

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Výběr a validace referenčních genů pro relativní kvantifikaci
mRNA v lidských jaterních řezech

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Boušová Iva, Ph.D.

Hradec Králové, 2020

Bc. Petra Studenovská

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

V Hradci Králové

Bc. Studenovská Petra

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Petra Studenovská

Školitel: doc. PharmDr. Boušová Iva, Ph.D.

Název diplomové práce: Výběr a validace referenčních genů pro relativní kvantifikaci mRNA v lidských jaterních řezech

Použití ultratenkých jaterních řezů je často využívaným *in vitro* systémem při biochemických, farmakologických a toxikologických studiích. Důvodem je zejména zachování buněčné architektury tkáně, a tedy i jejích funkcí. Cílem diplomové práce byl výběr a validace referenčních genů pro relativní kvantifikaci mRNA v lidských jaterních řezech. Jako vzorky byla použita jaterní tkáně od 3 pacientů s různým věkem, diagnózou a farmakoterapií. Ze vzorků jater byly připraveny jaterní řezy, které byly vystaveny působení dimethylsulfoxidu (kontrola) nebo známým induktorům cytochromu P450, rifampicinu (10 μ M) a β -naftoflavonu (10 μ M). Následně byla ověřena stabilita exprese referenčních genů pomocí programu RefFinder, který integruje programy geNorm, BestKeeper, NormFinder a komparativní ΔC_T metodu. Optimální počet referenčních genů, které by měly být použity k relativnímu hodnocení genové exprese cílových genů, byl zjištěn pomocí programu geNorm. Nejvhodnější kombinací genů pro normalizaci exprese sledovaných genů byla dvojice YWHAZ a B2M. Nicméně rozdíly mezi stabilitami jednotlivých referenčních genů byly malé a všechny geny by byly použitelné pro normalizaci dat. Vybrané referenční geny byly validovány v praktickém experimentu, kdy byla sledována exprese mRNA CYP1A2 a CYP3A4 v jaterních řezech inkubovaných s dimethylsulfoxidem, rifampicinem nebo β -naftoflavonem po dobu 24 hodin. Zdá se, že optimálním intervalem pro indukční studie v lidských jaterních řezech je 18-24 hodin.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Petra Studenovská

Supervisor: doc. PharmDr. Boušová Iva, Ph.D.

Title of diploma thesis: Selection and validation of reference genes for relative mRNA quantification in human liver slices

The use of precision-cut liver slices is often employed *in vitro* system in the biochemical, pharmacological and toxicological studies. This is mainly due to the preservation of the cellular tissue architecture and therefore its functions. The aim of this diploma thesis was to select and validate reference genes for the relative quantification of mRNA in human liver slices. Liver tissues obtained from 3 patients of different age, diagnosis and pharmacotherapy were used as samples. Liver slices, prepared from samples of liver tissue, were exposed to dimethyl sulfoxide (control) or known inducers of cytochrome P450, rifampicin (10 μ M) and β -naphthoflavone (10 μ M). Subsequently, the stability of the expression of reference genes was verified using RefFinder program, which integrates the programs of the geNorm, BestKeeper, NormFinder and comparative ΔC_T method. The optimal number of reference genes that should be used to evaluate the relative gene expression of target genes was determined using the geNorm program. The most suitable gene combination for the normalization of target genes expression was a pair of YWHAZ and B2M. However, the differences between the stability of each candidate gene were small and all genes could be used for data normalization. The selected reference genes were validated in a practical experiment, in which the mRNA expression of CYP1A2 and CYP3A4 in liver slices incubated with dimethyl sulfoxide, rifampicin or β -naphthoflavone was monitored in the range of 24 hours. The optimal interval for induction studies in human liver slices appears to be 18-24 hours.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	3
2.	SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ.....	4
2.1	Struktura a funkce jater	4
2.1.1	Mikroskopická stavba jater	5
2.1.2	Krevní oběh v játrech.....	7
2.1.3	Metabolické funkce jater.....	7
2.1.3.1	Metabolismus sacharidů	7
2.1.3.2	Metabolismus lipidů	7
2.1.3.3	Metabolismus proteinů	8
2.2	Modelové systémy pro studium hepatotoxicity	8
2.2.1	<i>In vitro</i> modely.....	9
2.2.1.1	Primární kultury izolovaných hepatocytů.....	9
2.2.1.2	Jaterní řezy.....	10
2.2.1.3	Izolovaná perfundovaná játra.....	14
2.2.2	Experimentální <i>in vivo</i> modely	14
2.3	Polymerázová řetězová reakce	14
2.3.1	Denaturace	15
2.3.2	Annealing.....	15
2.3.3	Extenze, elongace	15
2.3.4	Real-time PCR	16
2.3.4.1	Absolutní kvantifikace	17
2.3.4.2	Relativní kvantifikace.....	17
2.3.5	Referenční geny	18
2.3.5.1	Validace referenčních genů	19
2.4	Cytochromy	20
2.4.1	Cytochrom P450	21
2.4.1.1	CYP3A4.....	22
2.4.1.2	CYP1A1/2	23
3.	CÍLE PRÁCE	24
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25

4.1	Biologický materiál	25
4.2	Příprava ultratenkých jaterních řezů.....	25
4.2.1	Příprava Krebs-Henseleitova pufru	26
4.2.2	Příprava média pro inkubaci.....	26
4.3	Příprava ultratenkých lidských jaterních řezů.....	27
4.4	Inkubace jaterních řezů	27
4.5	Stanovení životnosti tkáňových řezů	28
4.5.1	Stanovení hladiny ATP	28
4.5.2	Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy (LDH)	29
4.6	Izolace RNA.....	30
4.6.1	Homogenizace	30
4.6.2	Měření koncentrace RNA	31
4.6.3	Ošetření DNázou.....	31
4.7	Reverzní transkripce.....	32
4.8	Real-Time PCR	33
4.9	Analýza dat	36
5.	Výsledky	38
5.1	Životaschopnost PCLS	38
5.1.1	Obsah ATP.....	38
5.1.2	Únik LDH do média	39
5.2	Stabilita exprese kandidátních referenčních genů	40
5.3	Validace referenčních genů.....	45
6.	Diskuze	49
7.	Závěr.....	52
8.	Seznam literatury	53

1. ÚVOD

Pro klinické i předklinické testování je nezbytné použití jaterních *in vitro* modelů. *In vitro* systémy jsou přínosným pomocníkem ve studiu v oblastech biochemie, farmakologie, toxikologie a fyziologie. Častým *in vitro* systémem, používaným ke studiím v různých oborech, jsou tkáňové řezy. Tyto řezy představují minimodel orgánu, ze kterého jsou připraveny, a který obsahuje všechny typy buněk přítomné v jejich původním uspořádání. Při správné technice přípravy řezu jsou jednotlivé metabolické a další funkce zachovány (de Graaf et al. 2007).

Ultratenké jaterní řezy jsou jedním z modelů, jejichž použití umožňuje získat nové poznatky o patologii jaterních chorob, toxicitě léčiv a dalších xenobiotik, jejich biotransformaci, nebo potenciálních interakcích léčiv s dalšími látkami chemického i přírodního původu. V jaterních řezech lze studovat změny v expresi genů, které jsou vyvolané studovanou látkou. V předchozí studii pracovní skupiny doc. Boušové byl pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) sledován vliv šesti vybraných seskviterpenů na expresi mRNA enzymů I. fáze biotransformace (Šadibolová et al. 2019).

Jednou z možností relativní normalizace qPCR dat je použití referenčních genů. Zvolení vhodných referenčních genů je klíčové pro získání spolehlivých a reprodukovatelných výsledků analýzy transkripční odpovědi. Základním předpokladem pro výběr referenčního genu je jeho stabilní exprese v různých tkáních a za různých experimentálních podmínek (Chervoneva et al. 2010, Kozera a Rapacz 2013). V lidských jaterních řezech zatím nebyla analýza referenčních genů provedena.

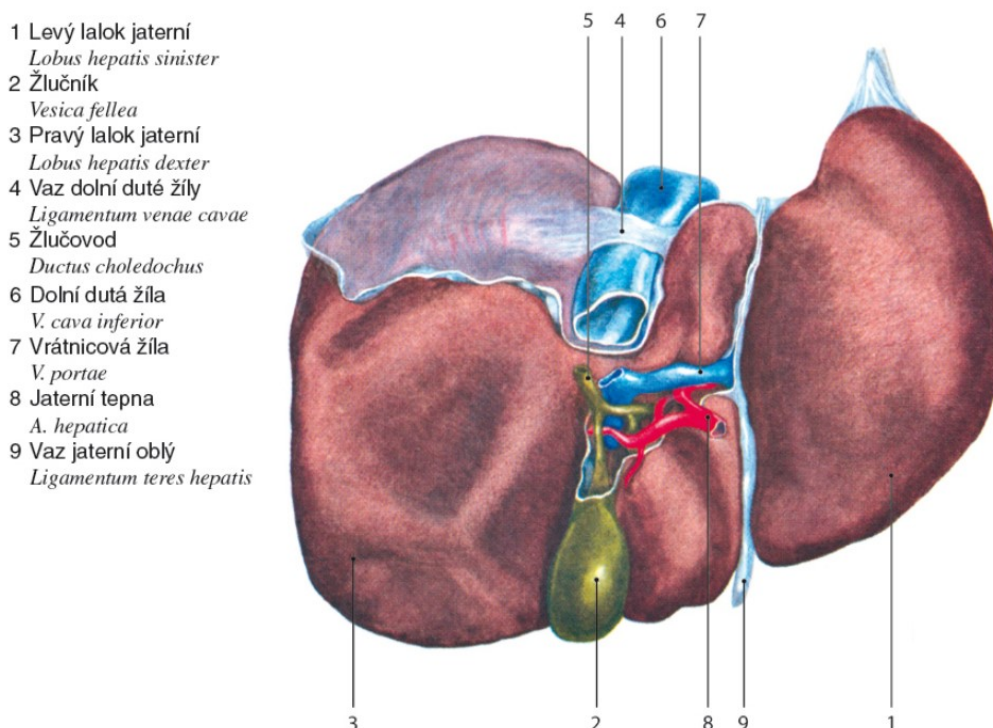
Cílem mé diplomové práce bylo ověřit stabilitu vybraných referenčních genů v ultratenkých lidských jaterních řezech, které byly vystaveny působení dimethylsulfoxidu (kontrola) nebo známých induktorů cytochromu P450, rifampicinu a β -naftoflavonu. Dalším cílem byla validace vybraných referenčních genů v praktickém experimentu, kdy byla sledována exprese mRNA CYP1A2 a CYP3A4 v průběhu 24hodinové inkubace lidských jaterních řezů s dimethylsulfoxidem, rifampicinem či β -naftoflavonem.

2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

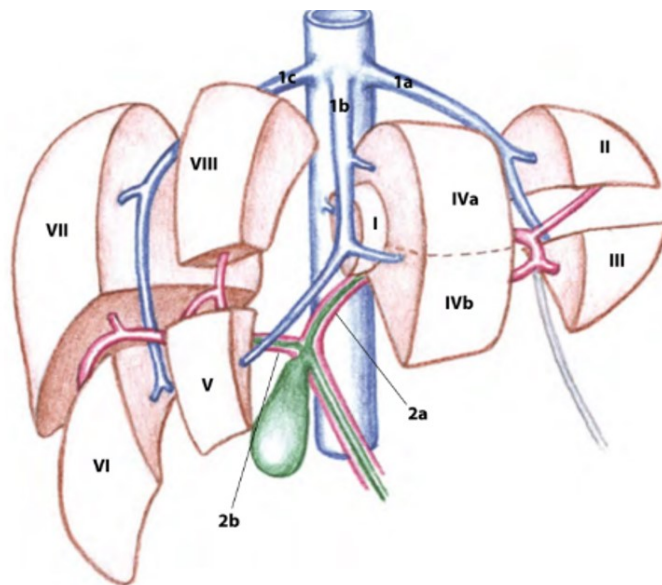
2.1 Struktura a funkce jater

Játra jsou největším parenchymovým orgánem v lidském těle. U dospělého muže dosahují hmotnosti 1500–1800 g a u dospělé ženy 1200–1500 g, jejich hmotnost tak tvoří přibližně 3 % celkové tělesné hmotnosti (Hůlek a Urbánek 2018).

Játra (Obr. 1) jsou umístěna intraperitoneálně pod bránicí v pravém a středním podžebří, tvarem se mohou přirovnávat k trojbokému jehlanu se základnou přiloženou k pravé břišní stěně s vrcholem směřujícím doleva. Anatomicky mají játra dva hlavní laloky, pravý lalok (*lobus dexter*) a levý lalok (*lobus sinister*). Laloky jsou rozdělené úponem srpkovitého vazy a průběhem levé sagitální rýhy. V závislosti na uložení cévního a žilního zásobení jater jsou játra členěna na osm funkčních segmentů (Obr. 2) (Hůlek a Urbánek 2018, Hanzlová a Hemza 2013).



Obrázek 1: Dolní orgánová plocha jater (Hanzlová a Hemza 2013)



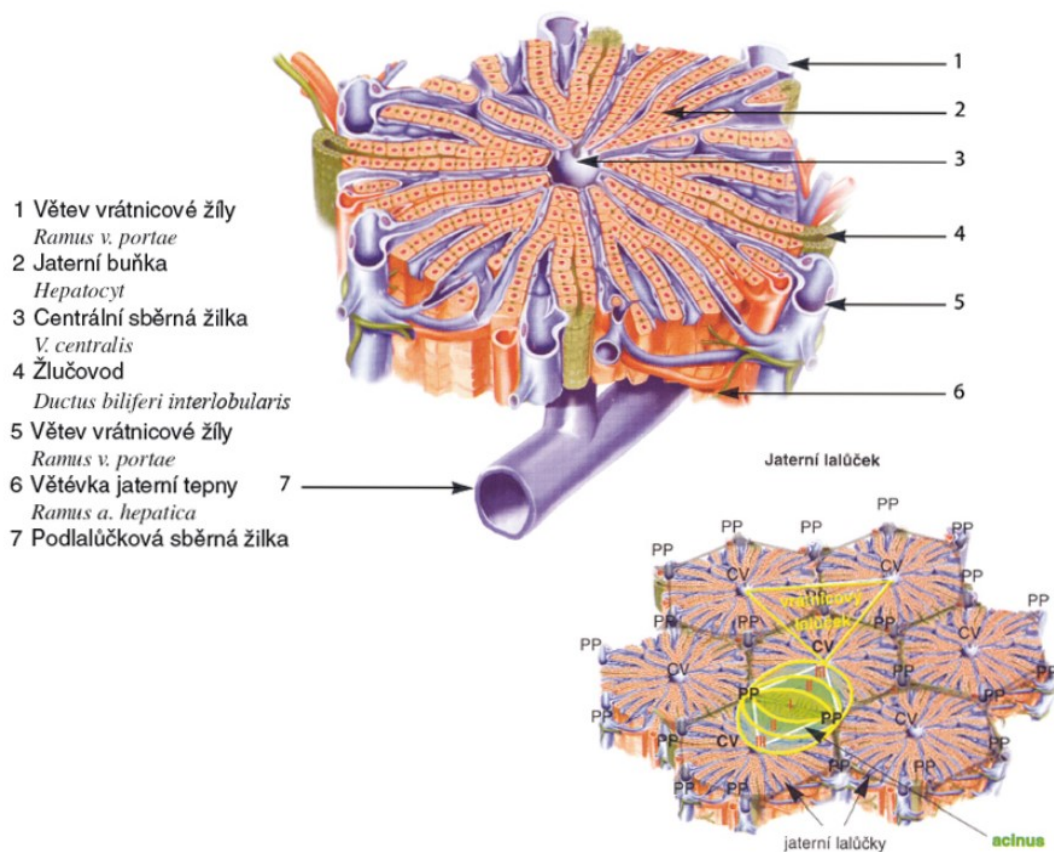
Obrázek 2: Jaterní segmenty podle Couinauda: 1a, 1b, 1c – levá, střední a pravá jaterní žíla; 2a, 2b – levá a pravá větev portální žíly; I-VIII – jaterní segmenty (Hůlek a Urbánek 2018)

2.1.1 Mikroskopická stavba jater

Základní strukturální komponentou jaterního parenchymu je jaterní buňka – hepatocyt. Hepatocyty jsou uspořádány do trámců, které jsou zpravidla tvořeny dvěma řadami buněk přiložených těsně k sobě (Fontana et al. 2013). V prostorech mezi trámci probíhají jaterní sinusoidy, které tvoří endotelové buňky na jejichž luminálním povrchu se nacházejí specifické jaterní makrofágy Kupfferovy buňky, a Itovy buňky (Lüllmann-Rauch 2012).

Morfologickou jednotkou jater je lalůček centrální žíly (*lobulus venae centralis*) (Obr. 3). Lalůček je situován kolem centrální žíly a je tvořen odstředivě uspořádanými trámci dvou řad hepatocytů. Mezi sousedními lalůčky se nachází septa, ve kterých jsou uloženy terminální žlučovody, do kterých ústí žlučové kanálky uložené mezi hepatocyty. V septech se dále nacházejí terminální portální venuly, terminální jaterní arterioly, terminální lymfatické cévy a nervy (Hůlek a Urbánek 2018, Hanzlová a Hemza 2013).

Jako základní strukturu jater lze označit portální lalůček (*lobulus venae interlobularis*). Lalůček je orientovaný kolem portální triády (interlobulární artérie, interlobulární vena a interlobulární žlučovod) a je obklopen několika centrálními žilami.



Obrázek 3: Stavba jaterního lalůčku (Hanzlová a Hemza 2013)

Další strukturní jednotkou jaterního parenchymu je portální acinus. Portální acinus je nepravidelného tvaru, jednu jeho osu tvoří linie mezi dvěma portálními triádami a druhou pak spojnice mezi dvěma centrálními žilami (Hůlek a Urbánek 2018, Hanzlová a Hemza 2013).

Acinus tvoří tři zóny, které jsou v důsledku mikroprostředí různě enzymaticky aktivní. V periportální zóně, která je umístěná nejbližší přívodním cévám, jsou hepatocyty bohatě zásobené živinami i kyslíkem, probíhají zde oxidační děje, β -oxidace mastných kyselin, katabolismus aminokyselin, glukoneogeneze, tvorba močoviny, syntéza cholesterolu, glykogenolýza a tvorba žluči. Perivenózní zóna je umístěna nejvzdáleněji od přívodních cév, hepatocyty jsou zde perfundovány krví se sníženou koncentrací živin a kyslíku. V hepatocytech zde probíhá syntéza glykogenu, glykolýza, lipogeneze, ketogeneze, tvorba glutaminu, syntéza žlučových kyselin a biotransformace.

2.1.2 Krevní oběh v játrech

Krevní oběh v játrech má funkční a výživovou funkci. Nutriční oběh obvykle zajišťuje jaterní tepna (*arteria hepatica communis*), která přechází v *arteria hepatica propria*.

Funkční oběh zajišťuje vrátnicová žíla (*vena portae*), vstupující do jater v hilu, která přivádí do jater 60-70 % krve bohaté na živiny, které byly vstřebány ve střevech. Vrátnicová žíla se větví na žíly procházející portobiliárním prostorem a dále na sinusoidy procházející mezi trámci hepatocytů. Na úrovni sinusoid se spojuje nutriční a funkční oběh jater a je veden do dolní duté žíly (*vena cava inferior*) (Hůlek a Urbánek 2018, Hanzlová a Hemza 2013).

2.1.3 Metabolické funkce jater

Jaterní parenchym je bohatý na řadu metabolických dějů. Díky strategické pozici v krevní cirkulaci je do jater přiváděná ze střev portální krev plná živin. Játra se podílejí na metabolismu sacharidů, lipidů, aminokyselin, detoxikaci amoniaku, degradaci cholesterolu a následné tvorbě žlučových kyselin, degradaci hemu, syntéze některých plazmatických proteinů atd. (Hůlek a Urbánek 2018).

2.1.3.1 Metabolismus sacharidů

Játra zabezpečují konstantní hladinu krevní glukózy. Podle potřeb organismu glukózu vycytávají, skladují ji ve formě glykogenu, nebo při jejím nedostatku z glykogenu uvolňují. V případě nedostatku glukózy ji vytváří z necukerných složek, jako jsou např. laktát, glycerol, pyruvát a další (Hůlek a Urbánek 2018).

2.1.3.2 Metabolismus lipidů

Do jater jsou tuky transportovány v podobě chylomiker – lipoproteinových částic, které vznikají v enterocytech. V jaterních buňkách vznikají lipoproteiny o různé hustotě, které se podílejí na transportu lipidů. Transport lipidů do tkání zajišťuje LDL (lipoprotein o nízké hustotě), který vniká převážně transformací VLDL (lipoprotein o velmi nízké hustotě). Transport cholesterolu do jater, kde je jeho část degradována na žlučové kyseliny, zajišťuje HDL (lipoprotein o vysoké hustotě) (Hůlek a Urbánek 2018).

V játrech dále probíhá β -oxidace mastných kyselin, syntéza triacylglycerolů a cholesterolu a jsou jediným orgánem, kde vznikají ketolátky, které mohou být zdrojem acetyl-CoA, a tedy zdrojem energie (Hůlek a Urbánek 2018).

2.1.3.3 Metabolismus proteinů

V játrech vzniká řada plazmatických proteinů. Jedním z nejvýznamnějších plazmatických proteinů syntetizovaných v játrech, který je zodpovědný za udržení onkotického tlaku krve, slouží jako transportní protein a proteinová rezerva organismu, je albumin. Stanovení hladin albuminu se používá při hodnocení syntetické funkce jater a při dlouhodobém monitorování průběhu chorob (Schneiderka 2004).

Játra jsou také jediným orgánem, kde vzniká močovina v ornitinovém cyklu, díky které je odstraňován z organismu jinak toxický amoniak vznikající při degradaci aminokyselin. V neposlední řadě jsou játra i místem transaminačních a deaminačních reakcí aminokyselin (Hůlek a Urbánek 2018).

Játra zastávají v organismu i významnou roli v metabolismu xenobiotik a jejich eliminaci z těla. Na metabolismu xenobiotik se podílí řada enzymů I. a II. fáze biotransformace. Nejdůležitějšími enzymy první fáze biotransformace jsou oxidační enzymy nadrodiny cytochromů P450 a flavinových monooxygenas, redukční enzymy zastupuje nadrodina aldo-ketoreduktas a dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem a mezi hydrolasy xenobiotik patří karboxyesterasy a epoxidhydrolasy. Druhou fází biotransformace zajišťují nadrodiny UDP-glukuronosyltransferáz, glutation-S-transferáz, sulfotransferáz, acyl-CoA-syntetáz, N-acyltransferáz, N-acetyltransferáz a metyltransferáz (Skálová et al. 2017).

2.2 Modelové systémy pro studium hepatotoxicity

V experimentálních studiích, které se zabývají hepatotoxicitou studovaných látek, se využívají různé modelové systémy. Mezi základní *in vitro* modely patří primární kultury izolovaných hepatocytů, ultratenké jaterní řezy a perfundovaná játra. Další možností studia hepatotoxicity látek je použití *in vivo* modelů, které využívají různá experimentální zvířata. Každý z uvedených modelů má určitá pozitiva a negativa.

V dalším textu se více zaměřím na popis ultratenkých jaterních řezů, které jsem využívala v experimentální části této práce.

2.2.1 *In vitro* modely

Pro studium hepatotoxicity se používají tři hlavní modelové systémy: primární kultury izolovaných hepatocytů, ultratenké jaterní řezy a izolovaná perfundovaná játra. Každý z těchto modelů má řadu výhod a nevýhod (Tabulka 1), a proto by měl být výběr modelu založen na specifickém toxikologickém problému, který je řešen (Groneberg et al. 2002).

Tabulka 1 Výhody a omezení jednotlivých *in vitro* modelů (Groneberg et al. 2002)

Model	Výhody	Omezení
Hepatocyty	Všechny živočišné druhy včetně člověka Celá játra nebo biopsie jako zdroj Informace o buněčné toxicitě Kryoprezervace Různé látky v různých koncentracích	Není možné stanovení ve žluči Chybí mezibuněčné interakce Není zachována anatomie tkáně
Jaterní řezy	Částečně zachovaná lobulární struktura Všechny živočišné druhy včetně člověka Informace o buněčné toxicitě Různé látky v různých koncentracích	Není možné stanovení ve žluči Není zachována anatomie tkáně
Izolovaná játra	Nejbližší <i>in vivo</i> podmínkám Zachovaná anatomie Zachován průtok žluči Lze stanovit hemodynamické parametry	Krátká životnost Lze sledovat jen několik látek v jednom orgánu Lidská tkáň je nedostupná Velké množství zvířat Komplikovanost provedení

2.2.1.1 Primární kultury izolovaných hepatocytů

Primární kultury hepatocytů jsou nejběžněji používaným modelem ke studiu hepatotoxicity a metabolismu léčiv. Jejich dostupnost (zejména lidských) je omezená a mezi jednotlivými šaržemi jsou značné rozdíly. Jejich nevýhodou je především časná změna v morfologii hepatocytů (dediferenciace), krátká životnost a rychlý pokles enzymatických aktivit (Vanhaecke a Rogiers 2006).

2.2.1.2 Jaterní řezy

Jaterní řezy se v dnešní době využívají v mnoha vědních oborech. Díky vyvinutým technikám přípravy, uchování a zpracování jaterních řezů tento *in vitro* systém dobře odráží činnost a funkci jaterních buněk *in vivo*. Jaterní řezy se jako *in vitro* systém využívají pro studium hepatotoxicity, metabolismu endogenních a exogenních látek v toxikologii a farmakologii, ke studiu konzervace a ischemie orgánu. Využití mají i v enzymologii při studiu indukce enzymů a exprese stresových proteinů nebo peroxisomálních enzymů (Gandolfi et al. 1996).

Lidské řezy mohou být připraveny z části jater získaných například biopsií nebo jako chirurgický odpad. Neoptimálnější parametry jaterních řezů jsou průměr 5-8 mm a tloušťka 200-250 μm , což umožňuje plný přístup vnitřních buněčných vrstev ke kyslíku, živinám a testované látce. Je-li třeba, může se tloušťka snížit až na 100 μm (de Graaf et al. 2010).

2.2.1.2.1 Historie tkáňových řezů

První techniku přípravy tkáňových řezů vyvinul v roce 1923 německý biochemik Otto H. Warburg. Tato technika se ale potýkala s problémy odlišné rychlosti difuze kyslíku díky variabilitě geometrie řezu. Řezy byly krájeny ručně žiletkou nebo skalpelem z tkáně, která byla umístěna mezi dvěma mikroskopickými sklíčky, tento postup byl velmi náročný na provedení. Použitím těchto řezů nebylo možné získat reprodukovatelné výsledky. Postupem let bylo proto vyvinuto několik přístrojů pro tvorbu tkáňových řezů s vylepšenými funkcemi, ale stále nebylo dosaženo požadovaných parametrů (Krumdieck 2013).

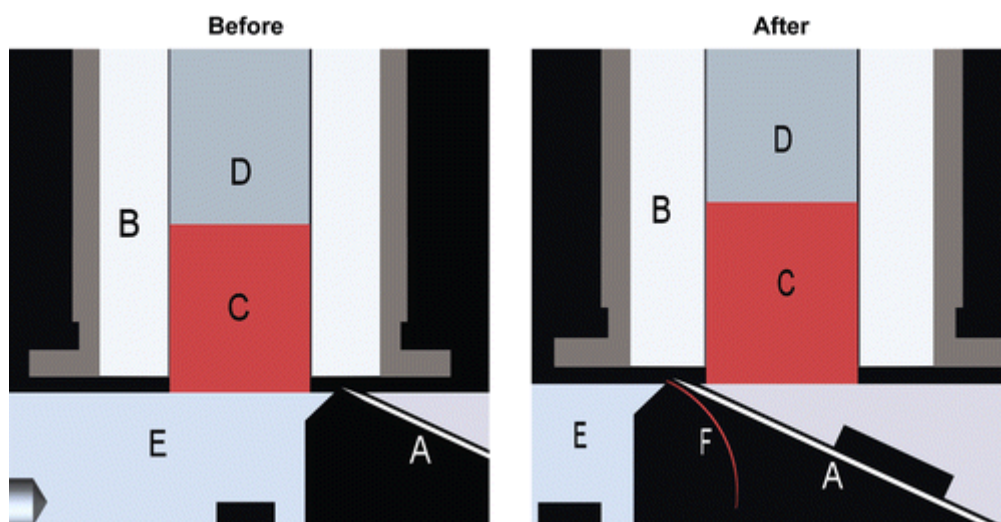
Z důvodu náročné manipulace s celým orgánem nebo jeho částí byl vyroben přístroj na mechanickou tvorbu tkáňových válečků s nastavitelným průměrem (Obrázek 4). Konstrukčně náročnějším úkolem bylo sestrojení mikrotomu pro živou tkáň. Teprve v roce 1978 se podařilo sestrojít ručně ovládaný přístroj, který byl schopen vytvořit kruhové řezy o jednotné geometrii. Pro krájení byla použita Steadie-Rieggsova čepel a bylo možné nastavit požadovanou tloušťku řezu. V roce 1985 vyrobil Carlos L. Krumdieck kráječ modifikovaný o motorem poháněné jednorázové oscilační ostří v podobě žiletky Gillette. Čepel byla na rozdíl od předešlých

kráječů umístěna pod úhlem 20° k válečku tkáně, tím se umožnilo vytvoření tenčích a rovnoměrnějších řezů (Krumdieck 2013).



Obrázek 4: Příklad pro mechanickou tvorbu tkáňových válečků (převzato z Krumdieck 2013)

Mechanismus tvorby tkáňového řezu na kráječi „Krumdieck tissue slicer“ lze popsat následovně (*Obrázek 5*): vertikálně orientovaný tkáňový váleček (C) je svrchu jemně přitlačován k desce (E) pístem (D). Držák tkáně (B) je propojený s ramenem, které aparát rozpohybuje a váleček tkáně se pohybuje přes oscilující ostří nakloněné pod úhlem 20° (A). Řezy (F) jsou přemístěny z kráječe do sběrné nádoby jemným proudem pufu (Krumdieck 2013).



Obrázek 5: Proces krájení na Krumdieckově kráječi (převzato z Krumdieck 2013)

Koncem osmdesátých let 20. století dosáhl Krumdieckův kráječ své finální podoby, byl plně automatizovaný, sterilizovatelný, vytvářel reprodukovatelné tkáňové řezy, byl doplněn o prvky moderní dotykové elektroniky a další prvky, které zlepšovaly kvalitu řezu (Obrázek 6).



Obrázek 6: Současná verze Krumdieckova kráječe – ALABAMA R&D TISSUE SLICER MD6000 (převzato z Krumdieck 2013)

2.2.1.2.2 Příprava tkáně

Postup při odběru orgánu od dárce a jeho zachování pro následné použití k transplantaci nebo klinickému použití jsou doprovázeny nesčetnými multifaktoriálními změnami na molekulární, buněčné i tkáňové úrovni. Pro zachování základní fyziologie jsou orgány uchovávány v chladu uložené v konzervačním roztoku. Chlad zajišťuje útlum metabolických pochodů a tím i nároků na zásobení kyslíkem a konzervační roztoky dodávají potřebné živiny (Guibert et al. 2011).

Při další přípravě tkáně je důležité zachovat celistvost buněk a co nejméně ovlivnit pochody, které v buňkách probíhají. Orgán by měl být při přijetí do laboratoře ihned zpracován. Játra by měla být nařezána na kousky o tloušťce 2 cm a z těchto částí se provede odběr jádra ostrým nástrojem k tomu určeným. Standardní průměr nástroje na vyvrtání jádra je 8 mm, ale je možné použít i jiné průměry. Jádra se uchovávají v chladném konzervačním roztoku.

Řezy se z těchto jader připravují komerčně dodávanými kráječi na přesné krájení tkání viz kap. 2.2.1.2.1 (Fisher et al. 1993). Připravené řezy by měly být uchovávány na ledu až do inkubace. Optimální tloušťka řezů pro játra, ledviny, srdce a štítnou žlázu je mezi 175–225 μm , zatímco řezy plic lze připravit v tloušťce 450–500 μm . Tloušťka řezu může být stanovena řadou prostředků, včetně mechanických a optických mikrometrů, stejně jako vlhká hmotnost řezu. Tloušťka řezu je velmi důležitá pro udržení jeho životaschopnosti (Fisher et al. 1993).

2.2.1.2.3 Inkubace tkáňových řezů

Pro správný průběh inkubace tkáňových řezů je rozhodující optimální tloušťka řezu a inkubační systém, který zaručí dostatečný přísun živin i difuzi kyslíku až do středu řezu. Pokud je řez příliš tenký (<100 μm), je poměr poškozených k nepoškozeným buňkám příliš velký. Pokud je plátek příliš tlustý (> 275 μm pro játra), střed řezu se stane nekrotickým v důsledku nedostatku kyslíku a živin (Fisher et al. 2001).

K dlouhodobé inkubaci orgánových řezů lze použít dynamický kultivační systém firmy Vitron, kde jsou plátky umístěny na teflonové nebo titanové kolébce ve

scintilační lahvičce spolu s filtrem z esteru celulózy a kultivačním médiem, doplněným o antibiotika, antimykotika případně 10 % fetálního telecího séra. V uzávěrech lahviček je otvor, který usnadňuje okysličování. Lahvičky jsou uzavřeny do dynamického inkubátoru, zahřívány na 37 °C a kontinuálně je k nim přiváděn plyn (0,5 l/min, 95 % O₂ a 5 % CO₂). Lahvička se s řezem v inkubátoru neustále otáčí a tím je zajištěn rovnoměrný přísun živin z média i přísun kyslíku (Fischer a Vickers 2013).

Pro potřeby krátkodobé inkubace v řádu minut až hodin jsou řezy obvykle umístěny v Erlenmeyerových baňkách nebo v destičkách s jamkami. Po přidání kultivačního média je destička umístěna do inkubátoru při teplotě 37 °C a atmosféře (0,5 l/min) 95 % O₂ a 5 % CO₂ na horizontální třepačku, tak je zajištěn konstantní přísun média a kyslíku k řezu (Fischer a Vickers 2013).

2.2.1.3 Izolovaná perfundovaná játra

Perfundovaná játra mají nejbližší k *in vivo* podmínkám. Je zde zachována jak struktura, tak i mezibuněčné kontakty. Perfundovaná játra jsou využívána při studiu toxických poškození jater. Nevýhodou tohoto modelu je obtížná manipulace a krátkodobá životnost (Kučera et al. 2006).

2.2.2 Experimentální *in vivo* modely

Experimentální *in vivo* modely patří stále k nejvyužívanějším testům, a to hlavně z důvodu možnosti sledovat dopad aplikované cizorodé látky na cílový testovaný organismus. Pomocí *in vivo* testů je možné získat poznatky o toxikodynamických a toxikokinetických procesech. Hlavní nevýhodou zvířecích *in vivo* modelů je nedostatečná predikce účinků léčiv na člověka kvůli mezidruhovým rozdílům v jejich jaterním metabolismu a rozdílné citlivosti na toxické účinky (Li 2004).

2.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metoda založená na exponenciální amplifikaci DNA. Nové řetězce DNA vznikají za pomoci DNA-polymeráz, které mají katalytické vlastnosti ve směru 5'-3'.

PCR je rychlá a spolehlivá technika používaná v molekulární biologii. Využití této technologie výrazně zvýšilo schopnost studia genetického materiálu. PCR využívá cyklické opakování změn teploty, která odpovídá optimu pro danou fázi PCR. PCR probíhá v termocyklérech, ve kterých probíhá fáze denaturace, annealing a extenze, elongace. Pro každý experiment je zásadní optimalizace jednotlivých kroků (Beránek 2016).

2.3.1 Denaturace

Výchozím materiálem je dvouřetězcová DNA, která je narušena tepelnou denaturací, což vede k rozvolnění DNA a vzniku jednořetězcové DNA. Teplota, při které DNA denaturuje, je zčásti určena obsahem bazí G a C, čím větší je podíl těchto bazí, tím větší je teplota potřebná k oddělení templátové DNA. V PCR reakcích katalyzovaných Taq-polymerázou se denaturace provádí při 94-95 °C (Beránek 2016).

2.3.2 Annealing

Jednovláknová DNA slouží jako templát pro syntézu nového vlákna DNA. Na vlákno DNA nasedá komplementární primer. Jedná se o krátké oligonukleotidové řetězce o délce 18-24 nukleotidů s obsahem GC 40-60 %. Primery musí být specifické pro úsek DNA, který má být amplifikován, nesmí být vzájemně komplementární, neměly by tvořit sekundární struktury a měly by mít podobnou teplotu tání. Při annealingu je zásadní optimalizovat teplotu pro zajištění optimální výtěžnosti. Teplota by měla být nastavena o 5-10 °C nižší než teplota tání obou primerů (Beránek 2016).

2.3.3 Extenze, elongace

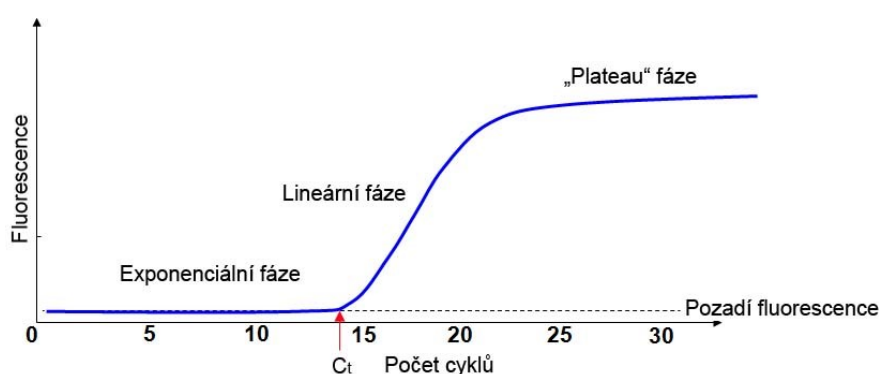
Prodloužení oligonukleotidových primerů se provádí při nebo blízko optimální teplotě pro syntézu DNA katalyzovanou termostabilní polymerázou. Pro PCR se využívají termostabilní polymerázy izolované z bakteriálního kmene *Thermus aquaticus* (*Taq*). Stabilita *Taq*-polymerázy je 40 min při 95 °C a teplotní optimum je 72 °C. Její stabilita zajistí funkčnost polymerázy v 30 i více cyklech bez nadměrného poškození. (Green 2019). Délka amplifikovaných produktů je omezena pozicemi obou primerů (Beránek 2016).

2.3.4 Real-time PCR

Real-time PCR (qPCR) je jednou z mnohých modifikací metody PCR. Jedná se o kvantitativní metodu, při které se na rozdíl od klasické PCR nárůst produktu stanovuje po každém cyklu. U klasické PCR se k detekci amplikonů používají další metody (elektroforetické metody, sekvenační metody, hybridizace atd.), zatímco u qPCR je využíváno zvýšení intenzity fluorescenčního signálu generovaného interkalačním barvivem nebo rozpadem sondy značené barvivem během amplifikace cílové sekvence. Intenzita fluorescenčního signálu je přímo úměrná počtu amplifikovaných molekul DNA (Beránek 2016).

Jako interkalační barviva jsou využívána ethidium bromid, SYBR Green, SYBR Gold a Amplifluor. Výhodou použití těchto barviv je příznivá cena a jejich univerzální použití. Nevýhodou je jejich nespecifita, barvivo se váže na jakoukoli DNA nebo dimery primerů (Beránek 2016).

Výsledkem qPCR jsou hodnoty naměřené fluorescence a počty proběhlých cyklů. Tyto hodnoty jsou nejčastěji zanášeny do amplifikační křivky, ze které se odvozuje Ct hodnota (Obr. 7). Ct hodnota je pořadí cyklu, při kterém fluorescence generovaná v reakci překračuje fluorescenční práh. Amplifikační křivka se podle průběhu reakce rozděluje do čtyř fází. V první fázi z důvodu malého množství templátu nedochází k překročení úrovně pozadí. V další fázi je průběh reakce exponenciální, fluorescence přesahuje úroveň pozadí a je již detekovatelná. V lineární fázi dochází k prudkému nárůstu fluorescence, která přechází do tzv. plateau fáze, kdy jsou spotřebovány některé komponenty v reakci a dochází tak ke zpomalení reakce (Logan et al. 2009).



Obrázek 7: Amplifikační křivka (převzato z LabGuide 2014)

2.3.4.1 Absolutní kvantifikace

Pro absolutní kvantifikaci se využívá kalibrační závislosti s nelineárním charakterem. Při absolutní kvantifikaci se využívají ředěné standardy o známé koncentraci k vytvoření kalibrační křivky. Kalibrační křivka vytváří lineární vztah mezi Ct a počátečním množstvím DNA. Zanesením hodnot Ct pro neznámý vzorek se stanovuje množství DNA ve vzorku (Stephenson 2016).

Nevýhodou absolutní kvantifikace je nezohlednění ztrát vzniklých během celého procesu zahrnující např. extrakci nukleových kyselin, pipetování nebo přítomnost inhibitorů. Častěji se využívá kvantifikace relativní, kdy se porovnává míra fluorescence testovaného genu s genem referenčním (Beránek 2016, Kozera a Rapacz 2013).

2.3.4.2 Relativní kvantifikace

Při relativní kvantifikaci je využíváno současné amplifikace a hodnocení vyšetřovaného a referenčního genu (Beránek 2016). Pro relativní kvantifikaci se volí referenční gen s podobnou mírou exprese vyjádřenou jako Ct (cyklus prahu) jako má zkoumaný gen. Podobnost exprese by měla být v řádech jednotek a v rozmezí $30 < Ct < 15$. Dále je třeba vybrat gen, který nebude ovlivněn spolu se studovaným genem. Aby došlo k minimalizaci pravděpodobnosti a rozsahu chyb, je používáno několika genů, které se validují pro každou studii (Bustin et al. 2009, Kozera a Rapacz 2013, Chervoneva et al. 2010).

Jednou z metod relativní kvantifikace je metoda kalibrační křivky. Po provedení kalibrace metody a určení absolutního množství amplikonů ve vzorcích se provede výpočet podílu exprese referenčního a studovaného genu (Beránek 2016). Tato metoda se využívá při měření malého počtu genů nebo při kvantifikaci počtu virových částic v daném vzorku (Ginzinger 2002).

Druhou možností je využití komparativní ΔCt metody, kdy dochází ke srovnání hodnot Ct referenčního a zkoumaného genu. Tato metoda vyjadřuje rozdíl Ct hodnot pro referenční a studovaný gen. Podmínkou pro tuto metodu je podobná účinnost PCR reakcí (Beránek 2016).

$$\Delta Ct = Ct_{\text{vzorek}} - Ct_{\text{kalibrátor}}$$

Používanější metodou pro relativní kvantifikaci je komparativní metoda $\Delta\Delta Ct$. Ta využívá zvolený vnitřní vzorek jako referenční. Jako referenční vzorek lze použít vzorek z definované tkáně, ze zdravé tkáně nebo z tkáně před zahájením léčby.

Prvním krokem je výpočet ΔCt pro všechny vzorky, následuje výpočet hodnoty $\Delta\Delta Ct$ jako rozdíl hodnot ΔCt vzorků a referenčního vzorku.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{vzorek}} - \Delta Ct_{\text{referenční vzorek}}$$

Hodnota $\Delta\Delta Ct$ je nakonec převedena na hodnotu normalizační exprese R , která je vztažena k referenční tkáni (Beránek 2016).

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

2.3.5 Referenční geny

Jako referenční geny jsou označovány geny, které si zachovávají stabilitu exprese nezávisle na experimentálních podmínkách. Nejčastěji se jedná o strukturní geny. Při expresi strukturních genů vznikají transkripty mRNA určující při proteosyntéze pořadí aminokyselin v peptidových řetězcích. Tyto geny tedy zajišťují základní metabolické procesy v buňkách.

Referenční geny se využívají při kvantifikaci jako vnitřní kontrola při expresi sledovaných genů. Vzhledem k variabilitě referenčních genů mezi tkáněmi a jedinci se referenční geny stanovují ideálně pro každou prováděnou studii. Doporučuje se používat vždy alespoň dva referenční geny, protože použití pouze jednoho může vést k relativně velkým chybám (Vandesompele et al. 2002). Při použití více referenčních genů dochází obvykle ke zvýšení rozlišení a větší přesnosti výsledků.

Mezi nejčastěji používané referenční geny patří např. geny pro *18S RNA*, *glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázu*, β -*aktin*, *cyklofilin*, β 2-*mikroglobulin*, *hypoxanthin-guaninfosforibosyltransferázu* a další (Beránek 2016).

Byly navrženy různé statistické přístupy a algoritmy pro optimální výběr páru nebo několika referenčních genů (Vandesompele et al. 2002).

2.3.5.1 Validace referenčních genů

Validace referenčních genů se provádí na základě zjištění míry stability exprese genu. K tomuto účelu bylo vytvořeno několik programů, které využívají různých přístupů ke stanovení nejstabilnějšího genu. Mezi nejpoužívanější programy patří geNorm, BestKeeper a NormFinder.

Program geNorm využívá algoritmus, který vyhodnotí míru stability genové exprese (M) na základě průměrné párové variace jednoho genu se všemi ostatními referenčními geny (Vandesompele et al. 2002). Párová variace je definována jako standardní odchylka log-transformovaných poměrů exprese párových genů. Algoritmus nejprve vybere dvojici dvou kandidátních referenčních genů, které mají nejvyšší shodu v expresi (to je nejmenší variabilitu v poměrech) mezi všemi možnými páry genů. Poté je identifikován další stabilní referenční gen jako ten, který má nejvyšší shodu se zbytkem kandidátních genů a s geometrickým průměrem prvních dvou vybraných referenčních genů atd. (Vandesompele et al. 2002).

Zdá se, že lepším přístupem je výběr genů na základě lineárních modelů popisujících geometrický průměr exprese jako komplexní sadu faktorů, jako je genová exprese ve skupině, množství mRNA ve vzorku a náhodné variace způsobené biologickými a experimentálními faktory (Andersen et al. 2004). Tyto aditivní modely umožňují použít různé statistické přístupy, jako je klasický model ANOVA a další metody pro smíšené lineární modely sestávající z pozorování a nezávislých proměnných. Při zohlednění průměrného vlivu genu v tkáni (skupině) a individuálního dopadu genu vypočítali autoři vnitro- a meziskupinové variace, které byly spojeny do hodnoty stability. Tento algoritmus byl použit v softwaru NormFinder (Kozera a Rapatz 2013).

Populárním programem je také software BestKeeper. Vyhodnocení se provádí na základě hodnot C_t , směrodatné odchylky (SD) a variačního koeficientu (CV). Na základě vypočtené variace (SD a CV) jsou vybírány jako referenční geny ty s hodnotami $SD < 1$ (Kozera a Rapatz 2013).

K validaci referenčních genů je potřeba přistupovat komplexně, a to i vzhledem k tomu, že při použití několika programů pro validaci nemusí být určeny jako

nejstabilnější stejné geny, protože každý program používá při vyhodnocení jiný algoritmus. Z toho důvodu je často používán program RefFinder, který integruje čtyři výpočetní algoritmy. Na základě pořadí genu z každého programu je určen geometrický průměr důležitosti a určeno konečné pořadí (Spiegelaere et al. 2015).

Pro normalizaci dat je důležité používat několik referenčních genů najednou, protože použití jediného referenčního genu může způsobit relativně velkou chybu (Kozera a Rapatz 2013).

2.4 Cytochromy

Cytochromy se vyskytují ve všech organismech kromě několika výlučných anaerobů. Jsou to proteiny, na které je vázán jeden až dva tetrapyrrolové kruhy. Centrálním atomem tetrapyrrolového kruhu je atom železa. Tetrapyrrolový kruh cytochromů se železem jako centrálním atomem se nazývá hem. Hemová skupina je vysoce konjugovaný kruhový systém (který umožňuje, aby jeho elektrony byly velmi mobilní) obklopující ionty železa. Železo v cytochomech obvykle existuje v železnatém (Fe^{2+}) a železitém (Fe^{3+}) stavu s ferylovým Fe^{4+} stavem nalezeným v katalytických meziproduktech. Cytochromy jsou tedy schopné provádět reakce přenosu elektronů a katalýzy redukci nebo oxidaci jejich hemového železa. Buněčné umístění cytochromů závisí na jejich funkci. Lze je nalézt jako globulární proteiny a membránové proteiny (Palmer 1989, Yamanaka a Okunuki 1974).

Různé podtřídy cytochromů jsou organizovány podle typu hemu a rozsahu vlnových délek jejich redukovaných alfa-absorpčních pásů (Yamanaka a Okunuki 1974). Existuje několik typů cytochromů a lze je rozlišit spektroskopicky, přesnou strukturou hemové skupiny, citlivostí k inhibitoru a redukčním potenciálem. Patří sem: cytochrom a, cytochrom b, cytochrom c a cytochrom d (Yamanaka a Okunuki 1974). Kromě této klasifikace zavedené Mezinárodní unií biochemie a molekulární biologie (IUBMB) můžeme v biochemické literatuře nalézt i třídu cytochromu P450, který patří mezi hlavní enzym I. fáze biotransformace xenobiotik.

2.4.1 Cytochrom P450

Cytochromy P450 (CYP) patří do rozsáhlé skupiny hemoproteinů. Ve své redukované formě a při vazbě oxidu uhelnatého vykazují v UV-VIS spektru maximum při 450 nm. Nejčastěji se CYP vyskytují v játrech, významně se vyskytují i v ledvinách, gastrointestinálním traktu a v plicích, ale v menší míře se vyskytují v celém organismu.

V lidském genomu je známo 57 genů kódujících geny CYP a 35 jejich isoform. Nadrodina CYP se dělí na rodiny, podrodiny a jednotlivé isoformy (Skálová et al. 2017). Každý gen cytochromu P450 je označen *CYP*, což naznačuje, že je součástí genové skupiny cytochromu P450. Genu je také přiděleno číslo spojené se specifickou skupinou v genové skupině, písmeno představující genovou podskupinu a číslo přiřazené specifickému genu v podskupině. Například gen cytochromu P450, který je ve skupině 27, podskupině A, gen 1, je psán jako CYP27A1 (Genetics Home Reference 2020).

Podle katalytické funkce řadíme CYP mezi monooxygenázy tedy enzymy, které váží vzdušný kyslík, jehož molekulu následně štěpí. Po štěpení kyslíkové molekuly jeden kyslíkový atom zabudovávají do molekuly substrátu a druhý do molekuly vody. Za určitých podmínek mají ale i reduktázovou aktivitu. Jako reduktázy se chovají nejen ke kyslíku, ale i některým xenobiotikům. Při reduktázové aktivitě CYP vznikají vysoce reaktivní a toxické volné radikály, nejčastěji jsou tvořeny v centrálních jaterních lalůčkách. Při redukci O₂ vzniká superoxidový radikál a peroxid vodíku (Skálová et al. 2017).

CYP se podílejí i na metabolismu endogenních látek jako cholesterolu a steroidních hormonů, mastných kyselin, vitamínů rozpustných v tucích, žlučových kyselin a eikosanoidů. CYP účastníci se metabolismu eobiotik se nacházejí na endoplazmatickém retikulu a membránách mitochondrií.

Běžné variace (polymorfismy) v genech kódujících cytochrom P450 mohou ovlivnit funkci enzymů. Účinky polymorfismů jsou nejvíce patrné při metabolismu léků. V závislosti na genu a polymorfismu mohou být léčiva metabolizována rychle nebo pomalu. Pokud cytochrom P450 metabolizuje léčivo pomalu, zůstává léčivo aktivní déle a pro dosažení požadovaného účinku je ho potřeba méně. Lék, který je rychle

metabolizován, se rozkládá dříve a může být zapotřebí vyšší dávka, aby byl účinný. Enzymy cytochromu P450 představují 70 až 80 procent enzymů zapojených do metabolismu léčiv (Genetics Home Reference 2020).

V klinické praxi se vědomosti o funkci CYP využívá u polypragmzie. Polypragmzie má několik výhod, ale díky výskytu interakcí mezi léčivými přípravky (např. rostlinná léčiva, volně prodejná léčiva) a léky na předpis může způsobit nežádoucí účinky, jako je toxicita a selhání léčby (Grimm et al. 2009). Řada léků a chemikálií totiž může inhibovat nebo indukovat enzymy CYP, které metabolizují léčiva, což může vést ke vzniku toxicity nebo selhání léčby (Wrighton a Stevens 1992, Yan a Caldwell 2001).

Mezi nejvýznamnější zástupce lidských CYP patří CYP3A4, CYP2D6, CYP2C, CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 (Skálová et al. 2017). V experimentální části práce jsem se zabývala stanovením exprese mRNA CYP3A4 a CYP1A2, proto je zde podrobněji popíšu.

2.4.1.1 CYP3A4

CYP3A4 je nejdůležitější isoformou cytochromu P450 z hlediska biotransformace léčiv. Je hlavní formou vyskytující se v játrech a lidském střevě v menším množství se vyskytuje v ledvinách, placentě, plicích a mozku. Spolu s CYP3A5 a CYP3A7 je odpovědný za významnou část všech metabolických reakcí. Díky velké plasticitě jeho vazebného místa patří mezi jeho substráty řada xenobiotik (Švihovec et al. 2018).

Gen *CYP3A4* se nachází na chromosomu 7q21.1, je členem rodiny genů *CYP3A*, která se podílí na metabolizaci kyseliny arachidonové na kyselinu epoxyeikosatrienovou (Gao et al. 2020). Polymorfismus u *CYP3A4* není běžný, ale mezi jedinci se vyskytuje značná variabilita v jeho aktivitě způsobená značnou indukovatelností a citlivostí k inhibičním vlastnostem některých složek obsažených v potravě. Mezi induktory *CYP3A4* patří barbituráty, fenytoin, rifampicin, karbamazepin a dexamethason. Jako inhibitory *CYP3A4* působí makrolidová antibiotika, ketozonazol, dilthiazem atd. (Skálová et al. 2017).

Regulace exprese *CYP3A4* je regulována přes pregnanový X receptor (PXR). PXR je přítomen především v játrech, ale nachází se i v tenkém a tlustém střevě, ledvinách

a v žaludku. Aktivace PXR probíhá vazbou ligandu na receptor. Po vytvoření dimeru s retinoidním receptorem- α jsou jejich cílem specifické sekvence promotorové DNA regulovaných cílových genů (Skálová et al. 2017).

2.4.1.2 CYP1A1/2

Isoformy CYP1A1 a CYP1A2 se liší místem, kde jsou exprimovány. CYP1A2 je exprimován výhradně v játrech, zatímco CYP1A1 je exprimován v extrahepatální tkáni např. v GIT, plicích, ledvinách atd. Mezi induktory obou těchto isoform patří polycyklické aromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, heterocyklické aromatické aminy, kofein atd. (Skálová et al. 2017).

Indukce podrodiny CYP1A je zprostředkována přes receptory pro aromatické uhlovodíky (AhR). Jedná se o transkripční faktor regulující expresi cílových genů po aktivaci specifickými ligandy. AhR tvoří komplex s proteiny Hsp90, XAP2 a p23, tento komplex je neaktivní až do navázání ligandu, kdy dochází ke změně konformace, uvolnění Hsp90 a XAP2 z komplexu. Ligandem aktivovaný AhR přechází do jádra, kde se váže na protein ARNT (AhR nuclear translocator) a společně se vážou do regulačních oblastí cílových genů (Skálová et al. 2017).

3. CÍLE PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo ověřit stabilitu vybraných referenčních genů v ultratenkých lidských jaterních řezech, které byly vystaveny působení dimethylsulfoxidu (kontrola) nebo známých induktorů cytochromu P450, rifampicinu a β -naftoflavonu. Dále bylo mým cílem ověřit stabilitu exprese referenčních genů pomocí stanovení exprese mRNA CYP1A2 a CYP3A4. K dosažení vytýčených cílů bylo třeba:

- Připravit ultratenké lidské jaterní řezy (PCLS)
- Inkubovat PCLS s induktory CYP rifampicinem a β -naftoflavonem v koncentraci 10 μ M po dobu 24 hodin
- Stanovit životaschopnost PCLS prostřednictvím sledování změn hladin ATP a úniku LDH do média
- Stanovit exprese mRNA vybraných referenčních genů
- Zhodnotit stabilitu exprese vybraných genů a jejich použitelnost jako referenčních genů
- Validovat referenční geny pomocí expresní analýzy CYP1A2 a CYP3A4

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Biologický materiál

V této práci byla jako biologický materiál použita lidská játra, která byla získána ve spolupráci s Chirurgickou klinikou Fakultní nemocnice Hradec Králové. Částečná resekce jater, ze které biologický materiál pocházel, byla provedena z terapeutických důvodů (obvykle kvůli odstranění nádoru). Všechny experimenty byly schváleny Etickou komisí Fakultní nemocnice Hradec Králové (povolení č. 201703 S14P) a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Popis souboru dárců je uveden v Tab. 2.

Tabulka 2 Charakteristika souboru dárců

Dárce č.	Věk (roky)	Pohlaví	Rasa	Diagnóza	Komorbidity	Dlouhodobá farmakoterapie
1	26	Žena	Europoidní	Benigní fokální nodulární hyperplazie	Žádné	Žádná
2	81	Žena	Europoidní	Jaterní metastázy kolorektálního karcinomu	Arteriální hypertenze, diabetes mellitus 2. typu	Hydrochlorothi azid, betaxolol, insulin, acetylsalicylová kys., zolpidem
3	50	Muž	Europoidní	Metastázy neuroendokrinního tumoru	Diabetes mellitus 2. typu	Insulin

4.2 Příprava ultratenkých jaterních řezů

Pro přípravu a inkubaci ultratenkých řezů lidských jater bylo třeba den před krájením připravit Krebs-Henseleitův pufr a inkubační médium. Rovněž bylo potřeba vydezinfikovat 70 % lihem všechny části rozloženého kráječe, které přijdou do kontaktu s pufrům. Následně byl alobalem zakrytý kráječ umístěn v chladicí místnosti stejně jako inkubační médium a pufr.

4.2.1 Příprava Krebs-Henseleitova pufru

Složky pro přípravu Krebs-Henseleitova pufru jsou uvedené v Tab. 3. K přípravě pufru byla použita redestilovaná voda. Jeho pH bylo upraveno na hodnotu 7,4 pomocí roztoku HCl. Kvůli riziku vykrystalizování uhličitanů z pufru byl chlorid vápenatý přidávaný jako poslední složka. Na jedna játra bylo potřeba připravit přibližně jeden litr tohoto pufru.

Tabulka 3 Složení Krebs-Henseleitova pufru

Složka	Mr (g/mol)	c (mM)
Chlorid draselný (KCl)	74,56	3,92
Chlorid sodný (NaCl)	58,44	150,53
Hydrogenuhličitan sodný (NaHCO ₃)	84,01	25,00
Síran hořečnatý (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	246,48	1,10
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	138,00	1,01
HEPES	238,31	9,00
D-glukóza	180,16	24,98
Chlorid vápenatý (CaCl ₂)	147,02	1,36

4.2.2 Příprava média pro inkubaci

Médium určené k inkubaci jaterních řezů bylo medium William's E suplementované GlutaMAXem. Komerčně dodávané medium William's E suplementované GlutaMAXem (jedná se o stabilizovanou formu glutaminu – L-alanyl-L-glutamin) bylo v laminárním boxu obohaceno o gentamycin a L-glukosu (Tab. 4). Připravené medium bylo sterilně přefiltrováno přes filtr s velikostí pórů 0,22 µm.

Tabulka 4 Příprava média pro inkubaci jaterních řezů

Suplement	Mr	Objem media William's E s GLUTAMAXem		
		100 ml	500 ml	1000 ml
50 µg/ml gentamycin	477,6	100 µl	500 µl	1000 µl
L-glukosa	180,16	0,448 g	2,24 g	4,48 g

4.3 Příprava ultratenkých lidských jaterních řezů

V den krájení řezů byl Krumdieckův kráječ sestaven a zapojen. Přibližně hodinu před experimentem se studený Krebs-Henseleitův pufr nechal probublávat pneumoxidem (95 % O₂/5 % CO₂). Okysličeným Krebs-Henseleitovým pufrem byl naplněn kráječ a byla vyzkoušena funkčnost všech jeho částí. Kráječ byl připojen k termostatu s vodní lázní a byl chlazen vodou o teplotě 4 °C.

Na vykrajování válečků z lidských jater byl připraven tál s ledem a Petriho miskami s filtračním papírem a vykrajovač o průměru 8 mm. Krouživým pohybem vykrojené válečky jaterní tkáně byly vloženy do nástavce v kráječi a ten z nich následně krájel řezy o tloušťce 150-180 μm. Manipulace s vykrojenými válečky i řezy probíhala v chladu až do okamžiku předání do předehřátého inkubačního média.

4.4 Inkubace jaterních řezů

Řezy byly inkubovány v médiu William's E + GlutaMAX obohaceném o gentamycin a L-glukosu. Toto medium bylo asi hodinu před experimentem předehřáto na 37 °C. Každý řez byl umístěn do jedné jamky 12-jamkové destičky s 1 ml média bez testované látky. Následovala preinkubace 60 min, která zajistila odstranění poškozených a nekrotických buněk. Dalším krokem byla vlastní inkubace po přemístění řezů do nové 12-jamkové destičky s 1,3 ml média s/bez testované látky. Preinkubace i inkubace probíhaly v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 95% O₂/5% CO₂, destičky byly umístěny na třepače s horizontálním pohybem (90 otáček/hod). Inkubace byla ukončována v předem stanovených časech po -1 (před preinkubací), 0 (po preinkubaci), 4, 8, 12, 18 a 24 hodinách. Kontrolní řezy byly inkubovány v přítomnosti 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO), ostatní řezy byly inkubovány v přítomnosti 10 μM β-naftoflavonu nebo 10 μM rifampicinu. Zásobní roztoky rifampicinu i β-naftoflavonu byly připraveny rozpuštěním přesné navážky látky v DMSO. Konečná koncentrace DMSO v jednotlivých jamkách byla 0,1 %.

Po uplynutí každého inkubačního času byly řezy vyjmuty pomocí kopisty a opláchnuty v 0,154 M KCl pufru obsahujícím 50 mM Tris-HCl (pH 7,4). Následovalo stanovení životnosti jaterních řezů a izolace RNA. Jaterní řezy byly inkubovány v hexaplikátu pro každou testovanou látku a délku inkubace, následně byla ve třech

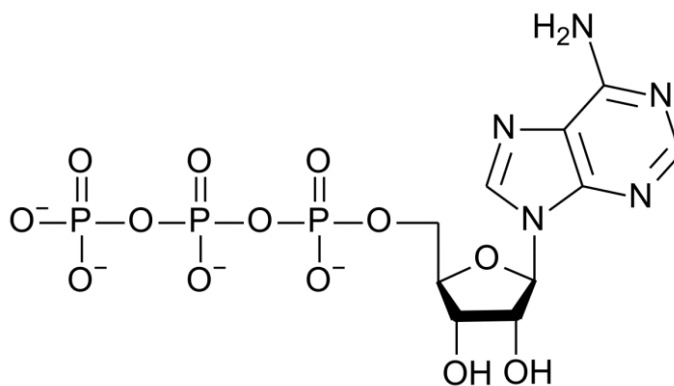
řezech stanovena koncentrace adenosin trifosfátu (ATP) a ze tří řezů byla vyizolována RNA.

4.5 Stanovení životnosti tkáňových řezů

Jako ukazatel životnosti jaterních řezů bylo použito stanovení hladiny ATP v jaterních řezech a aktivita laktátdehydrogenázy (LDH) v homogenátu jaterních řezů a v inkubačním médiu, které byly odebrané po inkubaci v čase 0, 4, 8, 12, 18, 24 hodin. V jaterních řezech byla stanovena hladina ATP pomocí ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II (Roche, Mannheim, Německo). Aktivita LDH se v jaterních řezech a v médiu stanovovala pomocí testu cytotoxicity LDH (Roche, Mannheim, Německo).

4.5.1 Stanovení hladiny ATP

Adenosin trifosfát (Obr. 4) je tvořen z adenosinu a trojice fosfátů vázaných na 5' - uhlíku. Je významným zdrojem energie pro funkci všech buněk, která je uvolňována při jeho rozkladu na ADP a fosfát.



Obrázek 9: Adenosin trifosfát (Mysid, 2007)

Principem stanovení ATP pomocí ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II je jeho účast při oxidaci luciferinu za pomoci enzymu luciferázy. Oxidace způsobí převod molekuly do excitovaného stavu a při návratu do stavu s nižší energií dochází k uvolnění energie ve formě světla s emisním maximem 562 nm.



Jednotlivé řezy byly po ukončení inkubace přeneseny do 150 μl homogenizačního pufru (70% etanol, 2 mM EDTA, pH 10,9) a okamžitě umístěny do

hlubokomrazícího boxu do další analýzy. Po rozmrazení byl homogenizační pufr doplněn do objemu 1 ml a do mikrozkušavky byly přidány drobné skleněné kuličky. Jaterní řezy byly homogenizovány s využitím homogenizátoru FastPrep-24 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Homogenát byl centrifugován po dobu 5 minut při 12 000 g a 4°C. Obsah ATP byl změřen s pomocí ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II v černé 96 jamkové destičce s plochým dnem. K 5 μ l homogenátu bylo do jamky přidáno 45 μ l TRIS/EDTA (100 mM TRIS, 2 mM EDTA, pH 8). Hladina ATP byla vyhodnocena z kalibrační křivky standardu ATP rozpuštěného v TRIS/EDTA pufru. K měření luminiscence byl využit Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko). Hladina ATP byla normalizována na koncentraci proteinu. Homogenizační pufr byl odpařen a peleta byla zahřívána ve 200 μ l 5 mM NaOH po dobu 30 minut při 37°C. Následně bylo přidáno 800 μ l destilované vody ke zředění koncentrace NaOH na 1 mM. Koncentrace proteinu byla změřena metodou s bicinchoninovou kyselinou (BCA) proti kalibrační přímce, kde jako standard sloužil hovězí sérový albumin. Vzorky byly 10x zředěny a hovězí sérový albumin byl rozpuštěn v 0,1 mM NaOH.

4.5.2 Stanovení aktivity laktátdehydrogenázy (LDH)

Únik LDH do kultivačního média byl určen jako marker poškození plazmatické membrány. Pro analýzu bylo všechno kultivační médium odebráno a udržováno při -80°C až do dalšího použití. Po rozmrazení bylo médium centrifugováno v centrifuze Heraeus Biofuge Stratos při 10.000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut při teplotě 4°C, aby se odstranily buněčné úlomky. K měření celkové aktivity LDH byly tři řezy po 24 hodinách inkubace homogenizovány v kultivačním médiu, ve kterém byly inkubovány, homogenizačními tyčinkami a homogenát byl zpracován stejným způsobem jako testovaná kultivační média. Tato aktivita LDH byla brána jako 100 % maximální možné aktivity v médiu. Aktivita LDH byla stanovena za použití Cytotoxicity detection kit (LDH) (Roche, Mannheim, Německo). Na destičku s plochým dnem bylo pipetováno 100 μ l supernatantu a 100 μ l reakční směsi. Destička byla inkubována po dobu 30 minut při 37°C. Absorbance technických duplikátů byla měřena při vlnové délce 490 nm pomocí čtečky desek Tecan Infinite M200 (Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko) a únik LDH do média byl vyjádřen jako % celkové aktivity LDH.

4.6 Izolace RNA

K izolaci RNA byl použit TRIzol (specifická směs fenolu a guanidinisotiokyanátu) umožňující její selektivní izolaci i z malého množství buněk. Vzhledem k toxicitě TRIzolu a nutnosti vyhnout se možné kontaminaci RNAzami, byla izolace prováděna v PCR boxu. K ředění etanolu a rozpuštění pelet byla použita DEPC voda připravená přidávkem 0,1% dietylpyrokarbonátu (DEPC) do redestilované vody (1 l ddH₂O + 1 ml DEPC). DEPC voda byla autoklávována při 120°C po dobu 20 minut.

Roztoky :

- DEPC voda
- TRIzol
- Chloroform
- Isopropanol
- 75% etanol

4.6.1 Homogenizace

Do jednotlivých mikrozkušavek s jaterními řezy bylo pipetováno 500 µl TRIzolu a byla provedena homogenizace za pomoci kuličkového homogenizátoru (dva cykly 40 s, 6 m/s). Po homogenizaci bylo přidáno 100 µl chloroformu a následovalo intenzivní protřepání po dobu 15 s. Vzorky se nechaly stát 2-3 minuty při pokojové teplotě a následně se centrifugovaly v chlazené centrifuze Heraeus (4°C, 15 minut, 12 000 x g). K dalšímu kroku byla použita přepipetovaná horní vodná fáze, ke které bylo pipetováno 250 µl isopropanolu. Vzorky se protřepaly, nechaly se stát 10 minut při pokojové teplotě a centrifugovaly v chlazené centrifuze Heraeus (4°C, 10 min, 12 000 x g). Po odstranění supernatantu byly pelety omyty 0,5 ml 75% etanolu, protřepány a zcentrifugovány v chlazené centrifuze Heraeus (4°C, 5 min, 7500 x g). Supernatant byl úplně odstraněn skleněnou pipetou s vytaženým koncem a peleta se nechala na vzduchu 10 minut usušit. Když začala zprůhledňovat, byla rozpuštěna ve 40 µl DEPC vody. Vzorky byly důkladně protřepány a po 5 minutách při pokojové teplotě byly znovu promíchány a poté uloženy na led.

4.6.2 Měření koncentrace RNA

K měření koncentrace RNA byl použit spektrofotometr NanoDrop. Kromě koncentrace byla sledována i kontaminace RNA proteiny z poměru absorbancí při 260 nm (DNA) a 280 nm (proteiny). Tento poměr by měl mít hodnotu >1,8. Rovněž byla sledována kontaminace fenolem z poměru absorbancí při 260 nm (DNA) a 230 nm (fenol), tento poměr by měl mít hodnotu blízkou dvěma.

Před měřením se nejprve zapne počítač, kde se otevře program NanoDrop a zvolí se modul „Nucleic acid“. Rameno NanoDropu se odklopí, spodní ploška se očistí 2 μ l H₂O, rameno se přiklopí, stiskne se OK, následně se rameno opět odklopí a spodní ploška se otře buničinou. V programu se otevře tabulka pro měření. Nejprve se nanese opět 2 μ l H₂O a v programu se nastaví „Blank“, po jeho změření se buničinou otřou obě plošky ramena NanoDropu, na spodní plošku se nanese 2 μ l vzorku, který se změří. Po změření všech vzorků se z programu vyexportuje tabulka s výsledky.

4.6.3 Ošetření DNázou

Izolovanou RNA je z důvodu možné kontaminace genomovou DNA nutné před dalším použitím ošetřit DNázou. DNáza I patří mezi endonukleázy hydrolyticky štěpící řetězce ssDNA a dsDNA za vzniku mono- a oligodeoxyribonukleotidů a její použití zajišťuje selektivní odstranění genomové DNA (LabGuide 2014).

Roztoky:

- Zásobní roztok 0,5 M EDTA pH 8,0
- 0,1 M EDTA pH 8,0
- DEPC H₂O

K přípravě zásobního roztoku 0,5 M EDTA bylo použito 18,61 g EDTA, 80 ml DEPC H₂O a 2 g NaOH. V roztoku bylo za stálého míchání monitorováno pH a postupně byl přidáván další NaOH ve formě pelet. EDTA se rozpustila až když se pH blížilo hodnotě 8,0. Roztok byl následně doplněn do 100 ml DEPC H₂O. Ředěním zásobního roztoku 1:4 s ddH₂O byl získán 0,1 M roztok EDTA pH 8,0.

Reakční směs pro 1 vzorek:

- 3 µl pufr (10x DNase buffer)
 - 1 µl DNázy
-
- 6 µg RNA (objem přepočten dle změřené koncentrace na Nanodropu)
 - X µl DEPC H₂O (množství dopočítáno do celkového objemu směsi 30 µl)

Prvním krokem byla příprava mastermixu, který obsahoval pufr a DNázu, pro odpovídající počet vzorků. Mastermix byl dobře promíchán na vortexu a stočen ve stolní minicentrifuze. Následně byl po 4 µl rozpipetován do příslušných mikrozkušavek. Do každé 0,5 ml mikrozkušavky bylo následně přidáno 6 µg RNA (vypočtený objem dle změřené koncentrace) s odpovídajícím množstvím DEPC H₂O. Takto připravená reakční směs byla promíchána na vortexu a inkubována ve stolním inkubátoru 25 minut při 37°C s třepáním 500 otáček/min. Po ukončení inkubace bylo pro inaktivaci DNázy přidáno ke směsi 1,5 µl 0,1M EDTA a následovala inkubace 10 min při 75°C. V posledním kroku bylo přidáno do každé zkumavky 16,5 µl DEPC H₂O.

Výsledná koncentrace RNA po ošetření DNázou byla 0,125 µg/µl. Takto upravené vzorky RNA byly připraveny pro reverzní transkripci. Vzorky byly uchovávány v mrazicím boxu při -80°C.

4.7 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu primární sekvence nukleotidů RNA do vlákna DNA a vzniká tak řetězec cDNA („*complementary DNA*“). Řetězec cDNA je na rozdíl od RNA odolnější vůči rychlé degradaci. Enzymaticky je tento proces zajišťován RNA-dependentními DNA-polymerázami (Beránek 2016).

Reagencie:

- Reverzní transkriptáza (RT) ProtoScript II (NEB)
- Reakční pufr
- DTT (10x dodáván s RT)
- Směs dNTP (každý 5 mM)

- RNaseIN (inhibitor RNázy)
- Náhodné hexamery
- DEPC H₂O

Pro reverzní transkripci byly připraveny dvě paralelní sady vzorků, jedna s RT (RT+) a druhá bez RT (RT-), která slouží jako negativní kontrola. Do 0,2 ml mikrozkumavek bylo pipetováno 8 μ l RNA ošetřené DNázou o koncentraci 0,125 μ g/ μ l ze všech námi připravených vzorků a 1 μ l náhodných hexamerů. Takto připravená směs byla zahřívána v PCR cykléru 5 min při 65°C. Po uplynutí této doby byly vzorky vloženy na led a stočeny v minicentrifuze. V dalším kroku bylo do obou sad pipetováno 11 μ l mastermixu, jehož složení je uvedeno v tabulce 4. Po promíchání a stočení byla směs zahřívána v PCR cykléru nejprve 10 min při 25°C pro nasednutí náhodných hexamerů, následně 50 minut při 42°C, kdy probíhala syntéza cDNA a 5 minut při 80°C pro denaturaci RT.

Po ukončení reverzní transkripce bylo ke směsi pipetováno 80 μ l redestilované vody, došlo tak k naředění vzniklé cDNA 5x a do následující PCR reakce bylo použito 5 μ l cDNA odpovídající 50 ng RNA. Takto připravenou cDNA bylo možné dále uchovávat při -20°C.

Tabulka 5 Složení mastermixu pro RT+ a RT-

Složky	RT+	RT-
Pufr 5x	4 μ l	4 μ l
DTT	2 μ l	2 μ l
dNTPs	4 μ l	4 μ l
RT	0,5 μ l	-----
DEPC H ₂ O	0,5 μ l	0,5 μ l

4.8 Real-Time PCR

Metoda Real-Time PCR se používá ke kvantifikaci DNA a RNA po reverzní transkripci. S využitím speciálního cykléru je sledován průběh každého cyklu a kontinuálně je zaznamenáváno množství produktů (amplikonů). K jejich detekci se

využívá fluorescence, která vzniká díky interkalačním látkám (např. SYBR green, etidiumbromid) nebo fluorescenčním sondám (např. TaqMan sondy), které během PCR hybridizují k řetězcům vznikajících amplikonů (Beránek 2016).

Reagencie:

- qPCR kit (xCEED-Biotech) obsahující DNA polymerázu, dNTPs, pufr a SYBR Green I
- F (forward) Primer – ředěný na koncentraci 5 μ M
- R (reverse) Primer – ředěný na koncentraci 5 μ M
- ddH₂O
- cDNA

Použité primery navrhla doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D. pomocí programu Primer3 (Untergasser et al., 2012) a jejich syntéza proběhla ve firmě Generi Biotech, Hradec Králové. U navržených primerů byla kontrolována jejich předpokládaná sekundární struktura, tvorba primer-dimerů a vlásenek v amplikonu a v případě výskytu těchto nežádoucích jevů byla struktura navržených primerů příslušně upravena. Sekvence použitých primerů a další údaje jsou uvedeny v tabulce 5. Před vlastním použitím byla ověřena funkčnost a účinnost použitých primerů. Vzhledem k tomu, že toto ověření proběhlo již v předchozích experimentech a sama jsem se ho neúčastnila, tak tento proces není v mojí diplomové práci popisován.

Tabulka 6 Informace o referenčních a cílových genech a struktura navržených primerů

Zkratka	Číslo v genové bance	Název genu	Fyziologická funkce	Sekvence primerů 5'-3'
Referenční geny pro normalizaci mRNA				
ACTB	NM_001101.4	β-aktin	Strukturní protein cytoskeletu	F: TCCCTGGAGAAGAGCTACGAG R: CAGGAAGGAAGGCTGGAAGAG
B2M	NM_004048.2	β2-mikroglobulin	Součást histokompatibilních antigenů na povrchu buněk	F: TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATC R: TCTCTGCTCCCCACCTCTAAG
GAPDH	NM_002046	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa	Enzym glykolýzy	F: GAGTCCACTGGCGTCTTCAC R: GAGGCATTGCTGATGATCTTGAG
HPRT1	NM_000194.2	Hypoxanthin-fosforybosltransferasa 1	Enzym záchranné dráhy metabolismu purinů	F: TGGTCAGGCAGTATAATCCAAAGA R: TTCAAATCCAACAAAGTCTGGCT
SDHA	NM_004168.3	Sukcinátdehydrogenasa, podjednotka A	Součást citrátového cyklu a dýchacího řetězce	F: TGGGAACAAGAGGGCATCTG R: ACCACCACTGCATCAAATTCATG
YWHAZ	NM_003406.3	Tyrosin-3-monooxygenasa/tryptofan-5-monooxygenasa aktivační protein ζ	Součást celé řady signálních drah	F: TGATCCCCAATGCTTCACAAG R: GCCAAGTAACGGTAGTAATCTCC
Cílové geny				
CYP1A2	NM_000761	Cytochrom P450 rodina 1, podrodina A, člen 2	I. fáze biotransformace	F: CTTCCTGAGAGTAGCGATGAGA R: GCAGTCTCCACGAACTCATGAG
CYP3A4	NM_017460.5	Cytochrom P450 rodina 3, podrodina A, člen 4	II. fáze biotransformace	F: CCCCTGAAATTAAGCTTAGGAGG R: CTGGTGTTCTCAGGCACAGA

Vlastní reakce probíhala na 96jamkových destičkách, do kterých se pipetovalo 15 μ l mastermixu, jeho složení je popsáno v tabulce 6, a 5 μ l cDNA. Koncentrace forward i reverse primerů v destičce byla 250 nM. Vzorky byly stanovovány v duplikátech. Po napipetování jednotlivých složek, byla destička uzavřena speciální folií, krátce stočena při 3000 x g a vložen do PCR cykléru Quant Studio 6, ve kterém následně probíhala amplifikace.

Tabulka 7 Složení mastermixu pro qPCR

Složky mastermixu	Objem v μ l (1 vzorek)
Voda	4,2
qPCR kit	10,0
F Primer	0,4
R Primer	0,4
Celkové množství mastermixu	15 μ l
cDNA	5
Celkové množství mastermix + cDNA	20 μ l

4.9 Analýza dat

Výstupem z RT-qPCR byly hodnoty C_T („*threshold cycle*“, prahový cyklus) pro každý vzorek a gen, které byly exportovány do Excelu. Z C_T hodnot jednotlivých duplikátů byl vypočítán aritmetický průměr. Byly zkontrolovány odchylky mezi cykly v duplikátech a při odchylce větší, než půl cyklu nebyly tyto hodnoty zařazeny do souboru dat. Stabilita použitých referenčních genů byla hodnocena pomocí webového nástroje RefFinder, který integruje programy geNorm, BestKeeper, NormFinder a komparativní ΔC_T metodu. Tento webový nástroj vyhodnotil stabilitu referenčních genů na základě údajů z jednotlivých programů a určil jejich pořadí. Optimální počet referenčních genů, které by měly být použity k relativnímu hodnocení genové exprese cílových genů, byl zjištěn pomocí programu geNorm.

Při validačním experimentu byla využita komparativní ΔC_T metoda pro stanovení relativního množství mRNA CYP1A2 a CYP3A4 (Schmittgen a Livak 2008). Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. Rozdíly mezi kontrolními a ovlivněnými

skupinami byly provedeny pomocí two-way ANOVA v programu GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Rozdíly jsou brány jako statisticky významné při $p < 0,05$.

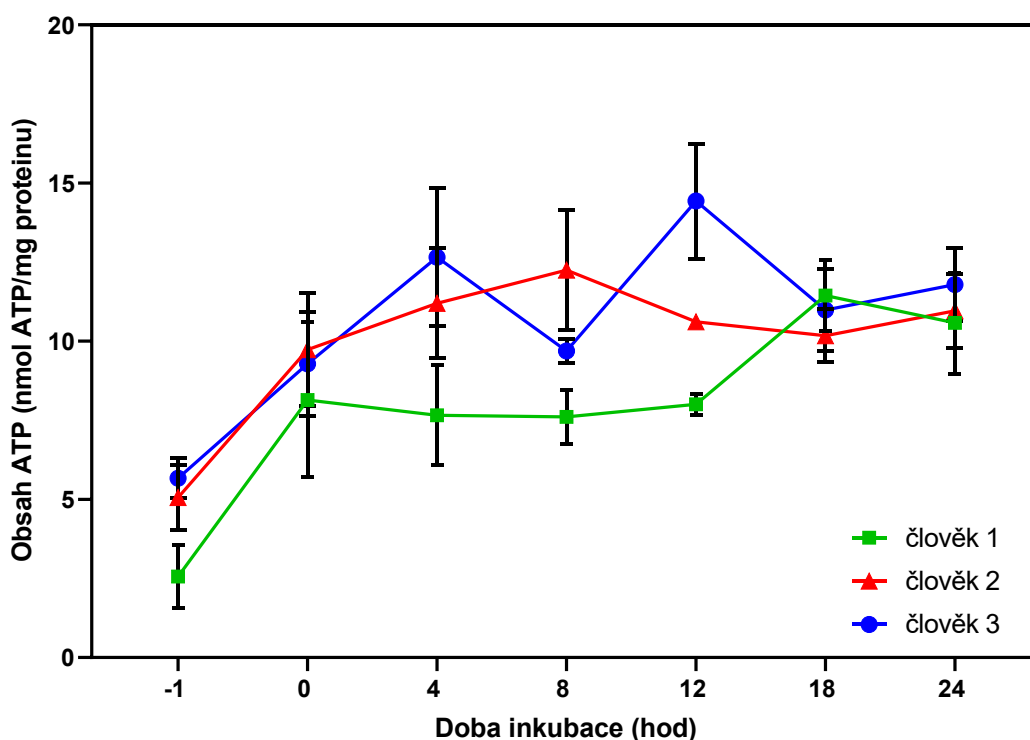
5. VÝSLEDKY

5.1 Životaschopnost PCLS

Důležitou roli ve stanovení míry exprese genů hraje životaschopnost PCLS, která by mohla nepředvídatelně ovlivnit míru exprese sledovaných genů. Jako markery životaschopnosti byly sledovány obsah ATP a únik laktátdehydrogenázy.

5.1.1 Obsah ATP

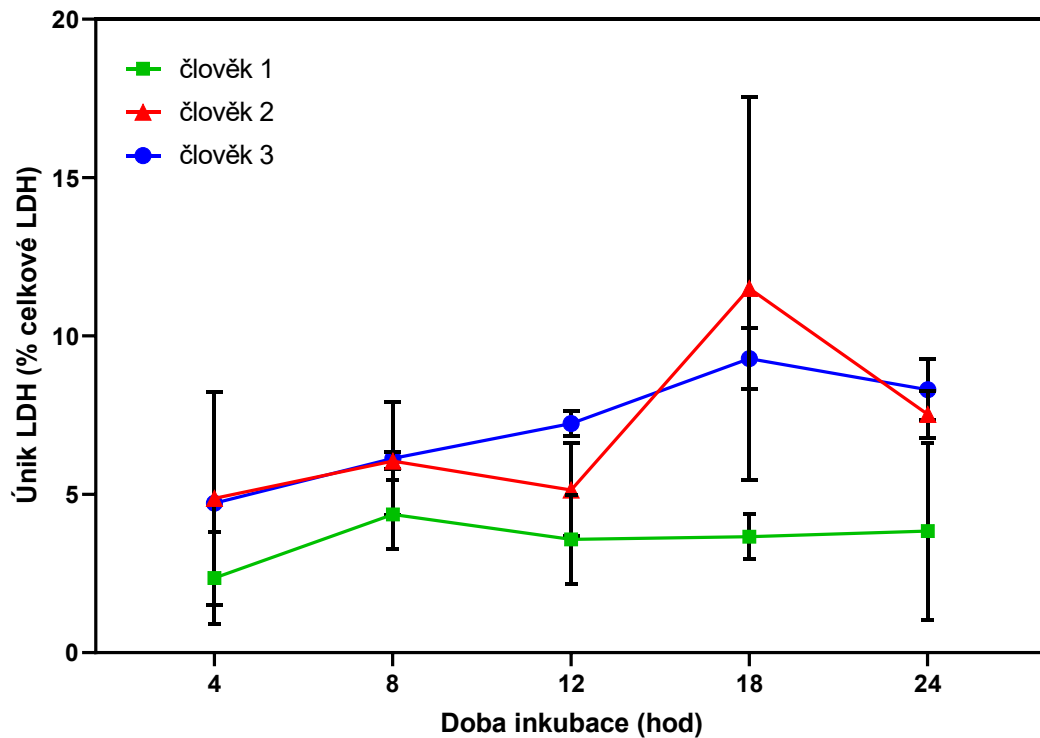
Na obrázku 10 jsou zobrazeny výsledky stanovení obsahu ATP v ultratenkých jaterních řezech během 24 h inkubace. Z naměřených hodnot vyplývá, že během preinkubace došlo ke zvýšení hladiny ATP ve všech vzorcích, důvodem bylo pravděpodobně obnovení mitochondriálních funkcí po ischemii způsobené při chirurgickém zákroku. V dalších částech experimentu zůstaly hodnoty ATP již poměrně stabilní.



Obrázek 10: Změny v obsahu ATP v ultratenkých lidských jaterních řezech během 24-hodinové inkubace. Vzorky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD (n = 3).

5.1.2 Únik LDH do média

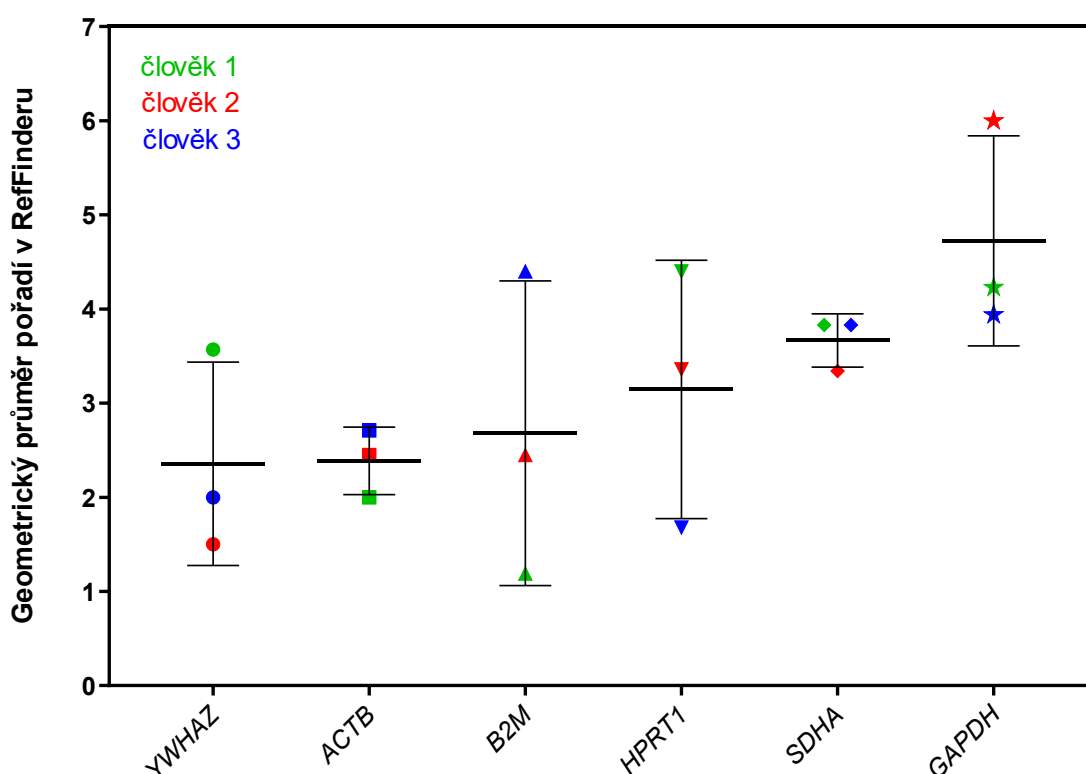
Obrázek 11 zobrazuje únik LDH z ultratenkých jaterních řezů do média. Z výsledků vyplývá že, únik LDH do média obvykle nepřekročil 10 % celkové aktivity LDH, což znamená, že plazmatické membrány jaterních buněk nebyly nijak významně poškozeny.



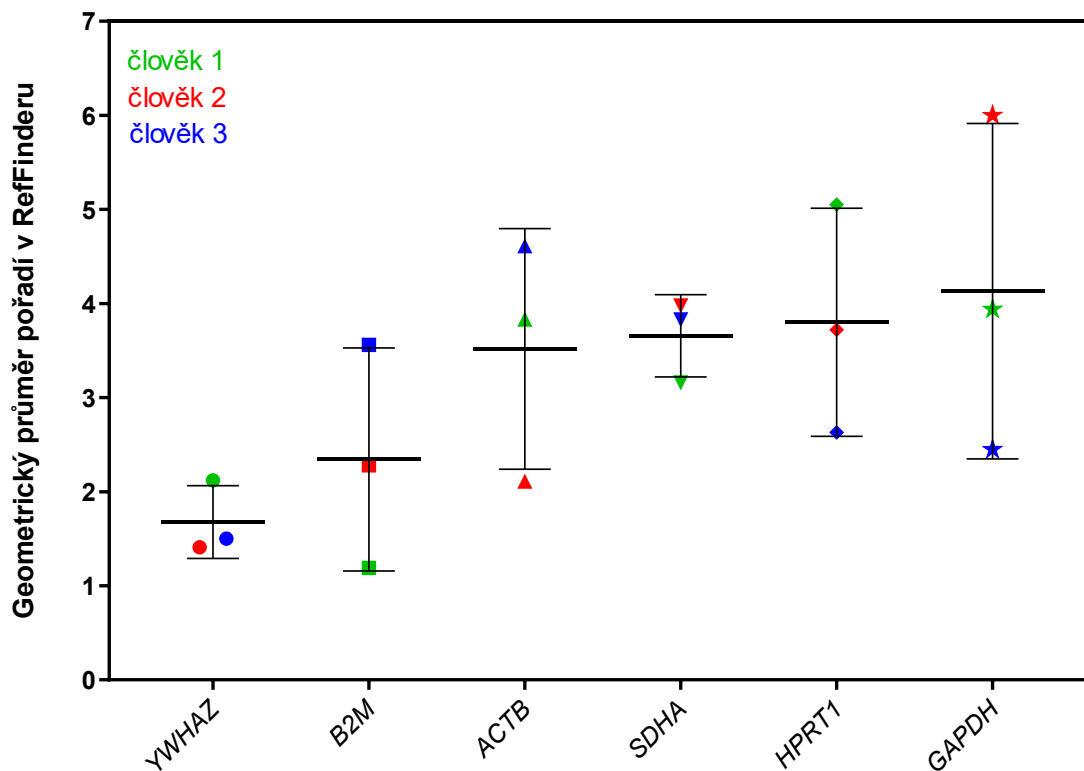
Obrázek 11: Únik LDH z ultratenkých lidských jaterních řezů do media během 24-hodinové inkubace. Vzorky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD (n = 3).

5.2 Stabilita exprese kandidátních referenčních genů

Pomocí programu RefFinder bylo určeno pořadí jednotlivých kandidátních genů. Rozdíly ve stabilitě jednotlivých testovaných genů byly malé. V případě stability kontrolních vzorků inkubovaných s DMSO je pořadí následující: YWHAZ > ACTB > B2M > HPRT1 = SDHA > GAPDH (Obrázek 12). Nejstabilnějším genem tedy byl YWHAZ, zatímco nejméně stabilním byl GAPDH. Zatímco pořadí stability v řezech inkubovaných v přítomnosti DMSO 0,1%, rifampicinu 10 μ M nebo β -naftoflavonu 10 μ M bylo YWHAZ > B2M > ACTB > HPRT1 = SDHA = GAPDH (Obrázek 13).

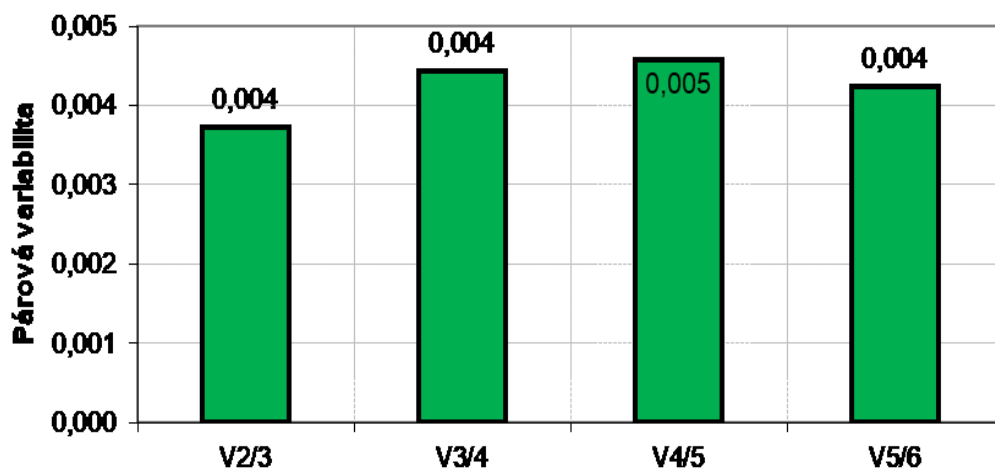


Obrázek 12: Pořadí jednotlivých kandidátních genů v programu RefFinder pro ultratenké lidské jaterní řezy z kontrolní skupiny. Řezy byly inkubovány v přítomnosti DMSO 0,1% po dobu 24 hodin.

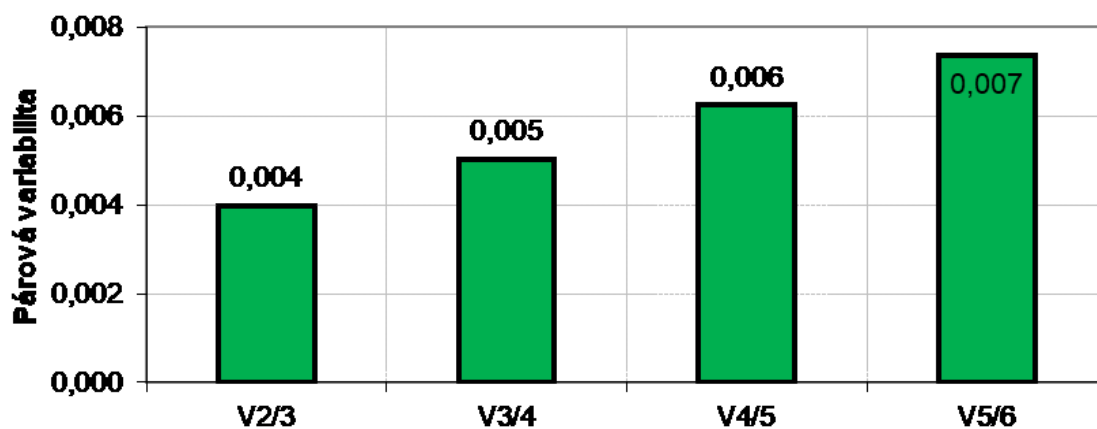


Obrázek 13: Pořadí jednotlivých kandidátních genů v programu RefFinder pro ultratenké lidské jaterní řezy z ovlivněných skupin. Řezy byly inkubovány v přítomnosti DMSO 0,1%, rifampicinu 10 μ M nebo β -naftoflavonu 10 μ M po dobu 24 hodin.

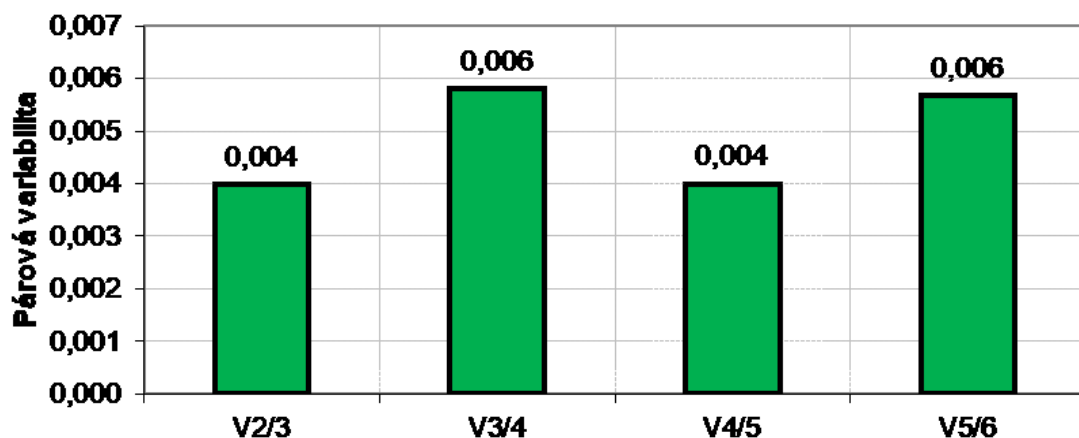
Použitím programu geNorm byl pomocí výpočtu párové variace genů pro jednotlivé pacienty určen optimální počet referenčních genů. Z výsledků je patrné, že hodnota párové variace $V_{2/3}$ je jak u kontrolních, tak u ovlivněné skupiny $<0,15$ což je hodnota cut-off definována v práci Vandesompele et al. (2002). Z toho vyplývá, že použití dvou referenčních genů je ve zkoumaných PCLS dostačující (Obrázky 14-18).



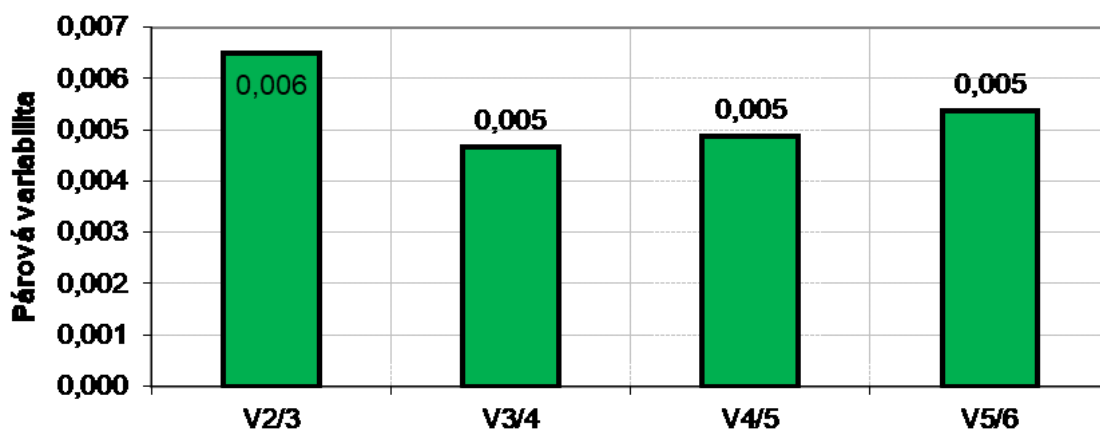
Obrázek 14: Určení optimálního počtu referenčních genů v programu geNorm pro normalizaci mRNA. PCLS (pacient 1) byly inkubovány s DMSO po dobu 24 hodin.



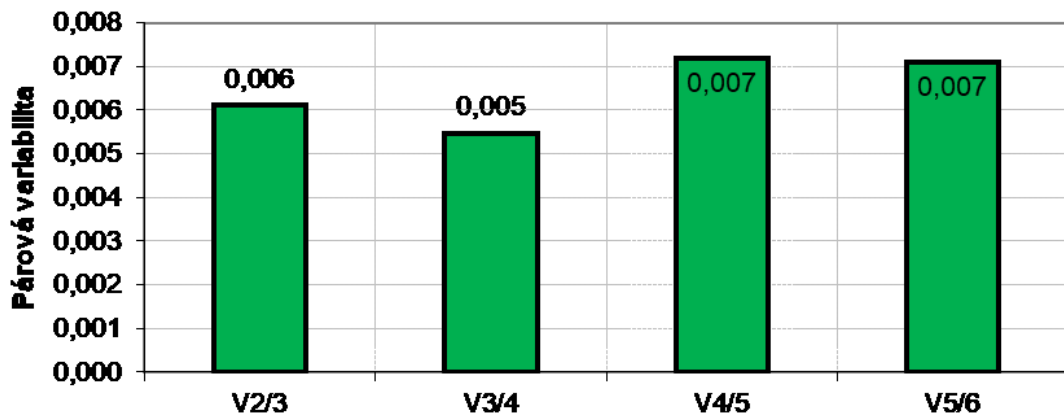
Obrázek 15: Určení optimálního počtu referenčních genů v programu geNorm pro normalizaci mRNA. PCLS (pacient 2) byly inkubovány s DMSO po dobu 24 hodin.



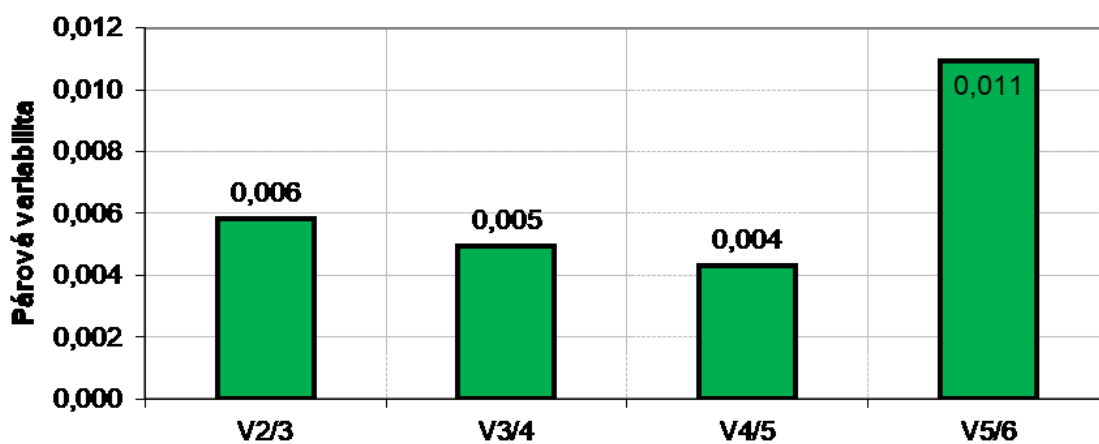
Obrázek 16: Určení optimálního počtu referenčních genů v programu geNorm pro normalizaci mRNA. PCLS (pacient 3) byly inkubovány s DMSO po dobu 24 hodin.



Obrázek 17: Určení optimálního počtu referenčních genů v programu geNorm pro normalizaci mRNA. PCLS (pacient 1) byly inkubovány s DMSO, RIF a BNF po dobu 24 hodin.



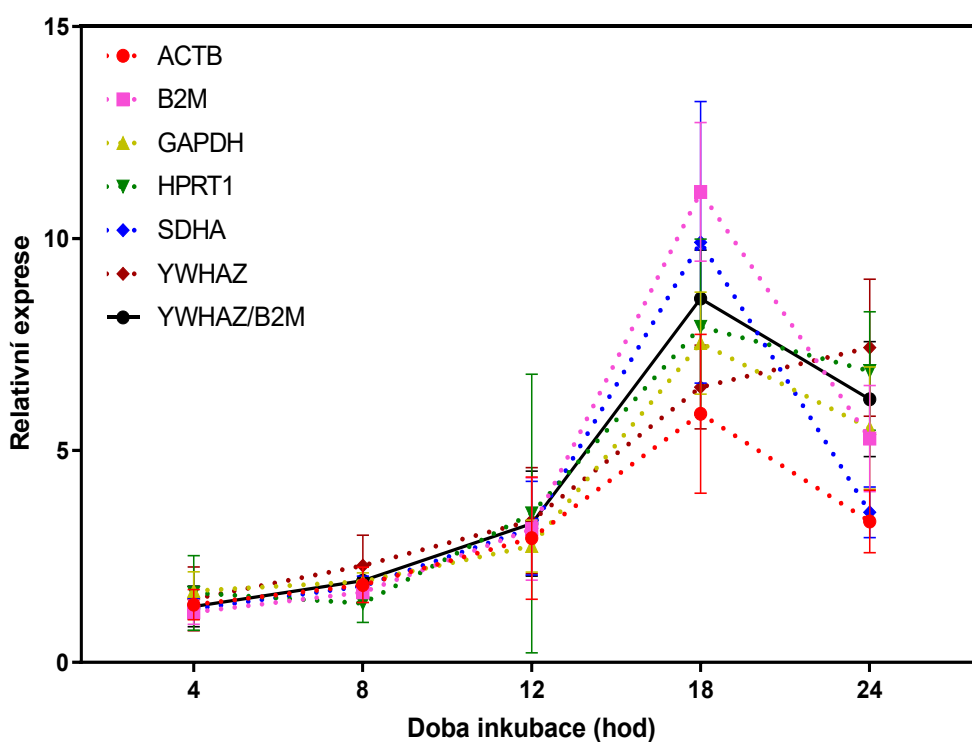
Obrázek 18: Určení optimálního počtu referenčních genů v programu geNorm pro normalizaci mRNA. PCLS (pacient 2) byly inkubovány s DMSO, RIF a BNF po dobu 24 hodin.



Obrázek 19: Určení optimálního počtu referenčních genů v programu geNorm pro normalizaci mRNA. PCLS (pacient 3) byly inkubovány s DMSO, RIF a BNF po dobu 24 hodin.

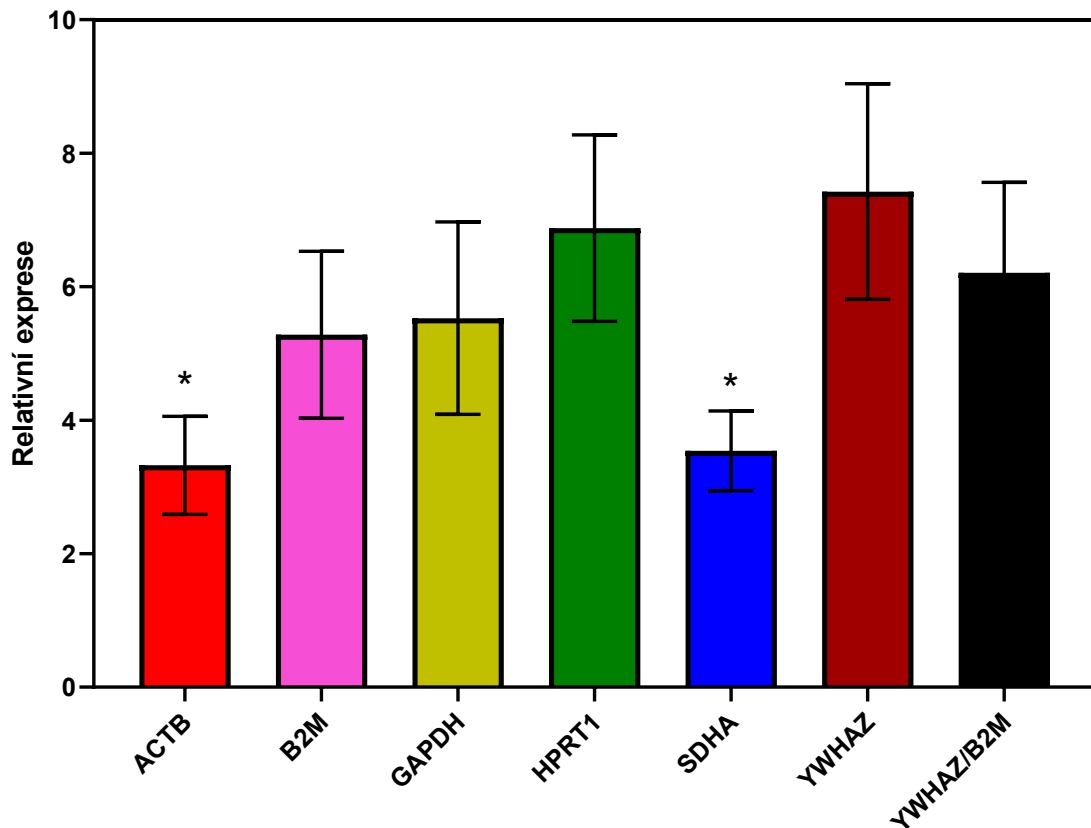
5.3 Validace referenčních genů

Výběr referenčních genů může mít dopad na výpočty a další interpretaci celkových výsledků. Analyzovali jsme expresi CYP3A4 u pacienta 1 při použití jednotlivých referenčních genů pro normalizaci výsledků. Výběr referenčních genů před experimentem prokázal, že testované kandidátské geny mají dostatečnou stabilitu v čase a mohly by být použity pro normalizaci. Obrázek 20 ukazuje, jak moc mohou být rychlost a trend exprese cílového genu ovlivněny výběrem referenčního genu v experimentech s PCLS. Pokud byl jako referenční gen použit ACTB, B2M, GAPDH, HPRT nebo SDHA, tak se exprese CYP3A4 během prvních 18 hodin inkubace zvýšila 6 až 10krát a poté začala klesat, zatímco při použití YWHAZ pro normalizaci stoupala exprese CYP3A4 během celé inkubační doby.



Obrázek 20: Vliv různých normalizačních postupů na expresi CYP3A4 v PCLS (pacient 1) v průběhu 24-hodinové inkubace. Relativní exprese genu CYP3A4 byla normalizována na jeden referenční gen nebo kombinaci referenčních genů. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD (n=3).

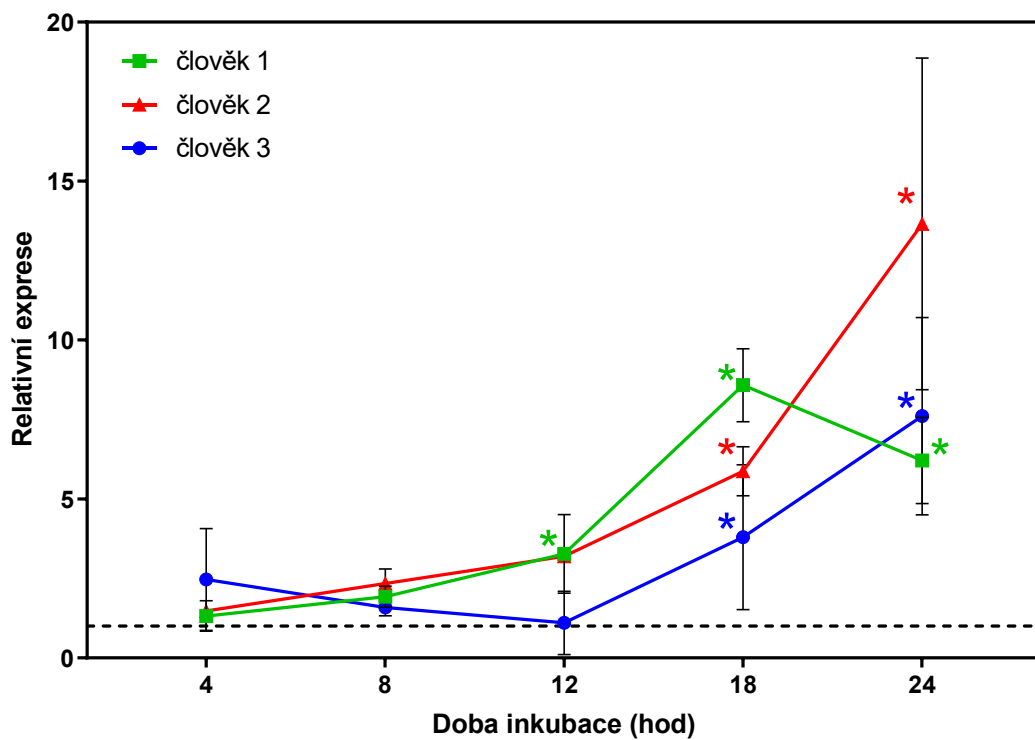
Obrázek 21 ukazuje relativní expresi CYP3A4 po 24 hodinách inkubace při normalizaci na jeden referenční gen nebo geometrický průměr dvou referenčních genů, které byly zvoleny jako nejstabilnější. Z výsledků je patrné, že při použití referenčních genů ACTB a SDHA je výsledná hodnota statisticky významně nižší, než při použití normalizace na YWHAZ/B2M, a mohlo by tedy při jejich použití dojít ke zkreslení výsledků experimentu.



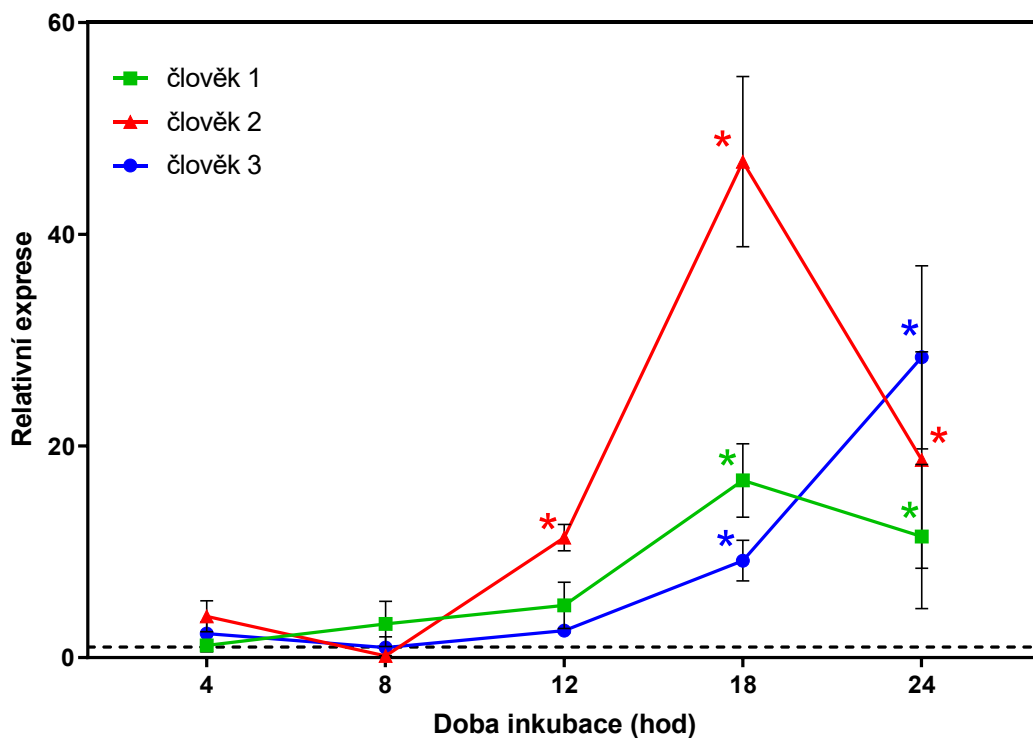
Obrázek 21: Vliv různých normalizačních postupů na expresi CYP3A4 v PCLS (pacient 1) po 24 hodinách inkubace. Relativní exprese genu CYP3A4 byla normalizována na jeden referenční gen nebo kombinaci referenčních genů. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD (n=3). * významně se liší od YWHAZ/B2M s $p < 0,05$ (two-way ANOVA, Fisherův LSD test).

Abychom zhodnotili zvolené referenční geny, rozhodli jsme se porovnat účinky induktorů CYP rifampicinu a β -naftoflavonu na expresi CYP3A4, respektive CYP1A2 za použití normalizace na YWHAZ/B2M. Z výsledků vyplývá, že časový interval, kdy indukce mRNA cílového genu CYP1A2 i CYP3A4 dosáhla maxima se liší mezi jednotlivými lidskými vzorky a pohybuje se mezi 18 až 24 hodinami. U vzorků člověk 2

a člověk 3 lze nalézt podobný trend v expresi CYP1A2 a CYP3A4, zatímco u člověka 2 byl v trendech dosažení maximální exprese CYP1A2 a CYP3A4 významný rozdíl. V případě vzorku člověk 2 bylo dosaženo maxima relativní exprese mRNA pro CYP1A2 po 18 h inkubace a pro CYP3A4 po inkubaci 24 hodin (Obrázek 22 a 23).



Obrázek 22: Relativní mRNA exprese CYP3A4 v PCLS ovlivněných rifampicinem 10 µM. Data byla normalizována na geometrický průměr genů YWHAZ a B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD (n=3). Vodorovná přerušovaná čára znázorňuje expresi odpovídající kontroly = 1. * významně se liší od kontroly s $p < 0,05$ (two-way ANOVA).



Obrázek 23: Relativní mRNA exprese CYP1A2 v PCLS ovlivněných β -naftoflavonem 10 μ M. Data byla normalizována na geometrický průměr genů YWHAZ a B2M. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr \pm SD (n=3). Vodorovná přerušovaná čára znázorňuje expresi odpovídající kontroly = 1. * významně se liší od kontroly s $p < 0,05$ (two-way ANOVA).

6. DISKUZE

Ultratenké jaterní řezy jsou často používaným *in vitro* modelem zejména při biochemických, farmakologických a toxikologických studiích. Důvodem je zachování buněčné architektury tkáně, a tedy i jejích funkcí. Ačkoliv je tento modelový systém využíván v celé řadě laboratoří, výběr vhodných referenčních genů pro normalizaci dat z RT-qPCR zatím nebyl řešen. Výběr referenčních genů je přitom při analýze genové exprese zásadní a použití nevhodného referenčního genu pro normalizaci dat může významným způsobem ovlivnit získané výsledky a z nich vyvozované závěry mohou být zkreslené (Vandesompele et al. 2002, Bustin et al. 2009).

Referenční geny jsou využívány při kvantifikaci jako vnitřní kontrola exprese sledovaných genů. Hlavním požadavkem při výběru referenčního genu je stabilita jeho exprese nezávisle na experimentálních podmínkách. Takto je zajištěno, že rozdíly, které pozorujeme v expresi cílového genu, jsou skutečně způsobeny změnou exprese cílového genu, a ne použitím nestejného množství genetického materiálu v testovaných vzorcích. Protože perfektní referenční gen neexistuje, je doporučeno používat kombinaci několika (nejméně dvou) validovaných genů, aby se předešlo odchylkám způsobeným technickými nebo experimentálními chybami (Vandesompele et al. 2002, Bustin a Nolan 2017).

Pro normalizaci RT-qPCR dat v ultratenkých jaterních řezech je podle dostupných údajů z literatury používána celá řada referenčních genů. Mezi nejčastěji používané patří ACTB (Vickers et al. 2017, Wu et al. 2018), B2M (Vickers et al. 2017), GAPDH (Melgert et al. 2001, van de Bowenkamp et al. 2005, Vickers et al. 2017, Wu et al. 2018) a HPRT (Lee et al. 2013, Vickers et al. 2017, Wu et al. 2018). V některých publikacích použili autoři jako referenční geny RPLP0 (Vickers et al. 2017), GUSB (Lee et al. 2013) či α -SMA (Vickers et al. 2004).

V mé práci jsem se snažila nalézt vhodný referenční gen(y) pro analýzu genové exprese v ultratenkých lidských jaterních řezech a vybraný gen(y) validovat. Výběr vhodné kombinace referenčních genů je klíčovým krokem pro získání spolehlivých a reprodukovatelných výsledků, zejména pokud jsou pro experiment použity jaterní řezy

z biologicky variabilních jedinců. Použila jsem šest kandidátních referenčních genů. Čtyři z nich (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT) jsou často používané v ultratenkých jaterních řezech, další dva (YWHAZ a SDHA) byly do výběru přidány, protože se používají jako referenční geny v jiných tkáních (Ahn et al. 2008, Nygard et al. 2007).

Jaterní řezy byly krájeny z válečků jaterní tkáně o průměru 8 mm na řezy o tloušťce 150-180 μm . Připravené řezy byly jednotlivě 60 min preinkubovány pro odstranění poškozených a nekrotických buněk a následně po přendání do nové 12jamkové destičky inkubovány. Inkubace i preinkubace probíhala v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 95 % O_2 /5 % CO_2 v médiu William's E + GlutaMAX obohaceném o gentamicin a L-glukosu. Kontrolní řezy byly inkubovány v přítomnosti 0,1% dimethylsulfoxidu (DMSO) a ostatní řezy s 10 μM β -naftoflavonem nebo 10 μM rifampicinem, což jsou známé induktory CYP1A resp. CYP3A4. Inkubace byla ukončována v předem stanovených časech: -1 (před preinkubací), 0 (po preinkubací), 4, 8, 12, a 24 hodin. Po ukončených inkubacích byla stanovena životaschopnost jaterních řezů. Jako markerů životaschopnosti bylo použito stanovení hladiny ATP v jaterních řezech a aktivita LDH v homogenátu jaterních řezů a v inkubačním médiu.

Nejprve jsem sledovala stabilitu exprese kandidátních referenčních genů v ultratenkých lidských jaterních řezech připravených z tkáně tří pacientů. Stabilita použitých referenčních genů byla hodnocena pomocí webového nástroje RefFinder. Tento webový nástroj vyhodnotil stabilitu referenčních genů na základě údajů z jednotlivých programů a určil jejich pořadí. Rozdíly ve stabilitě kandidátských genů byly malé, což potvrdilo vhodný výběr kandidátů na základě dostupné literatury. Jako nestabilnější gen byl v kontrolních i ovlivněných řezech vyhodnocen YWHAZ, zatímco nejméně stabilním byl GAPDH. Na druhém místě se v případě kontrolních vzorků umístil gen ACTB, zatímco u řezů ovlivněných induktory to byl B2M.

Program geNorm pomocí výpočtu párové variace vyhodnotil, že optimální bude použití dvou referenčních genů. Pro následující validaci byly na základě určení stability genů použity geny YWHAZ a B2M a pro porovnání jednotlivé geny. Ve studii Zárybnický et al. (2019), která se zabývala výběrem a validací referenčních genů v jaterní tkáni a jaterních řezech, není B2M pro svoji nejmenší stabilitu v použitých jaterních vzorcích doporučován jako referenční gen i přes to, že na základě programu geNorm byl

hodnocen jako druhý nejstabilnější po YWHAZ. Nicméně v této studii bylo zpracováno větší množství vzorků a ukazuje to na nutnost optimalizace a výběr referenčních genů pro každou studii.

Výběr referenčního genu může ovlivnit pozorovanou míru exprese cílových genů. V našem případě jsme vybrané referenční geny validovali pomocí analýzy exprese CYP1A2 a CYP3A4 v ultratenkých lidských jaterních řezech inkubovaných v přítomnosti známých induktorů β -naftoflavonu a rifampicinu. Pokud byl jako referenční gen použit ACTB, B2M, GAPDH, HPRT nebo SDHA, tak se exprese CYP3A4 během prvních 18 hodin inkubace zvýšila 6 až 10krát a poté začala klesat, zatímco při použití YWHAZ pro normalizaci stoupala exprese CYP3A4 během celé inkubační doby.

Závěrem bychom doporučili, aby byl při relativní kvantifikaci mRNA v pokusech s lidskými jaterními řezy použit geometrický průměr dvou referenčních genů, YWHAZ a jednoho dalšího genu z nejlépe hodnocených (ACTB, B2M). Rozdíly ve stabilitě jednotlivých referenčních genů však byly malé a všechny by tedy mohly být použity pro normalizaci dat. Stabilita referenčních genů by měla být testována před každou studií, kvůli rozdílům ve farmakoterapii dárců jaterní tkáně, jejich stravě, komorbiditám a věku, rozdílům v experimentálních podmínkách a zacházení s tkání.

7. ZÁVĚR

Souhrnně lze uvést, že soubor kandidátních referenčních genů pro mRNA by testován na třech vzorcích lidských jater pomocí RT-qPCR. Za pomoci programů geNorm a RefFinder byly vybrány vhodné nejstabilnější referenční geny pro normalizaci. U kontrolních vzorků to byly geny YWHAZ/B2M, pro ošetřené vzorky byla vybrána dvojice genů YWHAZ/ACTB. Pro normalizaci exprese sledovaných genů byla na základě programů geNorm a RefFinder použita dvojice genů YWHAZ/B2M. Vybrané referenční geny byly validovány v praktickém experimentu, kdy byla sledována exprese genů CYP1A2 a CYP3A4 v PCLS inkubovaných s DMSO, rifampicinem nebo β -naftoflavonem.

Nicméně rozdíly ve výsledcích stabilit mezi jednotlivými kandidátními geny byly malé a všechny geny by byly použitelné pro normalizaci. Stabilitu referenčních genů je potřeba vždy testovat hlavně kvůli rozdílům v experimentálních podmínkách, zdravotním stavu, věku, stravě nebo farmakoterapii dárců jater.

8. SEZNAM LITERATURY

Ahn K., Huh J. W., Park S. J., et al. (2008) Selection of internal reference genes for SYBR green qRT-PCR studies of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) tissues. *BMC Mol. Biol.* 9, 78.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 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; 64:5245-5250.

Beránek M. (2016) *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 1. vydání, Nakladatelství Karolinum, 196 stran.

van de Bovenkamp M., Groothuis G. M. M., Draaisma A. L., et al. (2005) Precision-cut liver slices as a new model to study toxicity-induced hepatic stellate cell activation in a physiologic milieu. *Toxicol. Sci.* 85, 632–638.

Bustin S. A., Benes V., Garson J.A., et al. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55,611-622.

Bustin S., Nolan T. (2017) Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. *Eur. J. Clin. Invest.* 47, 756–774.

Fischer R. L., Vickers A. E. (2013) Preparation and culture of precision-cut organ slices from human and animal. *Xenobiotica*. 43, 8-14.

Fisher R. L., Ulreich J. B., Nakazato P. Z., Brendel K. (2001). Histological and biochemical evaluation of precision-cut liver slices. *Toxicol. Methods*. 11, 59–79.

Fisher R. L., Hasal S. J., Sanuik J.T., et al. (1993) Cold-and cryopreservation of human liver and kidney slices. *Cryobiology*. 30, 250–261.

Fontana J., Šajdíková M., Maďa P. (2013) Játra a biotransformace xenobiotik. In: *Funkce buněk a lidského těla*. Multimediální skripta. [Citace: 7-12-2018]. [Online]<http://fbt.cz/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>

Stephenson F. S. (2016) *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*. 3. vydání, Academic Press, 496 stran.

Gandolfi J. A., Wijeweera J., Brendel K. (1996) Use of Precision-Cut Liver Slices as an In Vitro Tool for Evaluating Liver Function. *Toxicol. Pathol.* 24, 58–61.

Gao N., Tang H., Gao L., et al. (2020) CYP3A4 and CYP11A1 variants are risk factors for ischemic stroke: a case control study. *BMC Neurol.* 20, 77.

- Ginzinger D. G. (2002) Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 30, 503-12.
- de Graaf I. A. M., Olinga P., de Jager M. H., et al. (2010) Preparation and incubation of precision-cut liver and intestinal slices for application in drug metabolism and toxicity studies. *Nat. Protoc.* 5, 1540-1551.
- de Graaf I. A. M., Olinga P., Groothuis G. M. (2007) Precision-cut Tissue Slices as a Tool to Predict Metabolism of Novel Drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 3, 879-98.
- Green M. R., Sambrook J. (2019) Polymerase Chain Reaction. Cold Spring Harbor Laboratory Press 441-444.
- Grimm S. W., Einolf H. J., Hall S. D., et al. (2009) The Conduct of in Vitro Studies to Address Time-Dependent Inhibition of Drug-Metabolizing Enzymes: A Perspective of the Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. *Drug Metab. Dispos.* 37, 1355-70.
- Groneberg D. A., Grosse-Siestrup C., Fischer A. (2002) In Vitro Models to Study Hepatotoxicity. *Toxicol. Pathol.* 30, 394-9.
- Guibert E. E., Petrenko A. Y., Balaban C. L., et al. (2011) Organ Preservation: Current Concepts and New Strategies for the Next Decade. *Transfus. Med. Hemother.* 38, 125-142.
- Hanzlová J., Hemza J. (2013) *Základy anatomie soustavy trávicí, žláz s vnitřní sekrecí a soustavy močopohlavní*. 2. vydání, Masarykova Univerzita, 77 stran.
- Hůlek P., Urbánek P. (2018) *Hepatologie*. 3. vydání, Grada Publishing, 768 stran.
- Chervoneva I., Li Y., Schulz S., Croker S., et al. (2010) Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR. *BMC Bioinformatics.* 11, 253.
- Kozera B., Rapatz, M. (2013) Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.* 54, 391-406.
- Krumdieck C. L. (2013) Development of a live tissue microtome: reflections of an amateur machinist. *Xenobiotica.* 43, 2-7.
- Kučera O., Lotková H., Křiváková P., Roušar T., Červinková Z. (2006) Modelové systémy pro studium toxického poškození hepatocytů in vitro. *Cesk. Fyziol.* 55, 103-110.
- LabGuide. *Real-time PCR* [online]. ©2014-2019. [Cit. 15.12.2018]. Dostupné z: <http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>
- Lee S. M. L., Schelcher C., Gashi S., et al. (2013) RNA Stability in Human Liver: Comparison of Different Processing Times, Temperatures and Methods. *Mol. Biotechnol.* 53, 1-8.

- Li A. P. (2004) Accurate prediction of human drug toxicity: A major challenge in drug development. *Chem. Biol. Interact.* 150, 3–7.
- Logan J., Edwards K., Saunders N. (2009) *Real-time PCR: current technology and applications*. 1. vydání, Caister Academic Press, 284 stran.
- Lüllmann-Rauch R. (2012) *Histologie*. 3. vydání, Grada Publishing, 576 stran.
- Melgert B. N., Olinga P., Van der Laan J. M. S. et al. (2001) Targeting dexamethasone to Kupffer cells: Effects on liver inflammation and fibrosis in rats. *Hepatology*. 34, 719–728.
- Mysid. Wikimedia Commons: *ATP structure* [online]. Poslední změna 16.8.2007. [Cit. 19.11.2018]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:ATP_structure.svg.
- National Library of Medicine (US). *Genetics Home Reference* [online]. Bethesda (MD): The Library; 2020. Cytochrome p450; [poslední revize 28.4.2020; citováno 5. 5. 2020]. Dostupné z: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genefamily/cytochromep450>
- Nygard A. B., Jorgensen C. B., Cirera S., Fredholm M. (2007) Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol. Biol.* 8, 67.
- Palmer G. (1992). Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) Nomenclature of electron-transfer proteins. *J. Biol. Chem.* 267, 665-677.
- Schmittgen T., Livak J. K. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-8.
- Schneiderka P. (2004) *Kapitoly z klinické biochemie*. 2. vydání, Karolinum, 366 stran.
- Skálová L. a kolektiv (2007) *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. 2. vydání, Karolinum, 177 stran.
- Spiegelaere W., Dern-Wieloch J., Weigel R., Schumacher V., et al. (2015) Reference gene validation for RT-qPCR, a note on different available software packages. *PLoS ONE*. 10, e0122515.
- Šadibolová M., Zárybnický T., Smutný T., Pávek P., et al. (2019) Sesquiterpenes Are Agonists of the Pregnane X Receptor but Do Not Induce the Expression of Phase I Drug-Metabolizing Enzymes in the Human Liver. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4562.
- Švihovec J., Bultas J., Anzenbacher P., Chládek J., et al. (2018) *Farmakologie*. 1. vydání, Grada Publishing, 1008 stran.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., et al. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 12.

- Vanhaecke T., Rogiers V. (2006) Hepatocyte Cultures in Drug Metabolism and Toxicological Research and Testing. *Methods Mol. Biol.* 320:209-27.
- Vickers A. E. M., Ulyanov A. V., Fisher R. L. (2017) Liver Effects of Clinical Drugs Differentiated in Human Liver Slices. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 33.
- Vickers A. E. M., Saulnier M., Cruz E., et al. (2004) Organ slice viability extended for pathway characterization: An in vitro model to investigate fibrosis. *Toxicol. Sci.* 82, 534–544.
- Wrighton S. A., Stevens J. C. (1992) The Human Hepatic Cytochromes P450 Involved in Drug Metabolism. *Crit. Rev. Toxicol.* 22, 1-21.
- Wu X., Roberto J. B., Knupp A., et al. (2018) Precision-cut human liver slice cultures as an immunological platform. *J. Immunol. Methods.* 455, 71–79.
- Yamanaka T., Okunuki K. (1974) Cytochromes. In: Neilands J. B. (ed.) *Microbial Iron Metabolism. A Comprehensive Treatise*. 1. vydání, Academic Press, str. 349-400.
- Yan Z., Caldwell G. W. (2001) Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 403-25.
- Zárybnický T., Matoušková P., Ambrož M., et al. (2019) The selection and validation of reference genes for mRNA and microRNA expression studies in human liver slices using RT-qPCR. *Genes.* 10, 763.