor-like protein precursor (macrophage stimulating 1)</i>
mtDNA	mitochondriální DNA
MuMLV	<i>murine Moloney leukemia virus</i>
NFkappaB;	
NF κ B	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
Odc1	ornitin dekarboxyláza
p53	(gen kódující) tumor supresor p53
p73	(gen kódující) tumor protein p73

PAI-1	inhibitor 1 aktivátoru plazminogenu
PCA	analýza hlavní složky
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDGF	destičkový růstový faktor
PEPCK	fosfoenolpyruvátkarboxykináza
PH	parciální hepatektomie
PL	fosfolipidy
PPAR	peroxisomovými proliferátory aktivované receptory
pRb	<i>retinoblastoma(-susceptibility) gene product</i>
PTP	<i>permeability transition pore</i>
RCF	<i>rotational centrifugal force</i>
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku / kyslíkové radikály (<i>reactive oxygen species</i>)
rRNA	ribosomální RNA
SDS	dodecylsulfát sodný
Ski	<i>ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)</i>
Snon	<i>ski-related novel gene</i>
SSC	sodno-citrátový pufr (<i>saline-sodium citrate buffer</i>)
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
Tff3	<i>trefoil factor 3</i>
TGF	transformující růstový faktor
TGFβ	transformující růstový faktor beta
TIFF	<i>tag(ged) image file format</i>
TIMP	tkáňový inhibitor matrix metaloproteáz
TLR4	<i>toll-like receptor 4</i> (Kupfferových buněk)
TNFα	tumor nekrotizující faktor alfa
Tob1	<i>transducer of ErbB-2, 1</i>
uPA	urokinázový aktivátor plazminogenu
UZ	ultrazvuk
VEGF	růstový faktor cévního endotelu
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou
VMK	volné mastné kyseliny
Yap	<i>Yes-associated protein (Yorkie homolog)</i>
Yki	<i>Yorkie protein</i>
^{99m} Tc-GSA; Tc- 99m-GSA	metastabilní ⁹⁹ technecium - galactosyl sérový albumin

2 ÚVOD

Játra jsou životně důležitým orgánem s celou řadou funkcí. Jejich nepostradatelnost se odráží i v evolučně konzervované schopnosti spontánní regenerace po poškozeních různého původu. Tímto potenciálem se játra liší od ostatních útrobních orgánů a po právu tak již řadu desetiletí přitahují pozornost základního i aplikovaného výzkumu. Podstatná část *in vivo* experimentů se opírá o chirurgické intervence jako iniciační inzulty regenerace. Resekce definovaných rozsahů jaterní tkáně, zvané parciální hepatektomie, jsou dlouhodobě využívány pro svou dobrou reprodukovatelnost. Odpověď na resekci pak probíhá ve třech fázích, z nichž poslední, terminaci regenerace, se dosud věnovalo relativně nejméně studií. Přitom tato fáze není bez zajímavosti ani z hlediska biologie regulace buněčného dělení a přestavby tkání, ani z hlediska medicínských souvislostí.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Regenerace jater: používané modely a organizmy

Regenerační schopnost jater je mimořádná tím, že zůstává významně zachována i u evolučně nejpokročilejších organismů. Zatímco schopnost regenerace končetin nebo i útrobních orgánů u jednodušších druhů živočichů (např. ploštěnců a sumek) je velmi dobře známa a je chápána jako nezbytný předpoklad jejich přežití v prostředí, na kterém jsou značně závislé, u obratlovců vybavených širší škálou obranných mechanismů a nesrovnatelně větší pohyblivostí je regenerační schopnost mnohem omezenější a spíše překvapivá. Výhoda rozsáhlejší sebeobnovy je vykoupena u fylogeneticky nižších druhů tím, že složitost organizace jejich těl je limitována. Naproti tomu těla obratlovců vykazují pokročilejší uspořádání tkání a užší specializaci buněk, ze kterých se skládají. Daní za efektivitu pochodu v jejich organizmech je právě praktická nenahraditelnost jednou zničených či odňatých tkání.

Pozoruhodnou výjimkou z tohoto principu je právě zachovaná regenerační schopnost funkčního jaterního parenchymu, dokonce i u dospělých jedinců (Alvarado a Tsonis, 2006). Její vysvětlení úzce souvisí s rolí a také uložením jater v těle obratlovců. Vzhledem k jejich lokalizaci a uspořádání cévního zásobení, kdy do jater je směřována portální žilou krev z nepárových orgánů dutiny břišní, jsou játra jako první vystavována mohutnému a neutuchajícímu přísunu exogenních i endogenních látek s potenciálně toxickou či antigenní povahou. Právě pro případ, kdy s portální krví vstoupí do jater hepatotoxiny či patogenní mikroorganismy a vyvolají nekrózu, jsou jaterní buňky nadány schopností kompenzační proliferační odpovědi (Taub, 2004). Ta za určitý, druhově specifický, čas dokáže obnovit

objem i funkční kapacitu orgánu na úroveň postačující nárokům organismu (Michalopoulos, 2007). Vzhledem k životním strategiím mnoha savčích druhů nejsou takové situace vzácné a například u hlodavců dosahuje regenerace jater obdivuhodné rychlosti a účinnosti.

Než se však v dalším textu zaměříme na situaci u savců a zejména hlodavců, sloužících jako nejběžnější modelové organizmy, je hned zde nutno upozornit na odlišnost jejich jaterní regenerace od spontánní obnovy částí těl u nižších živočichů. Druhá uvedená situace je skutečnou regenerací, histologicky provázenou dediferenciací buněk v okolí místa léze a následnou tvorbou blastému, z něhož se odstraněná tkáň takřikajíc znovu vyvine, tedy rekapituluje vzorec organogeneze vlastní danému živočichu ve stádiu zárodku. Takto obnovená tkáň pak má uspořádání totožné s původní, odňatou. Významnou roli mohou v některých tkáních hrát i kmenové buňky. Histologická podstata regenerace jater u savců však není taková. Nedochozí ke tvorbě blastému zárodečné tkáně, dediferenciace zachovaných buněk není patrná (Michalopoulos, 2007). Proto také není dokonale dodržena původní architektonika tkáně. Cílem je obnovení objemu a funkce jater, avšak tvar není rozhodující. Ponechané jaterní laloky se zvětšují množením zralých buněk všech subpopulací a přebírají úlohu laloků chybějících či destruovaných. Proto, přísně vzato, bychom měli označovat proces obnovy jaterní tkáně po poškození u savců jako kompenzační hyperplazii a hypertrofii (Fausto a Riehle, 2005). Pojem regenerace jater je však v klinické i experimentální hepatologii natolik vžitý, že se jej budeme držet i v této práci.

Podívejme se nyní na možnosti studia regenerace jater v experimentu. Tento fenomén je pochopitelně studován *in vitro* i *in vivo*. *In vitro* studie znamenaly nezanedbatelný přínos pro tuto problematiku, avšak mají podstatné omezení. Protože jaterní tkáň je tvořena více buněčnými subpopulacemi a na průběh odpovědi jater na poškození mají vliv i signály a působky ze vzdálených orgánů, nelze celý regenerační děj beze zbytku modelovat *in vitro*. Při zaměření na komplexnější aspekty regenerace jsou tak *in vivo* experimenty nenahraditelné. Za pozornost stojí široké spektrum živočišných druhů, které již byly takto využity. Mezi menšími dominují myši a potkani, avšak regenerace jater je studována možná poněkud překvapivě i na drobných rybičkách zebříčkách pruhovaných (*Danio rerio*) (Curado *et al.*, 2010, Sadler *et al.*, 2007). Z rozměrnějších druhů, zvláště vhodných pro preklinické studie, jsou využívána prasata, psi, primáti (např. paviáni) a ovce (Martins *et al.*, 2008, Mortensen a Revhaug, 2011, Palmes a Spiegel, 2004).

Optimální výzkumný model regenerace by měl splňovat tato kritéria:

- snadnost a reprodukovatelnost vyvolání regenerace
- malá intra- i interindividuální variabilita v odpovědi modelových organizmů
- standardizovatelnost resp. stupňovatelnost intenzity počátečního stimulu.

Vedle těchto ohledů má praktický význam i dostupnost a snadnost manipulace se zvířaty a přijatelnost finančních nákladů na jejich pořízení a chov, zejména s rostoucí délkou studie. Je ovšem na místě uvést, že vhodnost modelu pro experimenty není nutně přímo úměrná aplikovatelnosti výsledků na reálné klinické situace. Je nepochybné, že pacienti s jaterními onemocněními jsou velmi různorodí a také případná regenerace je u nich modifikována řadou okolností, např. stádiem onemocnění, komorbiditami, celkovým stavem a mírou dodržování předepsané léčby.

Mimořádného regeneračního potenciálu jater si byli lidé vědomi již ve starověku. V řecké mytologii našel vyobrazení v legendách o Prométheovi a o Tityovi (DeFrances a Michalopoulos, 2011, Tiniakos *et al.*, 2010). Játra byla uctívána jako sídlo emocí, pocitů, přání, tužeb a sexuální potence. Etruští věštcí ze tvaru jater obětovaných zvířat předpovídali budoucnost. Řečtí badatelé již měli řadu morfologických znalostí a funkčních pozorování o játrech. V antickém Římě se o poznání jater nejvíce zasloužil Galén z Pergamu, jehož můžeme označit za zakladatele vědecky orientované hepatologie. Po období útlumu experimentálního výzkumu pod vlivem církevní ideologie, přinesli cenné nové poznatky renesanční autoři Leonardo da Vinci a Andreas Vesalius. Exaktnější a systematictější zájem o pochopení jaterní regenerace se více rozvinul v 18. století. Následující 19. století našeho letopočtu znamenalo velký rozkvět hepatologie. Dvacáté století pak přineslo nebývalý rozvoj laboratorních vyšetřovacích metod v hepatologii (Brodanová, 2010). Do dnešního dne tak mohlo být postupně vypracováno mnoho přístupů ke studiu regenerace. V každém modelu je klíčovým prvkem vyvolávající inzult, jenž může mít povahu mechanickou, chemickou či biologickou (infekční). Nejpoužívanější jsou modely s inzulty chirurgickými nebo toxickými (Palmes a Spiegel, 2004).

3.2 Modely regenerace jater s chirurgickými inzulty

3.2.1. Regenerace jater vyvolaná podvazem větve *vena portae*

Tato intervence je využívána zejména v chirurgii jaterních nádorů. Výzkumné studie i klinická pozorování ukazují, že po ní dochází k atrofii jaterního laloku zbaveného portálního přítoku a ke kompenzačnímu růstu ostatních laloků (Li *et al.*, 1997, Rous a Larimore, 1920). Rozga a kol. (1986) optimalizovali techniku podvazu tak, aby byly dosahovány reprodukovatelné výsledky. Pro tento model je charakteristické, že zahrnuje souběžně atrofii a apoptózu v podvázaných lalocích a hyperplazii v lalocích bez venózní okluze u téhož zvířete. Na rozdíl od jaterních resekcí je podvaz také plně reverzibilní. Zejména u větších zvířat je podvaz větví *vena portae* velmi vhodný pro studium operačních postupů, např. možnosti rozšíření rozsahu resekce jater díky předchozímu elektivnímu podvazu portální žíly (Nagano *et al.*, 2002, Nagano *et al.*, 2004, Palmes a Spiegel, 2004)

3.2.2. Regenerace jater vyvolaná parciální hepatektomií

Tato intervence spočívá v chirurgickém odstranění části jaterní tkáně, u plánovaných výkonů vždy s ohledem na segmentální uspořádání orgánu. Játra savců jsou pro tento přístup vhodná díky svému uspořádání do zřetelně oddělených laloků se samostatným cévním zásobením. Proporce představované jednotlivými laloky jsou v rámci druhů živočichů velmi stálé a umožňují tak provedení parciálních hepatektomií různého rozsahu. Radikalita operace má pak určující vliv na velikost vyvolané regenerační odpovědi a pochopitelně i na schopnost spontánního zotavení organismu (Man *et al.*, 2003, Mortensen *et al.*, 2008).

Průkopnickou práci na poli parciální hepatektomie publikovali Higgins a Anderson již v roce 1931. Jejich postup vypracovaný pro použití u potkanů převzali mnozí následovníci a upravili ho také pro provedení u myši a dalších druhů zvířat. Z variant resekce je nejběžnější dvoutřetinová resp. 67% až 70%-ní hepatektomie. Po ní následuje, u jedinců před resekci zdravých, silná a nejlépe synchronizovaná kompenzační odpověď zbylé tkáně. Tou se rozumí koordinovaný vstup dosud klidových zralých jaterních buněk všech subpopulací do buněčného cyklu završeného mitotickým dělením. Hepatektomie menšího rozsahu (např. 30%-ní a 50%-ní) jsou méně vydatným stimulem, který vyústí ve slabší proliferaci, nastupující méně synchronně a u menší části zbylých buněk. Naopak resekce větší než 75%-ní jsou spjaty se stupňujícím se poškozením již nedostačujícího zbytku jaterní tkáně. Buňky rezidua jsou sekundárně, v čase po operaci, destruovány progresivní nekrózou vyvolanou několika mechanismy (Panis *et al.*, 1997). Takové resekce bez terapeutických či podpůrných

zásahů přežívá klesající podíl operovaných zvířat, a u 90%-ní resekce je pro přežití nutriční podpora již nezbytná (Gaub a Iversen, 1984). Krajní variantou hepatektomie je úplné odstranění celých jater v jedné době za účelem studia mechanismů akutního jaterního selhání, to však již samozřejmě nespadá do kategorie parciálních resekcí (Azoulay *et al.*, 1997).

3.3 Modely regenerace jater s toxickými inzulty

V této skupině modelů je původcem iniciálního poškození chemická noxa, která působí buď na všechny jaterní buňky bez rozdílu anebo selektivně na některé buněčné subpopulace. Existuje celá řada látek schopných vyvolání jaterního poškození a následné regenerace. Na rozdíl od parciální hepatektomie je použití hepatotoxických modelů snazší a výsledný obraz je bližší klinickým situacím. Zatímco resekce ponechá zbylé části jater relativně nepoškozené, toxiny indukují zpravidla difúzní centrilobulární nebo periportální léze a tak lépe simulují projevy jaterních onemocnění (DeFrances a Michalopoulos, 2011, Palmes a Spiegel, 2004).

Na druhou stranu mají hepatotoxické modely některé nevýhody, mezi něž patří nižší reprodukovatelnost a obtížnější standardizovatelnost v experimentech. Je tomu tak proto, že účinky podávaných látek významně závisí na zvolených dávkách, způsobu aplikace, druhu pokusných zvířat a jejich věku a stavu výživy apod. Proto i rozsah jaterního poškození a regenerace může být velmi variabilní. Efekty chemických nox mohou přímo ovlivňovat průběh regenerace postižením některých klíčových dějů. Například destrukce buněčných membrán komplikuje vazbu růstových faktorů na jejich receptory, zánětlivá reakce zvyšuje produkci cytokinů a volných radikálů. Významnou roli může hrát i narušení genové exprese či proteosyntézy nebo vystupňovaná aktivace neparenchymových jaterních buněk. Projevy poškození a regenerace není v hepatotoxických modelech snadné odlišit, což ztěžuje hodnocení získaných výsledků. Rozsah výsledného jaterního inzultu a regenerace je nesnadné předpovědět a značná variabilita mezi experimenty je jen obtížně odstranitelná. Nejběžněji používanými hepatotoxiny jsou tetrachlormethan (CCl₄), D-galaktosamin, etanol, paracetamol (acetaminofen) a thioacetamid (Palmes a Spiegel, 2004).

3.4 Přehled regenerace jater po jednotlivých fázích

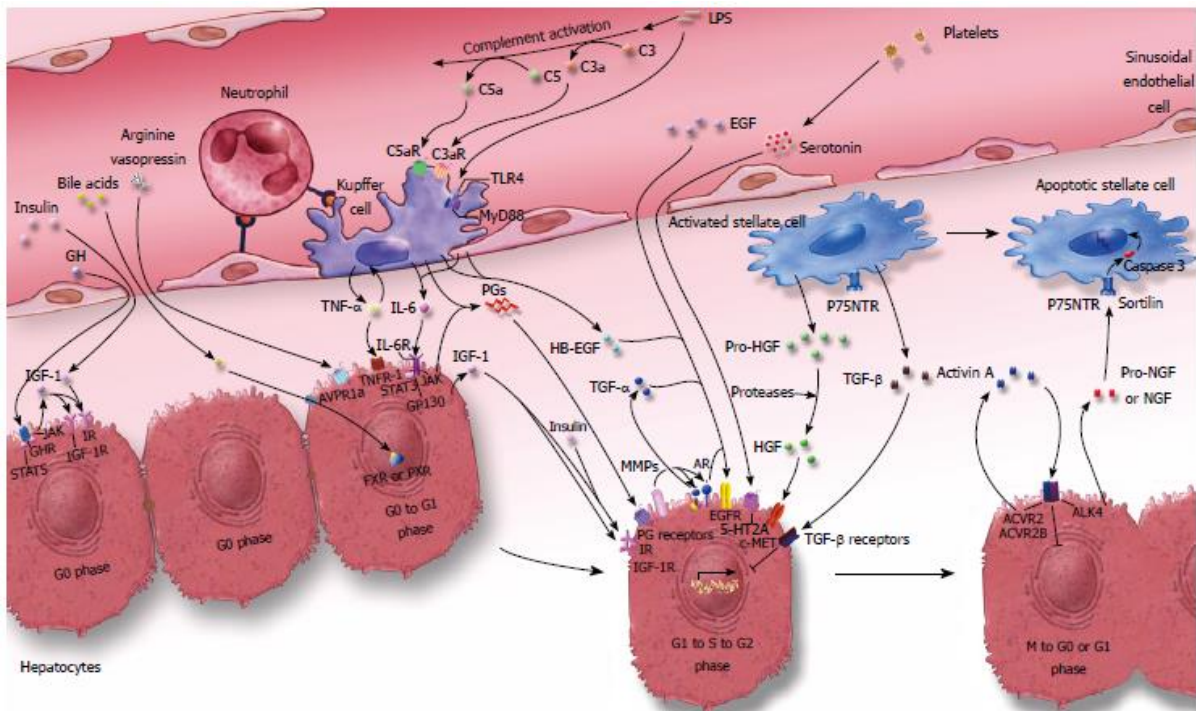
V následujících odstavcích předkládáme popis průběhu regenerace jater po 2/3 parciální hepatektomii. Uvedené poznatky pocházejí zejména z experimentů na potkanech či myších. Obsahem přehledu jsou informace spadající do několika kategorií, tvořících osnovu následujících kapitol, jíž jsme se snažili pro přehlednost držet. Rozsah příslušných částí textu se různí podle množství dostupných literárních údajů.

Kategorie informací o jednotlivých fázích průběhu jaterní regenerace:

- vymezení chronologické a vůči buněčnému cyklu
- transkripční faktory a genová exprese
- metabolické adaptace (systémové / hepatocytární)
- energetika a úloha mitochondrií
- role neparenchymových buněčných subpopulací
- role mezibuněčné hmoty

Odstranění převážné části jaterní tkáně způsobuje výrazné změny v expresi a aktivitě množství signálních mediátorů produkovaných mj. samotnými jaterními buňkami, endokrinními žlázami a krevními destičkami. K těmto mediátorům patří C3 a C5 složky komplementu; cytokiny (TNF α a interleukiny); růstové faktory (TGF, EGF, VEGF, FGF, IGF-I a HGF, NGF); komponenty mezibuněčné hmoty jater; extracelulární proteázy a jejich inhibitory; hormony (inzulin, růstový hormon, trijodtyronin, vazopresin, prostanoidy a endotelin-1); neurotransmitter serotonin; metabolity (žlučové kyseliny, kyslíkové radikály, oxid dusnatý, lipidy, glutathion, S-adenosylmethionin, sfingosin-1-fosfát) a chemokiny.

Průběh regenerace jater je důkladně koordinován prostřednictvím signální komunikace mezi hepatocyty a neparenchymovými buňkami jater a je také ovlivňován endokrinními žlázami, sympatickou inervací a krevním oběhem. Místa působení uvedených mediátorů a vzájemné interakce buněk jaterních subpopulací shrnuje obrázek 1. Níže podrobněji charakterizujeme jednotlivé typické fáze regeneračního děje.



Obrázek 1. Schéma signálních interakcí mezi subpopulacemi jaterních buněk a krevními elementy a plazmatickými faktory během regenerace jater po 2/3 parciální hepatektomii. Po poškození jater resekci přicházejí k játrům s portální krví faktory ze střeva např. bakteriální lipopolysacharid (LPS). LPS aktivuje komplementový systém a ten tvoří anafylatoxiny C3a a C5a. Společně LPS, C3a a C5a aktivují Kupfferovy buňky vazbou na receptory TLR4, C3aR a C5aR a indukují tak produkci TNF α a IL-6. Tyto faktory senzitivizují hepatocyty k růstovým faktorům a vedou je z G0 do G1 fáze buněčného cyklu. Inzulin, růstový hormon, žlučové kyseliny, arginin vazopresin, serotonin z krevních destiček a EGF z plazmy a prostaglandiny, HB-EGF, HGF a IGF-I z různých jaterních buněk a autokrinně amfiregulin (AR) a TGF α navozují postup z G1 přes S a G2 do M fáze buněčného cyklu. TGF β tvořený převážně hvězdicovými buňkami inhibuje G1 - S přechod hepatocytů a jeho působení je blokováno v proliferační fázi regenerace. Pro-NGF a nervový růstový faktor (NGF) tvořený regenerujícími hepatocyty ukončuje aktivaci sousedících hvězdicových buněk (HSCs) spuštěním apoptotických kaskád v HSCs. Když je obnovena hmota jater na normální objem na ukončení regenerace se podílejí zvýšená signalizace aktivinem A, apoptóza a další činitelé. Obrázek převzat z práce ZHENG, Z. Y., WENG, S. Y. a Y. YU. Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World J Gastroenterol*, 2009, **15**(46), 5776-5783.

3.4.1 Iniciace regenerace jater

Úvodní fází regeneračního děje je zahájení (iniciace). Časově je vymezena jako období od spouštěcího inzultu do překonání restriktivního bodu na rozhraní G1 a S fázi buněčného cyklu v jaterních buňkách. Trvání tohoto období pak závisí na druhu a intenzitě inzultu a na živočišném druhu (DeFrances a Michalopoulos, 2011). Klidové hepatocyty jsou jen velmi málo vnímavé vůči mitogenním stimulům (Steer, 1995). To se však překvapivě rychle může změnit působením adekvátního podnětu (*trigger*). Parciální hepatektomie patří k nejsilnějším spouštěčům, mohou to však být např. i působení hepatotoxinů či rozrušení mezibuněčných kontaktů nebo mezibuněčné hmoty různé etiologie (Etienne *et al.*, 1988, Liu *et al.*, 1994). Nabytí schopnosti odpovídat na proliferační stimuly zahajuje kaskádu dalších změn (a v anglosaské literatuře se nazývá *priming*). Je připisováno působení cytokinů, které se odehrává v nejčasnějších minutách a hodinách po inzultu (Fausto a Riehle, 2005).

Po mnoho let byl přechod hepatocytů z G0 do G1 fáze buněčného cyklu po parciální hepatektomii považován za nezávislý na expresi a aktivitě cyklinů a cyklin-dependentních kináz (Cdk). Nověji byly podány důkazy o úloze cyklinu C, který v komplexech s Cdk2 a Cdk3 fosforyluje a tím aktivuje transkripční faktory, např. LSF a pRb. Nestimulované hepatocyty konstitutivně exprimují Cdk2, zatímco Cdk1 lze prokázat nejdříve v době odpovídající u hlodavců pozdní G1 fázi a G1/S přechodu. V postupné kaskádě se během G1 fáze uplatňují cykliny D a E a Cdk 4, 6 a 2 (Corlu a Loyer, 2012).

V dalším popisu iniciace regenerace se budeme věnovat pouze situaci po 2/3 parciální hepatektomii. Nejdříve, prakticky okamžitě po resekci, začne na zbývající jaterní tkáň působit skokové zvýšení krevního průtoku. Redukce objemu orgánu na třetinu znamená relativní trojnásobný nadbytek objemu krve, který má játry protéci. To s sebou přináší významný nárůst smykového napětí (*shear stress*) vůči stěnám krevních cév. Tento vzestup portálního žilního tlaku vyvolává odezvu jaterních sinusoid, které rozšiřují své fenestrace a jejichž celková prostupnost roste již 5 minut po operaci (Wack *et al.*, 2001).

Bezprostředně po resekci stoupá aktivita urokinázového aktivátoru plazminogenu (uPA), jednoho z hlavních enzymů zodpovědných za aktivaci hepatocytárního růstového faktoru (HGF). Za fyziologických podmínek je HGF v neaktivní podobě vázán na proteoglykany mezibuněčné hmoty, avšak působením uPA je štěpen na svou biologicky účinnou podobu. Poté se HGF váže na c-Met, svůj transmembránový receptor na jaterních buňkách s tyrozinkinázovou aktivitou (dosahující maxima 60 minut po resekci) (Stolz *et al.*, 1999). Vedle vazby na c-Met je aktivní HGF vyplavován do krevního oběhu, kde jeho

koncentrace (u potkanů po 2/3 PH) dosahuje maxima za 60 až 120 minut po operaci. Vyplavování účinného HGF do oběhu bylo zdokumentováno i u žijících dárců jaterních štěpů při příbuzenských transplantacích (Efimova *et al.*, 2005, Lindroos *et al.*, 1991). Význam působení HGF a jeho interakce s c-Met doložila celá řada studií. Podávání HGF v infuzi je dokonce schopno vyvolat hyperplastickou odpověď jaterních buněk i u zvířat bez předchozího poškození jater (Patijn *et al.*, 1998).

Dalším významným činitelem v časně fázi jaterní regenerace je epidermální růstový faktor (EGF). Je produkován exokrinními žlázami trávicího traktu (Brunnerovými žlázami duodena a slinnými žlázami) a vzhledem k relativnímu nárůstu portálního přítoku do jater po PH se nabízí ve výrazně zvýšeném množství pro vazbu na příslušné povrchové receptory (EGFR) (Noguchi *et al.*, 1991, Böhm *et al.*, 2010). Interakce EGF-EGFR vyvolává fosforylaci receptoru (s maximem 60 minut po PH) a následnou mnohočetnou proliferací stimulaci (Stolz *et al.*, 1999). U dalších látek (TGF α a HB-EGF) byla prokázána schopnost interakce s EGFR v průběhu časně fáze jaterní regenerace (Fausto a Riehle, 2005). Je to jeden z mnoha příkladů redundance signálních kaskád podílejících se na odpovědi na parciální hepatektomii. V důsledku to pak znamená, že experimentální vyřazení účinku jednotlivých faktorů zpravidla přinese pouze oslabení či zpomalení regenerační odpovědi, nikoli její úplné znemožnění (Fausto, 1999, Mohammed a Khokha, 2005).

Zatímco HGF a EGF jsou nejvýznamnějšími zástupci skupiny tzv. přímých (úplných) jaterních mitogenů, samostatně schopných indukce jaterní proliferace *in vivo* i *in vitro*, další látky byly zařazeny mezi tzv. pomocné (vedlejší) jaterní mitogeny. Tyto nejsou samy o sobě dostačující pro vyvolání proliferace jaterních buněk *in vivo* ani v kultuře, nicméně mají prokázaný aditivní (synergický) účinek s přímými mitogeny. Do druhé jmenované skupiny patří například prozánětlivé cytokiny tumor nekrotizující faktor alfa (TNF α) a interleukin 6 (IL-6). Produkce těchto cytokinů některými jaterními buněčnými subpopulacemi je rovněž stimulována spouštěcími inzulty (nevyjímaje 2/3 PH) a v řádu desítek minut od poškození vede k rozsáhlé odezvě na transkripční úrovni. Působení TNF α a IL-6 zvyšuje afinitu k DNA několika transkripčních aktivátorů, např. aktivovaného proteinu 1 (AP-1), protoonkogenu *c-myc* a faktorů NFkappaB, STAT-3 a C/EBP β . Kromě cytokinů jsou pomocnými (vedlejšími) jaterními mitogeny také katecholaminy, tyroxin, inzulin a další látky (Taub, 2004). Kaskády růstových faktorů a cytokinů a jejich receptorů nepůsobí při iniciaci regenerace jater odděleně. Naopak se jejich účinky na mnoha úrovních prolínají a společně vedou k rychlé stimulaci navazujících signálních drah.

Teprve v posledních letech je odhalována úloha mikro RNA (miRNA) v průběhu regenerace jater po PH. Song a kol. v roce 2010 publikovali studii, v níž provedli 2/3 parciální hepatektomii u myši s inaktivací klíčové komponenty dráhy intracelulárního zpracování miRNA (*DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8)) v hepatocytech. Parenchymové jaterní buňky tak byly miRNA-deficientní a jejich vstup buněčným cyklem byl zpožděn na rozhraní fází G1 a S. U myši bez genetické manipulace dominovala v nálezech zejména zvýšená exprese miR-21 a snížená exprese miR-378. Autoři prokázali, že miR-21 přímo inhibuje Btg2. Btg2 je inhibitorem aktivace FoxM1, transkripčního faktoru nezbytného pro syntézu DNA v hepatocytech po 2/3 PH. Navíc miR-378 přímo inhibuje ornitin dekarboxylázu (Odc1), o které je známo, že podporuje syntézu DNA v hepatocytech po 2/3 PH ((Song *et al.*, 2010); viz také kapitola 3.4.3).

K úplnému popisu regulačních mechanismů jaterní regenerace neoddelitelně patří vedle kaskád růstových faktorů a cytokinů ještě signalizace zprostředkovaná metabolity a jejich receptory, zejména pak nukleárními (Delgado-Coello *et al.*, 2011, Imai, 2003, Li a Chiang, 2009, Mangelsdorf *et al.*, 1995, Wang *et al.*, 2008). Způsoby, jakými zvýšená metabolická zátěž ovlivňuje rozvoj jaterní regenerace, začaly být objasňovány teprve v nedávné době a dosud jsou ze tří uvedených principiálních regulačních sítí nejméně pochopeny. Dnes však lze již s jistotou konstatovat, že postupně se rozvíjející metabolické adaptace regenerující jaterní tkáň mají bohatou signalizační odezvu a jsou provázeny účelnými změnami genové exprese. Například vliv zvýšené intrahepatální koncentrace žlučových kyselin, která je výsledkem redukce počtu hepatocytů při zachované enterohepatální cirkulaci, na stimulaci regenerační odpovědi na PH byl jasně prokázán Huangem a kol. (2006). Odpověď zprostředkovaná nukleárním receptorem FXR zajišťuje dva protektivní účinky před akumulací hepatotoxických žlučových kyselin. Jednak inhibuje jejich novou syntézu a jednak navozuje proliferaci hepatocytů, aby mohly čelit této metabolické zátěži v obnoveném počtu. Na podobném principu se zakládá odpověď jaterní tkáň na xenobiotika zprostředkovaná nukleárním receptorem CAR. Po PH jak FXR, tak CAR indukují klíčový transkripční faktor FoxM1b a tím přispívají k postupu jaterních buněk buněčným cyklem. Rovněž peroxisomovými proliferátory aktivované receptory (PPAR), jejichž endogenními ligandy jsou mastné kyseliny, patří do rodiny nukleárních receptorů a mají důležitou roli v časných hodinách po PH, jak ještě uvádíme níže (Anderson *et al.*, 2002, Wheeler *et al.*, 2003).

Společným cílem, kterého všechny současně působící regulační kaskády při úspěšné regeneraci dosahují, je umožnit játrům vyhovět protichůdným požadavkům na ně po parciální hepatektomii kladeným. Dosud klidové jaterní buňky musí podstoupit výraznou proliferační odpověď a zároveň nadále nepřetržitě plnit své mnohdy vysoce specializované homeostatické funkce vůči organismu jako celku. Oboje je přitom značně energeticky náročné a hrazení těchto nároků vyžaduje změny ve skladbě využívaných substrátů oxidační fosforylace. Ne náhodou se tak mnoho studií věnovalo roli mitochondrií zejména v časných hodinách regenerace (Guerrieri *et al.*, 1995, Guerrieri *et al.*, 1999, Morimoto *et al.*, 1986, Tsai *et al.*, 1992). Také interakce s extrahepatálními orgány (viz níže) jsou zcela nepostradatelné. Jejich modelování vyžaduje *in vivo* experimenty a značně komplexní přístup.

Podívejme se tedy na systémové metabolické změny nastupující v organismu bezprostředně po 2/3 parciální hepatektomii u potkanů. Zvířata jsou okamžitě po resekcii vystavena dvěma vážným hrozbám. První je značné omezení zásob jaterního glykogenu, pohotového zdroje snadno mobilizovatelné glukózy, druhou je současný pokles možnosti novotvorby glukózy jaterní glukoneogenezí (Holeček a Šimek, 1989, Ockner, 2004). Rychle se sníží plazmatické hladiny glukózy a inzulínu, zatímco koncentrace a míra sekrece glukagonu, katecholaminů, kortikosteroidů a dalších antagonistických hormonů stoupají (Leffert *et al.*, 1979, Nakatani *et al.*, 1981, Olivecrona a Fex, 1970). Není divu, uvážíme-li, jak značný je rozsah resekce. Hormonální změny vedou k růstu aktivity hormon senzitivní lipázy adipocytů a uvolňování volných mastných kyselin do krevního oběhu s podporou strmě stoupajícího plazmatického HGF (viz výše).

Navozená situace připomínající hladovění je provázena změnami v metabolismu glukózy v zachovaných hepatocytech. Stoupá glykogenolýza a naopak je omezena utilizace glukózy jaterní tkání. Časně po akutním jaterním poškození snížený mitochondriální redoxní potenciál vede k zábráně utilizace pyruvátu v Krebsově cyklu a tím i k útlumu glykolýzy (Diehl, 1991, Holeček, 1999). Naopak k cíli, kterým je po resekcii navození zvýšeného exportu glukózy do cirkulace pro podporu extrahepatálních tkání, směřuje i nárůst jaterní novotvorby glukózy. Glukoneogeneze jako substráty spotřebovává aminokyseliny, laktát a glycerol mobilizované z periferních tkání (Camargo a Migliorini, 1971) a je energeticky hrazena výrazně vystupňovanou mitochondriální i extramitochondriální oxidací mastných kyselin. Ty jsou časně po PH hepatocytům k dispozici ve značném nadbytku (z cirkulace). Uvedené metabolické adaptace hepatocytů zastaví pokles koncentrace cirkulující glukózy a zabezpečí činnost centrálního nervového systému po operaci. Nízká koncentrace inzulínu v plazmě, vysoké hladiny protichůdně působících hormonů a hojnost mobilizovaných volných

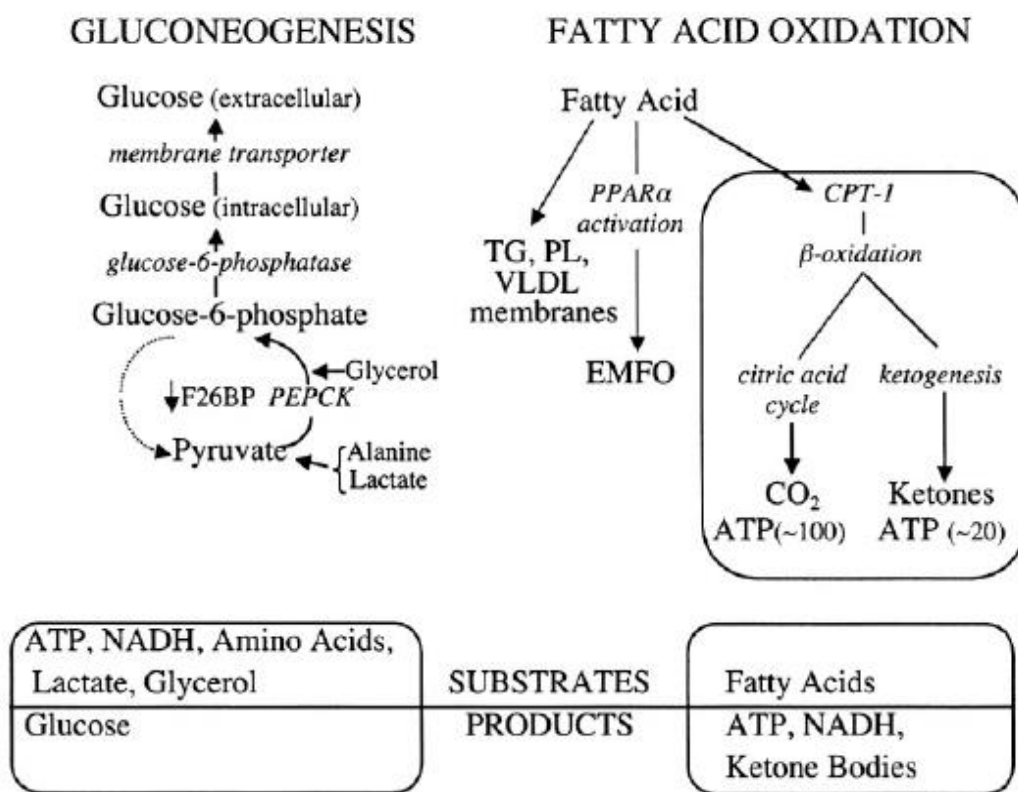
mastných kyselin (VMK) snižují spotřebu glukózy ve většině tkání s výjimkou CNS a VMK se stávají dominantním energetickým substrátem. Za pozornost stojí i renální glukoneogeneze a export glukózy, méně potlačitelné inzulinem než jaterní, které nabývají na významu jako záložní zdroje pro dobu, kdy hepatocyty vstupují do proliferační fáze.

Viscerální tuková tkáň dodává játrům VMK prostřednictvím portálního přítoku i v době, kdy se inzulinémie již zvyšuje a má tak důležitou roli jako zdroj stavebního materiálu pro novotvorbu membrán a syntézu eikosanoidů v následující proliferační fázi. Zprvu překvapivé zjištění, že suplementace glukózy časně po parciální hepatektomii zpožďuje syntézu DNA v hepatocytech a znovunabytí objemu orgánu, bylo vysvětleno tím, že normalizace inzulinémie touto intervencí potlačuje aktivitu hormon senzitivní lipázy a tím i zhoršuje nabídku esenciálních mastných kyselin (Bengmark, 1965, Ngala a Lambotte, 1981, Šimek *et al.*, 1967, Šimek, 1965). Opačné, pozitivní působení má podávání agonistů PPAR α . Například klofibrát omezuje mitochondriální produkci kyslíkových radikálů (ROS) a zvyšuje nabídku VMK (vč. esenciálních) pro extramitochondriální oxidaci, čímž urychluje nástup syntézy DNA v hepatocytech a obnovu jaterní tkáně po resekci (Mittal a Kurup, 1980). Po PH stoupá silně i exprese cytochrom P450 4A14 (ω -hydroxylázy MK) zodpovědné za tvorbu dikarboxylových mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Ty přispívají k aktivaci signalizace zprostředkované PPAR α (Anderson *et al.*, 2002).

Lze tedy shrnout, že iniciální fáze regenerace po parciální hepatektomii závisí do značné míry na dostupnosti zvýšeného množství volných mastných kyselin včetně esenciálních ω -6 MK mobilizovaných z tukové tkáně a dikarboxylových mastných kyselin s dlouhým řetězcem tvořených v hepatocytech extramitochondriální oxidací (Ockner, 2004; obrázek 2). Podle zjištění Andersena a spolupracovníků (1984) je časně po PH změněna distribuce enzymových aktivit glukóza-6-fosfatázy, sukcinát dehydrogenázy a fosfoenolpyruvátkarboxykinázy oproti játrům neoperovaných potkanů. U intaktních zvířat tyto enzymy dominují v periportální zóně acinů. Zato za 4 až 8 hodin po PH se tento gradient vyrovnává nebo dokonce obrací ve prospěch pericentrálních hepatocytů. Opětovné obnovení klidové distribuce začíná za 2 až 4 dny po resekci a úplně dokončeno je až za 14 dní od inzultu. Tyto změny jsou podkladem toho, že po PH pozbývají periportální hepatocyty preferenční schopnost novotvorby glukózy a jejího uvolňování do cirkulace, zřejmě ve prospěch přípravy na brzké zahájení proliferace. A naopak pericentrální hepatocyty v iniciální fázi regenerace přebírají tyto úlohy se vztahem k regulaci glykémie, když vykazují přechodně zvýšenou glukoneogenetickou schopnost a mají po PH vysoce zvýšenou aktivitu fosfoenolpyruvátkarboxykinázy (PEPCK). Adaptace metabolismu zachycené na obrázku 2,

jsou tak ve světle těchto informací charakteristické pro pericentrální hepatocyty (Kandilis *et al.*, 2010).

Souhrně vzato, v prvních 12 až 16 hodinách po parciální hepatektomii se hepatocyty podřizují potřebám organismu jako celku, zatímco pro ně samotné jde o období růstové inhibice.



Obrázek 2. Metabolické adaptace hepatocytů v časných hodinách po 2/3 parciální hepatektomii. Obrázek znázorňuje převažující glukoneogenezi a oxidaci mastných kyselin a současně potlačenou glykolýzu a syntézu mastných kyselin. Ohraničené oblasti reprezentují mitochondrie. Tento metabolický stav je antiproliferativní. Šířka šipek značí míru aktivity dané dráhy či reakce. Čísla v závorkách udávají přibližný výtěžek ATP při úplné oxidaci palmitátu (≈ 100) ve srovnání s úplnou konverzí ke ketogenezi (≈ 20). Úplná oxidace mastných kyselin je preferována. Nadbytek MK může překonat inhibici CPT-I působením malonyl-CoA. MK aktivují PPAR α a tím na transkripční úrovni zesilují vlastní oxidaci jak mitochondriální tak extramitochondriální. Zkratky: ATP: adenosintrifosfát; CPT-I: karnitin palmitoyltransferáza 1; EMFO: extramitochondriální oxidace mastných kyselin (β -oxidace v peroxisomech a ω a ω -1 oxidace v endoplazmatickém retikulu); F26BP: fruktóza-2,6-bisfosfát; MK: mastné kyseliny; PEPCK: fosfoenolpyruvátcarboxykináza; PL: fosfolipidy; PPAR α : peroxisomovými proliferátory aktivovaný receptor α ; TG: triacylglyceroly; VLDL: lipoproteiny o velmi nízké hustotě. Obrázek převzat z práce OCKNER, R. K. *Metabolism and Gene Expression in Liver Regeneration. Integration of metabolism, energetics, and signal transduction.* New York: Kluwer Academic Publishers, c2004, s. 177-200.

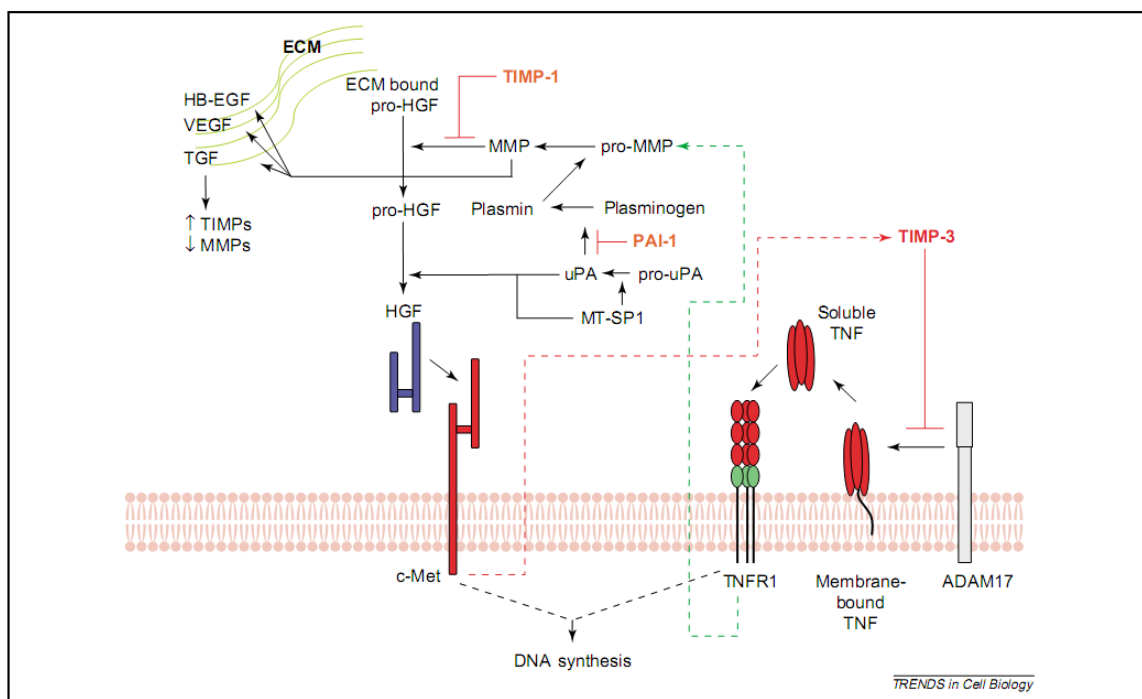
Z pohledu energetického metabolismu lze vysvětlit, proč není možná okamžitá příprava hepatocytů na proliferační odpověď a také pochopit, proč resekce příliš velkého rozsahu jaterního parenchymu vede časně k akutnímu jaternímu selhání (Gove a Hughes, 1991). Nadbytek volných mastných kyselin s dlouhým řetězcem působí v několika směrech nepříznivě na činnost mitochondrií: rozpřahuje oxidační fosforylaci, snižuje mitochondriální transmembránový potenciál, snižuje aktivitu ATP syntázy a tak i účinnost tvorby ATP (Ockner, 2004).

V hepatocytech se v iniciální fázi po 2/3 hepatektomii snižuje poměr $((ATP + 1/2ADP)/(ATP + ADP + AMP))$ v souladu s preferenční utilizací mastných kyselin. Porušení funkce respiračního řetězce je silnější než (protektivní) efekt rozpřažení oxidační fosforylace mastnými kyselinami a výsledkem je oxidační stres a peroxidace lipidů. Zvýšená tvorba superoxidového radikálu má odezvu ve zvýšené koncentraci malondialdehydu v mitochondriích i v jaterní tkáni. Roste i aktivita mitochondriální Mn-superoxiddismutázy a tvorba oxidu dusnatého, naopak klesá hladina glutathionu v mitochondriích (s minimem 24 hod po operaci (Guerrieri *et al.*, 1995, Guerrieri *et al.*, 1999, Morimoto *et al.*, 1986, Tsai *et al.*, 1992)). Vedle toho dochází ke zmnožení peroxisomů a nárůstu oxidace mastných kyselin v nich, který je provázen tvorbou dalších kyslíkových radikálů. Koncentrace mitochondriálního glutathionu v intervalech 48, 72 a 96 hod po operaci dosahuje vyšších hodnot než před operací; množství glutathionu vázaného na mitochondriální proteiny se od maxima 24 hod po operaci do 4. dne dne vrací téměř na hodnotu před PH (Guerrieri *et al.*, 1999). Koncentrace tkáňového glutathionu v játrech po 2/3 PH vykazuje poněkud odlišnou kinetiku. Za 12 hod po operaci je dvojnásobná a za 24 hod činí cca 160% koncentrace naměřené u laparotomovaných kontrol. Do 36 hod po resekci se tkáňová koncentrace GSH vrací k výchozím hodnotám (Huang *et al.*, 1998). Právě popsaná energeticky nouzová situace dočasně brání přípravě hepatocytů na proliferaci, která má záhy následovat. Nicméně v průběhu odezvy na PH má tato fáze své nezastupitelné místo.

Iniciace regenerace jater po resekci se pochopitelně neúčastní jen samotné hepatocyty. Kooperaci parenchymových a neparenchymových buněk naopak zajišťuje řada růstových faktorů a mediátorů (Böhm *et al.*, 2010, Zheng *et al.*, 2009). Tito činitelé pocházejí nejen ze samotné jaterní tkáně, ale nezřídka z extrahepatálních bližších i vzdálených zdrojů. Mezi ně patří PDGF, původem z trombocytů (Nowatari *et al.*, 2012), stimulující proliferaci hvězdicových buněk. Dělení endoteliálních buněk zase podporuje resekci stimulovaná exprese HIF1 α a na ni navazující zvýšená exprese VEGF (Maeno *et al.*, 2005); další množství

VEGF přichází portální žilou ze sleziny a střev (Yamamoto *et al.*, 2010). Na druhou stranu hvězdicové a endoteliální buňky již 3 hodiny po PH *de novo* syntetizují HGF, který nabývá na významu poté, kdy je vyčerpáno množství preexistujícího HGF časně pohotově uvolněného z ECM (Michalopoulos, 2007, Padiaditakis *et al.*, 2001). Chirurgický stres vyvolaný parciální hepatektomií má odezvu ve zvýšené produkci kyslíkových radikálů, aktivaci komplementu (C3a a C5a) a zvýšeném množství bakteriálního endotoxinu (LPS) z lumen střev. Všechny tyto látky dokáží aktivovat Kupfferovy buňky prostřednictvím *toll-like 4* receptoru (TLR4) a s G-proteinem spojených receptorů C3aR a C5aR s následnou signalizací na dráze transkripčního faktoru NFκB. To vede v Kupfferových buňkách k produkci cytokinů TNFα a IL-6. TNFα pak autokrinně stupňuje další produkci obou těchto cytokinů (viz obrázek 1). Syntézy a sekrece IL-6 jsou schopny endoteliální buňky jaterních sinusoid (LSECs), hvězdicové buňky (HSCs), cholangiocyty i samotné hepatocyty, takže dochází k synergické signalizaci. TNFα a IL-6 jsou zodpovědné za senzitivaci hepatocytů k růstovým faktorům (*priming*) prostřednictvím signálních účinků NFκB, JAK/STAT3 a MAPK a tím zahájení exprese tzv. bezprostředně časných genů (Zheng *et al.*, 2009, Clavien *et al.*, 2007, Fausto *et al.*, 2006, Mohammed a Khokha, 2005, Strey *et al.*, 2003).

Kromě intracelulárních dějů stojí za zmínku i dynamika mezibuněčné hmoty ve fázi iniciace. Přechod jaterních buněk z G0 do G1 fáze buněčného cyklu se neobejde bez průvodních změn ve složení matrix. Serinové proteázy a metaloproteázy zodpovídají za uvolňování či aktivaci klíčových signálních molekul pro buněčné dělení a pro přestavbu extracelulární matrix (např. HGF, VEGF, FGF a TGFβ). Činnost uvedených dvou tříd proteáz je provázaná a má vliv i na intracelulární signální kaskády, jak názorně ukazuje obrázek 3 (Mohammed a Khokha, 2005).



Obrázek 3. Vzájemné vztahy proteolytických kaskád v mezibuněčné hmotě a intracelulární signalizace během iniciační fáze regenerace jater po 2/3 parciální hepatektomii. Serinové proteázy mohou aktivovat matrix metaloproteázy (MMP) účastníci se štěpení mezibuněčné hmoty a tím uvolňování růstových faktorů a cytokinů do mikroprostředí buněk. Činnost proteáz je inhibována například PAI-1, TIMP-1 a TIMP-3. Růstové faktory a cytokiny vedoucí k zahájení syntézy DNA v hepatocytech mohou indukovat či inhibovat tkáňové inhibitory matrix metaloproteáz (TIMP) či matrix metaloproteázy samotné a podílet se tak na negativní či pozitivní zpětnovazební regulaci. Obrázek byl převzat z práce MOHAMMED, F. F. a R. KHOKHA. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends in Cell Biology*. 2005, 15(10), s. 555-563.

Mezibuněčná hmota (ECM) v játrech představuje jen 3% objemu orgánu, přesto jej podstatně ovlivňuje v různých (pato)fyziologických situacích. Na rozdíl od uspořádání v jiných parenchymatózních orgánech, mezi hepatocyty a sinusoidami není vytvořena souvislá bazální membrána (BM). Absence BM umožňuje velmi čilý obousměrný transport látek přes Disseho prostor. Během prvního dne regenerace po 2/3 parciální hepatektomii není u potkanů podle Martineze-Hernandez a Amenty (1995) patrná změna v množství či složení ECM. Studie Wackové a spolupracovníků (2001) potvrzuje nezměněný obsah kolagenu I a IV, a naopak poukazuje na zvýšené ukládání lamininu v sinusoidách, po 24 hodinách od resekce. Podle jejich práce je ukládání lamininu v sinusoidách zvýšeno již za 6 hodin po operaci a tato elevace přetrvává do 3. dne. Přestože laminin je základní složkou BM, ani během regenerace po hepatektomii není tato struktura v játrech tvořena. Hepatocyty tak i v průběhu regenerace zůstávají jedinými epiteliálními buňkami, které v savčím těle nejsou

odděleny od cév dvěma souvislými bazálními membránami. Kromě toho aktivita extracelulárních proteáz přispívá průběhu regenerace štěpením preexistujících inaktivních prekursorů růstových faktorů (např. HGF a EGF) případně proteoglykanů, které je dosud vázaly (Mohammed a Khokha, 2005).

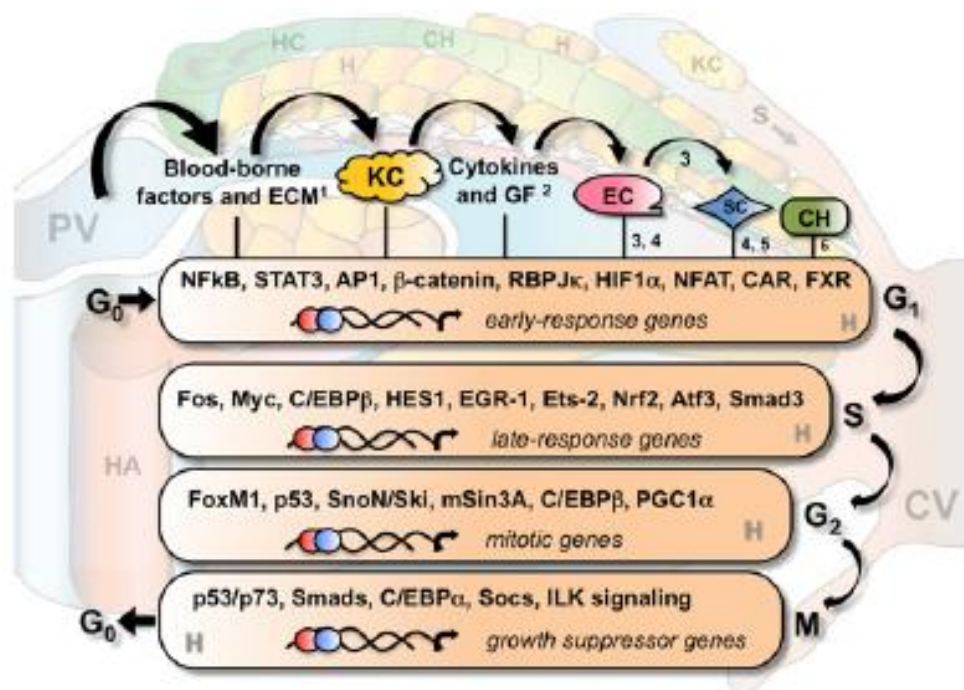
V úvodní fázi regenerace jater je také logické očekávat snížení množství či aktivity činitelů s antiproliferačními účinky. Mezi nemnoho faktorů s doloženým takovým vývojem po PH patří Tob1, člen rodiny PC3/BTG1 mitoinhibičních molekul. Tob1 působí jako konstitutivní inhibitor proliferace hepatocytů po PH. Hladiny Tob1 proteinu po PH rychle klesají, pravděpodobně vinou jeho degradace (tedy posttranslačním mechanismem). Pokles koncentrace Tob1 proteinu je nutný pro normální průběh časné jaterní regenerace. Protein Tob1 potlačuje aktivitu cyklin-dependentní kinázy Cdk1 a působí i na řadu dalších aktérů regulace buněčného cyklu, včetně suprese cyklinů D1 a A2 a inhibice cílových genů pro regeneraci významného transkripčního faktoru E2F (Ho *et al.*, 2010).

3.4.2 Proliferační fáze regenerace jater

Proliferační fáze regenerace je charakterizována mitotickými vlnami buněk všech jaterních subpopulací. Z pohledu buněčného cyklu toto období zahrnuje fáze S, G2 a M a začíná u hlodavců 12 až 18 hodin po 2/3 parciální hepatektomii a končí přibližně 4 dny po operaci (DeFrances a Michalopoulos, 2011). Zjevným znakem postupu v buněčném cyklu je syntéza DNA, jež v buňkách postupně koordinovaně narůstá. Po 2/3 parciální hepatektomii dosahují S fáze nejprve hepatocyty, v nichž syntéza DNA u potkanů začíná stoupat 12 hodin po resekci a dosahuje maxima přibližně 24 hodin po operaci. Neparenchymové buňky jater vstupují do S fáze později: Kupfferovy a hvězdicové buňky a buňky žlučovodů za 48 - 72 hodin a endoteliální buňky jaterních sinusoid (LSECs) cca za 48 - 96 hodin po zákroku (DeFrances a Michalopoulos, 2011, Wack *et al.*, 2001). Po inzultech způsobujících nekrózu nebo apoptózu jaterních buněk je průběh senzitivace k růstovým stimulům (*primingu*) stejný jako po PH, ale mitotické vlny jsou méně synchronizované (Taub, 2004, Zheng *et al.*, 2009).

Po odeznění maxima syntézy DNA při první synchronizované vlně dělení hepatocytů poklesá aktivita cyklin-dependentní kinázy 2. Je tlumena vazbou inhibitorů na komplexy, které Cdk2 obsahují. Na rozdíl od většiny ostatních savčích buněk tak v hepatocytech regenerujících po PH nacházíme expresi a aktivitu Cdk1 ve fázích S, G2 i M buněčného cyklu, zatímco činnost Cdk2 vykazuje jediný vrchol během S fáze (Corlu a Loyer, 2012).

Postup fází G2 k mitóze a její úspěšné završení s přesnou segregací chromozomů vyžadují expresi cyklinů A a B, Cdk1 a rodiny proteinfosfátáz Cdc25. Některé z těchto genů jsou indukovány transkripčním faktorem FoxM1, ke zvýšení jehož exprese dochází při iniciaci regenerace (Kurinna a Barton, 2011). Jiným příkladem účelné návaznosti je dvojice Egr-1 a Cdc20. Transkripční faktor Egr-1 je po PH silně exprimován již za 30 minut a jím řízený gen Cdc20, klíčový regulátor komplexu podporujícího anafázi mitózy, je u myši zvýšeně exprimován 48 hodin po resekcii (Su *et al.*, 2002, Liao *et al.*, 2004).



Obrázek 4. Kaskády aktivace transkripčních faktorů v průběhu regenerace jater po 2/3 parciální hepatektomii. Jednotlivé fáze buněčného cyklu v hepatocytech (H) provází aktivace specifických transkripčních faktorů a jimi regulované změny genové exprese. Na pozadí jsou znázorněny stavební struktury jaterní tkáně: PV: terminální větev portální žíly; HA: terminální větev jaterní arterie; HC: Heringův kanál; S: jaterní sinusoida; ECM: mezibuněčná hmota, v popředí pak neparenchymové buňky; KC: Kupfferovy buňky; EC: endotelové buňky výstelky sinusoid; SC: hvězdicové buňky; CH: cholangiocyty. Čísla zastupují mediátory regenerace působící na neparenchymové buňky jater nebo jimi secernované: 1: lipopolysacharid, ICAM, součásti komplementu, inzulin, acetylcholin, noradrenalin, EGF; 2: cytokiny IL-6 a TNF α ; 3: VEGF; 4: HGF; 5: TGF β ; 6: žlučové kyseliny. Obrázek byl převzat z práce KURINNA, S. a M. C. BARTON. Cascades of transcription regulation during liver regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43(2), 189-197.

Kontrolní bod buněčného cyklu na rozhraní G2 a M fází může být aktivován mitogenními stimuly a/nebo poškozením DNA při replikaci. Překonání tohoto restriktivního bodu při jaterní regeneraci může vyžadovat (přechodné) vyřazení regulačních funkcí

vykonávaných tumor supresorovým genem p53, jeho hlavním strážcem (Kurinna a Barton, 2011, Taylor a Stark, 2001). Do určité míry se překrývající řídicí úlohu s p53 může hrát příbuzný gen p73, který pravděpodobně umožňuje úspěšnou regeneraci jater u myši s knock-outem genu p53 (Cui *et al.*, 2005, Flores *et al.*, 2005). Obrázek 4 shrnuje postupnou aktivaci transkripčních faktorů v průběhu regenerace jater po parciální hepatektomii.

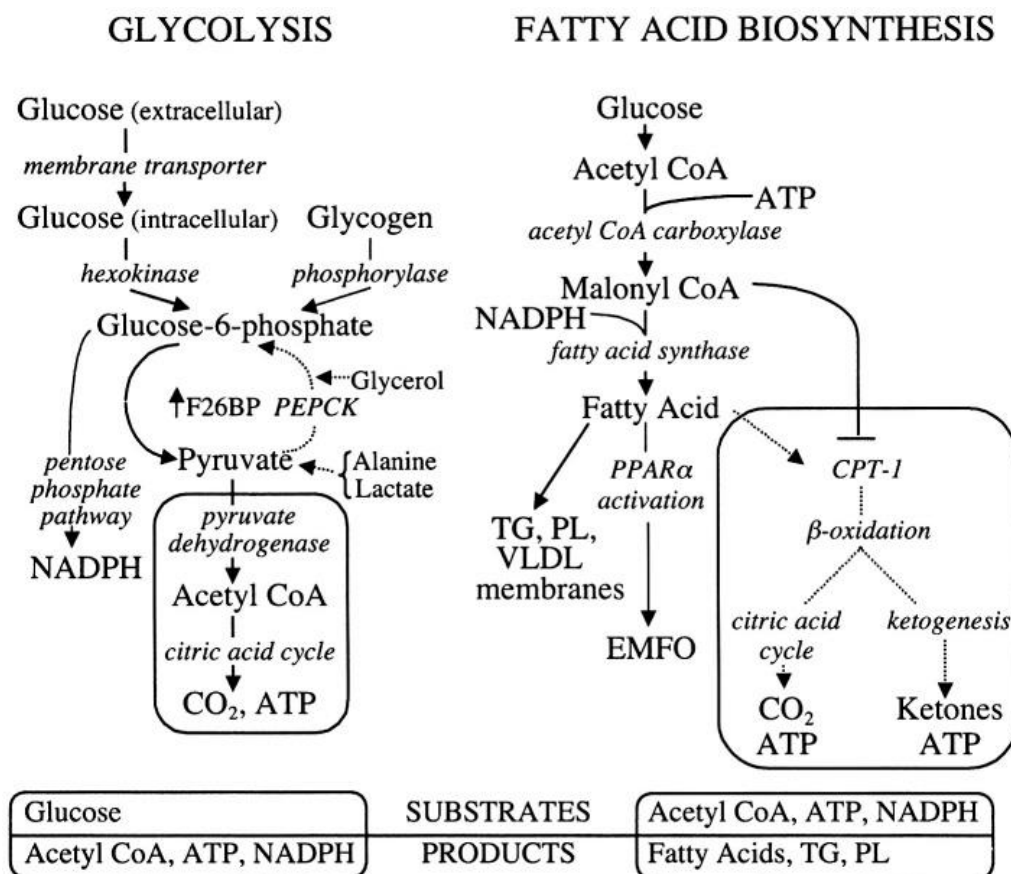
Funkční heterogenita hepatocytů se projevuje i během regenerace (Červinková, 2010). Syntéza DNA začíná v jaterních acinech v okolí portální vény (v I. zóně) a postupně nastupuje v dalších hepatocytech směrem k centrální véně (ve III. zóně acinu) (Barrass *et al.*, 1993, Rabes *et al.*, 1976). Funkční heterogenita může stát také v pozadí protirečících si nálezů metabolických změn v proliferační fázi regenerace.

Po iniciálním vzestupu se v proliferační fázi regenerace zmírňuje mitochondriální oxidační stres s tím, jak se postupně normalizuje vztah mezi nabídkou VMK a celkovou oxidační kapacitou mitochondrií. Do 18 – 24 hod po resekci se normalizuje aktivita komplexů respiračního řetězce a aktivita Mn-superoxiddismutázy (Tsai *et al.*, 1992). Při hodnocení poměru ATP/ADP za 24 hodin po 2/3 parciální hepatektomii u králíků prokázali Inomoto *et al.* (1994), že v cytosolu poklesá v souladu s rychlou spotřebou ATP pro potřeby regenerace. Naopak v mitochondriích poměr ATP/ADP roste výsledkem zvýšené aktivity oxidační fosforylace a rychlosti produkce ATP překračující rychlost jeho exportu do cytosolu. V mitochondriích z regenerujících jater králíků byly za 24 hod po PH rychlost respirace ve stavu 3, index respirační kontroly a rychlost fosforylace za saturačních koncentrací substrátů o 73%, 48% a 76% vyšší než u laparotomovaných kontrol. Nagino *et al.* (1989) hodnotili bioenergetické ukazatele u potkanů po 2/3 parciální hepatektomii až do 7. dne. Zaznamenali nárůst mitchondriální DNA o 40% oproti laparotomovaným kontrolám první den a o 50% druhý den, což bylo maximum ve sledovaném období. To dokládá biogenezi nových mitochondrií. U hepatektomovaných potkanů zaznamenali signifikantní nárůst spotřeby kyslíku při respiraci ve stavu 3 první, druhý a čtvrtý den a signifikantní zvýšení indexu respirační kontroly druhý a čtvrtý den. U potkanů po 2/3 PH byly nadále zjištěny zvýšené aktivity všech hodnocených respiračních komplexů a také nárůst obsahu cytochromů zejména aa₃ a b druhý a čtvrtý pooperační den.

Za 12 hodin po PH je zvýšena také koncentrace a syntéza glutathionu v potkaních játrech (Huang *et al.*, 1998). Tapia (2006) přináší podklady pro hypotézu, že přechodný akutní oxidační stres po hepatektomii dokonce prospívá vitalitě mitochondrií. Mechanismem popsaným u neuronů při kalorické restrikci by to mohlo být možné. Tapia se domnívá, že

zátěž spojená s hladověním, zahrnující zvýšení hladiny volných mastných kyselin a ketolátek jako např. hydroxybutyrátu, může sloužit k vyvolání mírného poškození metabolicky aktivních mitochondrií hladovějícího organismu, ale že toto mírné poškození je provázeno udržením přiměřené fyziologické integrity většiny dotčených mitochondrií prostřednictvím mechanismů mitofagie, mitochondriální fúze, zvýšené antioxidační obrany a reparace mtDNA. Ačkoliv může být uplatněna řada různých náhledů na akutní mitochondriální dysfunkci, důkazy naznačují, že pokles potenciálu vnitřní membrány mitochondrií ($\Delta\Psi_m$), nárůst produkce ROS a otevření PTP mohou souhrnně být platnými ukazateli počínající „mitohormeze“, tedy jevu odpovídajícímu pozorováním z jiných buněčných modelů, u nichž silný oxidační stres inhibující komponenty respiračního řetězce vyvolává nekrózu či apoptózu, avšak mírný oxidační stres může navodit růst a množení (Day a Suzuki, 2005, Dypbukt *et al.*, 1994, Thannickal *et al.*, 2000).

Na příklon hepatocytů ke zvýšené utilizaci glukózy dosažený do 24 hodin po PH poukazuje nárůst *de novo* syntézy mastných kyselin, protože tento proces závisí (dodávkami substrátů a kofaktorů) jak na glykolýze, tak na pentózofosfátovém zkratu (Obrázek 5).

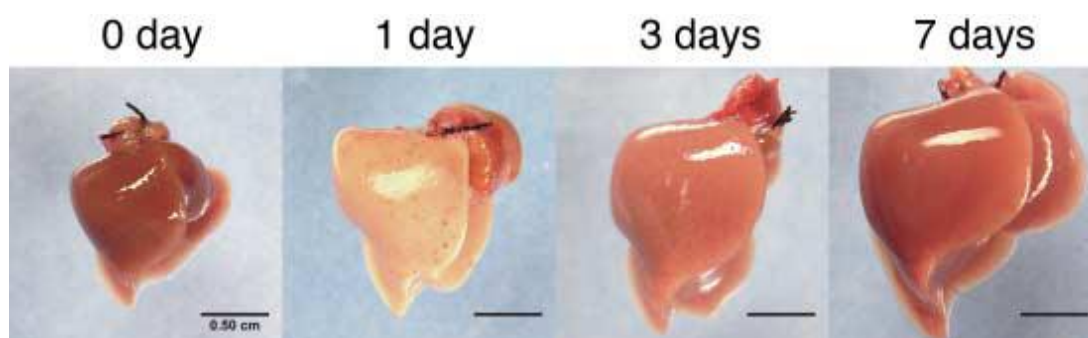


Obrázek 5. Schéma metabolických pochodů v hepatocytech charakteristických pro proliferační fázi regenerace po 2/3 parciální hepatektomii. V intermediárním metabolizmu převládá glykolýza a syntéza ATP a mastných kyselin hrazená probíhajícími reakcemi cyklu kyseliny citrónové. Naopak utlumeny jsou glukoneogeneze a oxidace mastných kyselin v mitochondriích. Ohraničené oblasti reprezentují mitochondrie. Šířka šipek znázorňuje relativní aktivitu drah či reakcí. Zkratky: ATP: adenosintrifosfát; CPT-I: karnitin palmitoyltransferáza 1; EMFO: extramitochondriální oxidace mastných kyselin (β -oxidace v peroxisomech a ω a ω -1 oxidace v endoplazmatickém retikulu); F26BP: fruktóza-2,6-bisfosfát; PEPCCK: fosfoenolpyruvátkarboxykináza; PL: fosfolipidy; PPAR α : peroxisomovými proliferátory aktivovaný receptor α ; TG: triacylglyceroly; VLDL: lipoproteiny o velmi nízké hustotě. Obrázek převzat z práce OCKNER, R. K. *Metabolism and Gene Expression in Liver Regeneration. Integration of metabolism, energetics, and signal transduction*. New York: Kluwer Academic Publishers, c2004, s. 177-200.

Zde se dostáváme k oněm zdánlivě nehospodárným a protirečícím si nálezům. Zdokumentovaná hepatocelulární syntéza mastných kyselin při pokračující oxidaci MK působí dojmem plýtvání. Je však třeba upozornit na to, že studie, které tyto údaje přinesly (např. Schofield *et al.*, 1987) pravděpodobně nedokázaly postihnout dynamiku, s níž v čase a prostoru (podél osy jaterních acinů (Barrass *et al.*, 1993, Rabes *et al.*, 1976)) dochází k přechodu od časných metabolických adaptací k těm preproliferativním (Ockner, 2004). Novější práce, například Ferriho a spolupracovníků (2005), blíže objasňují časovou dynamiku metabolických a energetických adaptací v jednotlivých zónách jaterních portálních acinů. Tak v periportálních hepatocytech byly za 24 hodin po PH prokázány mitochondrie se změněnou

ultrastrukturou, zvýšené množství lyzosomů, peroxisomů a volných polyribosomů. Tyto změny jsou přechodné a do 4. pooperačního dne vymizí. V pericentrálních hepatocytech takový vývoj nebyl prokázán a jejich orgány se výrazněji nelišily od těch u kontrolních potkanů. Podle recentních poznatků, shrnutých v přehledové práci Kandilise a kol. (2010), je nepochybná rozdílná míra zapojení a časová dynamika účasti hepatocytů na metabolických změnách po parciální hepatektomii daná jejich lokalizací v jednotlivých zónách portálních acinů. Funkční heterogenita hepatocytů má své souvislosti i např. ve vztazích k mezibuněčné hmotě anebo v produkci růstových faktorů pro neparenchymové buňky. Celkově vzato však lze konstatovat, že do 24 hodin po PH hepatocyty dokonaly úplný obrát v orientaci metabolismu. Od glukoneogeneze spotřebovávající MK a růstové inhibice přešly ke glykolýze, syntéze MK a kompetenci k postupu buněčným cyklem (Ockner, 2004).

Změny v hepatocytárním metabolismu lipidů v proliferační fázi regenerace mají i makroskopicky patrný projev. Je jím zvýšená akumulace triacylglycerolů a esterů cholesterolu v cytoplasmě hepatocytů a tedy rozvoj ztukovatění (steatózy) jaterní tkáně. I játra před PH steatózou zcela nepostížená vykazují tuto přechodnou změnu, která navíc vrcholí v období nejvyšší proliferační aktivity hepatocytů, tzn. mezi 24. a 72. hodinou po operaci (Obrázek 6). Může se to zdát paradoxní, ale tato transientní steatóza není neúčelná. Naopak, proběhnutí této změny právě v proliferační fázi je nezbytné pro plnou proliferační odezvu na resekci (Hata *et al.*, 2007, Shteyer *et al.*, 2004). Za zmínku stojí například fakt, že hepatocyty v I. zóně acinu, které se dělí nejdříve, preferují lipidy jako zdroj energie. Časné změny v expresi řady metabolických genů směřují k tomuto vývoji. Příklady jsou snížená exprese mediátorů inzulinové signalizace a naopak výrazný vzestup exprese PEPCCK před zahájením replikace. Jak již bylo výše naznačeno jaterní buňky potřebují nemalé množství substrátů lipidové povahy pro novotvorbu membrán a jako zdroj energie (Farrell, 2004). Studie Shteyera *et al.* (2004), která pro posouzení významu akumulace lipidů v regenerujících játrech využila mj. delecí glukokortikoidových receptorů, opět ukázala na význam nukleárních receptorů v játrech po PH. Popsaná steatóza je také dokladem regulační úlohy cholesterolu (a lipidů obecně) v průběhu regenerace jater, která je předmětem recentních přehledových prací (Delgado-Coello *et al.*, 2011, Rudnick a Davidson 2012).



Obrázek 6. Akumulace lipidů a přechodná steatóza v regenerujících játrech hlodavců po 2/3 parciální hepatektomii. A) Makroskopicky patrné změny velikosti a obsahu lipidů v myších játrech po 2/3 PH. Měřítko odpovídá velikosti 0,5 cm. Obrázek byl převzat z práce HATA, S., NAMAÉ, M. a H. NISHINA. Liver development a regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev Growth Differ*, 2007, 49(2), 163-170.

Hepatocyty, nejpočetnější jaterní buňky, se za fyziologických podmínek dělí jen velmi zřídka. V klidovém zdravém parenchymu připadá jeden dělicí se hepatocyt na 20 000 buněk v G0 fázi (Steer, 1995). Tím více překvapující je jejich proliferační kapacita po inzultech vyvolávajících regeneraci. V experimentech s opakovanými parciálními hepatektomiemi u potkanů prokázali Stocker *et al.* (1973), že hepatocyty jsou schopny za těchto podmínek nejméně 18 buněčných dělení. Overturf *et al.* (1997) dokonce prokázali, že diferencované adultní myší hepatocyty si uchovávají potenciál k dělení srovnatelný s hematopoetickými kmenovými buňkami. Při těchto experimentech po opakovaných transplantacích neztratily hepatocyty své specializované funkce ani schopnost vytvoření správných mezibuněčných kontaktů a nejevily známky genetické nestability ani hrozící nádorové transformace. Tato pozorování povzbudila snahy o využívání transplantací hepatocytů v klinických aplikacích. Současný stav vývoje této problematiky je předmětem přehledových prací Ezzata *et al.* (2011) a Shafritze a Oertela (2011). Poznání virtuálně neomezené proliferační kapacity diferencovaných hepatocytů také vedlo k zaměření pozornosti na jejich telomery a případnou aktivitu telomerázy v adultních buňkách, kterou by se lišily od jiných parenchymových buněk solidních orgánů. Vzestup aktivity telomerázy byl v regenerujících hepatocytech skutečně prokázán (Golubovskaya *et al.*, 1997), ale je třeba uvést, že potkaní hepatocyty vykazují aktivitu tohoto ribonukleoproteinu i za klidových podmínek. Tak tomu není v lidských játrech a vhodnějším modelem je zde PH u prasat, kde aktivita telomerázy po operaci stoupá i přes absenci bazální aktivity před zákrokem (Wege *et al.*, 2007).

Za zmínku stojí i skutečnost, že ne všechny hepatocyty, které dosáhly S fáze buněčného cyklu, se také nakonec rozdělí. Naopak, roste zastoupení polyploidních buněk. To, při každé vlně syntézy DNA, které jsou po PH nejvýše tři, omezuje rozsah výsledné proliferací odpovědi (Sigal *et al.*, 1999).

Také je třeba uvést, že proliferací odpověď se samozřejmě netýká pouze hepatocytů, ale i všech dalších jaterních buněčných subpopulací, bez jejichž účasti by nebylo možné nahrazení objemu a funkce resekovaných jaterních laloků. O procesech zajišťujících zdárnou a časově i prostorově účelnou replikaci neparenchymových buněk máme obecně méně znalostí, než o proliferaci hepatocytů. Mitotickým dělením hepatocytů vznikají shluky 10 - 14 buněk, které nejsou protkány cévními ani biliárními strukturami a postrádají i mezibuněčnou hmotu. Hvězdicové buňky pak vysílají do těchto shluků jemné membránové výběžky, za nimiž následují výstelkové buňky novotvořených sinusoid. Dělení endoteliálních buněk s cílem obnovit síť sinusoid probíhá v poměrně širokém rozmezí od 3. do nejméně 8. dne po PH (Wack *et al.*, 2001). Vrůstáním neparenchymových buněk je obnoveno charakteristické uspořádání tkáně do jaterních trámců s funkčně významnou polaritou hepatocytů vůči cévám a žlučovodům (Steer, 1995). Endotelie sinusoid jsou přitahovány ke shlukům nově namnožených hepatocytů pomocí jimi secernovaného VEGF a dalších látek (Shimizu *et al.*, 2001). V endotelových buňkách v blízkosti těchto shluků byla potvrzena zvýšená exprese receptorů Flt-1 (VEGF-R1), Flk-1/KDR (VEGF-R2), Flt-4 (VEGF-R3), Flt3/Flk2 a také Tie-1 a Tie-2 (pro angiopoetin) a pro destičkový růstový faktor beta (PDGF-R β) (Mohammed a Khokha, 2005, Ross *et al.*, 2001). Buňky výstelky sinusoid a hepatocyty se v proliferaci vzájemně podporují. Na stimulaci VEGF produkovaným hepatocyty odpovídají LSECs produkcí HGF (LeCouter *et al.*, 2003). Šířka trámců hepatocytů od prvního pooperačního dne vzrůstá a do třetího dne dosahuje maxima poměr počtu hepatocytů oproti endoteliím sinusoid, které proliferaci teprve zahajují. Avaskulární shluky nových hepatocytů utlačují již existující sinusoidy. Průměr fenestrací a celková propustnost výstelkových buněk sinusoid dosahují minima v periportální i pericentální zóně acinů za 72 hodin po operaci. Ve stejné době, jako v jediném intervalu dvoutýdenního sledování, byl elektronmikroskopicky patrný těsný kontakt endotelií sinusoid s buňkami s morfologií hvězdicových buněk. Vzhledem k časnější proliferaci hvězdicových buněk oproti LSECs připadá za 72 hodin po operaci na jednu sinusoidální epitelii nejvíce hvězdicových buněk a to může mít fyziologický význam pro zdárný průběh neovaskularizace hepatocytárních shluků (Wack *et al.*, 2001).

Otázka, zda se po PH dělí i Kupfferovy buňky není jednoznačně zodpovězena, jejich počty však mohou narůstat migrací prekursorových buněk z kostní dřeně (Michalopoulos, 2007). Cílené snížení aktivity Kupfferových buněk podáním $GdCl_3$ poněkud překvapivě posiluje regenerační odpověď (Rai *et al.*, 1996, Suzuki *et al.*, 1996). Na druhou stranu myši s Kupfferovými buňkami cíleně eliminovanými klodronátem vykazovaly zhoršenou obnovu hmotnosti jater po 2/3 resekci, kdy do 8. pooperačního dne dosáhly jen 79% kontrolních hodnot. Autoři prokázali změny v genové expresi vazoaktivních mediátorů a mírnější nárůst smykového tření v sinusoidách, které má u intaktních myši potenciační působení na regeneraci po hepatektomii (Abshagen *et al.*, 2008). Po PH exprimují hepatocyty nervový růstový faktor (NGF) a hvězdicové buňky zvyšují expresi jeho receptoru p75NTR. Interakce NGF s p75NTR vede k apoptóze hvězdicových buněk a může představovat ochranný parakrinní mechanismus regenerujících jater před nadměrnou aktivací HSCs a případnou nadprodukcí složek mezibuněčné hmoty (viz obrázek 1). Ta je charakteristická pro fibrotická jaterní onemocnění, kde regenerace neprobíhá úspěšně (Asai *et al.*, 2006, Parola a Pinzani, 2009). Hvězdicové buňky jsou hlavním zdrojem HGF v regenerujících játrech. Přispívají dělení hepatocytů jak syntézou HGF, tak aktivací pro-HGF díky tomu, že produkují uPA (Fibbi *et al.*, 1999, Ramadori *et al.*, 1992, Schirmacher *et al.*, 1992). Tvorba uPA hvězdicovými buňkami je stimulována růstovými faktory PDGF a bFGF, naopak TGF- β ji potlačuje. U akutních jaterních poškození HGF významně přispívá k regeneraci hepatocytů. V průběhu chronických poškození ztrácejí hvězdicové buňky schopnost syntézy HGF, v případě cirhotických onemocnění je to provázáno změnou jejich fenotypu na buňky myofibroblastového typu.

Produkce humorálních proliferačních signálů často není v játrech po resekci omezena jen na jednu buněčnou subpopulaci. Například IGF-I či ligandy EGF receptoru HB-EGF a amfiregulin jsou secernovány i neparenchymovými buňkami (Zheng *et al.*, 2009). V řádu dní po PH cholangiocyty rekonstruují intrahepatální žlučovody. Za tři dny po 2/3 parciální hepatektomii je u potkanů prokázáno zvýšené ukládání lamininu v Disseho prostorech v periportální i perivenózní lokalizaci. Ostatní složky matrix se v oblasti sinusoid významněji neliší od kontrolních zvířat, nicméně v parenchymu v okolí větších krevních cév je zřejmé zvýšené množství kolagenu IV, fibronektinu a lamininu (Martinez-Hernandez a Amenta, 1995, Wack *et al.*, 2001). Novotvorba mezibuněčné hmoty, jejíž složení a distribuce se normalizuje do 10. dne po PH (Steer, 1995), neovaskularizace a obnova biliárního stromu navrácí játrům jejich komplikovanou a pro funkci nezbytnou tkáňovou architekturu.

3.4.3 Terminační fáze regenerace jater

Ukončení regenerační odpovědi na parciální hepatektomii byla dosud věnována relativně nejmenší pozornost, a tak zůstává i přes desítky let studia tohoto modelu u hlodavců nejméně popsanou a objasněnou fází celého procesu. Je však třeba uvést, že otázka zastavení vydatné kompenzační proliferační odpovědi na resekci není o nic méně vědecky zajímavá než problematika zahájení regenerace. Pochopení spolehlivých regulačních mechanismů, které jsou zodpovědné za obdivuhodně přesné vybalancování finální velikosti regenerujících jater podle nároků celého organismu a za návrat všech buněčných subpopulací do klidového stavu slibuje přinést hodnotné poznatky pro patogenezi jaterních malignit a nádorů obecně.

Léta shromažďované zkušenosti z *in vivo* experimentů s hepatektomiemi a transplantacemi jater jasně naznačovaly existenci precizního regulačního systému ovládajícího poměr velikosti jater ku velikosti těla. Tento dlouho pouze iluzorní "hepatostat" dokáže korigovat velikost štěpů příliš malých i nadměrných (Francavilla *et al.*, 1994, Ninomiya *et al.*, 2003, Starzl *et al.*, 1993).

Z hlediska časového připadá na terminaci regenerace období od čtvrtého dne po PH. Z hlediska buněčného cyklu dochází k návratu jaterních buněk do klidové G0 fáze, avšak plná obnova homeostatického stavu může vyžadovat více než jen to. V otázce, který nejzazší den po operaci lze ještě počítat do regeneračního děje, a kdy už orgán dosáhl beze zbytku návratu k optimálnímu fyziologickému stavu, nepanuje jednoznačná shoda. Publikované práce s využitím potkaních nebo myších modelů hodnotí celý děj nejčastěji do 168 až 240 hodin (7 - 10 dní) po PH. Konečná fáze strukturální a funkční reorganizace bývá někdy konstatována na konci sledování bez vyjádření absolutního či relativního srovnání velikosti regenerovaných jater oproti stavu před intervencí. Nejednoznačnost v časovém vymezení terminace může být způsobena tím, že neexistuje obecně uznávaný ukazatel znovunabytí klidového stavu jaterní tkáně po regeneraci. Zatímco pro hodnocení proliferační fáze se nabízí stanovení syntézy DNA (např. pomocí inkorporace radioligandů) či exprese markerů dělení (PCNA, Ki-67), obdobná možnost pro terminační fázi chybí. Ani škála technik pro posuzování časového průběhu obnovy hmotnosti či objemu jater po PH není příliš velká. Zde se nabízí buď přímé vážení reziduálních a posléze resekovaných vzorků jater v různých intervalech po operaci, anebo nepřímé metody zobrazovací. Vážení vzorků jater vyžaduje větší počet zvířat ve studiích a jejich postupné usmrcování, které má své etické a ekonomické limitace. Metodickým problémem může být i reprodukovatelnost samotného vážení ať už nativního orgánu (vlhká váha), nebo vysušeného resekátu. Zvláště kontroverzní může být porovnávání

hmotnostních údajů mezi různými experimenty, užívají-li tyto navíc různé kmeny hlodavců apod. (Gur a Waner, 1993).

Zobrazovací metody (např. CT a MR volumetrie) mají několik předností. Umožňují pracovat s menším počtem jedinců při jejich opakovaném snímkování. Tak mohou být získané hodnoty kontinuálně porovnávány vůči výchozímu (i předoperačnímu) objemu jater u každého zvířete zvlášť. Proti radiologickým metodám však mluví finanční a odborná náročnost technik, které nejsou pro použití u modelových zvířat všeobecně dostupné. Také samo snímkování *in vivo* je komplikováno tím, že je nezbytná anestezie nebo jiný způsob znehybnění zvířat pro dosažení ostrého obrazu, zejm. pro účely prostorových rekonstrukcí z dvojrozměrných CT či MR snímků. Podání anestetik (někdy i vícečetné) může mít vliv na jaterní tkáň a při manipulaci se zvířaty v souvislosti se snímkováním hrozí jejich přílišné stresování.

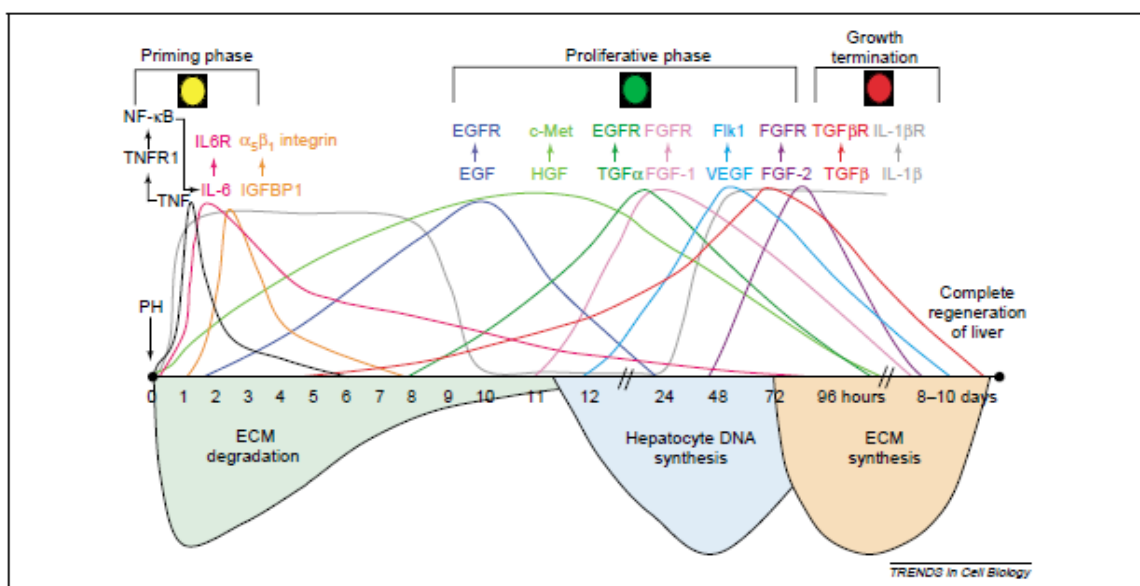
Připustíme-li však, že radiologické studie mají lepší výpovědní hodnotu o znovunabytí homeostatického objemu a funkce jater po parciální hepatektomii, najdeme i mezi nimi rozporné výsledky. Hockings *et al.* (2002) s využitím MR k sériovému měření velikosti jater u potkanů před PH a v různých intervalech po operaci konstatovali do 9. dne sledování dosažení přibližně 88% předoperační velikosti. Táž studie prokázala, že po počátečním prudkém nárůstu objemu jater po PH, zejména v prvních třech dnech, dochází k významnému zpomalení přírůstků, a od pátého dne po PH nárůst objemu jater koresponduje s nevelkou rychlostí přírůstků celkové tělesné hmotnosti potkanů. Tyto změny v delších intervalech jsou již jen v řádu jednotek procent. Novější studie de Graafa *et al.* (2008) využívající k hodnocení znovunabytí objemu jater u potkanů po PH také neinvazivní zobrazovací metodu, ^{99m}Tc -GSA scintigrafii, naproti tomu udává dosažení velikosti jater odpovídající předoperačnímu stavu již 5. a 7. den po resekci. Ani v obvykle sledovaných intervalech tedy nepanuje shoda.

Z pohledu dějů na buněčné a tkáňové úrovni v terminační fázi dochází k ukončení působení stimulačních signálů proliferace, obnovení převahy inhibičních činitelů, dosažení cílového (funkčního) objemu jater vůči velikosti těla a rekonstrukci komplexní tkáňové mikroarchitektury. Lze nalézt rozdílné názory na to, zda je důležitější aktivní působení inhibitorů regenerace nebo naopak převládá (či dostačuje) prosté vymizení účinku iniciálně působících aktivátorů. Pravděpodobné je, že pro zajištění tak důležitého děje, jakým terminace regenerace bezesporu je, neexistuje jednoduché řešení. Stejně jako iniciační dráhy jsou na mnoha místech redundantní, tak i v pozdních fázích lze nalézt příklady spíše tonického působení stimulačních a supresivních faktorů. Takové antagonistické dvojice či

skupiny lze nalézt mezi transkripčními faktory i mezi cytokiny a růstovými faktory. Časový průběh změn jejich aktivních koncentrací v intracelulárním i extracelulárním prostředí jaterních buněk hraje zásadní roli pro výsledný stav orgánu.

Mezi transkripčními faktory je příkladem takové protichůdně působící dvojice C/EBP α a C/EBP β . Vazba C/EBP α na DNA vede ke glukoneogenezi a zástavě dělení, ale tyto účinky překonává nárůst aktivity C/EBP β během prvních tří pooperačních dní. Poměr C/EBP α ku C/EBP β během proliferační fáze regenerace je <1, zatímco ve fázi terminace se v hepatocytech vracejících se do G0 fáze buněčného cyklu obrací na >1 (Diehl, 1998, Greenbaum *et al.*, 1995, Jakobsen *et al.*, 2013, Mischoulon *et al.*, 1992, Ockner, 2004, Taub, 1996).

Časovou návaznost působení růstových faktorů ve všech fázích regenerace přehledně shrnuje obrázek 7.



Obrázek 7. Schéma působení stimulačních a inhibičních růstových faktorů během regenerace jater po 2/3 parciální hepatektomii. V průběhu regenerace po sobě následují nejprve indukce působením cytokinů (pod žlutým terčem), poté překonání restriktivního bodu na konci G1 fáze buněčného cyklu díky růstovým faktorům (pod zeleným terčem) a nakonec zastavení regenerace vlivem inhibitorů (pod červeným terčem). Převzato z práce MOHAMMED, F. F. a R. KHOKHA. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends in Cell Biology*. 2005, 15(10), s. 555-563.

Mnoho úsilí bylo věnováno hledání rozhodujícího humorálního faktoru, který by byl ukončujícím signálem jaterní regenerace. Největší pozornost v tomto smyslu byla dlouho zaměřena k transformujícímu růstovému faktoru beta (TGF β). Ten je schopen inhibovat dělení hepatocytů *in vivo* i *in vitro* (Bissell *et al.*, 2001, Fausto *et al.*, 1990). Nicméně bylo prokázáno, že citlivost hepatocytů vůči účinkům TGF β je během regenerace snížena (Houck a Michalopoulos, 1989). Na snížení této vnímavosti se podílí jednak přechodný pokles exprese receptorů pro TGF β během regenerace a jednak aktivace transkripčních represorů SnoN a Ski (Chari *et al.*, 1995, Macias-Silva *et al.*, 2002). Ústřední roli TGF β v terminaci regenerace relativizovala práce Oeho a spolupracovníků (2004), kteří prokázali, že knock-out receptorové podjednotky TGF β RII v játrech myši s provedenou 2/3 parciální hepatektomií nezabránil řádnému a včasnému ukončení regenerace. Autoři vyvodili a doložili zjištění, že vedle TGF β se na inhibici proliferace hepatocytů podílí aktivin A, intracelulárně působící na téže Smad proteiny, díky čemuž může kompenzovat absenci TGF β . U myši s knock-outem TGF β RII se na výsledné velikosti jater podílela také zvýšená apoptotická redukce počtu nově namnožených buněk ve srovnání s kontrolami, což naznačuje existenci již výše zmíněného víceúrovňového zajištění řádné terminace regenerace. Důležitou úlohu apoptózy pro regulaci konečné velikosti jater po proběhnutí regenerace potvrzuje i práce Sakamota *et al.* (1999).

Za povšimnutí stojí skutečnost, že mezi prostředníky mitoinhibičního působení TGF β je i rodina transkripčních faktorů E2F, stejně jako u výše zmíněného inhibičního proteinu Tob1 (Ho *et al.*, 2010, Oe *et al.*, 2004).

Kromě TGF β bylo doloženo mitoinhibiční působení na hepatocyty i u interleukinu 1 β (IL-1 β). Oba tyto činitele musí být pro získání biologické účinnosti nejprve štěpeni specifickými proteázami, takže interakce komponent mezibuněčné hmoty s humorálními mediátory má mnohočetný význam i v terminační fázi regenerace (Mohammed a Khokha, 2005).

Recentně objevenou signální drahou s vlivem na velikost orgánů u savců i bezobratlých je kaskáda Hippo/Yki (resp. Mst1/2/Yap) (Apte *et al.*, 2009). Transkripční koaktivátor Yap (*Yes-associated protein*) reguluje velikost jater savců a v terminační fázi regenerace po PH je jeho exprese snížena. Genetickou manipulací cíleně zvýšená exprese Yap v játrech vyvolala expresi genů se vztahem k dělení hepatocytů a indukci inhibitorů apoptózy. Dlouhodobě zvýšená produkce Yap je hepatokarcinogenní a byla prokázána i u lidských tumorů (Dong *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2007).

V posledních letech prudce roste zájem o roli mikro RNA (miRNA) v průběhu regenerace jater po PH. Je pozoruhodné, že u nich jsou prokazovány interakce s již dříve popsanými regulačními drahami. To se týká i fáze terminace regenerace, během níž bylo prokázáno spolupůsobení miR-34 a miR-23b s činitelem signální dráhy TGF- β . Dohromady změny jejich exprese vedou k útlumu proliferační odpovědi hepatocytů, který má podobu zástavy prostupu buněčným cyklem v průběhu G2 fáze (Chen *et al.*, 2011, Yuan *et al.*, 2011a).

Podívejme se nyní na metabolické souvislosti terminace regenerace jater po PH. Významným faktorem mohou být proměny systémové i hepatocytárního využití mastných kyselin (Ockner, 2004). Pokles mobilizace volných mastných kyselin zprostředkovaný inzulínem omezuje dostupnost esenciálních ω -6 mastných kyselin z periferních zásob, čímž může podstatně omezovat trvání proliferační odpovědi. Postupná spontánní normalizace glykémie také navrácí hepatocyty do klidového stavu. Podávání glukózy ve snaze podpořit proliferační odpověď po PH se ukázalo jako kontraproduktivní (Bengmark, 1965, Ngala a Lambotte, 1981, Šimek *et al.*, 1967, Šimek, 1965). Fyziologická glykémie pak mezi dalšími plazmatickými parametry může hepatocytům signalizovat, že již vyhověly homeostatickým potřebám organismu. Vzhledem k významné proteosyntetické úloze hepatocytů se nabízí úvaha o tom, že dynamika sérových koncentrací albuminu nebo bílkovin celkově může být dalším činitelem přispívajícím k trvání či ukončení regenerace jater po parciální hepatektomii. Experimentální podklady však hovoří proti tomuto výkladu. Simmons a Boyle (1969) podávali potkanům po PH vysoké dávky albuminu a nezjistili, že by tato „kompenzace“ předpokládané hypalbuminémie zkrátila trvání či omezila rozsah regenerace. Sekas a Cook (1979) zase u potkanů sledovali po dva týdny po 2/3 parciální hepatektomii dynamiku biochemických sérových parametrů včetně albuminémie a celkové koncentrace bílkovin v porovnání s laparotomovanými kontrolami. Ve své studii prokázali poměrně stabilní koncentrace albuminu v rozmezí 2,5 – 3,6 mg/100 ml séra, které v žádném sledovaném intervalu nebyly statisticky významně odlišné od kontrol. Celková koncentrace proteinů byla snížena nejvíce 6 hodin po resekci, ale později již stoupala a do 36 hodin po PH již také nebyla statisticky významně odlišná od kontrol. Zajímavým vedlejším nálezem této práce je pomalejší nárůst celkové tělesné hmotnosti za jeden týden od operace nejen u hepatektomovaných, ale i u laparotomovaných potkanů oproti zcela intaktním zvířatům chovaným ve stejných podmínkách. Do dvou týdnů se průměrná celková tělesná hmotnost

laparotomovaných potkanů vyrovnala s hmotností zvířat intaktních, zatímco u potkanů zotavujících se z jaterní resekce zůstala nižší (250 g vs. 294 g).

Progrese či zástava v buněčném cyklu má vztah také k energetické bilanci buněk. Když se tato vrací do klidových podmínek, pravděpodobně, zatím ne zcela popsány mechanismy, vyvolává signální odezvu zastavující další dělení. V savčích buňkách je pojítkem mezi dostupností energetických substrátů a případným dělením AMPK, neboli proteinkináza aktivovaná adenosinmonofosfátem, jejíž aktivitu zvyšuje nárůst intracelulární koncentrace AMP samotné nebo relativní vůči koncentraci ATP. Tato kináza fosforyluje a tím inaktivuje klíčové enzymy syntézy mastných kyselin a sterolů. AMPK má prokázanou ústřední roli v řízení mitochondriální oxidace mastných kyselin vlivem na karnitinpalmitoyl transferázu 1 (CPT-I). Hladiny intracelulárních fosfátů se v terminační fázi nanejvýš pravděpodobně navracejí do homeostatických poměrů. Ve své studii energetických parametrů po 2/3 parciální hepatektomii u potkanů, neobvyklé trváním až do 7. pooperačního dne, Nagino *et al.* (1989) prokázali následující: 7. den po resekci se množství mitochondriální DNA již nelišilo od laparotomovaných kontrol, totéž platilo i pro index respirační kontroly a pro spotřebu kyslíku při respiraci ve stavu 3 podle Chance a Williamse (Chance a Williams, 1956, Nagino *et al.*, 1989). Bez signifikantních rozdílů oproti kontrolám byly 7. den po resekci i aktivity všech hodnocených komplexů respiračního řetězce a také obsah cytochromů aa₃, b a cc₁.

Velký význam v terminační fázi mají mnohočetné interakce jednotlivých druhů jaterních buněk a normalizace jejich mezibuněčných kontaktů a prostorových vztahů. Již zmíněný aktivin A nepůsobí jen na hepatocyty, kterými je secernován, ale má *in vitro* i následující účinky: posiluje viabilitu a tubulogenezi endoteliálních buněk jaterních sinusoid synergicky s VEGF (Endo *et al.*, 2004) a synergicky s TGFβ stimuluje produkci kolagenu I hvězdicovými buňkami (Wada *et al.*, 2004). Zevrubnou analýzu regenerace intrahepatálních žlučodů po 2/3 parciální hepatektomii u potkanů s dobou pooperačního sledování dosahující 28 dní provedli Lesage *et al.* (1996). Konstatují v ní návrat k normálním hodnotám hmotnosti jater mezi 7. až 10. dnem a poměru hmotnosti jater ku hmotnosti těla mezi 10. a 14. dnem studie (Lesage *et al.*, 1996). V klidových játrech prokázali histochemicky přítomnost 2 až 3 žlučodů (pozitivních na GGT nebo CK-19 (markery cholangiocyty)) v jedné portální oblasti. Tento počet výrazně vzrostl v období 1. až 3. dne po hepatektomii a opět se normalizoval do 28. dne. Z morfometrických měření a celkové hmotnosti jater autoři

stanovovali celkovou hmotnost intrahepatálních žlučovodů a zjistili, že tento ukazatel poprvé po resekci překoná kontrolní úroveň 7. den. V pozdějších intervalech až do 28. dne následoval další nárůst celkové masy žlučovodů, který autoři připsali celkovému růstu těla potkanů. Bazální syntéza DNA je v cholangiocytech velmi nízká, při hodnocení metodou inkorporace ^3H -thymidinu vyšla v citované studii dokonce negativní. Naopak po 2/3 PH byla syntéza DNA signifikantně zvýšena ve všech intervalech od 1 hodiny až do 21 dní po operaci. Mezi 1. a 21. pooperačním dnem byla zvýšena genová exprese sekretinového receptoru v cholangiocytech a mezi 1. a 7. pooperačním dnem byla oproti kontrolám signifikantně zvýšena i bazální a sekretinem stimulovaná intracelulární koncentrace cAMP, která je předpokladem aktivace chloridových kanálů, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ výměníku a v důsledku sekretinem stimulované sekrece žluči bohaté na hydrogenuhličitan. Lesage *et al.* (1996) shrnují, že proliferace po 2/3 PH je, na rozdíl od experimentálního podvazu žlučovodu, časově omezená. Ukončení proliferace cholangiocyty je zajištěno odezněním působení iniciálních stimulů, pravděpodobná je i účast korekce jejich počtu apoptózou. Dělení endoteliálních buněk jaterních sinusoid probíhá nejméně do 8. pooperačního dne (Wack *et al.*, 2001). Fenestrace endotelií sinusoid jsou místem prostupu řady látek z cirkulace přes Disseho prostor k hepatocytům. Propustnost těchto fenestrací není přitom neměnná a je nanejvýš pravděpodobné, že může hrát podstatnou regulační roli během regenerace. Z činitelů s prokázaným vlivem na fenestrace se s postupem regenerace navrácí do fyziologických mezí smykové napětí (*shear stress*) mechanicky působící na lumen sinusoid. Po skokovém nárůstu následkem hepatektomie se s obnovou kapacity intrahepatálního krevního řečiště jistě namáhání stěn sinusoid zmírňuje. Mezi dalšími faktory s účinkem na fenestrace lze v čase očekávat pokles koncentrace endotoxinu a také mezibuněčná hmota svým složením propustnost fenestrací ovlivňuje. S těmito předpoklady provedli Wacková *et al.* (2001) studii, v níž dynamiku regenerace sinusoid po 2/3 parciální hepatektomii u potkanů sledovali do 14. pooperačního dne s ohledem na zonální uspořádání acinů. Poté, co 3. pooperační den klesla celková propustnost i průměrná velikost sinusoidálních fenestrací v I. i III. zóně acinů na svá minima, začínají oba tyto ukazatele opět stoupat. Až do 14. dne po 2/3 PH zůstávají signifikantně vyšší než u neoperovaných potkanů, stejně jako šířka hepatocytárních trámců oproti klidovému parenchymu. Zonální heterogenita podél porto-centrální osy jaterních acinů byla patrná v dynamice změn propustnosti sinusoid, z čehož je zřejmé, že se netýká pouze hepatocytů.

Byla již shromážděna řada experimentálních podkladů pro tvrzení, že terminace regenerace může být z hlediska vztahu jaterních buněk a ECM opačným procesem než iniciace. Zatímco iniciální štěpení matrix uvolňuje mediátory regenerace do tkáně i do krevního oběhu, obnovení mezibuněčné hmoty přináší opětovné vyvážení solubilních faktorů a ukončení jejich vlivu na buňky (DeFrances a Michalopoulos, 2011, Michalopoulos, 2007, Michalopoulos, 2010). V prostředí "tonického" antagonistického vlivu stimulačních a inhibičních signálů regenerace, pravděpodobně právě vazba na složky matrix vykonává rozhodující roli pro výsledný efekt. Během regenerace roste syntéza nového dekorinu, perlekanu, syndekanu a kolagenů I a III (Gallai *et al.*, 1996, Rudolph *et al.*, 1999). HGF je tak zachycován proteoglykany, nemůže být dále aktivován a také exprese uPA se ke konci regenerace snižuje (Mars *et al.*, 1996). Hepatocyty jsou nyní obklopeny jak HGF, tak TGF β , ovšem v inaktivované podobě. Mezi součástmi ECM je významný glypikan-3, jehož exprese stoupá za 4 až 6 dní po PH. U myši s nadměrnou expresí glypikanu-3 v důsledku genové manipulace nedojde do 6 dní po PH k obnově objemu jater (Liu *et al.*, 2009). Naopak je znám klinický syndrom, kdy mutace způsobující nefunkčnost glypikanu-3 vede k abnormálnímu nárůstu velikosti útrobních orgánů včetně jater (Pilia *et al.*, 1996).

Důležitost řádné interakce mezi ECM a jaterními buňkami nevymluvněji demonstrovaly experimenty s PH u myši s knock-outovaným genem pro kinázu spojenou s integriny (ILK). Absence funkční ILK vyústila v "přestřelení" regenerační odpovědi, kdy za 14 dní po operaci dosáhla játra cca o polovinu větší velikosti než u kontrolních zvířat (Apte *et al.*, 2009).

Zdá se také, že regulace růstu jaterních štěpů, a obzvláště jater žijících dárců po odběru, má stejné principy jako regulace regenerace po PH u laboratorních zvířat (Fausto a Riehle, 2005, Hata *et al.*, 2007), i když toto srovnání pro více pooperačních intervalů má pochopitelné etické limitace. Bylo přitom pozorováno, že regenerace jater donorů končí na asi 85% velikosti před odběrem, což sice pokrývá jejich nároky za normálních podmínek, nicméně funkční kapacita jater může být po operaci snížena. Tento dopad na donory by mohl být, po rozpoznání řídicích mechanismů, cílem intervencí ve smyslu prodloužení regenerace (Humar *et al.*, 2004, Pomfret *et al.*, 2003).

Dosud dostupné studie o žijících donorech jaterních štěpů je obtížné souborně interpretovat pro různorodost metodik sběru dat. Zvláště údajů o dlouhodobých dopadech na dárce je citelný nedostatek. Renz a Brown (2009), odhadují celkovou mortalitu dárců v souvislosti s transplantacemi na 0,4% a celkovou incidenci komplikací na 15% až 50%. Spektrum komplikací pozorovaných u dárců je předmětem tabulky 1.

Tabulka 1. Spektrum komplikací dospělých dárců jaterních štěpů pro dospělé příjemce

Komplikace	Incidence (%)
Celkově	15 - 50
Prosakování žluče	8 - 15
Rehospitalizace	cca 8
Nedostatečná velikost štěpu *	cca 5
Reoperace	cca 5
Striktura žlučvodů	cca 3
Obstrukce střeva	cca 3
Plicní embolie	cca 2

* je-li zjištěna až peroperačně pro nedokonalost odhadu objemu jater zobrazovacími metodami. Data převzata z publikace RENZ, J. F. a R. S. BROWN. *The Dilemma of Adult-to-Adult Living Donor Liver Transplantation*. G. T. Everson, J. F. Trotter (eds). *Clinical Gastroenterology: Liver Transplantation: Challenging Controversies and Topics*. Totowa: Humana Press Inc, 2009, s. 65-89.

3.5 DNA microarrays – vývoj a současný stav

Druhá polovina 20. století byla věkem prudkého rozvoje metod molekulární biologie a genetiky. Prvotním impulzem bylo objasnění struktury DNA a tím i chemické podstaty dědičnosti Watsonem a Crickem v roce 1953. Genetické experimenty, ve snaze nalézt podklad pro změny biologických funkcí za fyziologických i patologických stavů, však zpravidla byly omezeny na studium jednoho či několika málo genů. Později, na sklonku 20. století, technologický pokrok umožnil sekvenování celých genomů organismů a toto úsilí bylo korunováno sekvenováním genomu lidského a také genomů mnoha druhů laboratorních pokusných zvířat (Gibbs *et al.*, 2004, Lander *et al.*, 2001, Venter *et al.*, 2001, Waterston *et al.*, 2002). V metodické oblasti se tak zrodila potřeba simultánního sledování exprese mnoha genů. Cestu k jejímu uspokojení popisují věcně a výstižně přehledové práce některých českých autorů (např. Brdička a Bručková Votavová, 2006, Prnka a Šperlink, 2006). Nejčastěji odkazovanou první studií s úspěšnou aplikací tohoto principu byla ta Scheny a kolegů z kalifornské Stanfordovy univerzity (Scheny *et al.*, 1995), kteří v ní hodnotili změny

exprese 45 genů rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) provedením simultánní hybridizace s využitím dvou fluorescenčních značek. Pouhý rok nato již tento tým publikoval čipovou analýzu tisíce lidských genů (Schena *et al.*, 1996), což dokládá rychlý pokrok, který nastal.

Záhy po vyvinutí této metody na akademické půdě se oblast aplikací DNA čipů stala předmětem soupeření narůstajícího počtu komerčních producentů. Mark Schena sám je ztělesněním výzkumníka úspěšného na univerzitní i obchodní úrovni. Za zmínku, z mnoha různých rozdělení čipů, stojí alespoň rozlišení platforem pasivních, jež v biologických aplikacích dominují, a aktivních, které jsou pojátkem genomiky k miniaturizované elektronice dnešních dní. Mezi výrobci pasivních čipů je uznávanou jedničkou firma Affymetrix, mezi výrobci aktivních čipů je to společnost Nanogen. Prezentace těchto firem i mnoha jejich následovníků lze nalézt prostřednictvím internetové stránky <http://www.biochipnet.com/companies>.

Postupným vývojem se pro nástroje simultánní analýzy exprese mnoha genů vžilo několik běžně užívaných označení, jejichž hranice nejsou ustálené ani v angličtině ani v češtině. Patří mezi ně názvy: DNA čipy či mikročipy i méně vžité překlady jako mikrosoubory či mikrošiky, jindy je ponechán termín array(s). Anglickými ekvivalenty pak jsou termíny: biochip, DNA (micro)arrays, gene array, DNA chip(s), genome chip(s) apod.

Čím vlastně byl takový kvantitativní pokrok umožněn? Můžeme pro objasnění srovnat princip fungování DNA čipů s nejbližší dřívější metodou, kterou je Southernův přenos (*Southern blotting*) (Granner, 2002). Ten dovoluje (semikvantitativní) detekci úseků DNA, o které se zajímáme, po předchozí elektroforéze a přenesení rozdělených fragmentů nukleové kyseliny na membránu. Membrána je zde nosičem reakce, při níž se na úseky DNA váží cílené sondy, nesoucí navíc značení (fluorescenční, radioaktivní aj.). V posledním kroku jsou ony značky vizualizovány buď přímo, nebo po aktivaci. Nutnost úvodní elektroforézy a také riziko nespecifické vazby sond či interference značek sond aplikovaných na membránu omezují v důsledku množství úseků DNA, které lze takto kvantifikovat.

Tato omezení překonává právě metoda DNA čipů, založená na několika odlišnostech. V první řadě jsou to neznačené sondy, které jsou přichyceny k podkladu (neporéznímu nosiči z různých materiálů). Značení naopak nesou fragmenty DNA vzorku či dvojice vzorků, které jsou najednou aplikovány na nosič se sondami. Specifitu vazby úseků DNA a příslušných sond zajišťuje, stejně jako u *Southern blottingu*, komplementarita bazí DNA a jejich párování.

Protože, nehledě na množství sond, je v reakci použito pouze jednoho či dvou druhů značení, je rozlišovací schopnost DNA čipů vyšší než u *Southern blottingu*. To dovolilo miniaturizaci této metody a postupný nárůst množství sond na DNA čipech až do řádu milionů. Od průkopnických dob vznikla celá řada modifikací čipových metod a tyto se rozšířily do mnoha aplikačních sfér (podrobněji viz např. Dufva, 2009, Prnka a Šperlink, 2006). Pro dobu 21. století je však velmi příznačné, že i DNA čipy pro stanovování změn genové exprese, pro které byly původně připraveny, již našly svého přemožitele v metodě tzv. sekvenování příští generace (*next generation sequencing*). Posledně jmenovaným přístupem je možné kvantifikovat nejenom mRNA, ale veškeré druhy ribonukleových kyselin v biologických vzorcích.

4 CÍLE PRÁCE

- 1) Osvojit si metodiku hodnocení genové exprese pomocí DNA čipů.
- 2) Popsat a analyzovat expresi genů provázející jednotlivé fáze regenerace jater po 2/3 parciální hepatektomii u potkanů s hlavním zaměřením na dosud nejméně objasněnou fázi terminace.

5 METODIKY

5.1 Laboratorní potkani

Projekt pokusů byl projednán a schválen Odbornou komisí pro ochranu zvířat Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Ve viváriu LF HK byla zvířata chována v klimatizovaných místnostech se stálou teplotou vzduchu 22°C a střídáním světla a tmy po 12 hod. Standardní laboratorní dieta (v peletách) a pitná voda byly potkanům k dispozici *ad libitum*, s jedinou výjimkou lačnění po dobu 12 hodin před chirurgickými procedurami. Před zapojením zvířat do pokusu jim byl vždy ponechán týden na aklimatizaci.

Pro experiment byli použiti samci potkanů kmene Wistar (BioTest¹, Konárovice, ČR) o vstupní tělesné hmotnosti 219 ± 20 g a stáří 7 až 8 týdnů. Dvacet sedm zvířat ve studii bylo rozděleno do 9 skupin po třech. Kontrolní skupinu tvořili tři potkani intaktní, kteří nepodstoupili parciální hepatektomii. U ostatních dvaceti čtyř zvířat byla provedena 2/3 parciální hepatektomie a byli ponecháni naživu po různě dlouhou dobu po resekci. Doba přežívání operovaných zvířat se pohybovala v rozmezí 1 až 14 dní. Ve stanovený den bylo usmrcování zvířat prováděno v éterové inhalační anestezii vykrvácením z břišní aorty.

Kontrolní skupinu tří intaktních potkanů jsme označovali jako "Den 0", skupiny operované jako "Den x", podle počtu dní ponechaných k regeneraci po PH. Stranou uvedených 27 zvířat, jsme stejným způsobem získali a odebrali vzorky jaterní tkáně pro izolaci RNA ještě od pěti intaktních váhově a věkově odpovídajících potkaních samců. Z těchto vzorků byl připraven tzv. referenční pool, neboli smíchaný kontrolní vzorek, nezbytný při zvoleném experimentálním designu. Více o jeho zdůvodnění a užití viz kapitola 5.5.4. Aortální exsanguinaci vždy předcházela střední laparotomie. Po vykrvácení byly odebírány vzorky jaterní tkáně pro molekulárně biologická vyšetření (viz další odstavce metodické části práce).

¹ Od dubna 2013 se společnost jmenuje MediTox.

5.2 2/3 parciální hepatektomie u dospělých potkanů

Jak již bylo uvedeno výše, metodiku této operace vypracovali Higgins a Anderson (1931). Při operacích jsme se drželi následujícího postupu. Potkana v éterové inhalační anestezii jsme vždy fixovali k operační podložce v poloze na zádech. Elektrickým strojkem jsme oholili břišní a hrudní stěnu. Zákrok začínal nastřížením kůže břicha ve výšce pupku a ve střední čáře. Poté byla kůže rozstřižena dále ve střední čáře až pod hrudní kost. Odpreparovali jsme podkoží a pinzetou nadzdvihli břišní svaly, které jsme rovněž nastříhli. Počínaje od takto vytvořeného otvoru jsme svaly břicha rozstříhli v *linea alba*. V blízkosti bránice bylo třeba zvláštní opatrnosti pro předejití pneumotoraxu. Jako orientační bod nám sloužila *cartilago xiphoidea*, patrná pod svalovinou. Tuto chrupavku jsme nadzvedli anatomickou pinzetou a odstříhli její spodní dvě třetiny. Tím byl usnadněn přístup k játrům potkana. Mírným tlakem třech prstů obou rukou současně z obou stran na dolní část hrudníku a horní část břišní dutiny břišní jsme vytlačili játra ventrálně. Tak jsme z operační rány vysunuli nedělený dolní levý lalok (*lobus sinister lateralis*) a nad ním dělený střední lalok (*lobus medialis dexter et sinister*). Resekce celých těchto laloků ponechá v dutině břišní 30% až 35% objemu jaterní tkáně. Odnímané laloky bylo třeba mobilizovat přestříhnutím ligament jednak proximálně v blízkosti bránice, jednak distálně vlevo u vstupu portální žíly do jater. Pro usnadnění mobilizace jsme jaterní laloky zvedali levou rukou, aby se ligamenta napnula. Levou rukou jsme pak podrželi oba resekované laloky a pravou pod ně podsunuli již přichystanou silnější ligaturu. Tuto ligaturu jsme umístili k hilům podvazovaných laloků a podvázali třemi uzly. Dbali jsme na to, aby se do podvazu nevsunula svalovina břišní stěny. Kdyby se to stalo, hrozilo by potkanovi smrtelné krvácení při pozdější sutuře břišní stěny, kdy by se zachycená svalovina vysmekla z ligatury. Po zauzlení jsme chirurgickými nůžkami odstříhli podvázané laloky v těsné blízkosti podvazu. Volné konce podvazu jsme zkrátili na minimum. Po ujištění se, že ligatura je těsná a nedochází ke krvácení, jsme pokračovali uzavíráním dutiny břišní. Při něm jsme nejprve zašili svalovou vrstvu, poté kůži. Zákrok končil dezinfekcí operačního pole, po níž byl potkan uložen do čisté klece (Živná, 2001).

5.3 Biochemická stanovení

Pro posouzení míry poškození jaterní tkáně chirurgickou resekci a následně jejího zotavování s přibývajícím dnem regenerace jsme stanovovali sérové aktivity alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST). Vyšetřována byla séra odebraná v den usmrcení jednotlivých potkanů, která jsme připravili centrifugací krve získané při aortální exsanguinaci (viz výše). Vzorky sér byly neprodleně po centrifugaci zamrazeny při -20°C a skladovány v mrazáku až do samotné analýzy, prováděné po sériích odpovídajících experimentálním skupinám, na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

5.4 Hmotnosti regenerujících jater v průběhu regenerace

Při absenci všeobecně uznávaného parametru úplnosti regenerační odpovědi po parciální hepatektomii, jsme se rozhodli stanovovat hmotnosti jaterní tkáně v den resekce a poté i v den usmrcování potkanů. Takto jsme chtěli morfologicky posoudit pokročilost proběhlé obnovy jaterního parenchymu v jednotlivých pooperačních skupinách. V den usmrcení zvířat jsme hmotnost jater stanovovali tak, že jsme celý orgán odkrvený provedenou exsanguinací krátce opláchli ve fyziologickém roztoku, ev. dle potřeby očistili od viscerální tukové tkáně a vaziva na povrchu, a poté jej osušili buničinou a zvážili na přesné digitální váze. Získali jsme tak celkovou hmotnost čerstvě vyjmutých a odkrvených jater. Ustálený postup této procedury, dlouhodobě zavedené na našem pracovišti, zajistil potřebnou reprodukovatelnost takto získaných výsledků. Odkrvení parenchymu žádoucí pro spolehlivé vážení i pozdější kvantifikaci genové exprese lze kontrolovat vizuálně odbarvením tkáně. V den odběru vzorků lze tedy získat hmotnost celých jater přímo. Jinak je tomu samozřejmě v den parciální hepatektomie, kdy z těla vyjímáme pouze část parenchymu. Pro tento účel jsme se rozhodli hmotnost celých jater v den PH dopočítávat. V pilotních pokusech jsme si u pěti potkanů ověřili, že podíl resekované části při 2/3 parciální hepatektomii činí $70\% \pm 3\%$ hmotnosti celého orgánu. Pak jsme mohli dopočítávat výchozí hmotnost celých jater každého zvířete v den jeho vstupu do pokusu (podstoupením PH). Zvážili jsme tedy resekovanou část (odkrvenou promytím fyziologickým roztokem) na stejných vahách a její hmotnost považovali za 70% hmotnosti celých jater v den PH. Snadno jsme pak dopočítali 100% hmotnosti intaktních jater na počátku experimentu. S touto hodnotou jsme pak porovnávali konečnou hmotnost celého orgánu na konci pokusu, pro posouzení morfologické obnovy. Abychom zmenšili vliv interindividuální variability hmotnosti jater na hodnocení regenerace,

přepočítávali jsme výchozí i konečnou hmotnost jater pro účely jejich srovnání na 100g celkové tělesné hmotnosti potkanů.

5.5 Molekulárně biologické metody

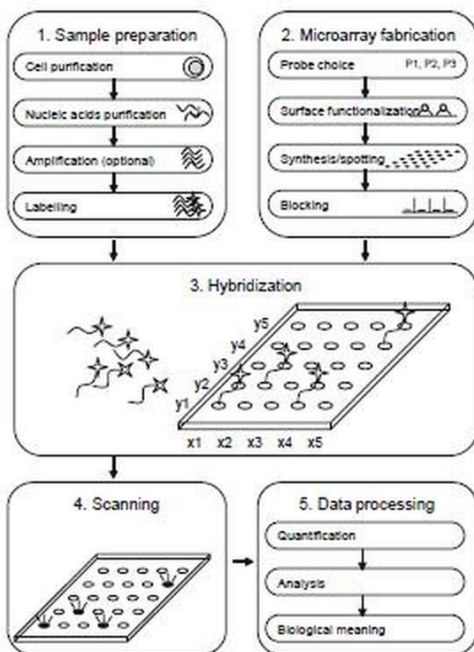
Popíšeme zde nejprve jednotlivé etapy analýzy genové exprese na DNA čípech, a poté se budeme hlouběji věnovat každé z nich, s uvedením našich konkrétních postupů. Každý genomický experiment na čípech může být rozdělen do dvou hlavních fází. První je zpracování materiálu a sběr dat, druhou je práce s výsledky (Causton *et al.*, 2003). První uvedená fáze zahrnuje pět dílčích kroků:

- 1) výrobu DNA čipů (5.5.1.)
- 2) přípravu biologických vzorků pro studii (5.1, 5.2)
- 3) izolaci a značení RNA z biologických vzorků (5.5.3)
- 4) hybridizaci značených vzorků na DNA čipy (5.5.4)
- 5) snímání obrazové informace z DNA čipů po proběhlé hybridizaci. (5.5.5)

Fáze práce s výsledky zahrnuje čtyři dílčí úkony:

- 6) kvantifikaci obrazové informace (5.5.6)
- 7) normalizaci a integraci dat (5.5.7)
- 8) analýzu dat o genové expresi (5.5.8)
- 9) formulování nové hypotézy o biologickém ději na základě vyhodnocených dat. (5.5.9)

V závorkách za každým krokem uvádíme čísla kapitol této disertační práce, které se k nim vztahují. Sled kroků genomické analýzy na DNA čípech názorně ukazuje i následující obrázek 8.



1. Příprava vzorků

Purifikace buněk
 Purifikace nukleových kyselin
 Amplifikace (volitelná)
 Značení

2. Výroba čipu

Volba / návrh sond
 Úprava povrchu čipu
 In-situ syntéza / nanášení sond
 Blokování povrchu čipu

3. Hybridizace

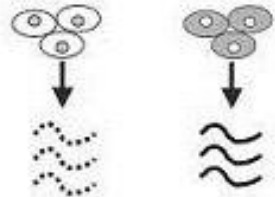
4. Snímání obrazové informace čtečkou

5. Zpracování dat

Kvantifikace
 Analýza
 Biologická interpretace

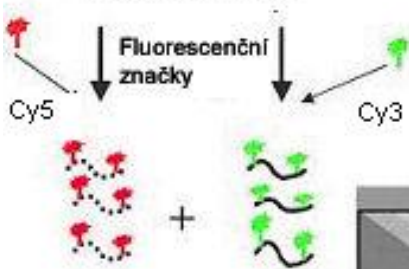
A. Izolace RNA

vzorek A vzorek B

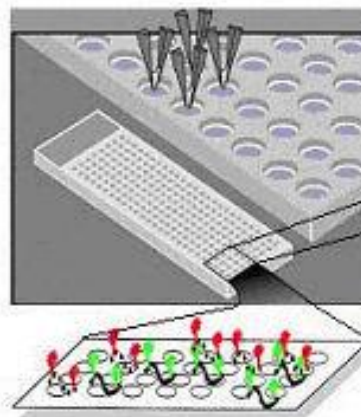
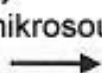


B. Celková RNA

C. Reverzní transkripce
 mRNA → cDNA

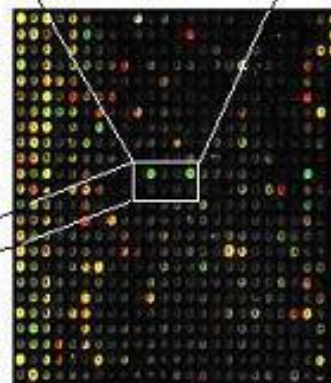
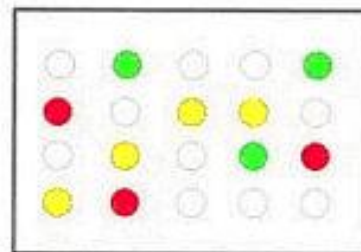


D. Hybridizace na mikrosouboru



E. Zobrazení

● Vzorek A > B ● Vzorek A = B
 ● Vzorek B > A



Obrázek 8. Sled jednotlivých kroků genomického experimentu s využitím DNA čipů pro stanovení míry genové exprese. V horní i dolní části představuje nezbytné pokusné i interpretační úkony, o kterých se zmiňujeme výše v textu, avšak s použitím jiného rozdělení. Tato schémata doplňujeme pro názornost a odkazujeme k nim také v následujících kapitolách. Vyobrazení byla převzata z prací Prnky a Šperlinka (2006) a Dufvy (2009).

5.5.1. Výroba DNA čipů

Nebylo naším úkolem samostatně si vyrobit DNA čipy pro provedenou studii. V počátečních letech rozvoje této genomické metody nebyl tento přístup ojedinělý a velkým pracovištím se může dodnes vyplatit investovat do vlastní technologie výroby DNA čipů na míru zamýšleným aplikacím. Nicméně s rostoucím počtem dodavatelů spolehlivých čipů připravovaných sériově nebo i na objednávku zákazníků, je jejich vlastní (tzv. *in house*) výroba spíše okrajovým jevem.

Přednosti a zápory nakupovaných či samostatně vyráběných DNA čipů shrnuje tabulka č. 2.

Tabulka 2. Přednosti a zápory nakupovaných či samostatně vyráběných DNA čipů

	Komerčně dodávané	Vlastní výroby (tzv. <i>in house</i>)
Dosažitelné množství spotů	až miliony	řádově stovky
Kvalifikační nároky na personál	nese výrobce	nutná specializace
Homogenita spotů	garantovaná v udaném rozmezí	obtížné ověřit
Výstupní kontrola kvality	podrobná, standardizovaná, dokumentovaná	nutno zavést vlastní, náročná personálně i technicky
Cena	několikanásobně vyšší, zejména u čipů na zakázku, nevyráběných sériově	podaří-li se výrobu zavést, je cena jednotlivého čipu výrazně nižší

Protože v našem řešitelském kolektivu jsme plánovali užívat DNA čipy pouze pro své výzkumné účely, bylo pro nás racionální volbou nakupování komerčně dodávaných čipů. Vynaložení nákladů na přístrojové vybavení a vzdělávání nezbytné pro soběstačnou produkci čipů se vyplatí typicky spíše sdíleným pracovištěm několika vědeckých skupin (pro něž se vžil v anglosaské literatuře pojem *core facilities*).

Výrobce námi využitých čipů pro potkaní genom byla firma Microarrays, Inc. (Huntsville, AL, USA). Čipy 29 K Rat Arrays dodávala na neporézním skleněném nosiči o rozměru klasického mikroskopického podložního skla (75 mm x 25 mm). Na jedné straně skla byla nanesena, v podobě miniaturních kapek, jednotlivá detekční místa čipů, tzv. spoty. Každý spot obsahoval řádově miliony identických oligonukleotidových molekul o délce zpravidla 70 bazí. Taková délka zajišťuje dostatečně specifickou vazbu s komplementárním transkriptem, aby nebylo nutné vícečetné osazení spotu na čipu. Tato charakteristika je vlastní nejen námi používaným DNA čipům, ale obecně všem oligonukleotidovým platformám s tzv. nízkou hustotou. Na druhou stranu, čipy s tzv. vysokou hustotou, nesou oligonukleotidové sondy kratších délek (méně než 30 bazí), s nižší specificitou vazby k transkriptu. Tato "nepřesnost" je však vyvážena opakovaným výskytem takovýchto spotů na nosiči čipu. Skutečnost, zda jsou čipy osazeny sondami s pouze jediným výskytem anebo s několika opakováními, pak zásadně ovlivňuje způsob interpretace získávaných dat.

5.5.2. Příprava biologických vzorků pro studii

Tato problematika byla již předmětem předchozích kapitol č. 5.1. a 5.2. Zde se o ní zmiňujeme pouze pro zachování logiky výstavby textu metodické části práce.

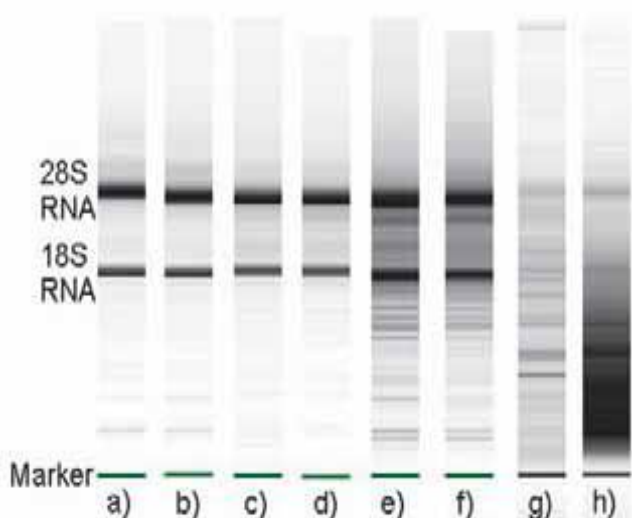
5.5.3. Izolace a značení RNA z biologických vzorků

Vzorky jaterní tkáně o hmotnosti 50-100 mg byly odebírány standardně z regenerovaného jaterního parenchymu (z *lobus caudatus*). Ihned po resekcii byly umístěny (ve zkumavkách) do tekutého dusíku pro vyloučení degradace nukleových kyselin. Do doby zpracování pak byly tkáně uchovávány v hlubokomrazících boxech při teplotě -70°C . Ze všech vzorků tkání jsme izolovali celkovou RNA užitím činidla TRI Reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA). Tato metoda pracuje na principu klasické fenol-chloroformové extrakce (Chomczynski a Sacchi, 1987).

Velká pozornost byla věnována zachování čistoty a integrity RNA, jejichž vysoká úroveň je zásadním předpokladem dosažení věrohodných výsledků analýz genové exprese metodami DNA čipů i real-time RT-PCR. Čistotu RNA jsme hodnotili spektrofotometricky a

integritu RNA jsme ověřovali elektroforézou na agarózovém gelu. Čistota RNA byla sledována na spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA) měřením absorbancí při vlnových délkách 260 nm a 280 nm, odpovídajících absorpčním maximům RNA a proteinů. Pro následné analýzy byly použity pouze vzorky, které dosáhly poměru absorbancí při vlnových délkách (λ) 260 nm a 280 nm nejméně 1,9. Spektrofotometr NanoDrop 1000 také po měření vždy vykreslil křivku hodnot absorbancí pro λ od 220 nm do 350 nm, a umožnil tak vyloučit i přítomnost nízkomolekulárních kontaminant (typicky izolačních činidel s max. absorbancí při 230 nm). Podmínkami dobré integrity RNA při elektroforéze byly: jasné, silné a dobře ohraničené proužky 18S a 28S rRNA a nepřítomnost nespecifických kontaminant ("šmíru") okolo nanášecí jamky. Obdobná opatření a kontroly vzorků nukleových kyselin se stala standardem všech seriózních uživatelů čipových metod, jak dokládají níže reprodukované obrázky z publikace Tichého a spolupracovníků (2006).

Obrázek 9. Metody a parametry kvalitativní kontroly RNA po izolaci

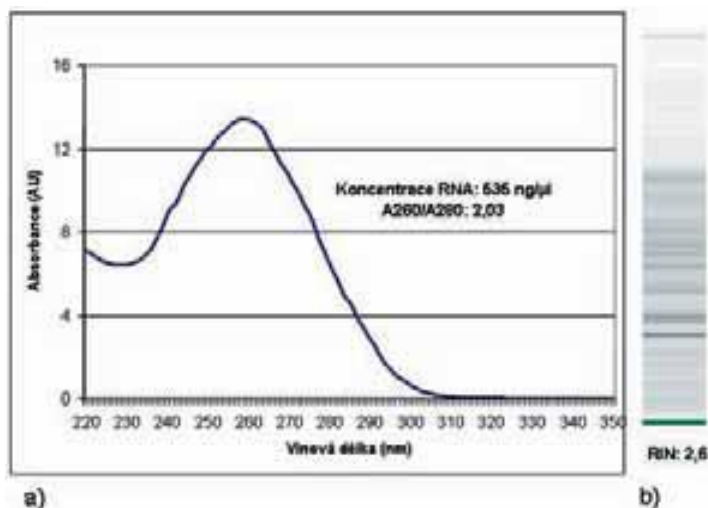


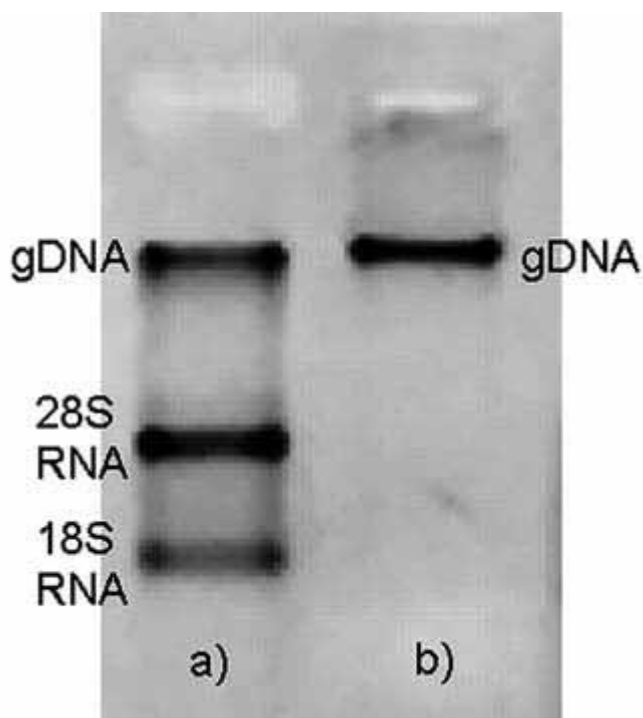
Porovnání vlivu odběru na stabilitu RNA. a) RNA izolovaná z buněčné linie (1,8/10,0); b) RNA izolovaná z buněčné linie (1,8/9,9); c) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložena po odběru 10 min na ledu (2,1/9,9); d) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložena po odběru 20 min na ledu (2,2/9,7); e) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložena po odběru 10 min při pokojové teplotě (1,3/7,2); f) RNA izolovaná ze solidní tkáně uložena po odběru 20min při pokojové teplotě (1,0/6,9); g) Degradovaná RNA (-/ 2,6); h) Degradovaná RNA (-/2,4).

V závorce vždy: 28S:18S rRNA/RIN („RNA integrity number“). Gel-like výstup přístroje Agilent BioAnalyzer 2100.

Spektrofotometrická křivka a elektroforéza degradované RNA. Přestože má vzorek velmi dobré parametry při spektrofotometrickém měření, může být integrity RNA nízká,

- a) Graf závislosti absorbance vzorku RNA na vlnové délce, data získána přístrojem Nanodrop ND-1000;
- b) Stejný vzorek RNA, gel-like výstup přístroje Agilent BioAnalyzer 2100.





Kontaminace RNA genomovou DNA (gDNA), a) Kontaminovaná RNA; b) Genomová DNA – pozitivní kontrola; 1% nenedaturující TBE/agarosový gel, barvení ethidiumbromidem. Obrázky převzaty z publikace Tichého a kol. (2006).

Vzorek celkové RNA splňující uvedené kvalitativní předpoklady byl pak podroben několika dalším krokům přípravy. Nejprve šlo o amplifikaci samotné mRNA, která je předmětem zájmu při studiu změn genové exprese. Využívali jsme té její vlastnosti, že každé její vlákno zpravidla začíná sekvencí poly-A, tedy opakováním baze adeninu, která mRNA spolehlivě odlišuje. Souprava TargetAmp 1-Round Aminoallyl-aRNA Amplification Kit 101 (Epicentre, Madison, WI, USA) v prvním kroku celé procedury přepisuje jednovláknovou mRNA na rovněž jednovláknovou cDNA (tzv. *copy DNA*), nukleovou kyselinu sestávající z bazí vlastních přirozené DNA, ovšem syntetizovanou *in vitro* reverzní transkripcí z mRNA. Tato reakce byla zahajována syntetickým oligo(dT) primerem obsaženým v soupravě a katalyzována reverzní transkriptázou SuperScript III (Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA).

Druhým krokem procedury přípravy vzorku byla syntéza druhého (komplementárního) vlákna cDNA. Původní templátová mRNA byla štěpena RNázou H a její fragmenty, pozůstávající na vláknech cDNA, byly místy nových počátků syntézy komplementárního vlákna. DNA polymeráza obsažená v soupravě tak vytvořila dvouvláknové molekuly cDNA, jež byly předpokladem posledního kroku přípravy.

Ve dvouvláknových molekulách cDNA obsahovala obě vlákna na 5' konci sekvenci promotoru RNA polymerázy z T7 fága. Tyto sekvence umožnily přepis obou vláken na tzv. *anti-sense RNA* (aRNA) během *in vitro* transkripční reakce. Výsledný produkt, v souladu

s materiály výrobce soupravy, v dalším textu označujeme, vedle již uvedeného pojmenování *anti-sense RNA* (aRNA), také jako aminoallyl-aRNA (aaRNA). Toto rozšířené označení odkazuje ke skutečnosti, že kromě *in vitro* transkripční reakce ve třetím kroku přípravné procedury, byly do vznikajících řetězců aRNA začleňovány vedle kanonických i modifikované aminoallyl-UTP nukleotidy. Velikost jejich molekuly se příliš neliší od nativních nukleotidů, předpokládá se tedy, že jsou jedny i druhé řazeny do syntetizované sekvence s velmi podobnou pravděpodobností. Ovšem pouze modifikované nukleotidy jsou následně využity pro vizualizaci výsledků hybridizací na čipech.

Navazujícím krokem přípravy vzorků tak vždy bylo provedení, či řekněme dokončení, značení řetězců aaRNA. Dosud popsaným postupem jsme získali molekuly o průměrné délce 1000 bazí, s obvyklým rozpětím od 200 do 3000 bazí. Jejich součástí vždy byly aminoallyl-uridiny. Aminové skupiny nesené modifikovanými uridiny vzápětí posloužily jako místa kovalentního navázání fluorescenčních barviv. Ta do reakce vstupují v podobě N-hydroxysukcinimidových (NHS) esterů. Nejznámějšími zástupci těchto fluorescenčních značek jsou Cy 3 a Cy 5 (Amersham Pharmacia Biotech UK, Ltd. Corp., Buckinghamshire, UK). My jsme však použili rovnocennou a levnější alternativu v podobě barev DY-548 a DY-648 (Dyomics GmbH, Jena, Německo). Absorpční a emisní maxima obou dvojic těchto fluoroforů jsou velmi podobná, což bylo podmínkou jejich zaměnitelnosti. Užití dvojice barviv je nezbytné k rozlišení signálů z DNA čipů, byla-li nanesena dvojice vzorků s cílem relativní kvantifikace jejich genové exprese. K barvám DY-548 a DY-648 nebyl výrobcem poskytován protokol k provedení značících reakcí. Tento krok přípravy vzorků jsme tedy sami optimalizovali. Jako rozpouštědlo barev, dodávaných v podobě lyofilizátu, jsme používali dimethylsulfoxid (DMSO). Naředěné alikvoty jsme z důvodu jejich ochrany před degradací teplem a "vysvícením" po vystavení světlu (tzv. *photobleaching*), skladovali ve tmě v hlubokomrazícím boxu při -70°C . Podle dostupných informací volné radikály představují riziko při skladování fluorescenčních barev, protože snižují efektivitu jejich vazby s modifikovanými bazemi. Rozpouštědlo jsme proto filtrovali přes sterilní (mikrobiologický) filtr a dbali na co nejkratší dobu skladování alikvotů. Jednou z klíčových veličin ovlivňujících efektivitu značící reakce se ukázalo být pH, při kterém probíhala. V naší studii jsme jako médium reakce používali 0,5 M bikarbonátový pufr o $\text{pH}=8,5$. Tento jsme připravovali z čerstvých zásobních roztoků Na_2CO_3 a NaHCO_3 . Alikvoty pufru jsme skladovali při -20°C . Složení reakční směsi pro barvení jednoho vzorku aminoallyl-RNA se ustálilo a osvědčilo tak, jak uvádí Tabulka 3.

Tabulka 3. Složení reakční směsi pro značící reakci jednoho vzorku aaRNA

Složka	finální koncentrace	objem (μl)
aaRNA	1 μg / μl	6
pufr (5x)	1x	4
barva + DMSO	50 %	10
CELKEM		20

Abychom získali důvěryhodná data z DNA čipů, museli jsme dbát na nejvyšší možnou standardizaci při přípravě vzorků. Již v této fázi bylo třeba zohlednit dva aspekty. Bylo přirozeně nutné, aby množství aaRNA v každé značící reakci bylo shodné. Výsledkem *in vitro* transkripce však byly templáty o různé koncentraci. Ze zásobních vzorků aminoallyl RNA jsme tak museli odpočítat a odebrat takové množství nukleové kyseliny, aby odpovídalo jednotně stanovené hmotnosti - v našem experimentu 20 μg. Tyto pracovní vzorky jsme přidáním deionizované MilliQ vody (filtrované a UV ošetřené, aby splňovala nároky molekulárně biologických aplikací) doplnili na shodný objem 35 μl. Poté jsme museli vzorky ještě na odstředivé sušičce vysušit na vstupní objem do značící reakce, který činil 6 μl. Teprve k takto získanému vzorku aaRNA jsme přidávali bikarbonátový pufr a příslušnou fluorescenční barvu v DMSO. Reakční směs jsme následně nechávali inkubovat 2 hod při pokojové teplotě ve tmě, opět proto, aby se předešlo "vysvícení". Pochopitelně, ne všechny molekuly barviv se inkorporovaly do řetězců aaRNA. Četnost jejich navázání na sekvenci aaRNA byla významně určována frekvencí modifikovaných nukleotidů (viz výše). A konečně, ne každý aminoallyl-UTP nukleotid nakonec nesl fluorofor. Nebylo by to ani žádoucí. Příliš vysoká frekvence navázání fluorescenčních značek by vnášela zkreslení vinou vzájemné interference a tzv. zhášení (*dye quenching*) blízce sousedících molekul DY-548 a zejména DY-648 (kvůli jejich větší molekule). To by v důsledku vedlo k falešně nízkým hodnotám fluorescenčního signálu při hodnocení hybridizací na DNA čípech.

Z výše uvedeného plynula nutnost purifikace vzorků aaRNA po proběhnutí značící reakce. Naše práce tedy pokračovala přečištěním každé reakční směsi, s cílem odstranit nenavázané molekuly fluorescenčních barev. K tomu jsme využívali purifikační soupravy NucleoSpin RNA Clean-up XS (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Německo) podle pokynů výrobce. Principem této metody purifikace RNA je její smíchání s vazebným pufrům s obsahem chaotropních solí a etanolu. Tento pufr jednak neprodleně inaktivuje RNázy, ohrožující integritu RNA, jednak vytvoří vhodné podmínky pro navázání RNA na křemičitou (SiO₂) membránu purifikační kolony. Následující dvě promytí promývacím pufrům odstraňují nečistoty, v našem případě nenavázaná barviva. Postup končí elucí čisté RNA

vodou zbavenou RNáz. Nízká iontová síla vody vede k opětovnému uvolnění vzorku RNA z křemičité membrány a dovoluje uživateli soupravy získat kýžený vzorek v podobě připravené buď k bezprostřednímu použití či skladování optimálně při -70°C. Při znalosti původní navážky aaRNA, koncentrace purifikovaného vzorku aaRNA a jeho konečného objemu (po eluci rovnému 40 µl) jsme mohli stanovovat i výtěžek purifikace, který se zpravidla pohyboval nad 90%.

Po provedení všech dosud popsaných kroků jsme stanovovali úspěšnost značení, resp. efektivitu inkorporace DY-548 či DY-648 do řetězců aaRNA. Tuto jsme v souladu se zažitými konvencemi vyjadřovali četností molekul barvy vůči počtu bází templátu. Opět jsme přitom využívali spektrofotometrické měření na přístroji NanoDrop 1000 (modul MicroArray). V tomto režimu spektrofotometr určil absorbanci vzorků aaRNA pro vlnové délky ve výrobcem přednastaveném rozmezí 220 nm až 748 nm. Z nich nás nejvíce zajímaly absorbance při vlnových délkách odpovídajících absorpčním maximům obou fluoroforů. Pro DY-548 jsme tedy užili k výpočtům průměr 3 absorbancí při λ nejbližších 558 nm a obdobně pro DY-648 průměr 3 absorbancí pro λ nejbližší 653 nm. Samotný přístroj NanoDrop a jeho software vyjadřovaly po provedeném měření množství zaznamenaných molekul barviv v pikomolech na mikrolitr vzorku nukleové kyseliny. My jsme však podle vzorce uvedeného v manuálech souprav společnosti Ambion (Applied Biosystems Inc., 2010) počítali množství molekul barviva na tisíc nukleotidů resp. jednu kilobázi templátu. Soupravy Ambion AminoAllyl MessageAmp Kit (Applied Biosystems Inc., Carlsbad, California, USA) jsme používali ke značení vzorků na DNA čipy v pilotní fázi studie. Doporučený (a níže uvedený) vzorec výpočtu "probarvenosti" templátu je však obecně platný nehledě na firemní původ chemikálií. V souladu s pokyny výrobců fluoroforů i publikovanými doporučeními (GE Healthcare UK Limited, 2009, t Hoen *et al.*, 2003) jsme k experimentům použili aaRNA s rozmezím 20 až 50 molekul barviva na jednu kilobázi.

Vzorec výpočtu množství molekul fluoroforu na tisíc bází templátové nukleové kyseliny

$$\text{počet molekul na 1000 nukleotidů} = \frac{A_{\text{barviva}}}{A_{260}} \times \frac{9010 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}}{\text{koefficient extinkce barviva}} \times 1000, \text{ kde:}$$

A_{barviva} je absorbance vzorku značené nukleové kyseliny při vlnové délce odpovídající maximu absorbance barviva

koeficient extinkce barviva je extinkční koeficient barviva při vlnové délce odpovídající maximu absorbance barviva. Pro námi používané fluorofory DY-548 a DY-648 to byly hodnoty $150.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ a $250.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (shodné jako u dvojice Cy 3 a Cy 5).

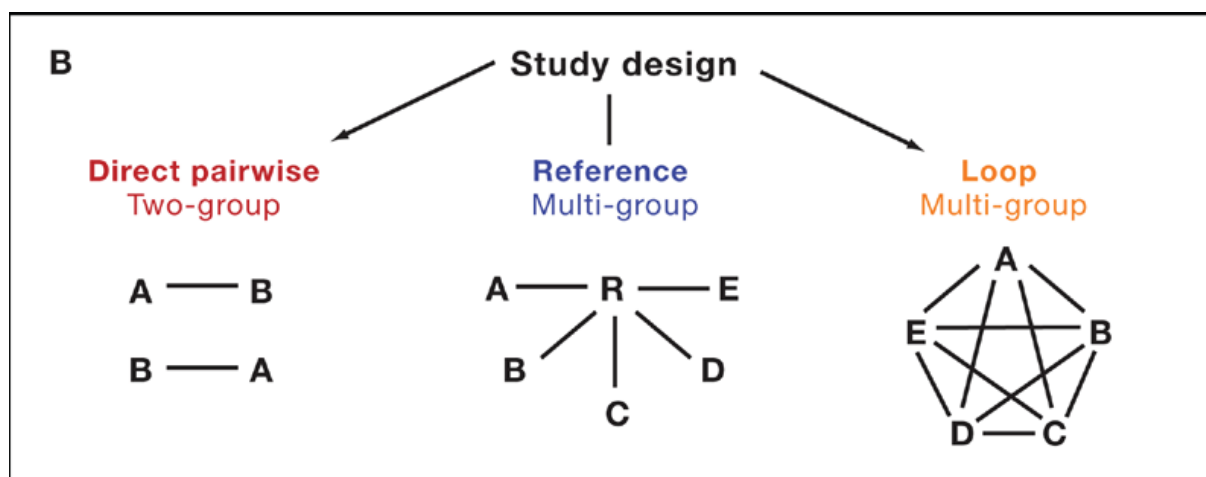
Hodnota $9010 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ je rovna extinkčnímu koeficientu neznačené RNA.

5.5.4. Hybridizace značených vzorků na DNA čipy

Povaha experimentálního úkolu, který jsme si vytyčili, vyžadovala dvoukrokový přístup. Protože genová exprese v terminální fázi regenerace byla do roku 2007, kdy jsme studii zahájili, předmětem velmi malého množství publikovaných prací, neměli jsme zpočátku k dispozici data, jež by úžeji zaměřila naši pozornost. Museli jsme proto sami nejprve provést vyhledávací analýzy v celogenomovém měřítku. Jejich cílem bylo soustředění výzkumu na menší počet funkčních skupin genů či dokonce jednotlivých genů. Pro tento účel se osvědčilo použití oligonukleotidových DNA čipů pokrývajících všechny toho času popsané potkaní kódující geny. Konkrétně jsme využívali sériově vyráběné DNA čipy 29K Rat Arrays od firmy Microarrays, Inc. (Huntsville, AL, USA) s nanesenými 26 962 sondami. Teprve na základě analýz na čipech jsme mohli přistoupit k experimentům založeným na polymerázové řetězové reakci v reálném čase, popsaným níže.

DNA čipy 29K Rat Arrays umožnily hodnocení relativních změn genové exprese u dvojic různě značených vzorků nanesených společně na jeden čip. Toto uspořádání experimentu nám vyhovovalo s ohledem na cíle pokusu, ale neméně významně i kvůli nižší finanční nákladnosti, než jaká je spojena s absolutní kvantifikací genové exprese jediného vzorku na každém čipu. Absolutní kvantifikaci sloužily v době naší studie např. DNA čipy firmy Affymetrix, největšího dodavatele na trhu. Pořizovací cena takových čipů, reagensů a příslušných přístrojů však byla mimo naše finanční možnosti. Z celé řady variant uspořádání analýz na čipech jsme zvolili tzv. referenční design (Dobbin a Simon, 2002, van Bakel a Holstege, 2007). Podstatou tohoto designu je zařazení společného referenčního vzorku do všech dvojic nanášených na jednotlivé čipy, jako by šlo o rovnocenný experimentální vzorek (viz obrázek 10). Jeho účelem však je umožnit vzájemné porovnávání získaných dat napříč pokusem, tedy mezi libovolnými vzorky, i když nebyly přímo společně naneseny a hybridizovány na čip. Referenční vzorek jsme připravili smícháním aminoallyl-aRNA z jater pěti intaktních potkaních samců Wistar odpovídajícího věku a hmotnosti jako ostatní zkoumaná zvířata. Zásadním ohledem je, aby referenční vzorek byl identický pro všechny párové hybridizace, což jsme v našem pokusu důsledně dodrželi.

Obrázek 10. Možná experimentální uspořádání analýz genové exprese na DNA čípech

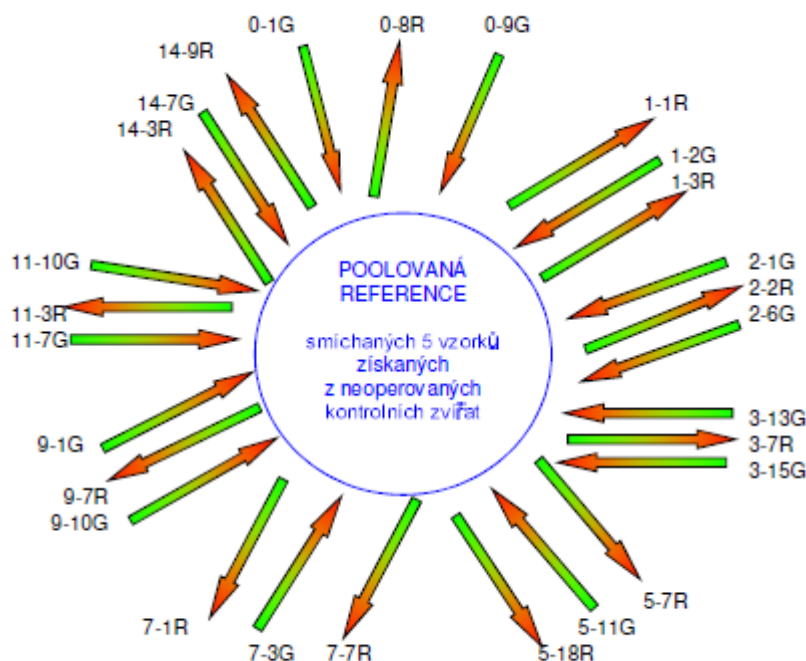


Pro účely naší studie, v níž šlo o porovnávání více skupin vzorků v různých časech od experimentálního inzultu (parciální hepatektomie), nejlépe vyhovoval design znázorněný veprostřed. Jde o tzv. referenční design. Oproti oběma ostatním je tento také robustnější proti ztrátě dat, v případě, kdyby se některou z plánovaných hybridizací nepodařilo v dostatečné kvalitě provést. I to pro nás bez předchozí zkušenosti s rozsáhlejším pokusem na DNA čípech hrálo podstatnou roli. Obrázek převzat z publikace van Bakela a Holsteho (2007).

Způsob případného zařazení referenčního vzorku není však jediným aspektem designu čipové analýzy genové exprese. U relativní kvantifikace a při ní nezbytném užití dvou značek (barev) musí být pozornost věnována i vyloučení artefaktů na vrub rozdílnosti těchto barev. Intenzita emitované energie, která reprezentuje klíčovou veličinu studie - míru exprese genů, není totiž mezi dvěma značkami nikdy zcela totožná. V anglosaské literatuře se pro tento okruh problémů užívá termín *dye bias* a jinými slovy spočívá v tom, že není lhostejné, kolik a kterých vzorků bude z celého souboru označeno jednou či druhou barvou. Dobře srozumitelné je to v experimentech porovnávajících v zásadě dvě skupiny vzorků, např. z nádorové a ze zdravé tkáně. Pokud by maligní buňky byly označeny jednou značkou a benigní druhou ze dvojice, pak vzniká arteficiální zkreslení zjištěných rozdílů exprese, které není zpětně možné oddělit od skutečných odlišností v biologické povaze zkoumaných buněk. V našem pokusu s více skupinami by takovou chybou bylo např. označení vzorků z časných pooperačních intervalů jednou barvou a z pozdějších intervalů druhou, čímž by zjišťované rozdíly byly méně věrohodné (Dobbin *et al.*, 2005). Vědomi si tohoto úskalí, naplánovali jsme značení a hybridizace vzorků tak, aby v žádné z experimentálních podskupin o třech zvířatech (vzorcích aaRNA), nenesla referenční aaRNA na všech třech čípech totožné fluorescenční barvivo. Pokud by naše podskupiny zahrnovaly sudý počet zvířat (vzorků), bylo by optimální rozdělit "barevnou orientaci" hybridizací na stejné poloviny. Takto, při lichém počtu probandů v každé skupině, jsme střídavě vzorkům přiřazovali buď DY-548 nebo DY-648 tak, aby z celkového počtu 27 hybridizací byly obě barvy rovnocenně zastoupeny na straně

hodnocených (vyšetřovaných) i referenčních (srovnávacích) vzorků aaRNA. Následující obrázek 11 znázorňuje vzorky v naší studii s přidělenými fluorescenčními barvami.

Obrázek 11. Schéma "barevné orientace" hybridizací na čípech v naší studii, respektive výčet analyzovaných i kontrolních vzorků spolu s přiřazenými fluorescenčními barvami



Zelený konec šipky znázorňuje barvení uvedeného vzorku aaRNA značkou DY-548, naopak červený konec reprezentuje barvení uvedeného vzorku aaRNA značkou DY-648. Jednotlivé vzorky z jater intaktních potkanů (skupina "Den 0") byly také hybridizovány vůči smíšenému (poolovanému) kontrolnímu (referenčnímu) vzorku k posouzení individuální variability v rámci kontrolní skupiny neoperovaných potkanů. Analýzou dat z těchto tří čipů jsme se později ubezpečili, že můžeme bez rizika významného zkreslení srovnávat ostatní vzorky se skupinou "Den 0".

Konečně tedy nyní uvedeme, jak jsme postupovali při samotných hybridizacích dvojic vzorků na DNA čipy. Pracovali jsme podle protokolu výrobce čipů. V celé mnohahodinové proceduře bylo nezbytné zachovat plynulou návaznost kroků, což kladlo velké nároky na důkladnou přípravu všech materiálů a reagensů před zahájením manipulace se vzorky a čipy. S ohledem na skleněný materiál nosiče užívaných čipů budeme v dalším textu používat pojmy čipy a skla jako synonyma. DNA čipy jsme vždy obdrželi v plastových zásobních krabičkách s vysoušedly překrytých ještě opakovaně uzavíratelnou neprůhlednou folií. Tyto obaly měly důležitou úlohu - zabránit jednak odpařování nanesených sond, jednak kontaminaci povrchu skel částicovými nečistotami z prostředí. Čipy nebyly hned po vyjmutí připraveny k experimentům. Úvodním krokem protokolu proto byla tzv. prehybridizace. Jejím cílem bylo

snížit intenzitu nespecifického fluorescenčního signálu pozadí čipů a předejít co nejvíce vazbě analyzovaných vzorků aaRNA na plochu skel neobsazenou sondami. Jinými slovy šlo o snížení zbytkové afinity chemické vrstvy, která při výrobě čipů sloužila k navázání sond (tzv. *probe attachment chemistry*). Pro tento účel jsme připravovali vždy čerstvý prehybridizační roztok o složení 5x sodno-citrátový pufr (SSC), 0,1% dodecylsulfát sodný (SDS) a 0,1% sérový bovinní albumin (BSA). V jedné sérii hybridizací jsme pracovali nejvýše se čtyřmi čipy. Tento limit byl dán kapacitou nám dostupné hybridizační stanice. Pro prehybridizaci 4 skel jsme spotřebovali 240 ml prehybridizačního roztoku. Ten jsme předehřáli v inkubační pídce na 42°C. Skla jsme s velkou opatrností na vrstvu sond jednotlivě umístili do 50 ml sterilních falkonek, v nichž jsme je přelili zahřátým prehybridizačním roztokem. Po dobu 30 minut jsme pak nechali probíhat žádoucí blokování nespecifických vazebných míst na čipech za stálé teploty 42°C a nepřetržitého omývání skel zajišťovaného otáčivým pohybem falkonek vložených do rotoru inkubační pícky. Při omývání po půl hodině prehybridizace nesl již první krok největší nebezpečí znehodnocení dalšího úsilí. Zahřátý prehybridizační roztok měl totiž tendenci rychle po vyjmutí falkonek z pícky zaschnout na čipech. Omývání jsme opakovali pětkrát dle protokolu pomocí deionizované MilliQ vody. Zvláště první omytí muselo být provedeno velkým přebytkem vody s ohledem na popsané riziko. Další čtyři opakování promývání se již odehrávala v menších objemech MilliQ vody a čipy byly při nich společně umístěny do vaničky tradičně určené k barvení histologických preparátů. Díky rozměrům skel odpovídajícím velikosti běžného mikroskopického podložního skla, se takové vybavení osvědčilo i v naší práci. K závěrečnému osušení jsme čipy opět po jednom umístili do čistých 50 ml falkonek a centrifugovali je jemně dle potřeby 3 až 5 minut (na 300 až 400 RCF).

Prehybridizované a osušené čipy nyní byly připraveny k nanesení vzorků aaRNA. Jeden přípravný krok však ještě musel proběhnout. Aby byla prostorově možná vazba řetězců aaRNA na oligonukleotidové sondy s převažující délkou 70 bazí, bylo podmínkou štěpení (fragmentace) aaRNA. Jak bylo uvedeno výše, délka molekul aaRNA po amplifikaci a *in vitro* transkripci činila v průměru 1000 bazí, což by na omezeném průměru detekčních pozic (tzv. spotů) čipů a při jejich nevelkých rozestupech mohlo stericky bránit komplementární vazbě vzorků k sondám. Tato neenzymatická reakce se tedy prováděla bezprostředně před aplikací vzorků na čipy. Do jednotlivé fragmentační reakce jsme vkládali v zájmu standardizace sjednocené množství 3 µg aaRNA. K nim jsme pak přidávali rovněž shodné množství aktivního činidla, jímž zde byl *Fragmentation solution* (ze soupravy RNA Fragmentation Reagents, Ambion, kat.č. AM8740), dle protokolu výrobce. Promíchané reakční směsi byly

inkubovány 15 minut při 70°C v termálním cykleru. Důležité bylo neprodlené přenesení reakcí na připravený led. Rychlé zchlazení bránilo opětovné renaturaci fragmentů nukleové kyseliny. Fragmentace aaRNA byla ukončována přidáním *Stop solution* (z již zmíněné soupravy firmy Ambion) opět dle pokynů výrobce.

Předpokladem zahájení hybridizačních reakcí bylo včasné spuštění a predehřátí hybridizační stanice Slide Booster (Advalytix², Mnichov, Německo). V jejích čtyřech komorách bylo po potřebnou dobu 16 hodin udržováno příznivé prostředí pro komplementární navazování fragmentů aaRNA k sondám čipů. Důležitými aspekty reakčních podmínek, které právě hybridizační stanice vytvářela a kontrolovala, byly: teplota, vlhkost a promíchávání směsí. Teplota byla 42°C dle protokolu výrobce čipů. Vlhkost byla zajišťována napipetováním zvlhčovacího roztoku do postranních dutin v každé reakční komoře. Promíchávání řádově mikrolitrových množství nemohlo být zajištěno mechanicky, nicméně fungovalo na efektivním principu ultrazvukové agitace kapalné směsi aaRNA a hybridizačního roztoku. Slabé UZ vlny nukleové kyseliny nepoškozovaly, nýbrž pomáhaly tomu, aby se, s přihlédnutím ke dlouhé reakční době, mohly veškeré vzorky aaRNA dostat do styku s celou plochou sond. Nerušený přenos ultrazvukových vln z piezoelektrických krystalů na dně komor stanice na tekutinu na DNA čípech zajišťoval tzv. párovací roztok (*coupling liquid*) Advalytix AdvaSon AS100.

Hybridizační roztok byl připravován vždy bezprostředně před použitím. Dbali jsme na co možná nejvyšší čistotu a jakost surovin, protože přicházel do styku se vzorky aaRNA v té nejchoulostivější fázi celého pokusu. Užívali jsme tedy sterilně filtrovaného SSC, čerstvě odtočené deionizované MilliQ vody a SDS o finálních koncentracích 5x SSC a 0,1% SDS. Čtvrtou složkou zde byl, na rozdíl od prehybridizačního roztoku, deionizovaný formamid o finální koncentraci 25%. Vzorky byly definitivně připraveny k hybridizaci na čip tak, že k výše uvedenému hybridizačnímu roztoku byly přidány ve stejném objemu fragmenty dvou aaRNA značených rozdílnými fluorescenčními barvami (viz výše). Výsledný objem reakční směsi k nanesení na čip byl zpravidla 240 až 250 µl.

Toto množství bylo třeba rovnoměrně aplikovat do reakční komůrky vytvořené nalepením tzv. hybridizačního rámečku na skleněný nosič čipu. Hybridizační rámečky (GeneFrame - 300µl (19 x 60mm internal) AB-0630; Thermo Fisher Scientific Inc., USA) měly velikost právě obepínající plochu sond na skle. Promíchávání reakčních směsí a

² Společnost Advalytix byla v r. 2009 koupena společností Beckman Coulter.

interakce aaRNA se sondami se odehrávaly v objemu vymezeném rozměry samolepícího rámečku.

Po šestnáctihodinových hybridizačních reakcích, které jsme zpravidla prováděli v časech mezi 17. a 9. hodinou, následovalo vyjímání čipů ze stanice a jejich konečné omývání. Nyní bylo jeho cílem odstranění hybridizačního roztoku a nenavázaného vzorku. Aby to bylo možné, museli jsme s opatrností opět sejmout samolepící hybridizační rámečky z jednotlivých skel a to pod hladinou prvního omývacího roztoku přehřátého na 42°C. Série tří protokolů předepsaných omývacích roztoků měla postupně klesající iontovou sílu. Tím byly čipy vystavovány zpřísnujícím se podmínkám pro vazbu nukleových kyselin se záměrem ponechání pouze specificky komplementárně navázaných fragmentů vzorků k sondám až do kroku snímání fluorescenčního signálu. Omývání ve druhém a třetím omývacím roztoku probíhalo za pokojové teploty a využili jsme při něm již zmíněné vaničky k barvení histologických preparátů. Na poslední krok omývaní jsme čipy jednotlivě umístili do čistých falkonek (50 ml tub). V nich jsme skla na závěr osušili centrifugací při 400 RCF po dobu 2 – 5 minut.

5.5.5. Snímání obrazové informace z DNA čipů po proběhlé hybridizaci

V této fázi experimentu končí přímá laboratorní práce (*wet lab*) a plynule navazuje bioinformatická interpretace dat (*dry lab*). Pro optimální výtěžnost dat bylo nejvhodnější provést snímání neprodleně po sušení čipů, popsáném výše. Bylo-li z provozních důvodů nutné skladování čipů, muselo to být ve tmě, k předejití zbytečnému vysvícení fluorescenčního signálu značek, a za pokojové teploty. DNA čipy jsme po dokončených hybridizačních reakcích a promývání nenavázaných kvant aaRNA vkládali do zařízení pro detekci fluorescenčních signálů z jednotlivých definovaných pozic (spotů) na čípech. Tímto zařízením v naší studii byla čtečka čipů (*microarray scanner*) Genepix 4000 B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA). Principem činnosti tohoto a podobných přístrojů je excitace molekul fluoroforů na vzorcích a obratem snímání jimi emitované fluorescence (Ramdas a Zhang, 2006). Pro tuto aplikaci se rozvinula dvě hlavní technická řešení. Jedním je užití laseru jako zdroje světla specifické vlnové délky k excitaci a poté fotonásobiče k detekci emitovaného světla sond. Druhým řešením je užití CCD zařízení (*charge-coupled devices*). Zde je přístroj osazen obloukovou lampou produkující bílé světlo. Bílé světlo zahrnuje všechny vlnové délky ve viditelném spektru, a tak je možné (vhodnými filtry) zvolit excitaci vyhovující použitým sondám. Fluorescence emitovaná excitovanými sondami je pak

zachycována a vyhodnocována CCD kamerou. Čtečka Axon Genepix 4000 B pracuje s laserem a fotonásobičem. Její rozlišovací schopnost a rychlost "čtení", související s režimem pohybu detektorů nad plochou čipů, byly pro naše účely plně vyhovující. Nastavení energie laserů není univerzálně pevně dané, je třeba jej upravit pro konkrétní snímání tak, aby nedocházelo ke ztrátám dat vinou příliš nízkého (podlimitního) anebo naopak příliš silného signálu (nad horní mezí rozlišovací schopnosti detektorů). Ve druhém jmenovaném případě, tzv. "přesvícených" či saturovaných spotů, by byla ztráta dat závažnější chybou. Spoty produkující silný signál reprezentují geny se silnou expresí, jež jsou přednostně předmětem zájmu ve studii. U spotů a genů s nízkým signálem spíše hrozí, že jde o artefakty, málo se lišící od nespecifického pozadí čipu, a tedy data méně věrohodná. Škála intenzit, kterou je čtečka schopna rozlišit závisí na její technologické pokročilosti. V našem případě byla horním detekčním limitem hranice 65536 arbitrárních fluorescenčních jednotek (FU). Ta byla dána formátem TIFF souborů při 16-ti bitovém kódování, $2^{16} = 65536$.

Kritériem vhodného nastavení síly laseru při skenování v našem experimentu bylo, aby nad horní a pod dolní detekční mezí nebylo více než 5% z celkového množství snímaných spotů. To představovalo kompromis mezi ztrátou dat z hodnoceného souboru a jeho očištěním od artefaktů, které mohly pocházet z mnoha zdrojů, nejčastěji z nedokonalostí provedení jednotlivých pokusných procedur (hybridizace, omývání a sušení). Výsledkem snímání čtečkou nejsou přímo numerická data. Je jím obrazová informace. Při relativní kvantifikaci genové exprese a užití dvou fluoroforů naše čtečka čipů simultánním skenováním v jedné době získala „dvoubarevný“ obraz. Každý z fluoroforů v něm byl zastoupen svou barvou, po vzoru konvence pro Cy-3 a Cy-5 konkrétně zelenou pro DY-548 a červenou pro DY-648. Takto jsou fluorofory značeny výše na obrázku 11. Některé scannery naproti tomu vyhodnocují každou emisní vlnovou délku zvlášť a poté složí výsledný obraz. Příklad snímku čipu vytvořeného superpozicí dvou barevných odstínů je na obrázku 8 (Prnka a Šperlink, 2006). Tak detekční místo (spot) na DNA čipu s výslednou žlutou barvou znamenalo srovnatelnou intenzitu exprese sondou detekovaného genu v obou vzorcích z hybridizované dvojice. Pokud naopak převládla zelená či červená barva, bylo zřejmé, ve kterém ze vzorků je gen silněji exprimován. Čtvrtou možností vzhledu detekčních míst byly spoty bílé. Tak software GenePix 5.0 označoval spoty saturované, tzn. s nadlimitní intenzitou signálu. Rozlišit je v odstínech červené a zelené by bylo pouhým zrakem obtížné, proto je takové dodatečné zvýraznění v souladu s publikovaným doporučením (Ramdas a Zhang, 2006).

Jednotlivé obrazové soubory dosahují úměrně množství později využitelných dat značných velikostí. Obvyklá velikost jednoho tohoto TIFF souboru byla okolo 250 megabytů (MB). Archivování a zpracovávání tak kladlo nemalé nároky na výpočetní techniku. Software GenePix Pro 5.0 nám posloužil k víceméně automatickému vytvoření datových GPR souborů z primárních obrazových výstupů. GPR soubory byly posléze převáděny na datovou matici. Kromě kalkulací z odstínů a jasu barev zachycených fluorescenčními detektory, musí být integrována do bioinformatického výstupu i data o prostorovém uspořádání spotů na čipu.

Údaje o tom, který spot nese jaké sondy, které pozice jsou kontrolní, a které neobsazené (i to má svůj význam, např. k odečtu nespecifického pozadí) byly předmětem souboru dodaného výrobcem čipů. Určování pozic detekčních míst pro jednotlivé geny je snazší, jak jsme se již zmínili, u čipů s tzv. nízkou hustotou, kde nedochází k multiplikaci sond na více míst čipu. To byl i případ naší platformy. Naopak tzv. čipy s vysokou hustotou mají vícečetná detekční místa, navíc záměrně rozptýlená do různých oblastí čipu, aby bylo zamezeno systematickému zkreslení dat odlišnostmi lokálních podmínek (zejm. intenzity signálu pozadí). Výpočetní algoritmy pak musí brát multiplikovaná detekční místa v potaz a správně přiřadit související data jednotlivým hodnoceným transkriptům. To přidává další nutnou úroveň bioinformatického zpracování, která musí předcházet vlastní interpretaci. Vraťme se ale k výrobcem poskytovanému popisu pozic sond na čipu. Tento tzv. *GAL file* byl vedle obrazové informace druhým vstupem pro software čtečky čipů. Ten dokáže vytvořit již numerickou datovou matici, což je klíčový krok interpretace. Další práce s datovou maticí je předmětem následující kapitoly. Nyní uvedeme podrobnosti její přípravy.

K přeměně obrazové informace na data je třeba tzv. *feature extraction software*. Pojem *feature* je v anglosaské literatuře synonymem termínu spot. Vytěžením (extrakcí) se myslí správné rozpoznání a kvantitativní vyhodnocení všech spotů na čipu. Cílem je získat údaje o intenzitě signálu z každého spotu v obou použitých barevných kanálech. Dílčí úkoly programu pak jsou: a) rozpoznat pozice spotů na nosiči čipu, b) každému spotu správně přiřadit pixely, které mu náleží, c) ke každému spotu nalézt blízko sousedící pixely pro odečtení signálu lokálního pozadí a d) vypočítat číselné údaje o intenzitě spotu, intenzitě pozadí a o celkové kvalitě snímání. Všechny tyto kroky jsou zvláště důležité pro DNA čipy, vyrobené technologií nanášení sond jehlami na nosič. To byl případ námi používaných čipů. Naopak u čipů vyrobených fotolitografickou technologií nebo nanášením sond bezkontaktně "tiskovou hlavou" uživatelům starost o tyto aspekty odpadá (Stekel, 2003). Rozmístění spotů na čipu je podmíněno uspořádáním robotické hlavy s nanášecími jehlami použité při výrobě.

Mřížka (*grid*) charakterizující vzájemnou polohu spotů nebývá zcela pravoúhlá. Její specifikaci obsahuje právě *GAL file*. Ten musí uživatel získat od výrobce čipů. V našem případě nesly čipy 48 bloků, upořádaných na nosiči do 12 řad a 4 sloupců. Každý blok pak zahrnoval 648 spotů (v uspořádání připomínajícím přepravku na ovoce (*orange packing*) s ustupujícími sudými řadami; 24 sloupců a 27 řad).

K rozlišení pixelů, náležejících jednotlivým spotům, námi užívaný software GenePix 5.0 (dodávaný ke čtečce) pracoval metodou fixní či variabilní kruh. To znamenalo, že spotům, jež ideálně měly mít kruhový tvar a totožný průměr, přiřadil dle mřížky kruhové obrysy s určitou schopností upravit průměr kruhů podle skutečné situace. Nanášením sond jehlami totiž není dosahováno ideálního uniformního tvaru a velikosti spotů. Kde si program neporadil dobře s volbou pixelů, mohl uživatel manuálně půdorys spotů upravovat. Vzhledem k jejich počtu šlo o velmi zdlouhavou činnost náročnou na pozornost, avšak při vědomí technických limitací čipů a čtečky jsme na ni nerezignovali.

GAL file vedle stanovení pozic jednotlivých spotů, zahrnoval i vícečetné textové údaje, které byly nepostradatelné při interpretaci výsledků. Stěžejní informací byla nukleotidová sekvence všech druhů sond na čipu. Ta byla rozhodující molekulárně biologickou charakteristikou, ovlivňující specifitu a sílu vazby s cílovým transkriptom. Navzdory neustálému zpřesňování genomických databází novými výzkumy a nevyhnutelnému zastarávání dat použitých při návrhu čipu (v roce 2007), nám sekvence sond dovoľovala ověřit si, jaký transkript podle aktuálního stavu poznání potkaních genů sonda váže. Popis detekovaného genu a jeho případné varianty ke dni návrhu byl rovněž obsahem *GAL file*. Výrobce tak uživatelům poskytl následující podstatné údaje: příslušnost genu k chromozomu, označení lidských a myších homologních genů, o samotném genu pak jeho názvy a alfanumerické identifikátory v genomických databázích (GenBank, Ensembl, RefSeq, LocusLink). Navíc byl každý dostatečně anotovaný transkript zařazen do tří deskriptivních kategorií databáze Gene Ontology – biologický děj, molekulární funkce a lokalizace v buňce. Navazující datové výstupy s sebou nesly tyto informace pro usnadnění porozumění výsledkům.

5.5.6. Kvantifikace obrazové informace

Datová matrice získaná experimentem na DNA čípech může být s různou měrou uživatelského komfortu hodnocena některým z komerčních softwarových prostředků či bezplatně dostupných bioinformatických nástrojů. Pořizovací cena licencí za pohodlnější programy velkých firem výrazně překračovala naše možnosti. Navíc jsou naneštěstí tyto licence časově omezené, obvykle na jeden kalendářní rok a jejich prodlužování je i nadále velmi nákladné. Dlužno dodat, že určitou daní za snazší práci je u těchto softwarů i menší transparentnost výpočtů, protože z pochopitelných obchodních zájmů, jejich vývojáři algoritmy svých programů nezveřejňují. Zcela opačný přístup mají zdarma dostupné, tzv. *open source*, aplikace a jejich programátoři. U nich je naopak maximum z programovacího kódu zveřejněno a nabízeno zájemcům z řad odborné veřejnosti k úpravám a vylepšením. Starost o pořizovací cenu a nákup aktualizací zde odpadá, protože užívání je bezplatné. Vývoj je pak úsilím celosvětové komunity sdíleným v prostředí sítě internet. Financování takových aplikací je pak možné díky vládním i nevládním grantům a dobrovolným příspěvkům uživatelů, oplátkou za usnadnění řešení bioinformatických problémů v jejich profesních projektech. Je nasnadě, že jsme se v našem řešitelském kolektivu rozhodli pro druhou jmenovanou cestu a našim prostředím interpretace dat z DNA čipů se stal programovací jazyk R a jeho bioinformatická rozšíření (tzv. balíčky) souborně označované názvem Bioconductor.

Programovací jazyk R je možno využívat prostřednictvím tzv. GUI (*graphic user interface*) aplikací, ve kterých se uživatel pohybuje v pracovních oknech, tak jak je to obvyklé i u jiných počítačových programů. Do těchto oken pak vepisuje definované příkazy, umožňující práci s nahranými experimentálními daty. Obecnou logiku jazyka R i jednotlivé příkazy se lze naučit z návodů dostupných na internetu (tzv. vinět, *vignette* či obsáhlejších autorských manuálů; Girke, [2009]), případně knižních publikací dostupných v angličtině i češtině (Becker *et al.*, 1988, Pekár a Brabec, 2009, Stekel, 2003, Venables a Ripley, 2002).

5.5.7. Normalizace a integrace dat

Přestože dosud popsané kroky přípravy vzorků byly pracné a zdlouhavé, hlavní těžiště a úsilí naší studie tkvělo právě v interpretaci dat. Z obecně statistického hlediska spočívala nezvyklost získávaných výsledků z DNA čipů ve faktu, že o nevelkém počtu vzorků (27 potkanů) jsme získávali desetitisíce numerických údajů (hodnot intenzity fluorescenčního signálu z bezmála 27 tisíc sond při každé experimentální hybridizaci). To kladlo vysoké nároky na statistické zpracování výsledků a mnohočetnou kontrolu věrohodnosti dat, s nimiž jsme pracovali.

Hodnoty intenzity fluorescenčního signálu z technických důvodů nelze jednoduše přímo převádět na vyčíslení množství mRNA ve studovaných buňkách či tkáních. Vžilo se proto používání poměrného vyjádření, které relativně kvantifikuje míru genové exprese mezi dvěma experimentálními podmínkami či populacemi buněk (Stekel, 2003, van Bakel a Holstege, 2007). Odpadá tak např. starost o rozdílnou vazebnou afinitu použitých sond na čipech.

Významu poměrného vyjádření je snadné intuitivně porozumět. Hodnoty mezi 1,0 a (teoreticky) nekonečnem znamenají zesílení exprese, naopak hodnoty mezi 0 a 1,0 svědčí pro pokles exprese. Obtíž však nastává se statistickým zpracováním takovýchto nerovnoměrně distribuovaných hodnot. I základní matematické operace jako výpočet průměru se pak komplikují. Proto je široce zavedeno uplatnění logaritmické transformace hrubých dat před jakoukoliv pokročilejší analýzou, díky které je docíleno symetrické distribuce zpracovávaných hodnot. Pro lepší představu níže uvádíme převodní vztahy mezi hrubými a logaritmovanými daty v podobě tabulek. Obě jsou převzaty z monografie Dova Stekela (Stekel, 2003).

Tabulka 4. Převodní vztahy mezi hrubými a logaritmovanými vyjádřeními intenzity signálu z čipu

log ₂ intenzita	hrubá intenzita	hrubá intenzita	log ₂ intenzita
0	1	1	0
1	2	2	1
2	4	5	2,32
3	8	10	3,32
4	16	20	4,32
5	32	50	5,64
6	64	100	6,64
7	128	200	7,64
8	256	500	8,97
9	512	1000	9,97
10	1024	2000	10,97
11	2048	5000	12,29
12	4096	10000	13,29
13	8192	20000	14,29
14	16384	50000	15,61
15	32768		

Tabulka 5. Převodní vztahy mezi hrubými a logaritmovanými vyjádřeními relativní genové exprese

poměr v prostých násobcích (x)	poměr v logaritmickém vyjádření (log ₂ x)
4x snížená exprese	-2
3x snížená exprese	-1,58
2x snížená exprese	-1
1,5x snížená exprese	-0,58
bez rozdílu exprese	0
1,5x zvýšená exprese	0,58
2x zvýšená exprese	1
3x zvýšená exprese	1,58
4x zvýšená exprese	2

Podbarvením řádků se sníženou expresí červeně a se zvýšenou zeleně předesíláme později ve výsledcích užívané značení dat získaných analýzou genové exprese na DNA čipech v názorném grafickém výstupu zvaném teplotní mapa (*heat map*).

Dalšími dvěma kroky obecně patřícími k prvotnímu zpracování hrubých dat jsou odečtení signálu pozadí (*background subtraction*) a rozhodnutí o dalším nakládání s těmi spoty, které buď grafický program sám, nebo uživatel při snímání čipů po hybridizaci označili za sporné (*flagged features*).

Bohužel ani logaritmovaná data nelze ještě bezprostředně použít. Dalšími zdroji zkreslení mohou být rozdílné intenzity nespecifického signálu pozadí (nosiče) čipu nebo různá efektivita inkorporace fluorescenčních značek mezi studovanými vzorky nukleových kyselin. Tyto artefakty se nevyhýbají žádné čipové platformě a mohou nastávat mezi barevnými kanály na společném čipu (tzv. *within array*) anebo mezi čipy při absolutní (jednobarevné) kvantifikaci (tzv. *between arrays*). Závažnost těchto zkreslení navíc může být nerovnoměrně rozložena třeba v závislosti na intenzitě signálu ze spotů. Geny se silnou expresí budou signálem pozadí ovlivněny pochopitelně méně než slabě transkripčně aktivní geny. Pojmem normalizace dat rozumíme soubor statistických opatření s cílem dosažení věrohodné numerické reprezentace skutečných biologicky relevantních rozdílů mezi studovanými vzorky (Stekel, 2003, van Bakel a Holstege, 2007).

Potřebnost normalizace není při provádění experimentu zjevná. Stala se však metodickým imperativem plynoucím ze zjištění, že i při hybridizacích totožných vzorků nukleových kyselin vůči sobě na jeden čip anebo při opakovaných hybridizacích stejných párů (neidentických) vzorků vychází určitý počet genů jako diferenciatně (rozdílně) exprimovaný, třebaže pro to není biologický podklad. Na vině jsou systémové artefakty čipové platformy. Uplynulá léta přinesla postupné zdokonalování metod jejich průkazu a hlavně eliminace. Přístupy, které vizualizují tyto artefakty, jsou označovány jako průzkumná analýza dat (*exploratory data analysis*) a neslouží k hledání odpovědí na biologické otázky prováděného pokusu. Slouží výhradně k reflexi kvality naměřených dat a informují experimentátory o nutném rozsahu normalizace, který není vždy stejný. Pomocným ukazatelem hodnotícím věrohodnost spotu před normalizací je tzv. vážení spotů (*spot weights*), jehož výstupy mohou být při normalizaci zohledněny.

Ke grafickému vyjádření dat před normalizací slouží několik typů diagramů. Nejjednodušší je vynést logaritmovaná data o fluorescenční intenzitě ze dvou barevných kanálů proti sobě. V takovémto diagramu rozptylu (*scatter plot*), bychom ideálně měli vidět mrak bodů, zastupujících jednotlivá detekční místa čipů (spoty), rovnoměrně rozložený na obě strany od diagonály. Tato úhlopříčka neboli regresní přímka proložená mrakem bodů, by měla vycházet z nuly na svislé i vodorovné ose diagramu a mít sklon 1,0. Má-li však regresní přímka odlišný sklon, nebo protíná-li jednu z os v nenulové úrovni, znamená to, že data je nezbytné normalizovat některou ze statistických metod. Na věrohodnost dat lze usuzovat i podle rozložení jednotlivých bodů okolo diagonály. Pro lidské oko je přitom nesnadné poznat,

zda body okolo úhlopříčky jsou distribuovány rovnoměrně či nikoliv. Šikovnějším grafickým vyjádřením je proto tzv. MA diagram (*MA plot*). Na rozdíl od vynesení logaritmovaných hodnot fluorescenční intenzity ze dvou barevných kanálů proti sobě, znázorňuje logaritmovaný poměr intenzit fluorescence obou fluoroforů v místě spotu (osa y) vůči průměrné logaritmované intenzitě obou fluoroforů v místě spotu (osa x).

Odvození parametrů „M“ a „A“, podkladů MA diagramů

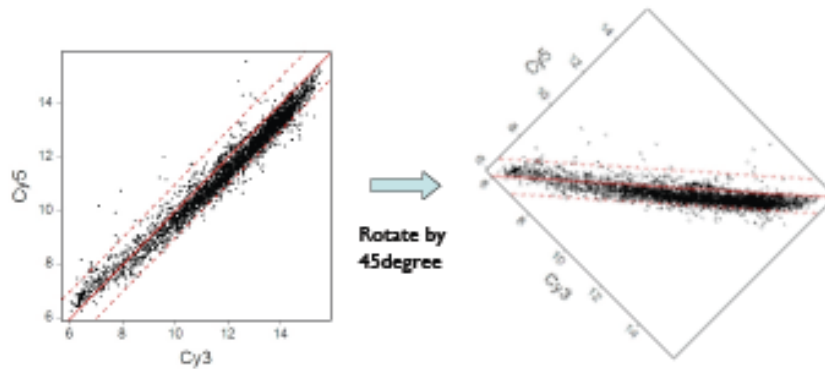
$\log_2 \mathbf{R}$	$\log_2 \mathbf{G}$
$M = \log_2 \mathbf{R} - \log_2 \mathbf{G} =$ $= \log_2(\mathbf{R} / \mathbf{G})$	
$A = \frac{1}{2} * (\log_2 \mathbf{R} + \log_2 \mathbf{G})$	

Písmeny **R** a **G** označujeme hodnoty fluorescenční intenzity v červeném a zeleném kanálu po odečtení intenzity pozadí. Normalizace obvykle pracuje s logaritmovanými poměry intenzit, značenými M ($M = \log_2 \mathbf{R} - \log_2 \mathbf{G} = \log_2(\mathbf{R} / \mathbf{G})$). Průměr logaritmované intenzity jednotlivého spotu bývá značen A ($A = \frac{1}{2} * (\log_2 \mathbf{R} + \log_2 \mathbf{G})$) a je ukazatelem celkové jasnosti spotu. Písmeno M je mnemotechnickou pomůckou odvozenou od slova *minus* (ve smyslu rozdíl) srozumitelnou v češtině i angličtině. Písmeno A odpovídá anglickým pojmům *average* (průměr), popřípadě *add* (ve smyslu sčítat) a v češtině tedy nemá protějšek se stejnou iniciálou. Při převažujícím užívání logaritmu o základu 2, znamená jednotkový rozdíl parametru M dvojnásobnou změnu poměru intenzit a jednotkový rozdíl parametru A dvojnásobnou změnu jasnosti. Takto platí následující: M = 0 shodná intenzita, M = 1 dvojnásobný rozdíl a M = 2 čtyřnásobný rozdíl mezi intenzitou spotů v červeném a zeleném kanálu (Smyth a Speed, 2003). MA diagram nápadně připomíná jednodušší diagram rozptylu téhož experimentu, s tím hlavním rozdílem, že mrak bodů je nyní rozprostřen kolem vodorovné regresní přímky. Ta je pro lidský zrak snáze hodnotitelná. Ovšem příprava MA diagramu neznámá jen rotaci o 45°, jak by se mohlo zdát. Měřítka na osách jsou u obou diagramů odlišná. Vztahování logaritmovaných poměrů intenzity obou barev každého spotu vůči průměrné hodnotě logaritmované (fluorescenční) intenzity daného spotu čipu, které je podkladem konstrukce MA diagramu, zajistí tu výhodu, že při normalizaci není činěn rozdíl mezi barevnými kanály. S takovými vstupními daty pracují lineární i nelineární metody normalizace robustněji a s lepší reprodukovatelností, než kdyby porovnávaly barevné kanály vůči sobě (Stekel, 2003). Podstatu a rozdíly výše popsaných diagramů shrnuje obrázek 12.

Obrázek 12 Přehled odvození a rozdílností diagramů užívaných v průzkumné analýze čipových dat

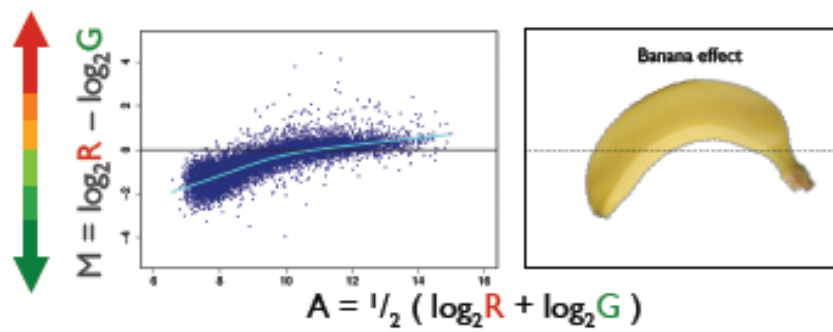
A

Scatter plots



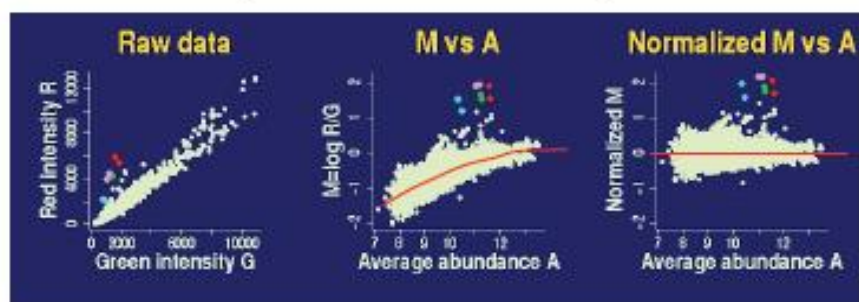
B

MA plots



C

Why use an M vs A plot ?



Obrázek shora dolů znázorňuje dva odlišné diagramy a nakonec jejich rozdíl. A) Diagram rozptylu. B) MA diagram. Zde znázorňuje data před normalizací. Je vidět, že mrak bodů je zakřiven v oblasti nízkých i vysokých intenzit. Tento artefakt se nazývá *banana effect* a je ukazatelem nezbytnosti normalizace. C) Zde vidíme, jak se mrak datových bodů změní díky normalizaci. Dostáváme jej „napřímený“ podél vodorovné regresní přímky MA diagramu (zcela vpravo). Body v horní polovině od horizontály zastupují geny se zvýšenou expresí (několik je barevně zvýrazněno), naopak v dolní polovině jsou geny s expresí relativně sníženou. Tyto obrázky jsou převzaty z prezentace *Issues in the analysis of two-colour microarray data*, přednesené Nathalií Thorne na kurzu *Practical Course on Analysis and Informatics of Transcriptomics Data*, European Bioinformatics Institute, Hinxton (Velká Británie) 18. 10. 2010.

V našem experimentu jsme používali DNA čipy se sondami nanášenými na nosič jehlami do definovaných pozic mřížky (viz výše). Možná nehomogenita depozice sond jehlami při tomto výrobním postupu je někdy zodpovědná za prostorovou variabilitu odečítaných fluorescenčních signálů. K řešení tohoto problému byla vypracována jedna z nelineárních normalizačních metod. Protože zvláště kalkuluje se spoty v jednotlivých blocích mřížky čipu, je v anglosaské literatuře označována jako *block-by-block*, případně *print tip loess* regrese. Podstatou této metody je pro hodnoty M a A náležející spotům v jednom bloku vypočtení separátní regresní křivky, která je využita k dílčí normalizaci. Opakováním algoritmu pro všechny bloky je ve výsledku eliminována prostorová nerovnoměrnost hodnot M a A, pramenící z technické nedokonalosti, nikoliv z biologických odlišností (Smyth a Speed, 2003). Tuto metodu normalizace dat v rámci čipů (*within array*) jsme využili.

5.5.8. Analýza dat o genové expresi

Identifikace genů se změněnou expresí (DEGs)

Statistickou analýzu dat z DNA čipů jsme provedli v programovacím prostředí R s použitím balíčku *limma* (*Linear Models for Microarray Analysis*; (Smyth, 2004)). Logaritmované poměry fluorescenčních intenzit v červeném a zeleném kanálu (označované v dalším textu také jako $\log_{2}FC$) byly normalizovány v rámci čipů metodou *print tip loess* (Smyth a Speed, 2003). Průměrné koeficienty diferenciální exprese mezi všemi skupinami zvířat podrobenými hepatektomií a společným referenčním vzorkem byly zhodnoceny metodou hierarchického shlukování (*hierarchical clustering*) a analýzou hlavní složky (*principal component analysis (PCA)*).

Rozdíly genové exprese v čase trvání experimentu byly vypočítány ve dvou krocích. Nejprve pro každou operovanou skupinu vůči intaktní kontrolní skupině. Poté mezi skupinami, které vyplynuly z hierarchického shlukování a analýzy hlavní složky. Geny s logaritmovanými poměry fluorescenčních intenzit ($\log_{2}FC$) vyššími než 1 nebo nižšími než

-1 byly dále hodnoceny. Z nich geny označené za signifikantně diferenciálně exprimované metodou *decideTest* balíčku *limma* byly dále analyzovány pomocí internetové genomické databáze DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*; (Huang *et al.*, 2009b)). V rámci této databáze jsme pracovali s nástrojem pro funkční anotaci genů (*Functional Annotation Tool*), založeným na nenáhodném výskytu souvisejících genů v uživatelem nahraném seznamu (Huang *et al.*, 2009a).

Hierarchické shlukování dat z DNA čipů

Abychom vyhodnotili průběh změn genové exprese v době trvání experimentu a našli skupiny vzorků s podobným vývojem transkripce v čase, přistoupili jsme k biostatistické metodě hierarchického vyhledávacího shlukování bez učitele (*unsupervised heuristic hierarchical clustering*). Měřítkem podobnosti nebo rozdílnosti shluků byla v našem případě úplná eukleidovská vzdálenost (*complete Euclidean distance*). Pro tento účel jsme pracovali s funkcí *hclust*, dostupnou v balíčku *stats* programovacího prostředí R (Becker *et al.*, 1988, Gordon, 1999, Stekel, 2003).

Analýza hlavní složky dat z DNA čipů

Analýza hlavní složky (PCA) je metodou pro snížení dimenzionality dat o genové expresi získaných na DNA čipech. Jejím principem je nalezení směrů v datovém prostoru, které zodpovídají za největší variabilitu (Becker *et al.*, 1988, Causton *et al.*, 2003, Venables a Ripley, 2002). Analýza hlavní složky byla provedena s vyváženou a centrovanou datovou maticí genové exprese pomocí funkce *prcomp*, dostupnou opět v balíčku *stats* programovacího prostředí R. Funkci *prcomp* jsme použili podle návodu Thomase Girkeho (Girke, [2009]).

5.5.9. Formulování nové hypotézy o biologickém ději na základě vyhodnocených dat

V tomto nejméně standardizovaném kroku interpretace čipových dat se vychází z předpokladu, že z naměřených hodnot je možné odvodit biologicky relevantní údaje. Například může jít o identifikaci genů, jejichž úroveň exprese dovoluje klasifikovat biologické vzorky do kategorií. Kategoriemi mohou být nádorové tkáně s více nebo méně agresivním chováním. Jiným výstupem čipových analýz mohou být odhalené soubory genů charakterizující zkoumanou fyziologickou odpověď na experimentální stimulus. Předpokladem formulování nových hypotéz je řádné vytěžení datové matrice hodnot genové exprese v předchozím kroku. Pro naši aplikaci DNA čipů se z metod interpretace hodilo výše popsané hierarchické shlukování bez učitele. Volba kroků dále navazujících je již závislá na zkušenostech a záměrech každého pracoviště a obecné platná doporučení lze stěží nalézt.

Mezi přístupy již osvědčené v této fázi patří zpětné inženýrství (*reverse engineering*) regulačních sítí genů (Laub *et al.*, 2000, Vilo *et al.*, 2000). Prostě vyjádřeno jde o to, zjistit, známe-li již skupiny společně regulovaných genů, co mají společného kromě časového průběhu změn exprese. Logicky se tedy hledá sdílený nadřazený (regulační) činitel, který by mohl zodpovídat za podobnost v odezvě skupiny genů na experimentální podmínky. Lze tedy přistoupit např. k porovnávání promotorových sekvencí genů a hledání společného sekvenčního motivu. Ten může být vazebným místem transkripčního faktoru. Takovéto hledání se široce opírá o databáze genových sekvencí a jeho výstup musí být vždy předmětem nového experimentálního ověření.

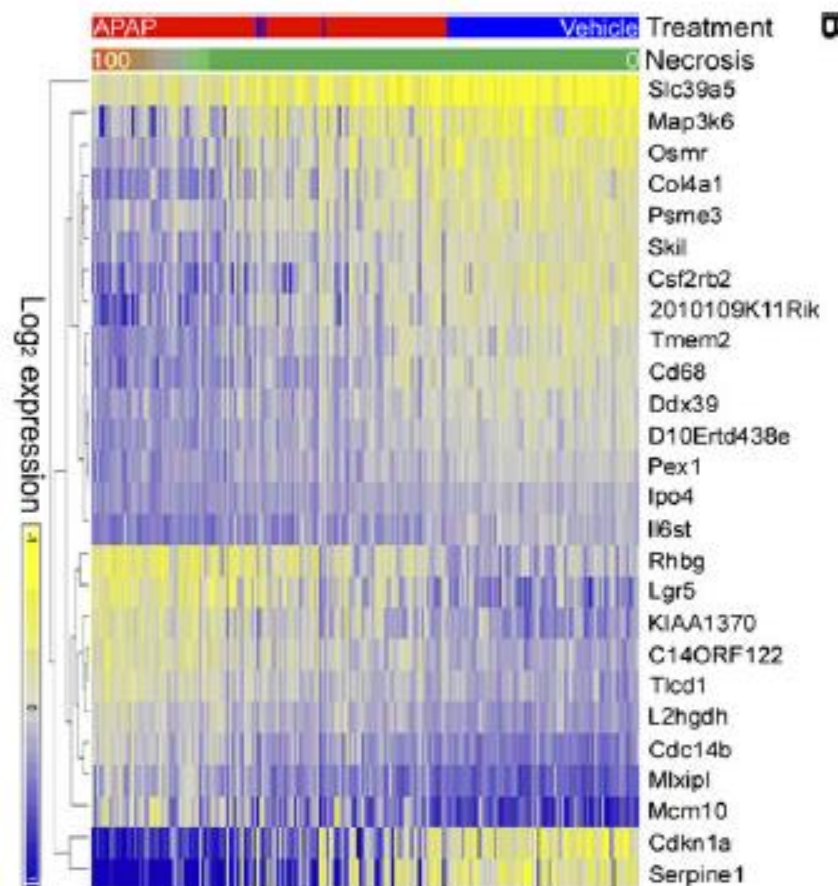
Naše čipová studie měla povahu časové řady (*time series experiment*), protože jsme sledovali odezvu na 2/3 parciální hepatektomii bez dalších modifikujících intervencí v průběhu spontánní regenerace u potkanů. Tato charakteristika tedy vymezovala vhodné metody interpretace nálezů. V souladu s cíli práce nám šlo o analýzu pořadí a časového postupu změn genové exprese. Jedním z motivů takových studií může být hledání případné periodicity v naměřených datech. Tak tomu bylo při vyhledávání genů regulovaných v souvislosti s fázemi buněčného cyklu u kvasinek (Spellman *et al.*, 1998). Usnadněním bývá skutečnost, že takové fáze jsou provázeny pozorovatelnými morfologickými změnami. Podmínkou rozpoznání skutečného intervalu periodických změn genové exprese je sběr biologických vzorků s četností častější nebo přinejmenším stejnou, jakou mají samotné změny. Náš protokol s odběry vzorků zpočátku každý den a později s dvoudenním rozestupem vycházel z předpokladu dramatictějších změn v časných fázích a naopak

pozvolnějšího ukončování regenerační odpovědi v našem modelu. Svou roli hrál samozřejmě i etický a ekonomický ohled na množství zahrnutých pokusných zvířat.

Dalším užitečným přístupem v této nejpokročilejší etapě interpretace čipových dat je vizualizace. Pomáhá objevit trendy v datech a napovídá tak dalšímu směřování teoretických úvah. Přínosnou a přitom vcelku jednoduchou metodou z této kategorie je sestavování Vennových diagramů. Ty mohou výstižně ukázat míru překrývání mezi množinami dat ohraničenými shlukováním, nebo mezi experimentálně odvozenými shluky a skupinami genů sdílejícími funkční anotaci (na základě genomických databází). My jej užíváme na obrázku 17 (v kapitole 6.5).

S ohledem na multidimenzionalitu čipových dat, která brání jejich přímočařejšímu posouzení, jdou nezdědka ruku v ruce s vizualizačními metodami i nástroje pro redukci dimenzionality (například analýza hlavní složky). Nejrozšířenější metodou vizualizace jsou teplotní mapy (*heat maps*) zavedené pro čipová data o genové expresi Eisenem a kol. (1998). Lze uvést, že teplotní mapa je znázorněním matrice genové exprese prostředky barevného kódování. V kapitole 6.6 (obrázek 18) užíváme teplotní mapu pro znázornění našich čipových a RT-PCR výsledků a jejich srovnání. Vynesené barvy a množství a uspořádání zahrnutých genů (řádků) a skupin (dle intervencí nebo intervalů) je věcí zvyku a volby autorů. Příkladem jiného barveného schématu a většího rozsahu dat je obrázek z publikace Harrillové a kol. (2009; obrázek 13).

Obrázek 13. Příklad využití teplotní mapy k názorné prezentaci čipových dat



Teplotní mapa převzatá z publikace Harrillové a kol. (2009). Jedná se o znázornění míry genové exprese 26 ukazatelů hepatotoxického působení acetaminofenu po podání myším. Řádky zastupují 26 hodnocených genů. Sloupce představují jednotlivé vzorky jaterní tkáně seřazené navíc podle rozsahu jaterní nekrózy (pomocná stupnice od 0 do 100) a dále podle podané látky (toxin (APAP) nebo neškodný nosič (vehicle)). Na první pohled je patrné jiné barevné schéma než v naší vlastní teplotní mapě v kapitole 6.6. Zde je snižená exprese značena žlutě a zvýšená modře. Tím je zjevnější, že odstíny mapy zde neodkazují k barvám fluoroforů použitých při hybridizaci na čipy. Možnost seskupování vzorků a genů, a to i vícečetného, patří k hlavním přednostem pokročilých teplotních map. Zde vlevo od barevné mapy vidíme dendrogram, vizualizující výsledky hierarchického shlukování genů.

Jinou možností vizualizace je zvýraznění genů našeho experimentálního zájmu v rámci nezávisle anotované funkční či metabolické dráhy. Na podkladu drah dostupných v databázi KEGG (Kanehisa *et al.*, 2002) to umožňují vícere bioinformatické aplikace. My v kapitole 7 uvádíme příklad takového postupu na obrázku 20 pro dráhu signalizace zprostředkované PPAR. Výčet existujících vizualizačních metod tím zdaleka není úplný.

Interpretační práce ještě není u konce. Množiny (shluky) genů, které mají podobný vývoj genové exprese, mohou být dále posuzovány srovnáváním s jinými množinami, s údaji

v databázích nebo dostupnými publikacemi o zkoumaném modelu. V tomto bodě závisí další postup na bioinformatické zdatnosti každého řešitelského kolektivu. My jsme pokračovali tradičním pročitáním publikací a návaznou snahou o validaci potenciálně zajímavých kandidátních genů metodou real-time PCR. Výpočetně náročnou alternativou pro zkušená pracoviště je např. hledání sdílených sekvenčních motivů v předpokládaných regulačních oblastech množiny kandidátních genů. Nicméně u vyšších organismů jsou predikce a ohrazení regulačních sekvencí velmi složité (Causton *et al.*, 2003). Příklady prací z oboru hepatologie, kde autoři postupovali po stanovení genové exprese na DNA čípech metodou analýzy obohacení sekvenčních motivů pro vazbu transkripčních faktorů, jsou studie Damrauera a kol. (2011) a Juskeviciuteho a kol. (2008). Obě se opět týkaly časných hodin po parciální hepatektomii.

5.5.10. Real-time PCR – příprava kvantifikačních systémů a vzorků cDNA

Jak bylo uvedeno výše, stalo se běžnou praxí, ověřovat výsledky získané pomocí DNA čipů některou z dalších genetických či proteomických metod. My jsme volili polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (*real-time PCR*), s níž jsme v řešitelském kolektivu již měli dobrou předchozí zkušenost (Jiroutová *et al.*, 2007, Libra *et al.*, 2006, Radilová *et al.*, 2009, Vondráček *et al.*, 2009).

Pro validaci výsledků čipových analýz jsme tedy využili sady o dvou primerech a jedné specifické fluorescenčně značené sondě navržené k detekci exprese 11 cílových a 3 kontrolních (*housekeeping*) genů. Všechny tyto systémy byly připraveny ve společnosti GENERI BIOTECH s.r.o. (Hradec Králové, Česká republika) a souhrn údajů o jejich návrzích je předmětem tabulky č. 6. Aby bylo zabráněno zkreslení výsledků případnou kontaminující genomovou DNA, byly sekvence primerů navrženy tak, aby produkty přesahovaly hranice exonů stanovovaných genů, bylo-li to možné. Specifické hydrolyzační sondy byly značeny fluorescenční značkou FAM. Na opačném konci sond byl navázán zhášec (tzv. *black hole quencher*, BHQ). Mezi těmito dvěma molekulami nastává přenos fluorescenční rezonanční energie (*Förster's/fluorescence resonance energy transfer*, FRET). Termostabilní polymeráza při amplifikaci úseku cDNA vymezeného primery svou exonukleázovou aktivitou štěpila komplementárně navázanou sondu a tím oddálila od sebe molekuly FAM a BHQ (Holasová *et al.*, 2006). Fluorescence narůstajícího počtu molekul FAM uvolněných do roztoku byla veličinou měřenou detektory optického cykleru a následně používanou k výpočtům.

Samotné vzorky byly připraveny tak, že vždy 1 mikrogram celkové RNA z jaterní tkáňe podstoupil reverzní transkripci na cDNA s použitím oligo-dT primerů (GENERI BIOTECH s.r.o. Hradec Králové, Česká republika) a MuMLV reverzní transkriptázy (Fermentas UAB, Vilnius, Litva) podle pokynů výrobce enzymu.

Tabulka 6. Souhrn údajů o kvantifikačních RT-PCR systémech

Oficiální symbol genu	Kód qPCR soupravy (GENERI BIOTECH s.r.o.)	Referenční sekvence	Exony přesahované produktem
Kontrolní (<i>housekeeping</i>) geny			
Surf1	rSurf1_Q1	NM_172068.1	4 / 5
Nup54	rNup54_Q1	NM_017361.1	11 / 12
Hmbs	rHmbs_Q2	NM_013168.2	7 / 9
Analyzované geny			
Lypla1	rLypla1_Q1	NM_013006.1	9
Me1	rMe1_Q1	NM_012600.2	12 / 13
Pltp	rPltp_Q1	XM_215939.4	10 / 11
Hmgcs2	rHmgcs2_Q1	NM_173094.1	5 / 6
Lcn2	rLcn2_Q1	NM_130741.1	1 / 2
Kng1	rKng1_Q1	NM_012696.2	9 / 10
Ppm1d	rPpm1d_Q1	NM_001105825.1	5 / 6
Sesn3	rSesn3_Q1	NM_001108125.1	7 / 8
Ces1e	rCes1e_Q1	NM_031565.2	10 / 11
Ang	rAng_Q1	NM_001012359.1	1
Nat8	rNat8_Q1	NM_022635.1	1

5.5.11. Provedení kvantifikačních PCR reakcí

Kvantifikační RT-PCR byla prováděna na optickém termálním cykleru iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) s amplifikačními podmínkami: 95°C po dobu 3 min, poté 50 cyklů se střídáním teplot 95°C po dobu 10 s a 60°C po dobu 30 s. Každý ze vzorků cDNA byl hodnocen v (technickém) triplikátu.

Stanovení těchto reakčních podmínek předcházela optimalizace nově navržených kvantifikačních systémů ohledně teploty hybridizace (*annealingu*) a koncentrace Mg²⁺ na gradientovém termálním cykleru při použití TrueStart Taq DNA polymerázy (Fermentas UAB, Vilnius, Litva). Produkty optimalizačních reakcí byly hodnoceny elektroforézou na 2% agarózovém gelu.

5.5.12. Interpretace výsledků qPCR

Také při stanovování míry genové exprese metodou RT-PCR je obecně možná absolutní nebo relativní kvantifikace. Absolutní kvantifikace by vyžadovala užití standardu a sestavení kalibrační křivky k odečítání počtu kopií transkriptu v analyzovaném vzorku. My jsme volili relativní kvantifikaci vztaženou vůči expresi trojice referenčních genů. Šlo o geny vybrané v předběžných experimentech z panelu potkaních *housekeeping* genů osvědčených a zavedených v nabídce společnosti GENERI BIOTECH s.r.o. (Hradec Králové, Česká republika). Použití více než jednoho kontrolního genu s předpokládánou neměnnou expresí v průběhu experimentu bylo v souladu s publikovanými doporučeními (Andersen *et al.*, 2004, Vandesompele *et al.*, 2002). Výpočty s užitím průměrných hodnot trojice genů jsou odolnější vůči náhodným vlivům či odlehlým hodnotám než spoléhání na jedinou referenční hodnotu. Relativní kvantifikace pomocí RT-PCR odpovídala navíc i předcházejícímu přístupu během čipových analýz. Mezi DNA čipy a polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase však jsou podstatné rozdíly. RT-PCR má oproti čipům širší dynamický rozsah, tzn., že dokáže přesněji zhodnotit množství transkriptů ve více řádech. Platí tedy, že DNA čipy mají roli spíše vyhledávací metody, zatímco RT-PCR již spolehlivěji ukazuje proměny intenzity genové exprese v čase nebo vlivem experimentálních intervencí. Pochopitelně i statistické zpracování dat získaných oběma metodami je zřetelně odlišné.

Každý ze vzorků cDNA byl hodnocen v triplikátu a aritmetický průměr Ct hodnot (*threshold cycle*) byl přepočítán na hodnoty relativní genové exprese s použitím rovnice dle Pfaffla (2001). Ct hodnota je počet cyklů PCR, při kterém dojde k signifikantnímu nárůstu fluorescence a protnutí stanoveného prahu (*threshold*). Výše prahu je nastavována tak, aby oddělila nespecifickou fluorescenci pozadí od vzorků (Holasová *et al.*, 2006). Programy příslušející cyklerům nastavují výši prahu automaticky, nicméně uživatel ji může změnit. Data o genové expresi byla normalizována vůči geometrickému průměru hodnot exprese tří referenčních (*housekeeping*) genů (viz kapitola 6.6). Nakonec jsme normalizované údaje získané o každém studovaném genu provedením RT-PCR porovnali pro všechny pooperační intervaly s výsledky hybridizací na DNA čipech.

6 VÝSLEDKY

6.1 Provedené hepatektomie

Provedli jsme 2/3 parciální hepatektomie dle Higginse a Andersona (1931) celkem u 24 potkaních samců kmene Wistar. Všechna zvířata přežila v pooperačním období až do plánovaného ukončení sledování, kdy byla dle protokolu usmrcována kvůli odběrům vzorků.

6.2 Biochemická stanovení

Cílem biochemických stanovení bylo odhalit případné pooperační komplikace hodnocením ukazatelů hepatocelulárního poškození. Výsledky stanovení sérových aktivit alaninaminotransferázy (ALT) a aspartátaminotransferázy (AST) po jednotlivých experimentálních skupinách jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7. Souhrn výsledků biochemických stanovení sérových aktivit jaterních transamináz

Enzym	Den 0	Den 1	Den 2	Den 3	Den 5	Den 7	Den 9	Den 11	Den 14
ALT [μ kat/l]	0,7 \pm 0,2	2,1 \pm 1,1	2,2 \pm 0,7	1,9 \pm 0,9	1,1 \pm 0,2	0,8 \pm 0,6	1,0 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	0,8 \pm 0,2
AST [μ kat/l]	1,5 \pm 0,5	6,4\pm1,7	5,5 \pm 4,0	2,7 \pm 1,1	1,8 \pm 0,1	2,0 \pm 0,4	1,7 \pm 0,1	2,3 \pm 0,6	1,6 \pm 0,1

Data jsou uvedena jako průměr \pm S.D. ($n = 3$ v každé skupině). Výsledek statisticky významně odlišný ($p < 0.05$ při hodnocení použitím jednosměrné ANOVA a Tukeyova *post hoc* testu) oproti kontrolám (Den 0) je zvýrazněn tučně.

Aktivity ALT a AST nenasvědčovaly nechtěnému poškození reziduálního jaterního parenchymu při operacích ani druhotně v době rekonvalescence potkanů po parciální hepatektomii. Ani v chování zvířat hodnoceném rutinně ve viváriu a v jejich spontánním příjmu potravy nebyly shledány odchylky nad rámec předpokládaný při studovaném modelu.

6.3 Hmotnostní parametry

Způsoby uvedenými výše jsme měřili celkovou vlhkou hmotnost jater v den usmrcení potkanů a dopočítávali celkovou vlhkou hmotnost jater v den parciální hepatektomie. Tyto údaje a z nich odvozené výpočty jsme využívali k posouzení pokročilosti morfologické obnovy jaterní tkáně po resekcí.

Hmotnost celých jater kontrolní skupiny potkanů jsme mohli měřit přímo při odběrech vzorků od těchto zvířat nevystavených parciální hepatektomii. U intaktních zvířat s celkovou tělesnou hmotností $220,7 \pm 4,5$ g činila $11,4 \pm 1,2$ g ($n = 3$). Ostatní hmotnostní údaje jsou shrnuty v tabulce 8. V popisované práci jsme používali dvou poměrných ukazatelů. Jednalo se o poměry celkové hmotnosti jater vůči 100 g celkové tělesné hmotnosti, následovně:

PH ratio = vypočítaná celková hmotnost jater / 100 g celkové tělesné hmotnosti v den parciální hepatektomie

DO ratio = celková hmotnost jater / 100 g celkové tělesné hmotnosti v den odběru vzorků

Popsané dva poměry jsme pro každou skupinu potkanů podstoupivší parciální hepatektomii navzájem porovnávali. Motivací k tomu bylo mnohokrát publikované tvrzení, že regenerující játra dosáhnou podílu na tělesné hmotnosti odpovídajícího stavu před resekcí (Hata *et al.*, 2007, Michalopoulos, 2010).

$$\%LReg = \frac{DO\ ratio}{PH\ ratio} \times 100 [\%]$$

Tabulka 8. Souhrn hmotnostních údajů a parametrů postupu morfologické regenerace jater po parciální hepatektomií

Parametr	Den 0	Den 1	Den 2	Den 3	Den 5
TH1 [g]	220,7±4,5	230,7±23,4	219,3±12,5	230,0±27,8	233,3±15,6
J1 [g]	---	7,9±0,9	7,0±1,0	7,3±0,5	7,7±0,5
J1* [g]	11,4±1,2	11,3±1,3	10,0±1,4	10,5±0,8	11,0±0,7
TH2 [g]	220,7±4,5	213,3±18,1	221,3±9,1	224,0±23,3	250,7±12,2
J2 [g]	11,4±1,2	4,3±0,5	6,6±0,3	6,5±0,2	8,9±0,7
PH ratio	---	4,9±0,1	4,6±0,6	4,6±0,2	4,7±0,1
DO ratio	5,1±0,5	2,0±0,2	3,0±0,1	2,9±0,3	3,6±0,3
%LReg [%]	---	41±3%	65±6%	63±4%	76±4%
Parametr	Den 7	Den 9	Den 11	Den 14	
TH1 [g]	218,3±19,3	222,7±11,7	208,3±3,5	206,3±4,2	
J1 [g]	6,9±1,0	7,9±0,8	6,8±0,8	6,7±0,7	
J1* [g]	9,9±1,4	11,3±1,1	9,7±1,1	9,5±1,0	
TH2 [g]	253,3±26,2	281,0±22,5	270,3±19,5	296,3±11,0	
J2 [g]	9,2±2,1	11,1±3,1	10,5±2,1	11,3±1,1	
PH ratio	4,5±0,2	5,1±0,6	4,6±0,5	4,6±0,4	
DO ratio	3,6±0,5	3,9±1,0	3,9±0,5	3,8±0,5	
%LReg [%]	80±10%	77±11%	84±7%	83±9%	

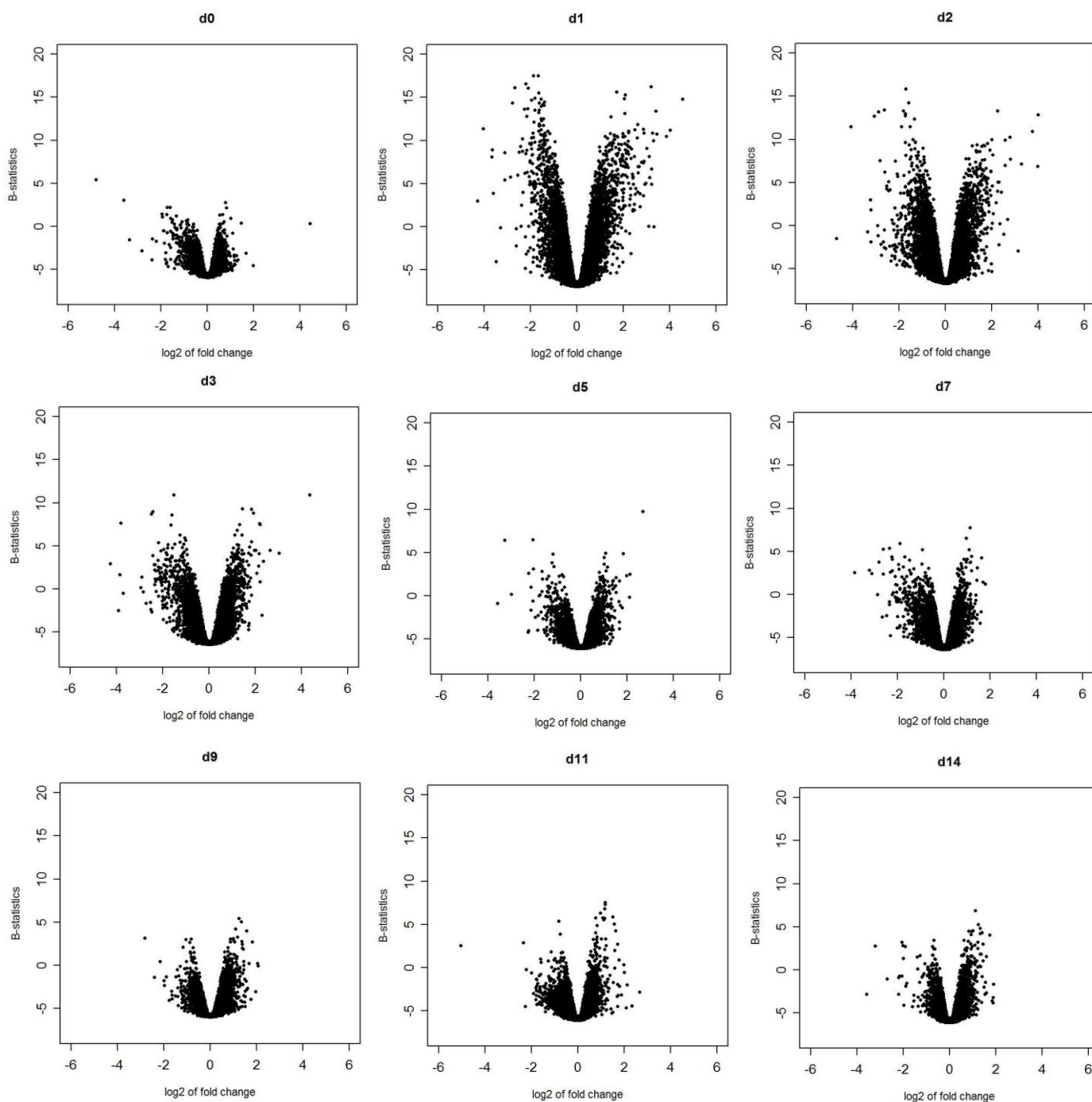
Tabulka shrnuje jak změřené, tak dopočítané hmotnostní parametry v naší studii. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± S.D. (n = 3 v každé skupině). Význam popisů řádků je následující: TH1 - vstupní tělesná hmotnost, J1 – hmotnost resekované části jater, J1* - vstupní hmotnost celých jater, TH2 – konečná tělesná hmotnost, J2 – konečná hmotnost celých jater; tři zbývající popisy jsou vysvětleny v textu nad tabulkou. Všechny hmotnosti jsou v gramech. Výsledky byly vždy porovnávány ke kontrolní (intaktní) skupině (Den 0) s použitím jednosměrné ANOVA a Tukeyova *post hoc* testu a signifikantní rozdíly ($p < 0.05$) jsou označeny tučně.

Tak jsme využívali vlastní parametr, označovaný jako %LReg, k posouzení hmotnostní obnovy jaterní tkáně. Soudě podle něj, nebyla plná obnova jaterní tkáně u potkanů v naší studii dosažena ani v nejdelším hodnoceném pooperačním intervalu.

6.4 Microarray analýzy – provedené hybridizace

Pro účely popisované studie jsme provedli celkem 31 čipových hybridizací. Z toho jednu čtveřici jsme museli z analýz vyřadit pro nesplnění kvalitativních kritérií. Hodnoceno bylo tedy 27 hybridizací v souladu s počtem pokusných potkanů (9 skupin po 3). V zájmu minimalizace technických artefaktů byl dodržován návrh experimentu znázorněný na obrázku 11 a popsáný v kapitole 5.5.4. Při snímání obrazové informace jsme postupovali tak, abychom dosáhli tolerovatelné hranice 5% hodnot mimo detekční rozmezí laserové čtečky. Tak jsme získali sadu nejprve TIFF a posléze GPR souborů, které jsme dále interpretovali.

Při jednotlivých stupních bioinformatické analýzy jsme vytvářeli různé grafické výstupy pro účely kontroly kvality a průzkumné analýzy dat, o kterých byla řeč v kapitole 5.5.7. Jedním z nich byly tzv. *volcano plots*, generované z čipových dat po odečtení pozadí a po normalizaci (v balíčku *limma* jazyka R (Smyth, 2004)). Poskytovaly nám základní orientaci o množství genů se změněnou intenzitou signálu oproti intaktní kontrolní skupině pro každý pooperační interval. Chronologickým seřazením těchto diagramů podle délky spontánní regenerace po PH jsme mohli vidět, že s trváním sledování změněných genů zřetelně ubývá (viz obrázek 14).



Obrázek 14. Jeden z možných grafických výstupů čipových hybridizací. Jde o tzv. *volcano plots*, nazývané takto pro jejich charakteristický tvar připomínající sopečnou erupci. Podkladem jim byla normalizovaná logaritmovaná data o poměrech fluorescenčních intenzit nasnímaných čtečkou. V textu je označujeme také jako logFC a zde jsou vynesena na ose x. Na ose y vidíme index B, ukazatel empirické Bayesiánské statistiky, který měl pro nás pomocnou úlohu v odlišování biologicky relevantních změn od technických artefaktů. Více viz Smyth (2004).

6.5 Microarray analýzy – vyhodnocení dat

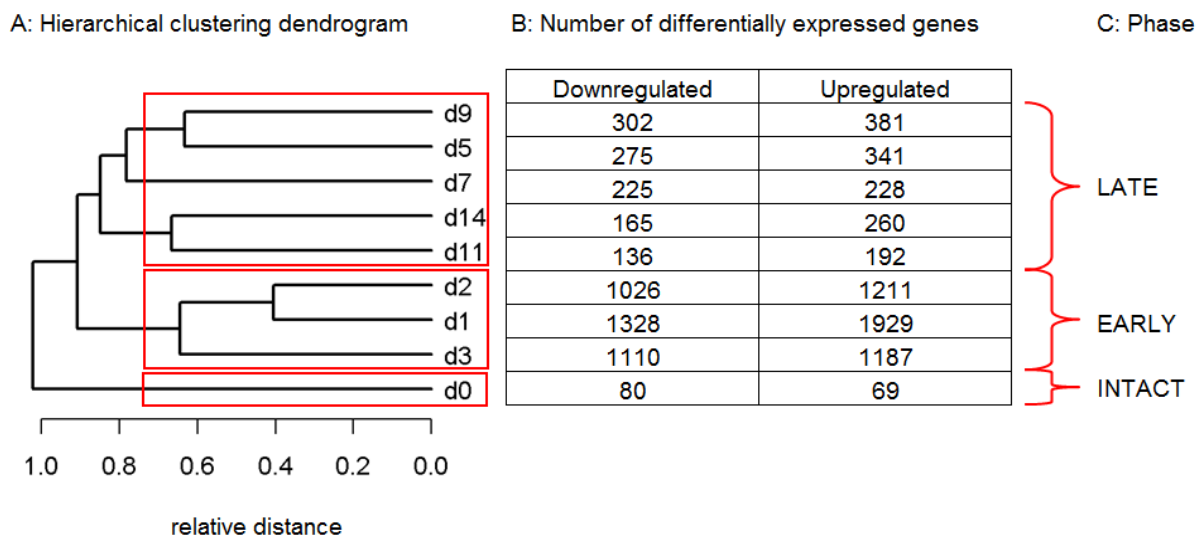
Diferenciální exprese, primární výstup naší čipové studie, byla hodnocena biostatistickým balíčkem *limma* prostředí R, jak bylo uvedeno výše. Tak jsme získali sadu hodnot relativní genové exprese pro každý pooperační den ve srovnání s referenční skupinou. Počáteční výrazné změny genové exprese spjaté s iniciací regenerace a dělením hepatocytů byly předmětem publikací jiných týmů (Cimica *et al.*, 2007, Juskeviciute *et al.*, 2008, Togo *et al.*, 2004). My jsme se nicméně chtěli zaměřit na terminaci regenerace odehrávající se v pozdějších dnech. Při neexistenci jasného vymezení, kdy, mezi 5. a 14. pooperačním dnem, proces regenerace vlastně končí, jsme použili dva vzájemně se doplňující postupy analýzy dat, abychom blíže ohraničili fázi terminace.

S touto motivací jsme podrobili primární sadu dat o diferenciální expresi dvěma nezávislým metodám redukce dimenzionality. Obě z nich dokáží zjednodušit rozsáhlé výsledky hybridizací na DNA čípech pro usnadnění jejich interpretace (Causton *et al.*, 2003). První metodou bylo hierarchické shlukování bez učitele, použité k odhalení skupin vzorků s celkově podobným průběhem změn genové exprese. Jak ukazuje obrázek 15, shlukování rozlišilo tři skupiny vzorků. Jejich rozdělení podle míry vzájemné podobnosti nebo odlišnosti bylo v dobrém souladu s počty genů se změněnou expresí (vůči směsi kontrolních aaRNA (referenčnímu poolu); tzv. DEGs) ve všech porovnávaných skupinách. V prvních třech dnech obnovy jaterní tkáně bylo DEGs zdaleka nejvíce (několik tisíc). Počínaje pátým dnem bylo diferenciatně exprimovaných genů podstatně méně (několik set). Tyto počty DEGs jsou smysluplné jen díky použití biologicky relevantní reference (směsi aaRNA z jater intaktních potkanů odpovídajícího kmene, věku a hmotnosti). Pokles počtu DEGs v průběhu regenerace odpovídá našemu očekávání. Zdaleka nejnižší počet DEGs připisovaný neoperované skupině potkanů (Den 0) potvrzuje robustnost a spolehlivost námi zvolených metod.

Druhou naší metodou byla analýza hlavní složky (PCA). Aplikovali jsme ji na stejná vstupní data jako v případě shlukování. První komponenta vysvětlila více než 90% variability dat (obrázek 16). Pokud je nám známo, bylo v naší studii poprvé použito metod hierarchického shlukování a PCA s cílem zpřesnit časové vymezení terminace regenerace po parciální hepatektomii. Hierarchické shlukování stanovilo tři skupiny pooperačních intervalů o různé velikosti. Nejprve samostatně vyčlenilo „intaktní skupinu“, zastoupenou těmi hybridizacemi označovanými v protokolu jako Den 0. Tak se potvrdil náš předpoklad odlišnosti klidové jaterní exprese jak od časných, tak i od pozdních fází regenerace. Zadruhé

shlukováním vznikla „časná skupina“, zahrnující pooperační dny 1, 2 a 3. Nakonec do nejširší „pozdní skupiny“ byly zařazeny výsledky z 5., 7., 9., 11. a 14. dne regenerace. Přesně ty samé tři skupiny vplynuly z analýzy hlavní složky (obrázek 16), čímž jsme se ubezpečili, že toto rozdělení bude racionálním podkladem další interpretace.

Obrázek 15. Výsledky hierarchického shlukování a mnohočetného testování dat z DNA čipů



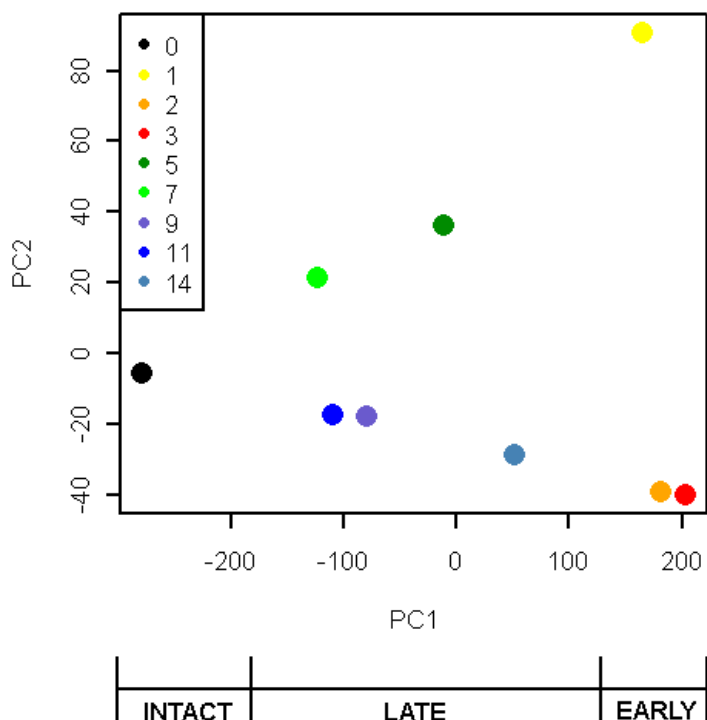
A: Navzájem podobnější intervaly (poooperační dny; dx) leží na dendrogramu blíže a naopak, čímž jsou názorně vyjádřeny jejich vztahy. Větve dendrogramu se sbíhají a tak ukazují skupiny popsané v textu. Rozlišení „intaktní“, „časné“ a „pozdní“ skupiny je dobře zřejmé.

B: Počty genů se významně sníženou (vlevo) nebo zvýšenou (vpravo) expresí ve srovnání s referenčním poolem. Ty byly získány metodou mnohočetného testování prostřednictvím funkce *decideTests* balíčku *limma* (s mezí $\log_{2}FC$ rovnou $|1|$) a metodou „*global*“.

C: Tři rozlišené fáze časového průběhu jaterní regenerace.

V dalších krocích interpretace jsme se drželi předpokladu, že genová exprese v pozdní fázi regenerace odráží aktivní terminační mechanismy a měla by tudíž být odlišná jak od časné tak od intaktní fáze. Proto jsme dále porovnávali data náležející právě vymezeným skupinám intervalů: „intaktní“, „časné“ a „pozdní“. Vennův diagram znázorňující toto porovnání, počty genů se změněnou expresí vůči oběma ostatním fázím a průsečík získaný těmito srovnáními pro "pozdní" fázi jsou předmětem obrázku 17.

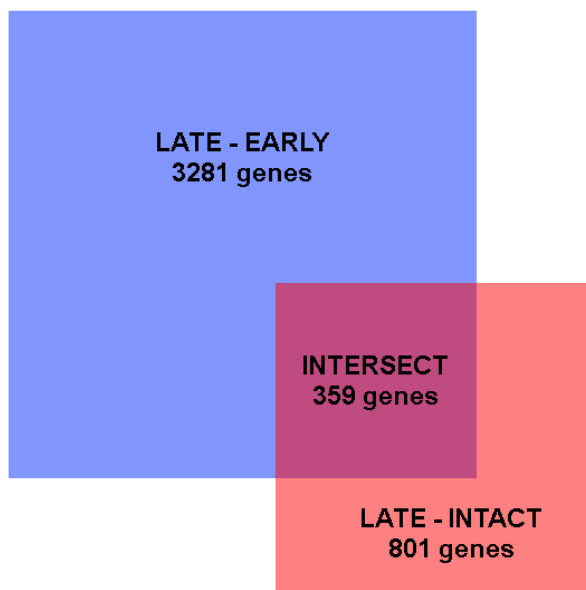
Obrázek 16. Vizualizace výsledků analýzy hlavní složky dat z DNA čipů



Analýza hlavní složky (PCA) dosáhla výsledků odpovídajících hierarchickému shlukování, ačkoliv pracuje na odlišném výpočetním principu. I zde byly zřetelně odlišeny tři skupiny pooperačních intervalů podél horizontální osy představující první hlavní složku (PC1). Tyto skupiny přesně odpovídají výše uvedenému rozdělení na „intaktní“, „časné“ a „pozdní“. Osy zastupují dva rozměry distribuce v datovém prostoru. Barevné body pak jednotlivé dny regenerace dle legendy ve výšeči grafu.

Data používaná počínaje tímto krokem analýzy byla již druhotným výstupem z DNA čipů. V metodické části práce v kapitole 5.5.8. je označujeme jako rozdíly genové exprese v čase (*time contrasts* v prostředí R). Naším hlavním zájmem bylo nalezení genů s expresí specificky změněnou v „pozdní“ skupině, které by ji co nejlépe odlišovaly od obou ostatních skupin. Výsledkem našeho hledání byla množina 359 genů splňujících toto kritérium. Jejich úplný výčet je elektronickou přílohou naší původní publikace (Rychtmoc *et al.*, 2012), v disertační práci jej z důvodu obtížného podání v přehledné tištěné podobě neuvádíme.

Obrázek 17. Vennův diagram znázorňující porovnání skupin časových intervalů vymezených na základě hierarchického shlukování a analýzy hlavní složky



Čísla ve větších čtvercích ukazují, kolik bylo odlišných genů se změnou exprese po provedení nezávislých párových porovnání skupin (v modrém „pozdní“ vs. „časné“, v červeném „pozdní“ vs. „intaktní“). Průsečíkem (*intersect*) těchto porovnání bylo 359 genů, jejichž genová exprese byla nejvíce specifická pro „pozdní“ skupinu pooperačních intervalů.

Těchto 359 kandidátních genů jsme podrobili tzv. analýze genového obohacení (*gene enrichment analysis*) pomocí internetové genomické databáze DAVID (Huang *et al.*, 2009b, Huang *et al.*, 2009a). Cílem tohoto kroku bylo roztrždit je do kategorií podle společných funkcí anotovaných v databázi KEGG (Kanehisa *et al.*, 2002). Úspěchem tohoto pokročilého bioinformatického stanovení byla identifikace pěti funkčních skupin nenáhodně častěji zastoupených („obohacených“) mezi zkoumanými 359 geny. Dosažení srovnatelné funkční anotace pouhým pročitáním publikací a postupným shromažďováním informací o jednotlivých genech by bylo mnohonásobně pracnější a časově náročnější.

Databázemi identifikované skupiny genů byly následující (s vybranými zástupci v závorkách):

- signální dráha PPAR (*malic enzyme 1; phospholipid transfer protein; fatty acid binding protein 4; ubiquitin C*)
- metabolismus glycerofosfolipidů (*diacylglycerol kinase, gamma; lysophospholipase 1; phosphatidic acid phosphatase type 2c; similar to diacylglycerol kinase epsilon*)
- signální dráha p53 (*Cd82 molecule; cytochrome c; protein phosphatase 1D; sestrin 3*)
- kaskády komplementu a koagulace (*coagulation factor X; complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide; complement component 4 binding protein, beta; kininogen 1*)
- ribozomy (*ribosomal protein L24; ribosomal protein L5; ribosomal protein S23; ribosomal protein S9*)

Názvy genů záměrně ponecháváme v anglickém znění, tak jak byly vyhledány v databázích. Blížeší identifikátory těch z nich, kterými jsme se dále zabývali, uvádí tabulka 9. Získali jsme tedy dvě signální dráhy a tři funkční kategorie s méně zřejmým zapojením do řízení regenerace jater. Nicméně podrobnější rešerši jsme i u nich našli mnohočetné vztahy příslušných genů k jaterní regeneraci nebo obecněji ke tkáňové homeostáze.

6.6 Real-time PCR – provedená stanovení

První série real-time PCR reakcí v naší studii sloužila k výběru vhodných referenčních genů, tedy takových se stabilní expresí v jaterní tkáni v průběhu regenerace po 2/3 parciální hepatektomii. Testovali jsme panel osmi potkaních *housekeeping* genů v portfoliu společnosti GENERI BIOTECH s.r.o. (Hradec Králové, Česká republika). Z hodnocených genů (B2m, Hmbs, Hprt1, Nup54, Polr2a, Surf1, Tbp, Ywhaz) jsme se rozhodli pro trojici Surf1, Nup54 a Hmbs. Tyto tři geny se shodně umístily nejlépe při posuzování algoritmy výpočetních aplikací GeNorm a NormFinder (Andersen *et al.*, 2004, Vandesompele *et al.*, 2002).

Volba genů pro validaci metodou real-time PCR se opírala o výsledky analýz exprese na DNA čípech a o publikované údaje. Seznam vybraných 11 genů je předmětem tabulky 9, kde jsou uvedeny spolu s identifikačními kódy z genomické databáze *Entrez Gene*. Do skupin podle funkčních anotací rozdělila databáze DAVID pouze 109 z 359 genů, protože ostatní neměly dostatek deskriptorů v KEGG. Vědomí této limitace výpočetní anotace nás vedlo

k tomu, prohledat celý soubor i vlastními silami. Nakonec jsme díky automatizované anotaci vytypovali 7 a pročitáním čipových výsledků a publikací další 4 geny do skupiny k ověření real-time PCR.

Tabulka 9. Vybrané geny určené k real-time PCR validaci

Oficiální symbol genu	Jméno genu	Entrez ID	KEGG dráha
Kng1	<i>kininogen 1</i>	24903	rno04610
Ppm1d	<i>protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform</i>	287585	rno04115
Sesn3	<i>sestrin 3</i>	315427	rno04115
Me1	<i>malic enzyme 1</i>	24552	rno03320
Pltp	<i>phospholipid transfer protein</i>	296371	rno03320
Hmgcs2	<i>mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase</i>	24450	rno03320
Ces1e	<i>carboxylesterase 1E</i>	29225	rno00983
Lyplal	<i>lysophospholipase 1</i>	25514	rno00564
Ang	<i>angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5</i>	497229	---
Nat8	<i>N-acetyltransferase 8 (GCN5-related, putative)</i>	64570	---
Lcn2	<i>lipocalin 2</i>	170496	---

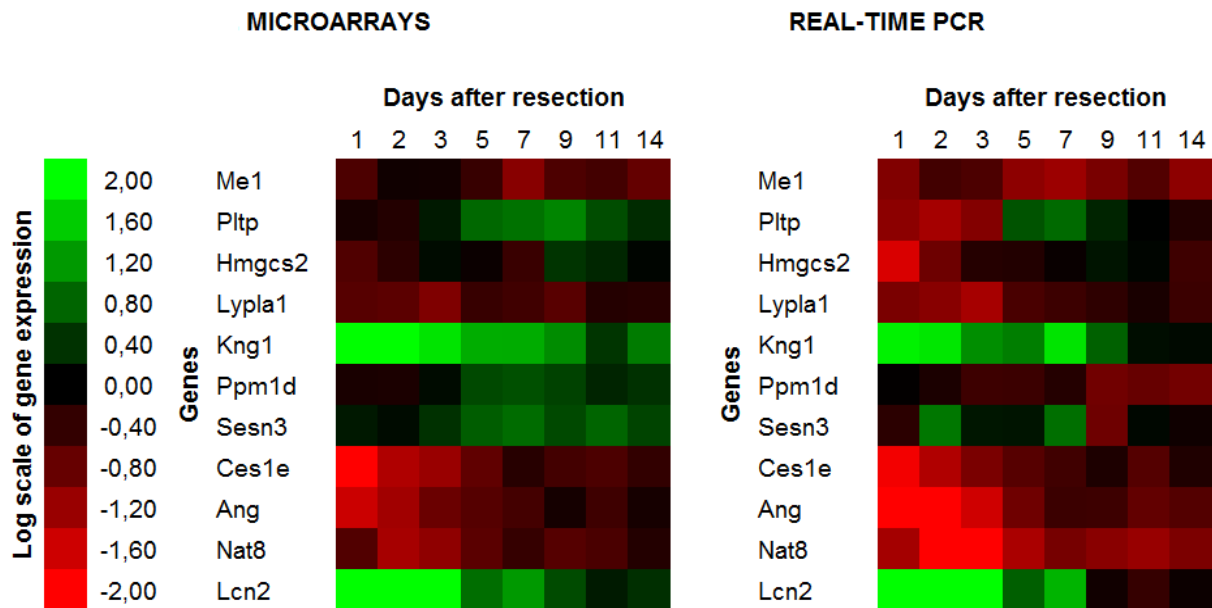
Tabulka 9 uvádí geny zvolené k real-time PCR validaci výsledků čipových stanovení relativní genové exprese. Jména genů zde pro zachování jednoznačnosti nepřekládáme. Výběr byl založen jak na analýze genového obohacení, tak na posouzení dat z DNA čipů a článků. Většina uvedených genů byla mezi 359 geny charakteristicky exprimovanými v pozdní fázi, které jsme hledali výše uvedenými postupy. Výjimkou v tomto byly Lcn2, zahrnutý na základě výrazných změn genové exprese dle DNA čipů a funkce v přestavbě mezibuněčné hmoty, a také Hmgcs2 zahrnutý s ohledem na příslušnost k signální dráze PPAR a recentní publikaci svědčící pro jeho roli v pozdní fázi regenerace jater (Yuan *et al.*, 2011b). Kódy drah KEGG znamenají: rno04610: kaskády komplementu a koagulace; rno04115: signální dráha p53; rno03320: signální dráha PPAR; rno00983: metabolismus léků – ostatní enzymy a rno00564: metabolismus glycerofosfolipidů. Poslední tři uvedené geny nejsou dosud přiřazeny k žádné z KEGG drah.

Výsledky real-time PCR a čipových stanovení ukazuje souhrnně obrázek 18. Data získaná pomocí čipů jsou prezentována v podobě tzv. teplotní mapy (*heat map*; 18A vlevo). Jde o přehledné grafické vyjádření umožňující uceleně podat informaci o změnách genové exprese množství genů v čase nebo mezi pokusnými skupinami. Připojená barevná škála ukazuje význam odstínů na mapě a konvenčně se užívá odstínů zelené pro zesílenou expresi a odstínů červené pro oslabenou expresi. Černá barva znamená nesignifikantní rozdíly. V teplotní mapě jsou zachyceny časové kontrasty vypočtené jako srovnání každé z operovaných skupin potkanů vůči intaktní kontrolní skupině, vždy získané pomocí společné reference (kontrolní směsi aaRNA). Takový postup interpretace je podstatou hodnocení čipových studií s designem zahrnujícím společnou referenci (viz výše). Výsledky real-time

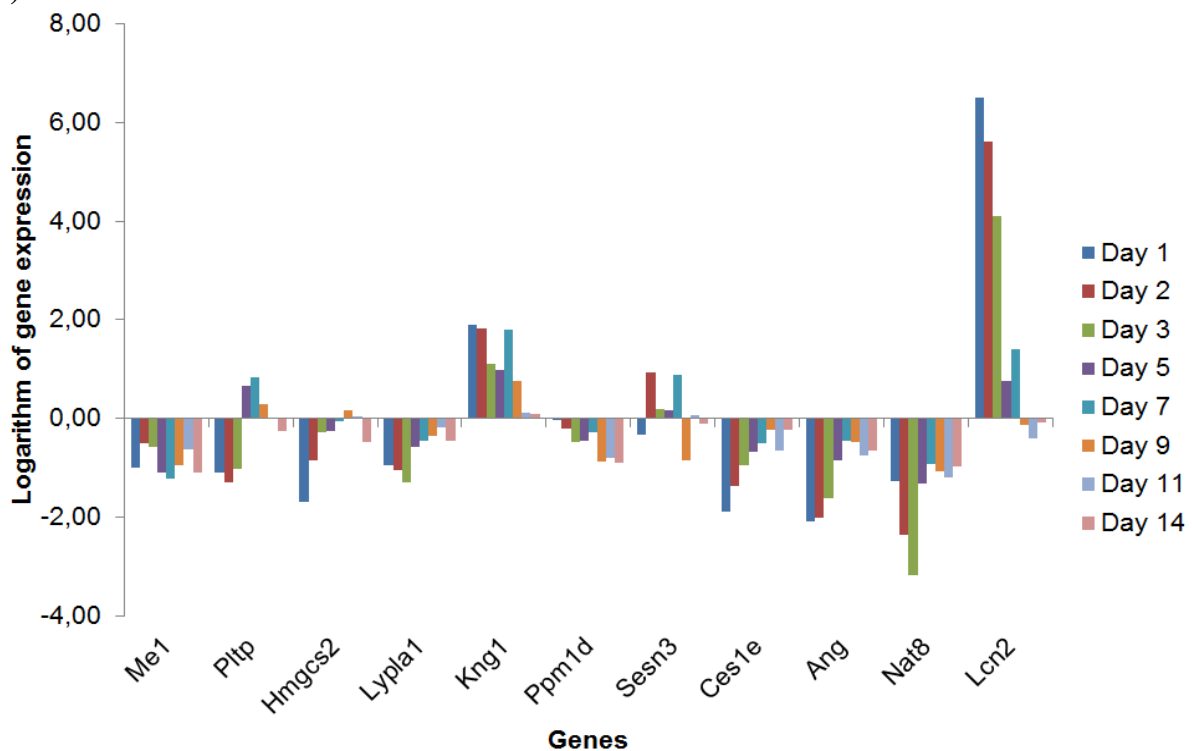
PCR jsou prezentovány jako \log_2 transformované hladiny relativní genové exprese vůči intaktní kontrolní skupině (18A vpravo). Tak mohou být intuitivně hodnoceny výstupy obou metod bok po boku. Výsledky PCR jsou i předmětem grafu (18B), kde je patrný širší dynamický rozsah této metody, jak bylo uvedeno v metodické části práce.

Obrázek 18: Výsledky analýz genové exprese na DNA čípech a pomocí real-time PCR a jejich srovnání

A)



B)



Log₂-transformovaná data o relativní genové expresi získaná experimenty na DNA čípech a provedením real-time PCR jsou zobrazena bok po boku pro usnadnění srovnání. Díky logaritmické transformaci mohou být oba soubory dat přímo porovnávány za použití jednotné škály. Důvodem, proč je rozsah osy y u teplotních map (A) užší než u grafu (B), je skutečnost, že by užití plného rozsahu dat zkreslilo teplotní mapy. Převládla by černá, protože většina hodnot je daleko od těch mezí. Proto jsme škálu teplotních map zúžili na ± 2 a hodnoty vně tohoto rozmezí jsou znázorněny nejtmavšími přítomnými zelenými nebo červenými odstíny.

A) Teplotní mapy ukazující dynamiku změn relativní genové exprese zhodnocenou oběma metodami užitými v naší studii. Dobrá celková shoda výsledků pro většinu genů je zjevná. Barevné odstíny označují směr změny genové exprese (červené snížení a zelené zvýšení; čím sytější, tím výraznější změna, viz legenda u barevné škály).

B) Relativní genová exprese hodnocená real-time PCR. Graf zobrazuje \log_2 -transformované hladiny exprese vůči kontrolní skupině. Hodnoty jsou průměry ze tří biologických replikátů analyzovaných v technických triplikátech. Šest z posuzovaných genů vykazuje dobrou shodu mezi PCR a čipovými výsledky. U dalších tří genů je shoda částečná a nakonec u dvou genů jsou výsledky protichůdné.

V případě grafického znázornění výstupů real-time PCR nebylo třeba rozpětí osy y limitovat. Pro přehlednost jsme se však rozhodli nevynášet do grafu chybové úsečky označující směrodatné odchylky. Úplný graf výsledků real-time PCR s chybovými úsečkami je elektronickou přílohou naší původní práce (Rychtmoc *et al.*, 2012).

6.7 Real-time PCR – vyhodnocení dat

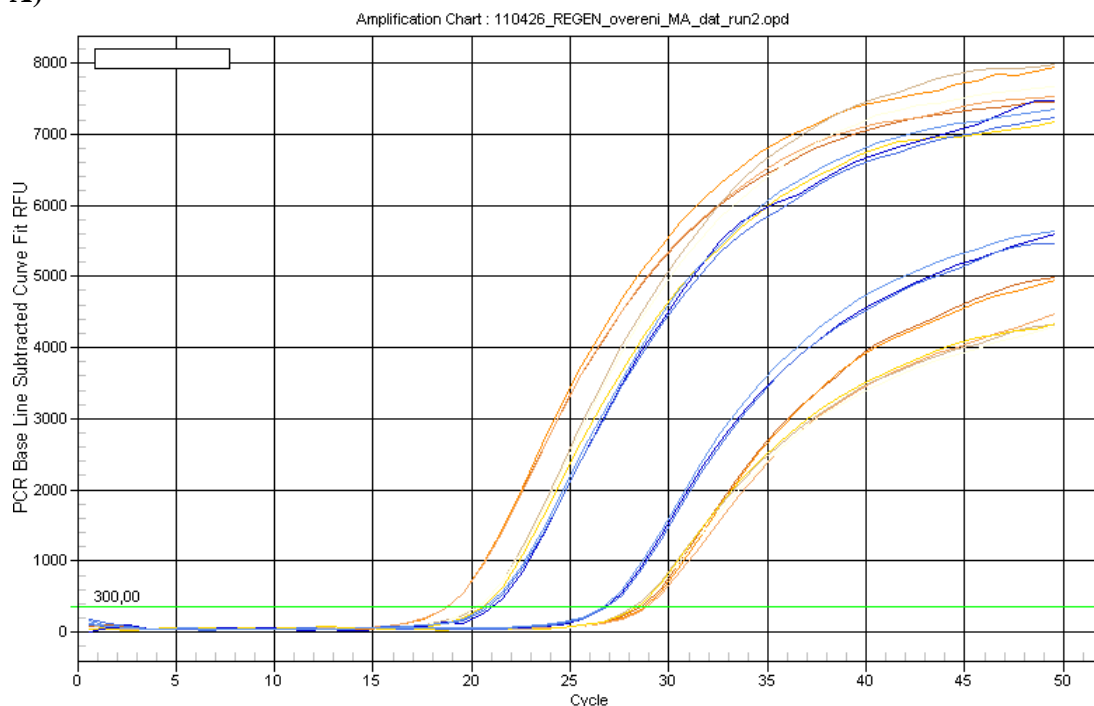
Jak jsme popsali v předchozích kapitolách, za účelem validace výsledků stanovení dynamiky genové exprese metodou DNA čipů, jsme provedli celkem 14 real-time PCR reakcí. Data takto získaná pro kontrolní geny potvrdila stabilní úroveň jejich exprese, na níž jsme při interpretaci spoléhali. Z plánovaných jedenácti PCR reakcí ke stanovení exprese genů našeho největšího zájmu, jsme jednu museli opakovat pro technické chyby prvního provedení. Nakonec jsme získali kvalitativně vyhovující hrubá data pro všechny geny uvedené v tabulce 9.

Pro příklad uvádíme obrázek zachycující nárůst intenzity fluorescenčního signálu s přibývajícím cykly PCR, vytvořený optickým cyklerem iCycler se softwarem iQ5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) pro gen *Lcn2*. Ten měl v naší sadě nejvýrazněji změněnou expresi v průběhu všech intervalů a je proto nejnázornějším zástupcem (obrázek 19).

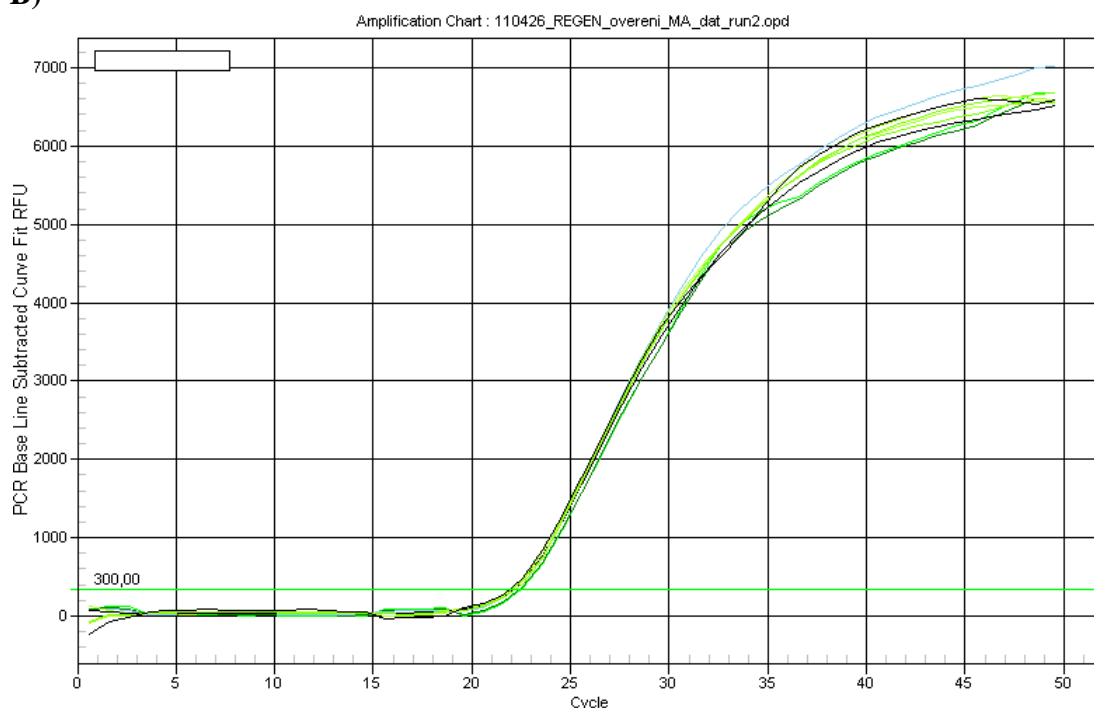
Hrubá numerická data exportovaná ze softwaru cykleru jsme dále zpracovávali v programu MS Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) s pomocí metody $\Delta\Delta Ct$ popsané Pfafflem (2001).

Obrázek 19 Grafické znázornění průběhu kvantifikačních real-time PCR reakcí zaměřených na gen *Lcn2*

A)



B)



A) Reprezentativní případ změny intenzity genové exprese genu našeho zájmu, lipokalínu 2, v průběhu regenerace jater po 2/3 parciální hepatektomii. Levá skupina křivek znázorňuje nárůst intenzity fluorescenčního signálu s přibývajícemi cykly RT-PCR u vzorků z prvního pooperačního dne (9 replikátů). Pravá skupina křivek patří vzorkům z jedenáctého pooperačního dne. Tento rozdíl byl největší zaznamenaný v průběhu naší série pokusů. B) Nepřítomnost technických artefaktů dokládá velmi podobný průběh křivek nárůstu fluorescenčního signálu devíti kalibrátorů (pozitivních kontrol), které byly naneseny rovněž v 9 replikátech do různých míst 96-ti jamkové destičky, v níž real-time PCR reakce byla provedena.

7 DISKUSE

Regenerace jater je klíčová v mnoha klinických situacích (Ibrahim *et al.*, 2005, Yamanaka *et al.*, 1993) a je základem patofyziologie a léčebných přístupů u jaterních onemocnění (Fausto a Riehle, 2005, Hata *et al.*, 2007). Z těchto důvodů byla zevrubně studována s užitím modelových systémů a také u pacientů. Terminace regenerace přesto zůstává málo pochopena a zaslouží si nadále pozornost ve výzkumech. Studie terminace regenerace po hepatektomii u prasat byla například poprvé publikována teprve v roce 2012 Nygardem *et al.* Naše rozhodnutí o použití intaktních (neoperovaných) potkanů jako kontrol v protokolu popisované studie se opíralo o dříve publikovaná zjištění, že po laparotomii nedošlo k významným změnám genové exprese v jaterní tkáni hlodavců při analýze metodou DNA čipů (Juskeviciute *et al.*, 2008, Su *et al.*, 2002).

Biochemické změny vyvolané 2/3 parciální hepatektomií u zdravých a jinak neovlivněných potkanů mají většinou krátké trvání. V naší studii netrvalo významné zvýšení sérové aktivity ALT ani AST déle než dva dny po operaci v souladu s prací Panise a kol. (1997), kteří posuzovali početnější skupiny potkanů. Naše stanovení aktivit transamináz byla navíc ovlivněna značnou variabilitou mezi zvířaty ve skupinách. Dlouholetá zkušenost našeho pracoviště nicméně svědčí pro normalizaci sérových aktivit ALT i AST do 72 hodin po 2/3 parciální hepatektomii. Sekas a Cook (1979) stanovovali sérové hladiny celé škály biochemických parametrů u potkanů po 2/3 PH po dobu dvou týdnů od resekce a porovnávali je s laparotomovanými kontrolami. Nejdéle zvýšená zůstala v jejich sledování aktivita alkalické fosfatázy, která se zcela nenormalizovala ani do 14. pooperačního dne. Druhý indikátor léze žlučodů resp. kanalikulárního pólu hepatocytů (Vítek, 2010) gama-glutamyltransferáza (GGT) však nekopíroval tento vývoj a naopak se do 24 hodin po hepatektomii vyrovnal kontrolním hladinám. Je tedy diskutabilní, zda za déletrvajících elevací sérové aktivity ALP může stát přechodné období porušených vztahů mezi hepatocyty a intrahepatálními žlučovody (viz kapitola 3.4.3), kdy by se na něm mohl podílet paracelulární únik ALP do cirkulace. Obnova intrahepatálních žlučodů po 2/3 PH trvá nejméně týden (Lesage *et al.*, 1996) a je třeba připočítat i biologický poločas ALP.

Podíváme-li se na otázku časování terminace regenerace, zjistíme, že většina studií v této oblasti byla zaměřena na fázi iniciace a vstup dosud klidových jaterních buněk do buněčného cyklu (Cimica *et al.*, 2007, Juskeviciute *et al.*, 2008, Togo *et al.*, 2004), zatímco obnovení poměru velikosti jater ku velikosti těla bylo nezdědka konstatováno bez uvedení

posuzovacího kritéria. Některé publikace s uvedením užitého parametru opětovné obnovy jater poukázaly na neúplnou strukturní regeneraci dokonce i v nejdelších sledovaných pooperačních intervalech. Tyto údaje pocházejí jak ze studií na zvířatech, tak z měření u pacientů (Hockings *et al.*, 2002, Ibrahim *et al.*, 2005). Na druhou stranu však jiné publikace uvádějí úplnou regeneraci objemu jater. Podle de Graafa a kol. (2008) objem jater potkanů po 70% hepatektomii stanovovaný scintigraficky i přímým měřením dosáhl předoperační úrovně již 5. den po resekci. Kaibori a kol. (2008) stejnou scintigrafickou metodou v čase po hepatektomii posuzovali regeneraci jater dvanácti donorů jaterních štěpů s časem sledování do 12 měsíců. Uvádějí, že u donorů, jejichž játra nebyla postižena steatózou, činil neinvazivně stanovený objem jater za 3, 6 a 12 měsíců od odběru štěpu $74\pm 13\%$, $83\pm 8\%$ a $89\pm 10\%$ výchozích hodnot. Ani v tomto souboru, byť nevelkém, nebyla tedy objemová regenerace stoprocentní. Kromě postupu strukturní obnovy usilovali autoři této klinické studie i o posouzení zotavování funkční kapacity regenerujících jater. Parametrem jim bylo asialoglykoproteinovými receptory zprostředkované vychytávání radioligandu (Tc-99m-GSA), s již dříve doloženou dobrou korelací se zavedenými klinicko-biochemickými vyšetřeními. Rychlost vychytávání radioligandu z oběhu byla u donorů bez steatózy za 6 a 12 měsíců po jaterní resekci dokonce vyšší než předoperačně. Tyto výsledky podporují hypotézu, že nově namnožené hepatocyty mohou pracovat výkonněji než ty resekci odstraněné. Přes nespornou zajímavost nálezů radiologických studií i mezi nimi panuje kontroverze. V publikaci de Graafa a kol. (2008), byla rychlost vychytávání Tc-99m-GSA také hodnocena, byť u potkanů, a zde nárůst nad výchozí úroveň nebyl prokázán. Nakolik je tento nesoulad způsoben použitím jiné metody výpočtu mezi citovanými pracemi je nesnadné posoudit. V dalších humánních studiích uvádějí Pomfretová a kol. (2003), že dárci jaterních štěpů ($n = 43$) dosáhli za rok sledování regenerace na úroveň $83,3\pm 9,0\%$ původního objemu jater a Humar a kol. (2004) za tři měsíce od operace pozorovali u dárců štěpů dosažení 79% objemu jater. V posledně jmenované studii bylo zajímavým zjištěním, že regenerace jater příjemců orgánů byla vydatnější než u dárců. Výše uvedené skutečnosti činí soudy o časovém vymezení ukončení regenerace a o principech předpokládaného „hepatostatu“ značně obtížnými. Interpretace nálezů o dárcích jaterních štěpů je dodnes komplikována různorodostí metodik sběru dat (Olthoff *et al.*, 2011, Renz a Brown, 2009).

Tato nejistota nás vedla ke snaze nezávisle posoudit úplnost strukturní obnovy jater v průběhu naší studie. Založili jsme své výpočty na údajích o celkové tělesné hmotnosti a celkové hmotnosti jater potkanů, z nichž jsme odvodili vlastní parametr označovaný jako

%LReg. Jeho prostřednictvím jsme míru úplnosti hmotnostní obnovy regenerovaných jater za čtrnáct dní po 2/3 PH, tedy v nejdelším námi posuzovaném intervalu, vyjádřili jako $83 \pm 9\%$ kontrolních hodnot. Tento rozdíl nebyl statisticky signifikantní, nicméně považujeme jej za biologicky zajímavý. Nejpozdější statisticky signifikantní rozdíl oproti kontrolám jsme pozorovali devátý den po operaci, kdy parametr %LReg činil pouze $77 \pm 11\%$ (viz tabulka 8). Tyto výsledky řadí naši práci k těm, které tvrdí, že onen „hepatostat“, nehledě na jeho (molekulární) mechanismy, nenavrací poměr velikosti jater ku velikosti těla beze zbytku na předoperační úroveň.

Nicméně můžeme uvést, že námi naměřené hmotnostní údaje odpovídají dostupným literárním pramenům (tabulka 10; (Gur a Waner, 1993, Sharp a La Regina, 1998, Živná, 2001)), a tak jim i přes nepočtené skupiny potkanů v naší studii můžeme v interpretaci důvěřovat. Nárůst celkové tělesné hmotnosti potkanů v naší studii odpovídal dostupným růstovým tabulkám intaktních potkaních samců kmene Wistar, což dodatečně nasvědčovalo nekomplikovanému průběhu spontánní regenerace po parciální hepatektomii.

Tabulka 10. Přehled publikovaných morfologických údajů o potkaních játrech

Hmotnost jater	10,0 g / 250 g tělesné hmotnosti potkana
Hmotnost jater	4,3 - 5,4 g / 100 g tělesné hmotnosti (potkan - samec Wistar do 200 g tělesné hmotnosti)
Hmotnost jater	3,2 - 4,5 g / 100 g tělesné hmotnosti (potkan - samec Wistar nad 200 g tělesné hmotnosti)
Objem jater	19,6 ml / 250 g tělesné hmotnosti potkana
Tvorba žluči	22,5 ml / den / 250 g tělesné hmotnosti potkana

Protože analýzy genové exprese na DNA čípech zahrnují množství kroků v přípravě vzorků a během samotných hybridizací, je oprávněné zajímat se o vliv technických artefaktů na věrohodnost výsledků. Recentní analýza Bryantové a kol. (2011) kvantifikovala podíly technických i biologických zdrojů na celkové variabilitě čipového experimentu. Všechny jednotlivé zdroje variability (plynoucí z návrhu experimentu) se ukázaly jako nevýznamné, a, co bylo nejdůležitější, účinek experimentálního stimulu na genovou expresi byl výrazně vyšší než jednotlivé nebo i kombinované ostatní zdroje variability.

Máme-li shrnout vlastní výsledky stanovení relativní genové exprese metodami DNA čipů a real-time PCR a jejich srovnání, konstatujeme, že pro devět z jedenácti hodnocených

genů bylo dosaženo dobré nebo uspokojivé shody, zatímco u zbývajících dvou genů nebyla PCR validace úspěšná (viz obrázek 18). Při vědomí základních rozdílů a limitací obou metod, nejčastěji jde o detekci rozdílných transkripčních variant genů, takový výsledek validace splnil naše očekávání a také běžný standard dosahovaný v recentních podobně zaměřených pracích. Bližší pohled s ohledem na příslušnost jednotlivých genů k funkčním skupinám odhalil, že role tří ze čtyř posuzovaných KEGG drah v pozdní fázi regenerace byla alespoň částečně potvrzena, zatímco u jedné dráhy byly výsledky z čipů a PCR v rozporu. Neshoda se týkala dvou genů příslušných ke dráze signalizace p53 (rno04115).

Ještě před diskusí o rolích jedenácti genů našeho experimentálního zájmu se krátce vrátíme k výběru kontrolních (*housekeeping*) genů v naší studii. Jak jsme uvedli výše v metodické části práce, vztahovali jsme výsledky real-time PCR při interpretaci vůči geometrickému průměru Ct hodnot trojice genů: *Surf1*, *Nup54* a *Hmbs*. Tyto se shodně umístily nejlépe při posuzování algoritmy výpočetních aplikací *GeNorm* a *NormFinder* (Andersen *et al.*, 2004, Vandesompele *et al.*, 2002). Geometrický průměr jejich exprese jsme použili proto, že je při výpočtech robustnější vůči odlehlým hodnotám než aritmetický průměr. Expresi genů jsme v naší práci hodnotili z RNA izolované z homogenátů celé jaterní tkáně se všemi buněčnými subpopulacemi. Předchozí gradientovou separaci jednotlivých zastoupených buněčných typů a teprve po ní navazující výběr kontrolních genů zvolili ve své práci Wang a Xu (2010). Výběr vhodných kontrolních genů pro výzkum regenerace po parciální hepatektomii na myším modelu byl předmětem publikace Tatsumiho a kol. (2008).

Funkční skupinu ribozom (rno03010) jsme se rozhodli metodou PCR nevalidovat pro její dle našeho názoru nejméně pravděpodobnou roli při řízení terminace regenerace jater. Vztah biogeneze ribozomů k regeneraci jater po hepatektomii byl nicméně podrobně studován již před mnoha lety Liebermanem a Kaneovou (1965), kteří prokázali, že celkový obsah RNA v jaterních homogenátech roste od 9. hodiny po PH, a že se tak děje rovnocenně v jaderné, mikrosomální i cytosolové frakci homogenátu. U laparotomovaných kontrol k takovému nárůstu nedochází. Elevace hladiny RNA (vůči celkové DNA) je lineární a trvá nejméně do 15. hodiny po resekci, kdy je maskována nastupující syntézou DNA se vstupem hepatocytů do S fáze. Protože aktivita RNA polymerázy stoupá neprodleně po hepatektomii, předpokládali autoři účast nějakého regulačního proteinu, který by spouštěl biogenezi ribozomů. (Navíc popsali, že podvaz portální žíly zabraňující perfuzi 2/3 jaterního parenchymu z tohoto zdroje, má na syntézu rRNA stejný efekt jako 2/3 hepatektomie).

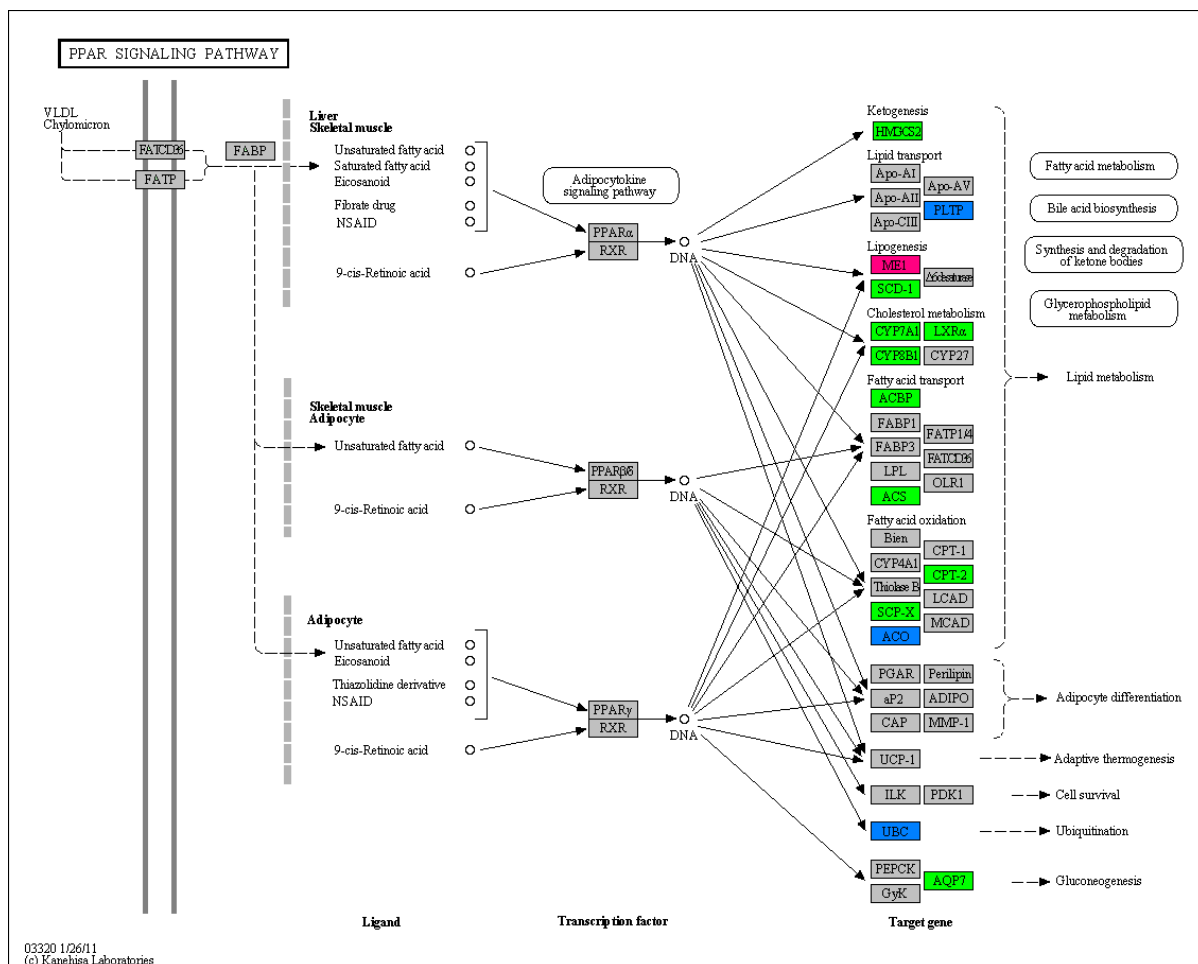
Regulátorem bílkovinné povahy, který nebyl Liebermanovi a Kaneové znám, by mohl být transkripční faktor eIF-4F. Podle studie Aloniho a kol. (1992) vzestup exprese mRNA pro eIF-4F patnáct hodin po hepatektomii jde ruku v ruce se vzestupem účinnosti translace mRNA pro ribozomální proteiny. Ta je tak po 2/3 hepatektomii přibližně 3x-4x vyšší než v klidovém adultním jaterním parenchymu a dokonce vyšší než ve fetální jaterní tkáni. Spolu s dvoj- až trojnásobným nárůstem množství těchto mRNA v regenerujících játrech oproti klidové adultní kontrole tyto dvě adaptace zodpovídají za prokázaný cca desetinásobný nárůst rychlosti syntézy ribozomálních proteinů. Na rozdíl od pozvolných posttranskripčně regulovaných změn rychlosti syntézy ribozomů během ontogeneze potkanů se tak na jejím akutním zvýšení po parciální hepatektomii podílejí transkripční i posttranskripční mechanismy. Recentní studie Donatiho a kol. (2011) se zaměřila na vztah množství volných ribozomálních proteinů k regulaci aktivity tumor supresorového genu p53. Regenerace jater po PH patřila mezi modely, na kterých dokladovali, že vystupňovaná syntéza ribozomální RNA vede k rychlejší degradaci cytoprotektivního proteinu p53 účinkem onkoproteinu MDM2. V proliferační fázi regenerace skutečně dochází k poklesu aktivity proteinu p53 (srovnej s kapitolou 3.4.2.). Na druhou stranu má p53 roli při návratu hepatocytů do G0 fáze buněčného cyklu (viz obrázek 4). Přes tyto biologicky velmi zajímavé souvislosti je nevýhodou citovaných studií z našeho pohledu fakt, že se omezily na první pooperační den. Úvahám o úloze komponent ribozomů při terminaci regenerace tedy bohužel nepřispívají a tato otázka zůstává nadále otevřená.

Vedle funkčních drah vytipovaných analýzou genomického obohacení, jsme získali vzájemně se podporující výsledky pro jeden gen příslušný ke dráze metabolismu léků jinými enzymy (než isoenzymy cytochromu P450) a navíc pro tři geny v současnosti postrádající asociaci k některé z KEGG drah, které se nám jevily jako relevantní pro průběh tkáňové regenerace.

Protože RT-PCR je obecně odolnější vůči technickým artefaktům než čipové experimenty, stanovení byla prováděna v triplicátech, což ještě zvýšilo jejich spolehlivost a tato metoda pokrývá širší dynamické spektrum transkripčních změn, budeme dále komentovat již jen data o relativní genomové expresi získaná real-time PCR. Naše výsledky jsou v souladu s prací Yuana a kol. (2011b). Tato studie je pro nás cennou referencí vzhledem ke svému zaměření na pozdní fázi regenerace, jež je jinak spíše ojedinělé. Zvláště dobré shody bylo dosaženo v případě role signální dráhy peroxisomovými proliferátory aktivovaných receptorů (PPAR) v pozdní fázi regenerace. Odlišnosti v počtu příslušných signifikantně změněných

genů mohou být důsledkem užití různých kmenů potkanů a počtů zvířat v experimentálních skupinách (blíže viz obrázky 20).

Obrázek 20. Vizualizace výsledků čipových analýz na pozadí signální dráhy PPAR



Předmětem obrázku je srovnání výsledků naší studie s prací Yuana a kol. (2011b) ohledně genů příslušných k signální dráze PPAR, tak, jak je anotována v databázi Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; (Kanehisa *et al.*, 2002)). Námi vytipované geny s aktivní úlohou v pozdní fázi regenerace jsou zvýrazněny modře. Yuanem a kol. identifikované geny jsou zvýrazněny zeleně a ohledně Me1 jsme se shodli, ten je vyznačen růžově.

Protein přenášející fosfolipidy (Pltp) se účastní transportu fosfolipidů z VLDL a LDL v plazmě a hraje roli ve zpětném transportu cholesterolu (tj. z periferie do jater (Yazdanyar *et al.*, 2011)). Exprese Pltp byla ve všech „časných“ intervalech snižena, ale pátý a sedmý den po PH naopak zvýšená oproti kontrolní skupině. Po parciální hepatektomii byl prokázán nárůst tkáňové koncentrace cholesterolu v játrech, který poskytuje nezbytný stavební materiál pro regeneraci (Abel *et al.*, 2001, Lo Sasso *et al.*, 2010, Yoshida *et al.*, 1993). Vzestup exprese Pltp by tak dával smysl pro zajištění dodávek cholesterolu pro dělicí se neparenchymové jaterní buňky, jejichž proliferace nastává později než dělení hepatocytů (Gilgenkrantz a Collin de l'Hortet, 2011, Taub, 2004). Počáteční paradoxní pokles exprese Pltp může být vysvětlen jeho schopností transportovat lipopolysacharidy stejně účinně jako ostatní substráty. Časné období regenerace je spojeno se zvýšeným přítokem endotoxinu střevního původu a bylo by představitelné, že se jaterní buňky snaží omezit jeho vstup (Massey *et al.*, 1984). Pltp je také popsán cílovým genem signalizace zprostředkované jaterním receptorem farnesoidů (LXR) (Cao *et al.*, 2002, Okazaki *et al.*, 2010), která je časně po PH utlumena a normalizuje se do sedmého pooperačního dne (Lo Sasso *et al.*, 2010), což nabízí alternativní vysvětlení dynamiky exprese Pltp v našich výsledcích.

Jablečný enzym 1 (Me1) je cytosolová malát dehydrogenáza. Produkuje NADPH pro syntézu mastných kyselin a spojuje glykolýzu a cyklus kyseliny citronové. Exprese Me1 byla snižena ve všech sledovaných intervalech. Ve druhém a třetím pooperačním dni bylo snížení nejmírnější, naopak nejvýraznější bylo v pátém a sedmém pooperačním dni. Protože od prvního dne regenerace je zvýšen objem glykolýzy i syntézy mastných kyselin, jsou naše data v rozporu s očekáváním a nálezy jiných autorů (Ockner, 2004). V tomto kontextu jsou smysluplnější nálezy Yuana a kol. (2011b), kteří udávají pro Me1 zvýšenou expresi za 168 hodin po PH a nezměněnou expresi oproti laparotomované kontrole za 6 hodin po PH.

Mitochondriální 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA syntetáza (Hmgcs2) katalyzuje první reakci ketogeneze, metabolické dráhy, která poskytuje extrahepatálním orgánům energii získanou katabolizmem lipidů v dobách sacharidové deprivace (Robinson a Williamson, 1980). Exprese Hmgcs2 byla v prvních dvou dnech po PH snižena a v pozdějších dnech jen zanedbatelně změněna oproti kontrolám. Takovýto vývoj je v souladu s výsledky Yuana a kol. (2011b) a s dřívější publikací Asinse a kol. (1994). Jaterní buňky zpočátku regenerace čelí stavu podobnému hladovění bez omezení objemu ketogeneze a naopak později, když se metabolicky připravují na proliferaci, již syntézu ketolátek omezují. Přesto může námi

popsaný vývoj exprese Hmgcs2 sloužit obraně jaterních buněk před potenciálně škodlivou akumulací ketolátek. Ještě pádnějším vysvětlením iniciálního poklesu exprese Hmgcs2 může být snaha ušetřit energetické substráty. Uvolňování eventuálně oxidovatelných uhlíkatých zbytků v podobě ketolátek do cirkulace v časných fázích regenerace by skutečně bylo plýtváním (Ockner, 2004).

Můžeme shrnout, že jsme dosáhli shody s Yuanem a kol. (2011b) ohledně podílu signální dráhy PPAR na řízení pozdní fáze regenerace jater po hepatektomii. Tento tým dále poukázal na význam metabolismu mastných kyselin a dalších substrátů lipidové povahy. My jsme jako pozoruhodnou identifikovali dráhu metabolismu glycerofosfolipidů. Gen pro lyzofosfolipázu 1 (Lypla1), který je její součástí, měl v naší studii ve všech „časných“ intervalech progresivně klesající expresi. V „pozdních“ intervalech byla jeho exprese oproti kontrolní skupině také snížena ale asi jen polovičně oproti „časné“ fázi. Lypla1, známá také jako acyl-protein thioesteráza 1 (APT-1), hydrolyzuje pestrou škálu lyzofosfolipidů a má také (thio)esterázovou aktivitu vůči řadě peptidů a bílkovin acylovaných na cysteinových nebo serinových reziduích (Long a Cravatt, 2011, Tom a Martin, 2013). Protože časné období jaterní regenerace je provázeno nadbytkem volných mastných kyselin z periferních tukových zásob, není tehdy třeba, aby Lypla1 poskytovala játrům další substráty tohoto druhu. Změny míry její exprese však mohou mít i určitou regulační úlohu. Lypla1 katalyzuje i depalmitoylaci bílkovinných substrátů s významným vlivem na jejich subcelulární lokalizaci a následně i aktivitu. Mezi takové substráty patří inducibilní forma syntázy oxidu dusnatého (iNOS) nebo členové rodiny Ras onkogenů. Jejich prostřednictvím může mít Lypla1 nejen metabolickou roli (Navarro-Lerida *et al.*, 2004, Oess *et al.*, 2006).

Pokud jde o význam genů příslušných ke kaskádám komplementu a koagulace, byla jejich přítomnost mezi diferenciallyně exprimovanými v „pozdní“ fázi regenerace pro nás zprvu překvapivá. Nicméně byla publikována řada studií o účasti obou těchto biologických procesů a také fibrinolytického systému na průběhu jaterní regenerace (Clark *et al.*, 2008, Lisman a Porte, 2010, Markiewski *et al.*, 2009, Mastellos *et al.*, 2001, Okumura *et al.*, 2007, Sato *et al.*, 2008, Strey *et al.*, 2003). Dosud popsané interakce se však odehrávají velmi časně po resekcii jater a dostupná data nevysvětlují roli komplementu v pozdní fázi regenerace. V naší studii jsme zjistili výrazně zvýšenou expresi kininogenu 1 (Kng1) v rozmezí prvního až devátého pooperačního dne. Trvala tedy jak v „časné“, tak v „pozdní“ fázi. Počáteční vzestup může být připsán roli Kng1 jako proteinu akutní fáze a prozánětlivého činitele, nicméně přetrvávající

elevace napovídá o více funkcích. Již bylo popsáno stimulační působení Kng1 na proliferaci endotelií a fibroblastů (Aravena *et al.*, 2005, Perez *et al.*, 2006) a my se domníváme, že vyšší exprese Kng1 v pozdní fázi může mít za cíl podporu dělení neparenchymových jaterních buněk. Návrat exprese Kng1 na kontrolní úroveň v nejdelších dvou intervalech naší studie takový výklad podporuje.

Při posuzování dat o signální dráze p53 jsme získali pro oba validované geny (Ppm1d a Sesn3) rozporné výsledky. Nemůžeme proto o nich vyvozovat žádné určité závěry. Nicméně úloha dráhy p53 byla také předmětem dřívějších studií jiných týmů (Fan *et al.*, 1998, Tzung *et al.*, 1997, Xu *et al.*, 2007). Tyto práce však buď nezahrnovaly naše dva kandidátní geny anebo netrvaly do pozdějších pooperačních intervalů. Obecně vzato je apoptóza jistě významným mechanismem spoluurčujícím konečnou velikost regenerovaných jater a také celkovou úspěšnost regenerace po inzultu (Masson *et al.*, 2000, Sakamoto *et al.*, 1999).

Nyní přistupujeme ke genům zvoleným pro validaci nikoliv výpočetní analýzou genomového obohacení, ale vlastním pročitáním a posuzováním dat z DNA čipů. Takto jsme vybrali čtyři kandidáty. Prvním z nich byla karboxylesteráza 1e (Ces1e), příslušející ke dráze metabolismu léků jinými enzymy než isoenzymy cytochromu P450. Má několik funkcí blízkých s dosud diskutovanými geny. Ces1e hydrolyzuje mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, je nezbytná pro esterifikaci cholesterolu a může být významná v detoxikaci některých léčiv. Exprese Ces1e byla výrazně snížena během „časných“ dní a méně silně snížena oproti kontrolám v „pozdní“ fázi regenerace. Takováto transkripční dynamika je v souladu s pozorováními Yuana a kol. (2011b) ohledně exprese Acs11 (člen 1 rodiny acyl-CoA syntetáz s dlouhým řetězcem), také se účastní katabolizmu mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Acs11 měla v jejich studii šest hodin po PH sníženou expresi a 168 hodin po PH nezměněnou oproti laparotomovaným kontrolám. Nadměrná nabídka mastných kyselin s dlouhým řetězcem působí nepříznivě na činnost mitochondrií v časných hodinách po hepatektomii. Hepatocyty proto směřují jejich větší podíl ke zpracování oxidací mimo mitochondrie (v peroxisomech a endoplazmatickém retikulu). Tato adaptace řízená zesílenou signalizací na dráze PPAR α zmírňuje oxidační stres a tvorbu reaktivních forem kyslíku v mitochondriích (Ockner, 2004). V čase se normalizující činnost mitochondrií může později během regenerace jater dovolit méně omezenou utilizaci mastných kyselin s dlouhým řetězcem.

Další validovaný gen byl prvním z oněch tří našich kandidátů, postrádajících funkční asociaci v databázi KEGG. Byl jím lipokalin 2, známý také jako lipokalin asociovaný s neutrofilní gelatinázou (Lcn2 nebo Ngal). Jeho produkt je členem proteinové rodiny lipokalinů účastníci se přenosu lipofilních látek přes membrány. Jak napovídá jeho alternativní jméno, Lcn2 tvoří komplexy s gelatinázou (matrix metaloproteázou 9; MMP-9). Tyto komplexy chrání MMP-9 před inaktivací tkáňovými inhibitory. Štěpení kolagenu IV, základní složky bazálních membrán, zprostředkované MMP-9 dovoluje buňkám tuto bariéru překonávat a migrovat či invadovat do nových lokalizací. Touto interakcí účinně zvyšující motilitu buněk hraje Lcn2 roli v přestavbě tkání za mnoha okolností včetně hojení gastrointestinálních orgánů nebo karcinogeneze v trávicí soustavě (Bolognino *et al.*, 2010, Playford *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2009). Remodelace tkáně nezbytně nastává i během pozdních fází jaterní regenerace, kdy neuspořádané shluky nově namnožených hepatocytů musí být znovu vybaveny zotavujícími se cévami a mezibuněčnou hmotou. Nicméně Lcn2 je proteinem s mnoha funkcemi (Kalousek *et al.*, 2006). Časně po resekci se může uplatňovat také díky svým prozánětlivým a bakteriostatickým vlastnostem a spojitosti s časně indukovanými cytokiny (interleukinem 6 a interleukinem 1 β) (Jayaraman *et al.*, 2005). Lcn2 byl v naší sadě validovaných genů indukován nejsilněji. Vykazoval strmé zvýšení exprese ve všech „časných“ dnech. Poté jeho exprese poklesla na podstatně mírnější hladinu indukce během pátého a sedmého dne po PH. Ještě později se již jeho míra exprese velmi blížila kontrolním hodnotám. Tento vývoj exprese Lcn2 po PH prokázali i Lai a spolupracovníci (2013), kteří jej potvrdili i *Western blotem*. Četné biologické role Lcn2 znesnadňují dohady o jeho úloze v „časných“ a „pozdních“ fází jaterní regenerace. Bylo by nicméně jistě velmi zajímavé připravit a studovat model s vyřazenou expresí Lcn2 (*knock-out*) nebo eliminovat jeho účast na regeneraci po hepatektomii nějakými jinými prostředky. Bifázický průběh exprese interleukinu 1 β po hepatektomii může napovědět více o dynamice Lcn2 (Mohammed a Khokha, 2005).

Předposledním genem v naší validované sadě byl angiogenin (Ang). Byl původně popsán jako angiogenní faktor. Jeho ubikviterní exprese však naznačila možné další funkce (Hu *et al.*, 1994, Weiner *et al.*, 1987). Ty byly bohatě potvrzeny recentními studiemi (Li a Hu, 2012). Dnes je již nepochybné, že zvýšená exprese angiogenu podporuje růst nádorů nejen stimulací neovaskularizace, ale i udržováním zvýšené syntézy rRNA. Za různých zátěžových situací (hypoxie, teplotní šok, oxidační stres) dokáže angiogenin napomáhat přežití buněk. Selektivně potlačuje translaci většiny proteinů, čímž šetří anabolickou energii pro zotavení

z působících nepříznivých podmínek. Studie naznačují, že však umožňuje translaci anti-apoptotických a dalších proteinů podporujících přežití buněk. V průběhu regenerace jater musí nutně docházet k novotvorbě cév, a proto je logické očekávat zvýšenou míru exprese Ang. Přesto naše data poukázala na signifikantní pokles exprese Ang ve všech „časných“ dnech a mírnější snížení exprese oproti kontrolám po dobu celé „pozdní“ fáze. Regulace novotvorby cév během regenerace je nejspíše složitější, než aby bylo možné jednoznačné předpovězení exprese jednotlivých zúčastněných genů. Studie Xua a kol. (2005), v níž stanovovali expresi potkaních genů v rozmezí 2 až 144 hod po 2/3 parciální hepatektomii, také našla sníženou expresi angiogeninu ve všech intervalech. Velmi podobný průběh měla v této studii i exprese RNázy A 4, blízkce příbuzného genu, který sdílí s angiogeninem promotor a exon na 5' konci sekvence. Na druhou stranu pozdější studie téhož autorského kolektivu (Xu *et al.*, 2007), prokázala zvýšenou expresi jiných genů podporujících angiogenezi. Geny Efnb1, F2 a Tff3 měly expresi v intervalech do 60 hodin po PH vesměs zvýšenou, později (do konce 168 hodinového sledování) naopak převážně sníženou. Gen Cnn1 měl expresi zvýšenou v časných i pozdějších intervalech, zatímco exprese angiopoetinu 1 (Angpt1) byla v některých intervalech snížena a jindy zvýšena. Nygård a kol. (2012) na modelu 60% PH u prasat, pozorovali v pozdních fázích regenerace pokles míry exprese vasohibinu 2, který nebyl přítomen u laparotomovaných ani intaktních kontrolních zvířat. Slabinou tří posledně jmenovaných studií však je nedostatečná validace výsledků jinou metodou kromě DNA čipů. Lze shrnout, že v otázce transkripční regulace tvorby cév během regenerace jater zůstává ještě mnoho nepoznaného.

Konečně posledním genem našeho zájmu byla N-acyltransferáza 8 (Nat8), recentně popsána jako mikrosomální enzym, který katalyzuje poslední krok syntézy kyseliny merkaptomočové při detoxikaci a exkreci cysteinylových konjugátů (Veiga-da-Cunha *et al.*, 2010). Podobně jako v případě Ces1e, exprese Nat8 byla výrazněji snížena ve všech „časných“ dnech. V „pozdních“ dnech bylo snížení exprese oproti kontrolám také asi poloviční. Časná exprese Nat8 postupně poklesala s minimem dosaženým 3. pooperační den, zatímco hladina Ces1e mRNA byla nejnižší hned první den po PH. Kromě xenobiotik jsou substráty Nat8 také některé leukotrieny, což naznačuje další možné role tohoto enzymu během regenerace jater.

8 ZÁVĚRY

Máme-li shrnout veškeré výsledky prezentované práce, můžeme uvést následující. Studovali jsme transkripční regulaci pozdní fáze regenerace jater na modelu 2/3 parciální hepatektomie, motivováni nedostatkem poznatků o tomto období a jeho potenciálně podstatným klinickým významem. Pro tento účel jsme provedli profilování genové exprese metodou celogenomových DNA čipů. Vzorky regenerující jaterní tkáň jsme sbírali v časovém rozpětí širším než je obvyklé, sahajícím až do čtrnáctého pooperačního dne. Toto rozšířené pokrytí pooperačního průběhu nám umožnilo spolehlivěji popsat dynamiku změn genové exprese a považujeme jej za vhodné i pro další práce v oboru. Inovativní kombinace hierarchického shlukování a analýzy hlavní složky dat získaných na DNA čipech nám dovolila rozlišit tři časové fáze regenerační odpovědi. Pozdní fáze se ukázala být odlišná od časné i intaktní, čímž se potvrdil náš předpoklad existence aktivních ukončovacích mechanismů regeneračního děje. Pozdní fáze, časově vymezená jako období počínající u potkanů pátým pooperačním dnem, byla předmětem dalšího interpretačního úsilí.

Bioinformatická počítačová analýza a vlastní literární rešerše informací o 359 genech charakteristických pro pozdní fázi dohromady odhalily pět funkčních skupin s vysoce pravděpodobnou účastí na pokročilé regeneraci. Společné použití výpočetních i tradičních postupů interpretace přineslo lepší výsledky než oba jednotlivé přístupy a jejich kombinování se nám proto jeví jako opodstatněné.

Naše nálezy podporují a rozšiřují průkopnická data recentně publikovaná Yuanem a spolupracovníky (2011b) a byly dosaženy originální kombinací bioinformatických metod vyhodnocení výsledků na genomické úrovni a potvrzeny obecně uznávanou metodou real-time PCR. S přihlédnutím k posttranskripčním regulačním mechanismům tvoří naše výsledky rozumný základ pro navazující výzkumné studie v aktivním oboru regenerace jater. Zlepšení znalostí o drahách řídicích ukončení proliferace jaterních buněk by bylo cenné pro prevenci a léčbu jaterních nádorů. Ty dodnes zůstávají obtížně léčitelné a resekce jater s kurativním záměrem jsou stále spojeny s významnými komplikacemi (Ezzat *et al.*, 2011).

Vedle nálezů analýz genové exprese přidáváme svůj hlas k názoru, že referenční hodnota „hepatostatu“ nečiní 100% objemu jater před resekcí, nehledě na mechanismus jeho činnosti. Funkční kapacita nově namnožených jaterních buněk může být větší než těch odstraněných dospělým jedincům při hepatektomii, což by dovolovalo po řádně ukončené regeneraci i „neúplně“ obnoveným játrům pracovat dostatečně výkonně.

Osobním přínosem doktoranda v popisované práci bylo zprostředkování spolupráce s nestátním výzkumným pracovištěm, biotechnologickou společností GENERI BIOTECH s.r.o., a tím i umožnění analýzy genové exprese metodou DNA čipů. K otázce původnosti řešení lze uvést, že provedená studie se týkala oblasti experimentální hepatologie, které je celosvětově věnována malá pozornost. Součástí zpracování výsledků bylo odvození a použití vlastního parametru hodnocení úplnosti strukturní obnovy jater. A konečně v postupech interpretace byla zahrnuta dosud jinde nepublikovaná kombinace bioinformatických metod ve snaze zpřesnit časové vymezení terminace regenerace jater.

Dedikace

Experimenty popisované v disertační práci byly finančně podporovány z následujících zdrojů: Výzkumný záměr MŠMT č. MSM VZ 0021620820; vnitřní grant Lékařské fakulty s podpoou firmy Roche, projekt GAUK č. 9945/2009(94509) a projekty Specifického vysokoškolského výzkumu č. SVV-2010-260907 a č. SVV-2011-262901. Část nákladů byla také hrazena z interních investičních prostředků společnosti GENERI BIOTECH s.r.o.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABEL, S., SMUTS, C. M., DE VILLIERS, C. a GELDERBLOM, W. C. Changes in essential fatty acid patterns associated with normal liver regeneration and the progression of hepatocyte nodules in rat hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2001, **22**(5), 795-804.

ABSHAGEN, K., EIPEL, C., KALFF, J. C., MENGER, M. D. a VOLLMAR, B. Kupffer cells are mandatory for adequate liver regeneration by mediating hyperperfusion via modulation of vasoactive proteins. *Microcirculation*, 2008, **15**(1), 37-47.

ALONI, R., PELEG, D. a MEYUHAS, O. Selective translational control and nonspecific posttranscriptional regulation of ribosomal protein gene expression during development and regeneration of rat liver. *Mol Cell Biol*, 1992, **12**(5), 2203-2212.

ALVARADO, A. S. a P. A. TSONIS. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nature Reviews Genetics*, 2006, 7873-884.

ANDERSEN, B., ZIERZ, S., JUNGERMANN, K. Alteration in zonation of succinate dehydrogenase, phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase in regenerating rat liver. *Histochemistry*, 1984, **80**, 97-101.

ANDERSEN, C. L., JENSEN, J. L. a ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*, 2004, **64**(15), 5245-5250.

ANDERSON, S. P., YOON, L., RICHARD, E. B., DUNN, C. S., CATTLEY, R. C. a CORTON, J. C. Delayed liver regeneration in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null mice. *Hepatology*, 2002, **36**(3), 544-554.

APPLIED BIOSYSTEMS INC. *Amino Allyl MessageAmp™ Kit: RNA Amplification and Labeling for Array Analysis*. P/N 1752M Revision C. [s.l.], 2010.

APTE, U., GKRETSI, V., BOWEN, W. C., MARS, W. M., LUO, J. H., DONTAMSETTY, S., ORR, A., MONGA, S. P., WU, C. a MICHALOPOULOS, G. K. Enhanced liver regeneration following changes induced by hepatocyte-specific genetic ablation of integrin-linked kinase. *Hepatology*, 2009, **50**(3), 844-851.

ARAVENA, M., PEREZ, C., PEREZ, V., ACUNA-CASTILLO, C., GOMEZ, C., LEIVA-SALCEDO, E., NISHIMURA, S., SABAJ, V., WALTER, R. a SIERRA, F. T-kininogen can either induce or inhibit proliferation in Balb/c 3T3 fibroblasts, depending on the route of administration. *Mech Ageing Dev*, 2005, **126**(3), 399-406.

ASAI, K., TAMAKAWA, S., YAMAMOTO, M., YOSHIE, M., TOKUSASHI, Y., YAGINUMA, Y., KASAI, S. a OGAWA, K. Activated hepatic stellate cells overexpress p75NTR after partial hepatectomy and undergo apoptosis on nerve growth factor stimulation. *Liver Int*, 2006, **26**(5), 595-603.

ASINS, G., ROSA, J. L., SERRA, D., GIL-GOMEZ, G., AYTE, J., BARTRONS, R., TAULER, A. a HEGARDT, F. G. Gene expression of enzymes regulating ketogenesis and fatty acid metabolism in regenerating rat liver. *Biochem J*, 1994, **299** (Pt 1), 65-69.

AZOULAY, D., ASTARCIOGLU, I., ASTARCIOGLU, H., LEMOINE, A., MAJNO, P. a BISMUTH, H. A new technique of one-stage total hepatectomy in the rat. *Surgery*, 1997, **121**(2), 219-222.

BARRASS, N. C., PRICE, R. J., LAKE, B. G. a ORTON, T. C. Comparison of the acute and chronic mitogenic effects of the peroxisome proliferators methylclofenapate and clofibric acid in rat liver. *Carcinogenesis*, 1993, **14**(7), 1451-1456.

BECKER, R. A., CHAMBERS, J. M. a WILKS, A. R. *The new S language: a programming environment for data analysis and graphics*. Wadsworth & Brooks/Cole Advanced Books & Software, 1988.

BENGMARK, S. et al. The influence of glucose supply on liver steatosis and regeneration rate after partial hepatectomy. *Acta Chir Scand*, 1965, **130**, 216-223.

BISSELL, D. M., ROULOT, D. a GEORGE, J. Transforming growth factor beta and the liver. *Hepatology*, 2001, **34**(5), 859-867.

BOLIGNANO, D., DONATO, V., LACQUANITI, A., FAZIO, M. R., BONO, C., COPPOLINO, G. a BUEMI, M. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene. *Cancer Lett*, 2010, **288**(1), 10-16.

BÖHM, F., KÖHLER, U. A., SPEICHER, T. a WERNER, S. Regulation of liver regeneration by growth factors and cytokines. *EMBO Mol Med*, 2010, **2**(8), 294-305.

BRDIČKA, R. a H. BRUCHOVÁ VOTAVOVÁ. Vznik a rozmach čipových technologií. *Klinická onkologie*, 2006, **19**(Supplement 2), 331 - 332.

BRODANOVÁ, M. Historie. *Hepatologie*. Jiří Ehrmann, Petr Hůlek (eds). Praha: Grada, 2010, s. 3-16. ISBN 978-80-247-3118-6.

BRYANT, P. A., SMYTH, G. K., ROBINS-BROWNE, R. a CURTIS, N. Technical variability is greater than biological variability in a microarray experiment but both are outweighed by changes induced by stimulation. *PLoS One*, 2011, **6**(5).

CAMARGO, A. C. a R. H. MIGLIORINI. Gluconeogenesis in liver slices from partially hepatectomized rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1971, **136**(3), 962-966.

CAO, G., BEYER, T. P., YANG, X. P., SCHMIDT, R. J., ZHANG, Y., BENSCH, W. R., KAUFFMAN, R. F., GAO, H., RYAN, T. P., LIANG, Y., EACHO, P. I. a JIANG, X. C. Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J Biol Chem*, 2002, **277**(42), 39561-39565.

CAUSTON, H. C., QUACKENBUSH, J. a BRAZMA, A. *Microarray Gene Expression Data Analysis: A Beginner`s Guide*. Blackwell Publishing, 2003. ISBN 1-4051-0682-4.

CIMICA, V., BATUSIC, D., HARALANOVA-ILIEVA, B., CHEN, Y., HOLLEMANN, T., PIELER, T. a RAMADORI, G. Serial analysis of gene expression (SAGE) in rat liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, **360**(3), 545-552.

CLARK, A., WEYMANN, A., HARTMAN, E., TURMELLE, Y., CARROLL, M., THURMAN, J. M., HOLERS, V. M., HOURCADE, D. E. a RUDNICK, D. A. Evidence for non-traditional activation of complement factor C3 during murine liver regeneration. *Mol Immunol*, 2008, **45**(11), 3125-3132.

CLAVIEN, P. A., PETROWSKY, H., DEOLIVEIRA, M. L. a GRAF, R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med*, 2007, **356**(15), 1545-1559.

CORLU, A. a P. LOYER. Regulation of the G1/S transition in hepatocytes: involvement of the Cyclin-Dependent Kinase Cdk1 in the DNA replication. *Int J Hepatol*, 2012, **2012**, Article ID 689324.

CUI, R., NGUYEN, T. T., TAUBE, J. H., STRATTON, S. A., FEUERMAN, M. H. a BARTON, M. C. Family members p53 and p73 act together in chromatin modification and direct repression of alpha-fetoprotein transcription. *J Biol Chem*, 2005, **280**(47), 39152-39160.

CURADO, S., OBER, E. A., WALSH, S., CORTES-HERNANDEZ, P., VERKADE, H., KOEHLER, C. M. a STAINIER, D. Y. The mitochondrial import gene tomm22 is specifically required for hepatocyte survival and provides a liver regeneration model. *Dis Model Mech*, 2010, **3**(7-8), 486-495.

ČERVINKOVÁ, Z. Funkce jater. *Hepatologie*. Jiří Ehrmann, Petr Hůlek (eds). Praha: Grada, 2010, s. 25-36. ISBN 978-80-247-3118-6.

DAMRAUER, S. M., STUDER, P., DA SILVA, C. G., LONGO, C. R., RAMSEY, H. E., CSIZMADIA, E., SHRIKHANDE, G. V., SCALI, S. T., LIBERMANN, T. A., BHASIN, M. K. a FERRAN, C. A20 modulates lipid metabolism and energy production to promote liver regeneration. *PLoS One*, 2011, **6**(3), e17715.

- DAY, R. M. a Y. J. SUZUKI. Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. *Dose Response*, 2005, **3**(3), 425-442.
- DE GRAAF, W., VETELÄINEN, R. L., DE BRUIN, K., VAN VLIET, A. K., VAN GULIK, T. M. a BENNINK, R. J. ^{99m}Tc-GSA Scintigraphy with SPECT for Assessment of Hepatic Function and Functional Volume During Liver Regeneration in a Rat Model of Partial Hepatectomy. *The Journal of Nuclear Medicine*, 2008, **49**(1), 122-128.
- DEFRANCES, M. C. a G. K. MICHALOPOULOS Liver Regeneration and Partial Hepatectomy: Process and Prototype. *Liver regeneration*. Dieter Häussinger (ed). Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 2011, s. 1-16. ISBN 978-3-11-025078-7.
- DELGADO-COELLO, B., BRIONES-ORTA, M. A., MACIAS-SILVA, M. a MAS-OLIVA, J. Cholesterol: recapitulation of its active role during liver regeneration. *Liver Int*, 2011, **31**(9):1271-84.
- DIEHL, A. M. Nutrition, hormones, metabolism, and liver regeneration. *Semin Liver Dis*, 1991, **11**(4), 315-320.
- DIEHL, A. M. Roles of CCAAT/enhancer-binding proteins in regulation of liver regenerative growth. *J Biol Chem*, 1998, **273**(47), 30843-30846.
- DOBBIN, K. a R. SIMON. Comparison of microarray designs for class comparison and class discovery. *Bioinformatics*, 2002, **18**(11), 1438-1445.
- DOBBIN, K. K., KAWASAKI, E. S., PETERSEN, D. W. a SIMON, R. M. Characterizing dye bias in microarray experiments. *Bioinformatics*, 2005, **21**(10), 2430-2437.
- DONATI, G., BERTONI, S., BRIGHENTI, E., VICI, M., TRERE, D., VOLAREVIC, S., MONTANARO, L. a DERENZINI, M. The balance between rRNA and ribosomal protein synthesis up- and downregulates the tumour suppressor p53 in mammalian cells. *Oncogene*, 2011, **30**(29), 3274-3288.
- DONG, J., FELDMANN, G., HUANG, J., WU, S., ZHANG, N., COMERFORD, S. A., GAYYED, M. F., ANDERS, R. A., MAITRA, A. a PAN, D. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell*, 2007, **130**(6), 1120-1133.
- DUFVA, M. Introduction to Microarray Technology. *DNA Microarrays for Biomedical Research. Methods and Protocols*. Dufva M. (ed). New York, Humana Press, a part of Springer Science Business Media, LLC, 2009. e-ISBN 978-1-59745-538-1.

DYPBUKT, J. M., ANKARCORONA, M., BURKITT, M., SJOHOLM, A., STROM, K., ORRENIUS, S. a NICOTERA, P. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J Biol Chem*, 1994, **269**(48), 30553-30560.

EFIMOVA, E. A., GLANEMANN, M., NUSSLER, A. K., SCHUMACHER, G., SETTMACHER, U., JONAS, S., NUSSLER, N. a NEUHAUS, P. Changes in serum levels of growth factors in healthy individuals after living related liver donation. *Transplant Proc*, 2005, **37**(2), 1074-1075.

EISEN, M. B., SPELLMAN, P. T., BROWN, P. O. a BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95**(25), 14863-14868.

ENDO, D., KOGURE, K., HASEGAWA, Y., MAKU-UCHI, M. a KOJIMA, I. Activin A augments vascular endothelial growth factor activity in promoting branching tubulogenesis in hepatic sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol*, 2004, **40**(3), 399-404.

ETIENNE, P. L., BAFFET, G., DESVERGNE, B., BOISNARD-RISSEL, M., GLAISE, D. a GUGUEN-GUILLOUZO, C. Transient expression of c-fos and constant expression of c-myc in freshly isolated and cultured normal adult rat hepatocytes. *Oncogene Res*, 1988, **3**(3), 255-262.

EZZAT, T. M., DHAR, D. K., NEWSOME, P. N., MALAGO, M. a OLDE DAMINK, S. W. Use of hepatocyte and stem cells for treatment of post-resectional liver failure: are we there yet? *Liver Int*, 2011, **31**(6), 773-784.

FAN, G., KREN, B. T. a STEER, C. J. Regulation of apoptosis-associated genes in the regenerating liver. *Semin Liver Dis*, 1998, **18**(2), 123-140.

FARRELL, G. C. Probing Prometheus: fat fueling the fire? *Hepatology*, 2004, **40**(6), 1252-1255.

FAUSTO, N. Lessons from genetically engineered animal models. V. Knocking out genes to study liver regeneration: present and future. *Am J Physiol*, 1999, **277**(5 Pt 1), G917-921.

FAUSTO, N., MEAD, J. E., GRUPPUSO, P. A. a BRAUN, L. TGF-beta in liver development, regeneration, and carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, **593**231-242.

FAUSTO, N. a K. J. RIEHLE. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2005, **12**(3), 181-189.

FAUSTO, N., CAMPBELL, J. S. a RIEHLE, K. J. Liver regeneration. *Hepatology*, 2006, **43**(2 Suppl 1), S45-53.

FERRI, D., MORO, L., MASTRODONATO, M., CAPUANO, F., MARRA, E., LIQUORI, G. E., GRECO, M. Ultrastructural zonal heterogeneity of hepatocytes and mitochondria within the hepatic acinus during liver regeneration after partial hepatectomy. *Biology of the Cell*, 2005, **97**(4), 277-288.

FIBBI, G., PUCCI, M., GRAPPONE, C., PELLEGRINI, G., SALZANO, R., CASINI, A., MILANI, S. a DEL ROSSO, M. Functions of the fibrinolytic system in human Ito cells and its control by basic fibroblast and platelet-derived growth factor. *Hepatology*, 1999, **29**(3), 868-878.

FLORES, E. R., SENGUPTA, S., MILLER, J. B., NEWMAN, J. J., BRONSON, R., CROWLEY, D., YANG, A., MCKEON, F. a JACKS, T. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell*, 2005, **7**(4), 363-373.

FRANCAVILLA, A., ZENG, Q., POLIMENO, L., CARR, B. I., SUN, D., PORTER, K. A., VAN THIEL, D. H. a STARZL, T. E. Small-for-size liver transplanted into larger recipient: a model of hepatic regeneration. *Hepatology*, 1994, **19**(1), 210-216.

GALLAI, M., SEBESTYEN, A., NAGY, P., KOVALSZKY, I., ONODY, T. a THORGEIRSSON, S. S. Proteoglycan gene expression in rat liver after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **228**(3), 690-694.

GAUB, J. a J. IVERSEN. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology*, 1984, **4**(5), 902-904.

GE HEALTHCARE UK LIMITED. *Amersham CyDye (Cy3/Cy5) Reactive Dye Protocols for Post Labelling Aminoallyl-cDNA and Aminoallyl-aRNA: For Microarray Applications*. [s.l.], 2009.

GIBBS, R. A., WEINSTOCK, G. M., METZKER, M. L., MUZNY, D. M., SODERGREN, E. J., SCHERER, S., SCOTT, G., STEFFEN, D., WORLEY, K. C., BURCH, P. E., OKWUONU, G., HINES, S., LEWIS, L., DERAMO, C., DELGADO, O., DUGAN-ROCHA, S., MINER, G., MORGAN, M., HAWES, A., GILL, R., CELERA, HOLT, R. A. et al. Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 2004, **428**(6982), 493-521.

GILGENKRANTZ, H. a A. COLLIN DE L'HORTET. New insights into liver regeneration. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2011, **35**(10):623-9.

GIRKE, Thomas. R & Bioconductor Manual. *UCR Institute for Integrative Genome Biology Manuals* [online]. [2009] [cit. 2013-12-13]. Dostupné z: http://manuals.bioinformatics.ucr.edu/home/R_BioCondManual#BIOCONPROGRAMS

GOLUBOVSKAYA, V. M., PRESNELL, S. C., HOOTH, M. J., SMITH, G. J. a KAUFMANN, W. K. Expression of telomerase in normal and malignant rat hepatic epithelia. *Oncogene*, 1997, **15**(10), 1233-1240.

GORDON, A. D. *Classification*. London: Chapman & Hall/CRC, 1999. ISBN 9781584888536.

GOVE, C. D. a R. D. HUGHES. Liver regeneration in relationship to acute liver failure. *Gut*, 1991, Suppl, S92-96.

GRANNER, D. K. Technologie rekombinantní DNA. *Harperova biochemie*. R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, V. W. Rodwell (eds.) Jinočany, Nakladatelství H+H, 2002. ISBN 80-7319-013-3.

GREENBAUM, L. E., CRESSMAN, D. E., HABER, B. A. a TAUB, R. Coexistence of C/EBP alpha, beta, growth-induced proteins and DNA synthesis in hepatocytes during liver regeneration. Implications for maintenance of the differentiated state during liver growth. *J Clin Invest*, 1995, **96**(3), 1351-1365.

GUERRIERI, F., MUOLO, L., COCCO, T., CAPOZZA, G., TURTURRO, N., CANTATORE, P. a PAPA, S. Correlation between rat liver regeneration and mitochondrial energy metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1272**(2), 95-100.

GUERRIERI, F., VENDEMIALE, G., GRATTAGLIANO, I., COCCO, T., PELLECCIA, G. a ALTOMARE, E. Mitochondrial oxidative alterations following partial hepatectomy. *Free Radic Biol Med*, 1999, **26**(1-2), 34-41.

GUR, E. a T. WANER. The variability of organ weight background data in rats. *Lab Anim*, 1993, **27**(1), 65-72.

HARRILL, A. H., ROSS, P. K., GATTI, D. M., THREADGILL, D. W. a RUSYN, I. Population-based discovery of toxicogenomics biomarkers for hepatotoxicity using a laboratory strain diversity panel. *Toxicol Sci*, 2009, **110**(1), 235-243.

HATA, S., NAMAIE, M. a NISHINA, H. Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev Growth Differ*, 2007, **49**(2), 163-170.

HIGGINS, G. M. a R. M. ANDERSON. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol (Chic)*, 1931, **12**, 186-202.

HO, K. J., DO, N. L., OTU, H. H., DIB, M. J., REN, X., ENJYOJI, K., ROBSON, S. C., TERWILLIGER, E. F. a KARP, S. J. Tob1 is a constitutively expressed repressor of liver regeneration. *The Journal of Experimental Medicine*, 2010, **207**(6), 1197-1208.

HOCKINGS, P. D., ROBERTS, T., CAMPBELL, S. P., REID, D. G., GREENHILL, R. W., POLLEY, S. R., NELSON, P., BERTRAM, T. A. a KRAMER, K. Longitudinal magnetic resonance imaging quantitation of rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Toxicol Pathol*, 2002, **30**(5), 606-610.

HOLASOVÁ, Š., RADILOVÁ, H. a BUNČEK, M. *Praktická cvičení z molekulární genetiky*. Praha: Karolinum, 2006.

HOLEČEK, M. a J. ŠIMEK. Metabolické změny u organismu s poškozenou jaterní tkání a možnosti nutričního ovlivnění regenerace jater *Suppl. Sborníku vědeckých prací LF UK Hradec Králové*, 1989, **32**(1), 6-40.

HOLEČEK, M. Nutritional modulation of liver regeneration by carbohydrates, lipids, and amino acids: a review. *Nutrition*, 1999, **15**(10), 784-788.

HOUCK, K. A. a G. K. MICHALOPOULOS. Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. *J Cell Physiol*, 1989, **141**(3), 503-509.

HU, G., RIORDAN, J. F. a VALLEE, B. L. Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91**(25), 12096-12100.

HUANG, D. W., SHERMAN, B. T. a LEMPICKI, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res*, 2009a, **37**(1), 1-13.

HUANG, D. W., SHERMAN, B. T. a LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protocols* 2009b, **4**(1), 44-57.

HUANG, W., MA, K., ZHANG, J., QATANANI, M., CUVILLIER, J., LIU, J., DONG, B., HUANG, X. a MOORE, D. D. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science*, 2006, **312**(5771), 233-236.

HUANG, Z. Z., LI, H., CAI, J., KUHNENKAMP, J., KAPLOWITZ, N. a LU, S. C. Changes in glutathione homeostasis during liver regeneration in the rat. *Hepatology*, 1998, **27**(1), 147-153.

HUMAR, A., KOSARI, K., SIELAFF, T. D., GLESSING, B., GOMES, M., DIETZ, C., ROSEN, G., LAKE, J. a PAYNE, W. D. Liver regeneration after adult living donor and deceased donor split-liver transplants. *Liver Transpl*, 2004, **10**(3), 374-378.

CHANCE, B. a G. R. WILLIAMS. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.*, 1956, **17**, 65-134.

CHARI, R. S., PRICE, D. T., SUE, S. R., MEYERS, W. C. a JIRTLE, R. L. Down-regulation of transforming growth factor beta receptor type I, II, and III during liver regeneration. *Am J Surg*, 1995, **169**(1), 126-131; discussion 131-132.

CHEN, H., SUN, Y., DONG, R., YANG, S., PAN, C., XIANG, D., MIAO, M. a JIAO, B. Mir-34a is upregulated during liver regeneration in rats and is associated with the suppression of hepatocyte proliferation. *PLoS One*, 2011, **6**(5), e20238.

CHOMCZYNSKI, P. a N. SACCHI. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**(1), 156-159.

IBRAHIM, S., CHEN, C. L., WANG, C. C., WANG, S. H., LIN, C. C., LIU, Y. W., YANG, C. H., YONG, C. C., CONCEJERO, A. a CHENG, Y. F. Liver regeneration and splenic enlargement in donors after living-donor liver transplantation. *World J Surg*, 2005, **29**(12), 1658-1666.

IMAI, T. Functional genetic dissection of nuclear receptor signalling in obesity, diabetes and liver regeneration using spatiotemporally controlled somatic mutagenesis in the mouse. *Keio J Med*, 2003, **52**(3), 198-203.

INOMOTO, T., TANAKA, A., MORI, S., JIN, M. B., SATO, B., YANABU, N., TOKUKA, A., KITAI, T., OZAWA, K. a YAMAOKA, Y. Changes in the distribution of the control of the mitochondrial oxidative phosphorylation in regenerating rabbit liver. *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1188**(3), 311-317.

JAKOBSEN, J. S., WAAGE, J., RAPIN, N., BISGAARD, H. C., LARSEN, F. S. a PORSE, B. T. Temporal mapping of CEBPA and CEBPB binding during liver regeneration reveals dynamic occupancy and specific regulatory codes for homeostatic and cell cycle gene batteries. *Genome Res*, 2013, **23**(4), 592-603.

JAYARAMAN, A., ROBERTS, K. A., YOON, J., YARMUSH, D. M., DUAN, X., LEE, K. a YARMUSH, M. L. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a discriminatory marker of the hepatocyte-secreted protein response to IL-1beta: a proteomic analysis. *Biotechnol Bioeng*, 2005, **91**(4), 502-515.

JIROUTOVÁ, A., SLAVKOVSKÝ, R., ČERMAKOVÁ, M., MAJDIÁKOVÁ, L., HANOVCOVÁ, I., BOLEHOVSKÁ, R., HAJZLEROVÁ, M., RADILOVÁ, H., RUSZOVÁ, E. a KANTA, J. Expression of mRNAs related to connective tissue metabolism in rat hepatic stellate cells and myofibroblasts. *Exp Toxicol Pathol*, 2007, **58**(4), 263-273.

JUSKEVICIUTE, E., VADIGEPALLI, R. a HOEK, J. B. Temporal and functional profile of the transcriptional regulatory network in the early regenerative response to partial hepatectomy in the rat. *BMC Genomics*, 2008, **95**, 27.

KAIBORI, M., HA-KAWA, S. K., UCHIDA, Y., ISHIZAKI, M., SAITO, T., MATSUI, K., HIROHARA, J., TANAKA, K. a KAMIYAMA, Y. Liver regeneration in donors evaluated by Tc-99m-GSA scintigraphy after living donor liver transplantation. *Dig Dis Sci*, 2008, **53**(3), 850-855.

KALOUSEK, I., RÖSELOVÁ, P. a OTEVŘELOVÁ, P. NGAL-neutrofilní, s gelatinázou asociovaný lipokalin v biochemii, fyziologii a klinické praxi. *Čas Lék Česk*, 2006, **145**(5), 373-376.

KANDILIS, A. N., KOSKINAS J., TINIAKOS, D. G., NIKITEAS, N. a PERREA., D. N. Liver Regeneration: Focus on Cell Types and Topographic Differences. *European Surgical Research*. 2010, (**44**)1, 1-12.

KANEHISA, M., GOTO, S., KAWASHIMA, S. a NAKAYA, A. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(1), 42-46.

KURINNA, S. a M. C. BARTON. Cascades of transcription regulation during liver regeneration. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, **43**(2), 189-197.

LAI, H. S., WU, Y. M., LAI, S. L. a LIN, W. H. Lipocalin-2 gene expression during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Int J Surg*, 2013, **11**(4), 314-318.

LANDER, E. S., LINTON, L. M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M. C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J. P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, N., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, **409**(6822), 860-921.

LAUB, M. T., MCADAMS, H. H., FELDBLYUM, T., FRASER, C. M. a SHAPIRO, L. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science*, 2000, **290**(5499), 2144-2148.

LECOUTER, J., MORITZ, D. R., LI, B., PHILLIPS, G. L., LIANG, X. H., GERBER, H. P., HILLAN, K. J. a FERRARA, N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science*, 2003, **299**(5608), 890-893.

LEFFERT, H. L., KOCH, K. S., MORAN, T. a RUBALCAVA, B. Hormonal control of rat liver regeneration. *Gastroenterology*, 1979, **76**(6), 1470-1482.

LESAGE, G., GLASER, S. S., GUBBA, S., ROBERTSON, W. E., PHINIZY, J. L., LASATER, J., RODGERS, R. E. a ALPINI, G. Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal secretion. *Gastroenterology*, 1996, **111**(6), 1633-1644.

LI, B., SALIEZ, A. a LAMBOTTE, L. Prior ligation of portal branches improves survival after a 90% portal hepatectomy in the rat. *Eur Surg Res*, 1997, **29**(4), 273-279.

LI, S. a G. F. HU. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *J Cell Physiol*, 2012, **227**(7), 2822-2826.

LI, T. a J. Y. CHIANG. Regulation of Bile Acid and Cholesterol Metabolism by PPARs. *PPAR Res*, 2009, 501739.

LIAO, Y., SHIKAPWASHYA, O. N., SHTEYER, E., DIECKGRAEFE, B. K., HRUZ, P. W. a RUDNICK, D. A. Delayed hepatocellular mitotic progression and impaired liver regeneration in early growth response-1-deficient mice. *J Biol Chem*, 2004, **279**(41), 43107-43116.

LIBRA, A., FERNETTI, C., LORUSSO, V., VISIGALLI, M., ANELLI, P. L., ŠTAUD, F., TIRIBELLI, C. a PASCOLO, L. Molecular determinants in the transport of a bile acid-derived diagnostic agent in tumoral and nontumoral cell lines of human liver. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, **319**(2), 809-817.

LIEBERMAN, I. a P. KANE. Synthesis of Ribosomes in the Liver after Partial Hepatectomy. *J Biol Chem*, 1965, **240**(4), 1737-1741.

LINDROOS, P. M., ZARNEGAR, R. a MICHALOPOULOS, G. K. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology*, 1991, **13**(4), 743-750.

LISMAN, T. a R. J. PORTE. The role of platelets in liver inflammation and regeneration. *Semin Thromb Hemost*, 2010, **36**(2), 170-174.

LIU, B., PARANJPE, S., BOWEN, W. C., BELL, A. W., LUO, J. H., YU, Y. P., MARS, W. M. a MICHALOPOULOS, G. K. Investigation of the role of glypican 3 in liver regeneration and hepatocyte proliferation. *Am J Pathol*, 2009, **175**(2), 717-724.

LIU, M. L., MARS, W. M., ZARNEGAR, R. a MICHALOPOULOS, G. K. Collagenase pretreatment and the mitogenic effects of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-alpha in adult rat liver. *Hepatology*, 1994, **19**(6), 1521-1527.

LO SASSO, G., CELLI, N., CABONI, M., MURZILLI, S., SALVATORE, L., MORGANO, A., VACCA, M., PAGLIANI, T., PARINI, P. a MOSCHETTA, A. Down-regulation of the LXR transcriptome provides the requisite cholesterol levels to proliferating hepatocytes. *Hepatology*, 2010, **51**(4), 1334-1344.

LONG, J. Z. a B. F. CRAVATT. The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chem Rev*, 2011, **111**(10), 6022-6063.

MAENO, H., ONO, T., DHAR, D. K., SATO, T., YAMANOI, A. a NAGASUE, N. Expression of hypoxia inducible factor-1alpha during liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Liver Int*, 2005, **25**(5), 1002-1009.

MACIAS-SILVA, M., LI, W., LEU, J. I., CRISSEY, M. A. a TAUB, R. Up-regulated transcriptional repressors SnoN and Ski bind Smad proteins to antagonize transforming growth factor-beta signals during liver regeneration. *J Biol Chem*, 2002, **277**(32), 28483-28490.

MAN, K., FAN, S. T., LO, C. M., LIU, C. L., FUNG, P. C., LIANG, T. B., LEE, T. K., TSUI, S. H., NG, I. O., ZHANG, Z. W. a WONG, J. Graft injury in relation to graft size in right lobe live donor liver transplantation: a study of hepatic sinusoidal injury in correlation with portal hemodynamics and intragraft gene expression. *Ann Surg*, 2003, **237**(2), 256-264.

MANGELSDORF, D. J., THUMMEL, C., BEATO, M., HERRLICH, P., SCHUTZ, G., UMESONO, K., BLUMBERG, B., KASTNER, P., MARK, M., CHAMBON, P. a EVANS, R. M. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, 1995, **83**(6), 835-839.

MARKIEWSKI, M. M., DEANGELIS, R. A., STREY, C. W., FOUKAS, P. G., GERARD, C., GERARD, N., WETSEL, R. A. a LAMBRIS, J. D. The regulation of liver cell survival by complement. *J Immunol*, 2009, **182**(9), 5412-5418.

MARS, W. M., KIM, T. H., STOLZ, D. B., LIU, M. L. a MICHALOPOULOS, G. K. Presence of urokinase in serum-free primary rat hepatocyte cultures and its role in activating hepatocyte growth factor. *Cancer Res*, 1996, **56**(12), 2837-2843.

MARTINEZ-HERNANDEZ, A. a P. S. AMENTA. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J*, 1995, **9**(14), 1401-1410.

MARTINS, P. N., THERUVATH, T. P. a NEUHAUS, P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int*, 2008, **28**(1), 3-11.

- MASSEY, J. B., HICKSON, D., SHE, H. S., SPARROW, J. T., VIA, D. P., GOTTO, A. M. Jr. a POWNALL, H. J. Measurement and prediction of the rates of spontaneous transfer of phospholipids between plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 1984, **794**(2), 274-280.
- MASSON, S., SCOTTE, M., GARNIER, S., FRANCOIS, A., HIRON, M., TENIERE, P., FALLU, J., SALIER, J. P. a DAVEAU, M. Differential expression of apoptosis-associated genes post-hepatectomy in cirrhotic vs. normal rats. *Apoptosis*, 2000, **5**(2), 173-179.
- MASTELLOS, D., PAPADIMITRIOU, J. C., FRANCHINI, S., TSONIS, P. A. a LAMBRIS, J. D. A novel role of complement: mice deficient in the fifth component of complement (C5) exhibit impaired liver regeneration. *J Immunol*, 2001, **166**(4), 2479-2486.
- MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. *J Cell Physiol*, 2007, **213**(2), 286-300.
- MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*, 2010, **176**(1), 2-13.
- MISCHOULON, D., RANA, B., BUCHER, N. L. a FARMER, S. R. Growth-dependent inhibition of CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP alpha) gene expression during hepatocyte proliferation in the regenerating liver and in culture. *Mol Cell Biol*, 1992, **12**(6), 2553-2560.
- MITTAL, B. a C. K. KURUP. Influence of clofibrate administration on the rate of synthesis of macromolecules in regenerating rat liver. *Biochim Biophys Acta*, 1980, **609**(3), 475-482.
- MOHAMMED, F. F. a R. KHOKHA. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol*, 2005, **15**(10), 555-563.
- MORIMOTO, T., TAKI, Y., JIKKO, A., YOKOO, N., KOIZUMI, K., NISHIHARA, T., NISHIKAWA, K., MOGUCHI, M., TANAKA, A., TANAKA, J. et al. Changes in oxidative phosphorylation, adenylate energy charge, and respiratory components in chloramphenicol-treated regenerating rat liver. *J Lab Clin Med*, 1986, **107**(3), 194-198.
- MORTENSEN, K. E., CONLEY, L. N., HEDEGAARD, J., KALSTAD, T., SORENSEN, P., BENDIXEN, C. a REVHAUG, A. Regenerative response in the pig liver remnant varies with the degree of resection and rise in portal pressure. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, **294**(3), G819-830.
- MORTENSEN, K. E. a A. REVHAUG. Liver regeneration in surgical animal models - a historical perspective and clinical implications. *Eur Surg Res*, 2011, **46**(1), 1-18.
- NAGANO, Y., NAGAHORI, K., KAMIYAMA, M., FUJII, Y., KUBOTA, T., ENDO, I., TOGO, S. a SHIMADA, H. Improved functional reserve of hypertrophied contra lateral liver after portal vein ligation in rats. *J Hepatol*, 2002, **37**(1), 72-77.

NAGANO, Y., NAGAHORI, K., YOSHIRO, F., HAMAGUCHI, Y., ISHIKAWA, T., ICHIKAWA, Y., TOGO, S., OKAZAKI, Y., HAYASHIZAKI, Y. a SHIMADA, H. Gene expression profile analysis of regenerating liver after portal vein ligation in rats by a cDNA microarray system. *Liver Int*, 2004, **24**(3), 253-258.

NAGINO, M., TANAKA, M., NISHIKIMI, M., NIMURA, Y., KUBOTA, H., KANAI, M., KATO, T. a OZAWA, T. Stimulated rat liver mitochondrial biogenesis after partial hepatectomy. *Cancer Res*, 1989, **49**(17), 4913-4918.

NAKATANI, T., OZAWA, K., ASANO, M., UKIKUSA, M., KAMIYAMA, Y. a TOBE, T. Differences in predominant energy substrate in relation to the resected hepatic mass in the phase immediately after hepatectomy. *J Lab Clin Med*, 1981, **97**(6), 887-898.

NAVARRO-LERIDA, I., CORVI, M. M., BARRIENTOS, A. A., GAVILANES, F., BERTHIAUME, L. G. a RODRIGUEZ-CRESPO, I. Palmitoylation of inducible nitric-oxide synthase at Cys-3 is required for proper intracellular traffic and nitric oxide synthesis. *J Biol Chem*, 2004, **279**(53), 55682-55689.

NGALA, K. J. F. a L. LAMBOTTE. Effect of glucose load on ATP and DNA synthesis in the regenerating rat liver. *Arch Internat Physiol Bioch*, 1981, **75**, 12-13.

NINOMIYA, M., HARADA, N., SHIOTANI, S., HIROSHIGE, S., MINAGAWA, R., SOEJIMA, Y., SUEHIRO, T., NISHIZAKI, T., SHIMADA, M. a SUGIMACHI, K. Hepatocyte growth factor and transforming growth factor beta1 contribute to regeneration of small-for-size liver graft immediately after transplantation. *Transpl Int*, 2003, **16**(11), 814-819.

NOGUCHI, S., OHBA, Y. a OKA, T. Influence of epidermal growth factor on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Endocrinol*, 1991, **128**(3), 425-431.

NOWATARI, T., FUKUNAGA, K. a OHKOHCHI, N. Regulation of signal transduction and role of platelets in liver regeneration. *Int J Hepatol*, 2012, **2012**, Article ID 542479.

NYGARD, I. E., MORTENSEN, K. E., HEDEGAARD, J., CONLEY, L. N., KALSTAD, T., BENDIXEN, C. a REVHAUG, A. The genetic regulation of the terminating phase of liver regeneration. *Comp Hepatol*, 2012, **11**(1), 3.

OCKNER, R. K. Metabolism and Gene Expression in Liver Regeneration. *Integration of metabolism, energetics, and signal transduction: unifying foundations in cell growth and death, cancer, atherosclerosis, and Alzheimer disease*. OCKNER, R. K. New York: Kluwer Academic Publishers, c2004, s. 177-200. ISBN 0-306-48471-4.

- OE, S., LEMMER, E. R., CONNER, E. A., FACTOR, V. M., LEVEEN, P., LARSSON, J., KARLSSON, S. a THORGEIRSSON, S. S. Intact signaling by transforming growth factor beta is not required for termination of liver regeneration in mice. *Hepatology*, 2004, **40**(5), 1098-1105.
- OESS, S., ICKING, A., FULTON, D., GOVERS, R. a MULLER-ESTERL, W. Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases. *Biochem J*, 2006, **396**(3), 401-409.
- OKAZAKI, H., GOLDSTEIN, J. L., BROWN, M. S. a LIANG, G. LXR-SREBP-1c-phospholipid transfer protein axis controls very low density lipoprotein (VLDL) particle size. *J Biol Chem*, 2010, **285**(9), 6801-6810.
- OKUMURA, N., SEKI, T. a ARIGA, T. Cell surface-bound plasminogen regulates hepatocyte proliferation through a uPA-dependent mechanism. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, **71**(6), 1542-1549.
- OLIVECRONA, T. a G. FEX. Metabolism of plasma lipids in partially hepatectomized rats. *Biochim Biophys Acta*, 1970, **202**(2), 259-268.
- OLTHOFF, K. M., ABECASSIS, M. M., EMOND, J. C., KAM, I., MERION, R. M., GILLESPIE, B. W. a TONG, L. Outcomes of adult living donor liver transplantation: comparison of the Adult-to-adult Living Donor Liver Transplantation Cohort Study and the national experience. *Liver Transpl*, 2011, **17**(7), 789-797.
- OVERTURF, K., AL-DHALIMY, M., OU, C. N., FINEGOLD, M. a GROMPE, M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol*, 1997, **151**(5), 1273-1280.
- PALMES, D. a H. U. SPIEGEL. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials*, 2004, **25**(9), 1601-1611.
- PANIS, Y., MCMULLAN, D. M. a EMOND, J. C. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery*, 1997, **121**(2), 142-149.
- PAROLA, M. a M. PINZANI. Hepatic wound repair. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2009, **2**(1), 4.
- PATIJN, G. A., LIEBER, A., SCHOWALTER, D. B., SCHWALL, R. a KAY, M. A. Hepatocyte growth factor induces hepatocyte proliferation in vivo and allows for efficient retroviral-mediated gene transfer in mice. *Hepatology*, 1998, **28**(3), 707-716.

PEDIADITAKIS, P., LOPEZ-TALAVERA, J. C., PETERSEN, B., MONGA, S. P. a MICHALOPOULOS, G. K. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology*, 2001, **34**(4 Pt 1), 688-693.

PEKÁR, S. a M. BRABEC. *Moderní analýza biologických dat. Zobecněné lineární modely v prostředí R*. Biologie dnes. Praha: Scientia, 2009.

PEREZ, V., LEIVA-SALCEDO, E., ACUNA-CASTILLO, C., ARAVENA, M., GOMEZ, C., SABAJ, V., COLOMBO, A., NISHIMURA, S., PEREZ, C., WALTER, R. a SIERRA, F. T-kininogen induces endothelial cell proliferation. *Mech Ageing Dev*, 2006, **127**(3), 282-289.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(9), e45.

PILIA, G., HUGHES-BENZIE, R. M., MACKENZIE, A., BAYBAYAN, P., CHEN, E. Y., HUBER, R., NERI, G., CAO, A., FORABOSCO, A. a SCHLESSINGER, D. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet*, 1996, **12**(3), 241-247.

PLAYFORD, R. J., BELO, A., POULSOM, R., FITZGERALD, A. J., HARRIS, K., PAWLUCZYK, I., RYON, J., DARBY, T., NILSEN-HAMILTON, M., GHOSH, S. a MARCHBANK, T. Effects of mouse and human lipocalin homologues 24p3/lcn2 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin on gastrointestinal mucosal integrity and repair. *Gastroenterology*, 2006, **131**(3), 809-817.

POMFRET, E. A., POMPOSELLI, J. J., GORDON, F. D., ERBAY, N., LYN PRICE, L., LEWIS, W. D. a JENKINS, R. L. Liver regeneration and surgical outcome in donors of right-lobe liver grafts. *Transplantation*, 2003, **76**(1), 5-10.

PRNKA, T. a K. ŠPERLINK. *Bionanotechnologie Nanobiotechnologie Nanomedicína: Vybrané molekulárně – biologické analytické techniky*. PRNKA, Tasilo a Karel ŠPERLINK. *Sedmý rámcový program evropského výzkumu a technického rozvoje*. Ostrava: Repronis, 2006, s. 96-104. ISBN 80-7329-134-7.

RABES, H. M., WIRSCHING, R., TUCZEK, H. V. a ISELER, G. Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet*, 1976, **9**(6), 517-532.

RADILOVÁ, H., LIBRA, A., HOLASOVÁ, Š., ŠAFÁŘOVÁ, M., VÍŠKOVÁ, A., KUNC, F., BUNČEK, M. COX-1 is coupled with mPGES-1 and ABCC4 in human cervix cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 2009, **330**(1-2), 131-140.

RAI, R. M., YANG, S. Q., MCCLAIN, C., KARP, C. L., KLEIN, A. S. a DIEHL, A. M. Kupffer cell depletion by gadolinium chloride enhances liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Am J Physiol*, 1996, **270**(6 Pt 1), G909-918.

RAMADORI, G., NEUBAUER, K., ODENTHAL, M., NAKAMURA, T., KNITTEL, T., SCHWOGLER, S. a MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H. The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, **183**(2), 739-742.

RAMDAS, L. a W. ZHANG. Microarray Image Scanning. *Methods in Molecular Biology: Cell Imaging Techniques: Methods and Protocols*. TAATJES, D. J., MOSSMAN, B. T. (eds). Totowa: Humana Press Inc., 2006, s. 261-273.

RENZ, J. F. a R. S. BROWN. *The Dilemma of Adult-to-Adult Living Donor Liver Transplantation*. G. T. Everson, J. F. Trotter (eds). Clinical Gastroenterology: Liver Transplantation: Challenging Controversies and Topics. Totowa: Humana Press Inc, 2009, s. 65-89.

ROBINSON, A. M. a D. H. WILLIAMSON. Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev*, 1980, **60**(1), 143-187.

ROSS, M. A., SANDER, C. M., KLEEB, T. B., WATKINS, S. C. a STOLZ, D. B. Spatiotemporal expression of angiogenesis growth factor receptors during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology*, 2001, **34**(6), 1135-1148.

ROUS, P. a L. D. LARIMORE. Relation of the Portal Blood to Liver Maintenance : A Demonstration of Liver Atrophy Conditional on Compensation. *J Exp Med*, 1920, **31**(5), 609-632.

ROZGA, J., JEPPSSON, B. a BENGMARK, S. Portal branch ligation in the rat. Reevaluation of a model. *Am J Pathol*, 1986, **125**(2), 300-308.

RUDNICK, D. A. a N. O. DAVIDSON. Functional Relationships between Lipid Metabolism and Liver Regeneration. *Int J Hepatol*, 2012, **2012**.

RUDOLPH, K. L., TRAUTWEIN, C., KUBICKA, S., RAKEMANN, T., BAHR, M. J., SEDLACZEK, N., SCHUPPAN, D. a MANNIS, M. P. Differential regulation of extracellular matrix synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Hepatology*, 1999, **30**(5), 1159-1166.

RYCHTRMOC, D., HUBÁLKOVÁ, L., VÍŠKOVÁ, A., LIBRA, A., BUNČEK, M., ČERVINKOVÁ, Z. Transcriptome temporal and functional analysis of liver regeneration termination. *Physiol Res*, 2012, **61**(Suppl 2), S77-92.

SADLER, K. C., KRAHN, K. N., GAUR, N. A. a UKOMADU, C. Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, uhrf1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104**(5), 1570-1575.

SAKAMOTO, T., LIU, Z., MURASE, N., EZURE, T., YOKOMURO, S., POLI, V. a DEMETRIS, A. J. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy. *Hepatology*, 1999, **29**(2), 403-411.

SATO, Y., NAKATSUKA, H., YAMAMOTO, S., OYA, H., KOBAYASHI, T., WATANABE, T., KOKAI, H., KUROSAKI, I., SHIRAI, Y. a HATAKEYAMA, K. Coagulation and fibrinolytic systems during liver regeneration in the early period after adult living related partial liver transplantation. *Transplant Proc*, 2008, **40**(8), 2501-2502.

SEKAS, G. a R. T. COOK. The evaluation of liver function after partial hepatectomy in the rat: serum changes. *Br J Exp Pathol*, 1979, **60**(5), 447-452.

SHAFRITZ, D. A. a M. OERTEL. Model systems and experimental conditions that lead to effective repopulation of the liver by transplanted cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, **43**(2), 198-213.

SHARP, P. E. a M. C. LA REGINA. *The laboratory rat*. CRC Press, 1998. ISBN 9780849377198.

SHIMIZU, H., MIYAZAKI, M., WAKABAYASHI, Y., MITSUHASHI, N., KATO, A., ITO, H., NAKAGAWA, K., YOSHIDOME, H., KATAOKA, M. a NAKAJIMA, N. Vascular endothelial growth factor secreted by replicating hepatocytes induces sinusoidal endothelial cell proliferation during regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatol*, 2001, **34**(5), 683-689.

SHTEYER, E., LIAO, Y., MUGLIA, L. J., HRUZ, P. W. a RUDNICK, D. A. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. *Hepatology*, 2004, **40**(6), 1322-1332.

SCHENA, M., SHALON, D., DAVIS, R. W. a BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995, **270**(5235), 467-470.

SCHENA, M., SHALON, D., HELLER, R., CHAI, A., BROWN, P. O. a DAVIS, R. W. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, **93**(20), 10614-10619.

SCHIRMACHER, P., GEERTS, A., PIETRANGELO, A., DIENES, H. P. a ROGLER, C. E. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology*, 1992, **15**(1), 5-11.

SCHOFIELD, P. S., SUGDEN, M. C., CORSTORPHINE, C. G. a ZAMMIT, V. A. Altered interactions between lipogenesis and fatty acid oxidation in regenerating rat liver. *Biochem J*, 1987, **241**(2), 469-474.

SIGAL, S. H., RAJVANSHI, P., GORLA, G. R., SOKHI, R. P., SAXENA, R., GEBHARD, D. R. Jr., REID, L. M. a GUPTA, S. Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol*, 1999, **276**(5 Pt 1), G1260-1272.

SIMMONS, F. a J. D. BOYLE. Effect of heterologous serum albumin on liver regeneration after partial hepatectomy. *Arch Surg*, 1969, **98**(3), 369-371.

SMYTH, G. K. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 2004, **3**(1).

SMYTH, G. K. a T. SPEED. Normalization of cDNA microarray data. *Methods*, 2003, **31**(4), 265-273.

SONG, G., SHARMA, A. D., ROLL, G. R., NG, R., LEE, A. Y., BLELLOCH, R. H., FRANDBSEN, N. M. a WILLENBRING, H. MicroRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Hepatology*, 2010, **51**(5), 1735-1743.

SPELLMAN, P. T., SHERLOCK, G., ZHANG, M. Q., IYER, V. R., ANDERS, K., EISEN, M. B., BROWN, P. O., BOTSTEIN, D. a FUTCHER, B. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell*, 1998, **9**(12), 3273-3297.

STARZL, T. E., FUNG, J., TZAKIS, A., TODO, S., DEMETRIS, A. J., MARINO, I. R., DOYLE, H., ZEEVI, A., WARTY, V., MICHAELS, M. et al. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet*, 1993, **341**(8837), 65-71.

STEER, C. J. Liver regeneration. *FASEB J*, 1995, **9**(14), 1396-1400.

STEKEL, D. *Microarray Bioinformatics*. Cambridge University Press, 2003. ISBN 0-521-52587-X.

STOCKER, E., WULLSTEIN, H. K. a BRAU, G. [Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine (author's transl)]. *Virchows Arch B Cell Pathol*, 1973, **14**(2), 93-103.

- STOLZ, D. B., MARS, W. M., PETERSEN, B. E., KIM, T. H. a MICHALOPOULOS, G. K. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res*, 1999, **59**(16), 3954-3960.
- STREY, C. W., MARKIEWSKI, M., MASTELLOS, D., TUDORAN, R., SPRUCE, L. A., GREENBAUM, L. E. a LAMBRIS, J. D. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med*, 2003, **198**(6), 913-923.
- SU, A. I., GUIDOTTI, L. G., PEZACKI, J. P., CHISARI, F. V. a SCHULTZ, P. G. Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, **99**(17), 11181-11186.
- SUZUKI, S., NAKAMURA, S., SERIZAWA, A., SAKAGUCHI, T., KONNO, H., MURO, H., KOSUGI, I. a BABA, S. Role of Kupffer cells and the spleen in modulation of endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy. *Hepatology*, 1996, **24**(1), 219-225.
- ŠIMEK, J. et al. Effect of protracted glucose infusion on the development of early biochemical changes and initiation of regeneration in rat liver after partial hepatectomy. *Physiol Bohemoslov*, 1965, **14**, 366-370.
- ŠIMEK, J., CHMELARĚ, V., MĚLKA, J., PAZDERKA, J. a CHARVÁT, Z. Influence of protracted infusion of glucose and insulin on the composition and regeneration activity of liver after partial hepatectomy in rats. *Nature*, 1967, **213**(5079), 910-911.
- T HOEN, P. A., DE KORT, F., VAN OMMEN, G. J. a DEN DUNNEN, J. T. Fluorescent labelling of cRNA for microarray applications. *Nucleic Acids Res*, 2003, **31**(5), e20.
- TAPIA, P. C. Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality. *Med Hypotheses*, 2006, **66**(4), 832-843.
- TATSUMI, K., OHASHI, K., TAMINISHI, S., OKANO, T., YOSHIOKA, A. a SHIMA, M. Reference gene selection for real-time RT-PCR in regenerating mouse livers. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **374**(1), 106-110.
- TAUB, R. Liver regeneration 4: transcriptional control of liver regeneration. *FASEB J*, 1996, **10**(4), 413-427.
- TAUB, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**(10), 836-847.

TAYLOR, W. R. a G. R. STARK. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 2001, **20**(15), 1803-1815.

THANNICKAL, V. J., DAY, R. M., KLINZ, S. G., BASTIEN, M. C., LARIOS, J. M. a FANBURG, B. L. Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF-beta1. *FASEB J*, 2000, **14**(12), 1741-1748.

TICHÝ, B., SVOBODA, M., MAYER, J. a POSPÍŠILOVÁ, Š. Odběr a zpracování vzorků pro expresní DNA čipy. *Klinická onkologie* 2006, **19**(Supplement 2), 350 - 354.

TINIAKOS, D. G., KANDILIS, A. a GELLER, S. A. Tityus: a forgotten myth of liver regeneration. *J Hepatol*, 2010, **53**(2), 357-361.

TOGO, S., MAKINO, H., KOBAYASHI, T., MORITA, T., SHIMIZU, T., KUBOTA, T., ICHIKAWA, Y., ISHIKAWA, T., OKAZAKI, Y., HAYASHIZAKI, Y. a SHIMADA, H. Mechanism of liver regeneration after partial hepatectomy using mouse cDNA microarray. *J Hepatol*, 2004, **40**(3), 464-471.

TOM, C. T. a B. R. MARTIN. Fat chance! Getting a grip on a slippery modification. *ACS Chem Biol*, 2013, **8**(1), 46-57.

TSAI, J. L., KING, K. L., CHANG, C. C. a WEI, Y. H. Changes of mitochondrial respiratory functions and superoxide dismutase activity during liver regeneration. *Biochem Int*, 1992, **28**(2), 205-217.

TZUNG, S. P., FAUSTO, N. a HOCKENBERY, D. M. Expression of Bcl-2 family during liver regeneration and identification of Bcl-x as a delayed early response gene. *Am J Pathol*, 1997, **150**(6), 1985-1995.

VAN BAKEL, H. a F. C. P. HOLSTEGE. A Tutorial for DNA Microarray Expression Profiling. In: *Evaluating Techniques in Biochemical Research* [online]. D. Zuk (ed.). Cell Press, Cambridge, MA, 2007, s. 22-28 [cit. 2013-08-01]. Dostupné z: <http://www.cellpress.com/misc/page?page=ETBR>

VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. a SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 2002, **3**(7), RESEARCH0034.

VEIGA-DA-CUNHA, M., TYTECA, D., STROOBANT, V., COURTOY, P. J., OPPERDOES, F. R. a VAN SCHAFTINGEN, E. Molecular identification of NAT8 as the enzyme that acetylates cysteine S-conjugates to mercapturic acids. *J Biol Chem*, 2010, **285**(24), 18888-18898.

VENABLES, W.N. a B. D. RIPLEY. *Modern applied statistics with S*. 4th ed. New York: Springer, c2002, 495 p. ISBN 03-879-5457-0.

VENTER, J. C., ADAMS, M. D., MYERS, E. W., LI, P. W., MURAL, R. J., SUTTON, G. G., SMITH, H. O., YANDELL, M., EVANS, C. A., HOLT, R. A., GOCAYNE, J. D., AMANATIDES, P., BALLEW, R. M., HUSON, D. H., WORTMAN, J. R., ZHANG, Q., KODIRA, C. D., ZHENG, X. H., CHEN, L., SKUPSKI, M., SUBRAMANIAN, G., THOMAS, P. D., ZHANG, J., GABOR MIKLOS, G. L., NELSON, C., BRODER, S., CLARK, A. G., NADEAU, J., MCKUSICK, V. A., ZINDER, N., LEVINE, A. J., ROBERTS, R. J., SIMON, M., SLAYMAN, C., HUNKAPILLER, M., BOLANOS, R., DELCHER, A., DEW, I., FASULO, D., FLANIGAN, M., FLOREA, L., HALPERN, A., HANNENHALLI, S., KRAVITZ, S., LEVY, S., MOBARRY, C., REINERT, K., REMINGTON, K. et al. The sequence of the human genome. *Science*, 2001, **291**(5507), 1304-1351.

VILO, J., BRAZMA, A., JONASSEN, I., ROBINSON, A. a UKKONEN, E. Mining for putative regulatory elements in the yeast genome using gene expression data. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 2000, **8**, 384-394.

VÍTEK, L. Laboratorní vyšetřovací metody. *Hepatologie*. Jiří Ehrmann, Petr Hůlek (eds). Praha: Grada, 2010, s. 42-52. ISBN 978-80-247-3118-6.

VONDRÁČEK, J., KRČMÁŘ, P., PROCHAZKOVÁ, J., TRILECOVÁ, L., GAVELOVÁ, M., SKÁLOVÁ, L., SZOTAKOVÁ, B., BUNČEK, M., RADILOVÁ, H., KOZUBÍK, A. a MACHALA, M. The role of aryl hydrocarbon receptor in regulation of enzymes involved in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a model of rat liver progenitor cells. *Chem Biol Interact*, 2009, **180**(2), 226-237.

WACK, K. E., ROSS, M. A., ZEGARRA, V., SYSKO, L. R., WATKINS, S. C. a STOLZ, D. B. Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology*, 2001, **33**(2), 363-378.

WADA, W., KUWANO, H., HASEGAWA, Y. a KOJIMA, I. The dependence of transforming growth factor-beta-induced collagen production on autocrine factor activin A in hepatic stellate cells. *Endocrinology*, 2004, **145**(6), 2753-2759.

WANG, G. P. a C. S. XU. Reference gene selection for real-time RT-PCR in eight kinds of rat regenerating hepatic cells. *Mol Biotechnol*, 2010, **46**(1), 49-57.

WANG, Y. D., CHEN, W. D., MOORE, D. D. a HUANG, W. FXR: a metabolic regulator and cell protector. *Cell Res*, 2008, **18**(11), 1087-1095.

WATERSTON, R. H., LINDBLAD-TOH, K., BIRNEY, E., ROGERS, J. et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 2002, **420**(6915), 520-562.

WATSON, J. D. a F. H. CRICK. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 1953, **171**(4361), 964-967.

WEGE, H., MULLER, A., MULLER, L., PETRI, S., PETERSEN, J. a HILLERT, C. Regeneration in pig livers by compensatory hyperplasia induces high levels of telomerase activity. *Comp Hepatol*, 2007, **6**,6.

WEINER, H. L., WEINER, L. H. a SWAIN, J. L. Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. *Science*, 1987, **237**(4812), 280-282.

WHEELER, M. D., SMUTNEY, O. M., CHECK, J. F., RUSYN, I., SCHULTE-HERMANN, R. a THURMAN, R. G. Impaired Ras membrane association and activation in PPARalpha knockout mice after partial hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, **284**(2), G302-312.

XU, C. S., CHANG, C. F., YUAN, J. Y., LI, W. Q., HAN, H. P., YANG, K. J., ZHAO, L. F., LI, Y. C., ZHANG, H. Y., RAHMAN, S. a ZHANG, J. B. Expressed genes in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *World J Gastroenterol*, 2005, **11**(19), 2932-2940.

XU, C. S., ZHANG, S. B., CHEN, X. G. a RAHMAN, S. Correlation analysis of liver tumor-associated genes with liver regeneration. *World J Gastroenterol*, 2007, **13**(24), 3323-3332.

YAMAMOTO, C., YAGI, S., HORI, T., IIDA, T., TANIGUCHI, K., ISAJI, S. a UEMOTO, S. Significance of portal venous VEGF during liver regeneration after hepatectomy. *J Surg Res*, 2010, **159**(2), e37-43.

YAMANAKA, N., OKAMOTO, E., KAWAMURA, E., KATO, T., ORIYAMA, T., FUJIMOTO, J., FURUKAWA, K., TANAKA, T., TOMODA, F. a TANAKA, W. Dynamics of normal and injured human liver regeneration after hepatectomy as assessed on the basis of computed tomography and liver function. *Hepatology*, 1993, **18**(1), 79-85.

YAZDANYAR, A., YEANG, C. a JIANG, X. C. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep*, 2011, **13**(3), 242-248.

YOSHIDA, M., TANAKA, J., TAMURA, J., FUJITA, K., KASAMATSU, T., KOHMOTO, M. a TOBE, T. Altered fluidity of liver plasma membranes following partial hepatectomy in rats. *J Surg Res*, 1993, **55**(4), 390-396.

YUAN, B., DONG, R., SHI, D., ZHOU, Y., ZHAO, Y., MIAO, M. a JIAO, B. Down-regulation of miR-23b may contribute to activation of the TGF-beta1/Smad3 signalling pathway during the termination stage of liver regeneration. *FEBS Lett*, 2011a, **585**(6), 927-934.

YUAN, X., YAN, S., ZHAO, J., SHI, D., YUAN, B., DAI, W., JIAO, B., ZHANG, W. a MIAO, M. Lipid metabolism and peroxisome proliferator-activated receptor signaling pathways participate in late-phase liver regeneration. *J Proteome Res*, 2011b, **10**(3), 1179-1190.

ZHANG, X. F., ZHANG, Y., ZHANG, X. H., ZHOU, S. M., YANG, G. G., WANG, O. C., GUO, G. L., YANG, G. Y. a HU, X. Q. Clinical significance of Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression in primary rectal cancer. *BMC Cancer*, 2009, **6**(9), 134.

ZHAO, B., WEI, X., LI, W., UDAN, R. S., YANG, Q., KIM, J., XIE, J., IKENOUE, T., YU, J., LI, L., ZHENG, P., YE, K., CHINNAIYAN, A., HALDER, G., LAI, Z. C. a GUAN, K. L. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*, 2007, **21**(21), 2747-2761.

ZHENG, Z. Y., WENG, S. Y. a Y. YU. Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World J Gastroenterol*, 2009, **15**(46), 5776-5783.

ŽIVNÁ, Helena. *Základy práce s potkanem v laboratoři*. s.l., 2001. Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové.