

**Univerzita Karlova v Praze
Lékařská fakulta v Hradci Králové**



Studium regulace regenerace jater za využití metod molekulární genetiky

David Rychtrmoc

Autoreferát disertační práce

**Doktorský studijní program
Fyziologie a patologická fyziologie**

Hradec Králové

2014

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného studia doktorského studijního programu Fyziologie a patologická fyziologie na Ústavu fyziologie Lékařské fakulty UK v Hradci Králové.

Autor: MUDr. David Rychtrmoc
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitelka: Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Ústav fyziologie, Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové

Školitel konzultant: RNDr. Martin Bunčec, Ph.D.
GENERI BIOTECH s.r.o., Machkova 587, 500 11 Hradec Králové

Oponenti: prof. RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D.
Centrum molekulární biologie a genové terapie
Interní hematologická klinika FN Brno a LF Masarykovy univerzity, Černopolní 9, 625 00 Brno

MUDr. Martin Leníček, Ph.D.
Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Na Bojišti 3, 120 00 Praha

Prostor pro doplnění místa konání a termínu obhajoby (4-6 cm k následujícímu textu) – doplní student po stanovení místa a termínu konání – před tiskem finálního počtu výtisků pro rozeslání.

Tato práce vznikla za podpory vnitřního grantu Lékařské fakulty s podporou firmy Roche a grantů MSM VZ 0021620820, GAUK 9945/2009(94509), Univerzity Karlovy SVV-2010-260907 a SVV-2011-262901. Část nákladů práce byla hrazena také z firemních prostředků společnosti GENERI BIOTECH s.r.o.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze, Šimkova 870, 500 38 Hradec Králové (tel. 495 816 131).

Prof. MUDr. Zuzana Červinková, CSc.
Předsedkyně komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Fyziologie a patologická fyziologie

Obsah

Seznam použitých zkratk	4
Souhrn	5
Summary	6
Úvod do problematiky	7
Cíle disertační práce	11
Materiál a metodika	11
Výsledky	20
Diskuse	26
Závěry	33
Použitá literatura	34
Přehled publikační činnosti autora	41

Seznam použitých zkratek

aaRNA	aminoallyl-aRNA
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
BHQ	<i>black hole quencher</i> (druh zhášedce)
cDNA	<i>copy DNA</i>
DEGs	gen(y) se změněnou expresí
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EGF	epidermální růstový faktor
FGF	růstový faktor fibroblastů
FRET	<i>Förster's/flourescence resonance energy transfer</i>
GUI	<i>graphic user interface</i>
HGF	růstový faktor hepatocytů
HK	Hradec Králové
IGF-I	inzulinu podobný růstový faktor I
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LDL	lipoproteiny s nízkou hustotou
LF	lékařská fakulta
logFC	logaritmovaný poměr fluorescenčních intenzit
LXR	receptor oxysterolů (<i>člen rodiny jaderných receptorů</i>)
MMP	matrix metaloproteáza
mRNA	informační (<i>messenger</i>) RNA
MuMLV	<i>murine Moloney leukemia virus</i>
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PCA	analýza hlavní složky
PH	parciální hepatektomie
RT-PCR	reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce
TGF	transformující růstový faktor
TIFF	<i>tag(ged) image file format</i>
TNF α	tumor nekrotizující faktor alfa
UK	Univerzita Karlova
VEGF	růstový faktor cévního endotelu
VLDL	lipoproteiny s velmi nízkou hustotou

Souhrn

Studium regulace regenerace jater za využití metod molekulární genetiky

Regenerace jater je pozoruhodný děj vydatné obnovy tkáně nastupující po celé škále poškození. Regenerační schopnost jater je mezi útrobními orgány savců ojedinělá a hraje roli v patofyziologii různorodých jaterních onemocnění. Proces obnovy jater probíhá ve třech fázích, z nichž terminace byla dosud nejméně objasněna. Dokonce i otázky načasování terminace regenerace a úplnosti zotavení orgánu zůstávají i přes desítky let studia kontroverzní.

Cílem předkládané disertační práce bylo analyzovat údaje o genové expresi ve vztahu k pozdní fázi jaterní regenerace. Hodnotili jsme průběh spontánního zotavování potkanů po 2/3 parciální hepatektomii. Vzhledem k chybění všeobecně uznávaného parametru úplnosti jaterní regenerace jsme navrhli vlastní ukazatel %LReg, založený na údajích o hmotnosti jater a celého těla zaznamenávaných v průběhu studie. Analýza genové exprese byla provedena nejprve metodou DNA čipů a následně pomocí RT-PCR v reálném čase.

Stanovením exprese v celogenomovém měřítku jsme získali obsáhlou sadu dat pokrývající transkripční dynamiku čtrnácti pooperačních dnů po 2/3 parciální hepatektomii u dospělých potkaních samců. Tato intervence provedená u potkanů je zlatým standardem *in vivo* studií v oblasti regenerace jater a na našem pracovišti má dlouhou tradici. Novinkou v popisované práci bylo využití pokročilých molekulárně biologických metod analýzy a výpočetních bioinformatických přístupů v interpretaci dat. Zaměřili jsme se na fázi terminace, která je v literatuře spíše opomíjena s motivací zaplnit tuto mezeru. Lze shrnout, že dle našich nálezů začíná pozdní fáze regeneračního děje v uvedeném modelu pátým pooperačním dnem a že zřejmě zahrnuje aktivní terminační mechanismy. Pro tyto dny jsme dosáhli dobré celkové shody mezi výsledky DNA čipů a RT-PCR.

Kromě výše uvedeného námi vypracovaný ukazatel %LReg svědčil pro neúplnou obnovu hmotnosti jater dokonce i v nejdelším hodnoceném intervalu studie. Konečné procento hmotnostní obnovy dosáhlo za 14 dní po resekci $83\pm 9\%$. Vysvětlením by mohla být vyšší funkční kapacita nově namnožených jaterních buněk oproti těm, odstraněným dospělým jedincům při hepatektomii.

Summary

Regulation of liver regeneration as assessed by means of molecular genetics

Liver regeneration is a noteworthy phenomenon of a vigorous tissue recovery following a wide variety of damaging events. Regenerative ability of the liver is unique among the mammalian visceral organs and plays its role in pathophysiology of heterogeneous hepatic diseases. The recovery process occurs in three phases of which the termination remains the least elucidated. Even the questions of regeneration termination timing and of completeness of organ build-up are still controversial despite decades of studies.

The aim of the present thesis was to analyse gene expression data pertinent to late phase of liver regeneration. We evaluated the course of spontaneous recovery in rats subjected to 2/3 partial hepatectomy. Because of lack of generally agreed parameter of hepatic regeneration completeness we proposed a proprietary indicator denoted as %LReg, based on organ and whole body weight assessments performed throughout the study. Gene expression analysis was first performed using DNA microarrays and consequently by real-time RT-PCR.

Whole genome scale transcriptional analysis yielded vast amount of data covering gene expression dynamics of fourteen post-surgery days after 2/3 partial hepatectomy in adult male rats. This intervention in rats is considered a gold standard of *in vivo* studies in the field of liver regeneration and has a long tradition at our department. Novelty of the present work laid in employing advanced molecular biology methods of analysis and computational bioinformatic approaches in data interpretation. We focused on the termination phase which is rather underrepresented in the literature with the aim to fill this gap. It might be concluded that according to our findings the late phase of regeneration process in the above mentioned model lasts from the fifth day on and that it seems to include active termination mechanisms. For the late days we reached good overall agreement among the DNA microarray and the real-time RT-PCR results.

Besides that our proprietary parameter %LReg indicated incomplete weight recovery even in our longest follow up interval. Final percentage of weight re-gain after fourteen days post-surgery was $83\pm 9\%$. The explanation might be in increased functional capacity of newly proliferated liver cells as compared to those resected in adults during hepatectomy.

Úvod do problematiky

Regenerační potenciál jater

Játra jsou životně důležitým orgánem s celou řadou funkcí. Jejich nepostradatelnost se odráží i v evolučně konzervované schopnosti spontánní regenerace po poškozeních různého původu (Alvarado a Tsonis, 2006). 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.

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 proliferací 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.

Přísně mechanisticky 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.

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). Exaktnější a systematičtější zájem o pochopení jaterní regenerace se rozvíjel od 18. století našeho letopočtu (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).

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 (PH) 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 resekcce je nejběžnější dvoutřetinová resp. 67% až 70%-ní hepatektomie. Po ní následuje, u jedinců před resekcí 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 resekcce větší než 75%-ní jsou spjaty se stupňujícím se poškozením již nedostačujícího zbytku jaterní tkáně (Gaub a Iversen, 1984, Panis *et al.*, 1997).

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 (Kandilis *et al.*, 2010, Zheng *et al.*, 2009, Böhm *et al.*, 2010).

Terminální fáze regenerace jater

Ukončení regenerační odpovědi na parciální hepatektomii (PH) 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 proliferace na resekcii 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 (DeFrances a Michalopoulos, 2011, Ockner, 2004). 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. Toto trvání experimentů je však spíše věcí konvence než dobře zdůvodněného ohraničení regeneračního děje.

Vývoj a současnost molekulárně biologických metod analýzy genové exprese

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. Podstatnou překážkou také často byl nedostatek vlastního biologického materiálu s obsahem dostatečně zachovalé DNA. Dalším významným impulzem, překonávajícím tento problém v řadě aplikací, byl proto objev polymerázové řetězové reakce Mullisem a spolupracovníky (1987). Díky němu se mohlo stanovování míry genové exprese nebývale rozšířit. 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 Bruchová 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 (Scheny *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. Presentace 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 vžitě 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.

Cíle disertační 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.

Materiál a metodika

2/3 parciální hepatektomie u dospělých potkanů

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 (BioTest, Konárovice, Česká republika) 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 sameců. Z těchto vzorků byl připraven tzv. referenční pool, neboli smíchaný kontrolní vzorek, nezbytný při zvoleném experimentálním designu. Aortální exsanguinaci vždy předcházela střední laparotomie. Po vykrvácení byly odebírány vzorky jaterní tkáně pro molekulárně biologická vyšetření.

Biochemická stanovení

Pro posouzení míry poškození jaterní tkáně chirurgickou resekci a následně jejího zotavování s přibývajícím dny 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). Vzorčky 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.

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.

Izolace a značení RNA z biologických vzorků

Vzorčky jaterní tkáně o hmotnosti 50-100 mg byly odebírány standardně z regenerovaného jaterního parenchymu (z *lobus caudatus*). Ihned po resekci byly umístěny (ve zkumavkách) do tekutého dusíku pro vyloučení degradace nukleových kyselin. Do doby zpracování pak byly tkáně uchovávány v hlubokomrazicích 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.

Z kvalitativně vyhovujících vzorků byla cíleně amplifikována mRNA soupravou TargetAmp 1-Round Aminoallyl-aRNA Amplification Kit 101 (Epicentre, Madison, WI, USA). Výsledný produkt tříkrokové procedury v dalším textu označujeme jako aminoallyl-aRNA (aaRNA). Toto označení odkazuje ke skutečnosti, že v posledním kroku přípravné procedury, byly do vznikajících řetězců 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 čípech. Konkrétně aminové skupiny modifikovaných uridinů posloužily jako místa kovalentního navázání fluorescenčních barviv. Využívali jsme dvojici fluoroforů DY-548 a DY-648 (Dyomics GmbH, Jena, Německo). Protokol značení jsme zoptimalizovali k dosahování potřebné míry inkorporace fluorescenčních molekul do sekvence aaRNA. V souladu s pokyny výrobců fluoroforů i publikovanými doporučeními (GE Healthcare UK Ltd., 2009, Applied Biosystems Inc, 2010, t Hoen *et al.*, 2003) jsme k experimentům použili aaRNA s rozmezím 20 až 50 molekul barviva na jednu kilobázi.

Hybridizace značených vzorků na DNA čipy

V popisované práci jsme využívali sériově vyráběné DNA čipy 29K Rat Arrays od firmy Microarrays, Inc. (Huntsville, AL, USA) s nanesenými 26 962 sondami. Teprve na základě stanovení na čípech jsme mohli přistoupit k experimentům založeným na polymerázové řetězové reakci v reálném čase, popsáným níže. Z četných variant uspořádání analýz na čípech jsme zvolili tzv. referenční design, jehož podstatou je zařazení společného referenčního vzorku do všech dvojic nanášených na jednotlivé čipy, jako by šlo o rovnocenný

experimentální vzorek (Dobbin a Simon, 2002, van Bakel a Holstege, 2007). Jeho účelem však je umožnit vzájemné porovnávání získaných dat mezi libovolnými vzorky napříč pokusem. Zásadním ohledem je, aby referenční vzorek byl identický pro všechny párové hybridizace, což jsme důsledně dodrželi.

Při samotných hybridizacích dvojic vzorků na DNA čipy jsme pracovali podle protokolu výrobce čipů. Začínali jsme prehybridizací s cílem snížit zbytkovou afinitu chemické vrstvy, která při výrobě čipů sloužila k navázání sond (tzv. *probe attachment chemistry*). Následovala neenzymatická fragmentace vzorků nukleových kyselin. Zbytek čipové analýzy probíhal ve čtyřkomorové hybridizační stanici Slide Booster (Advalytix, Jena, Německo). Důležitými aspekty reakčních podmínek, které právě hybridizační stanice vytvářela a kontrolovala, byly: teplota, vlhkost a průběžné promíchávání směsí. Po šestnáctihodinových hybridizačních reakcích, které jsme zpravidla prováděli v časech mezi 17. a 9. hodinou, následovalo vyjímání čipů ze stanice a jejich konečné omývání. To mělo minimalizovat technické artefakty při bezprostředně navazujícím snímání obrazové informace.

Snímání obrazové informace z DNA čipů po proběhlé hybridizaci

Po odmytí nenavázaných kvant nukleových kyselin vzorků jsme čipy vkládali do zařízení pro detekci fluorescenčních signálů z jejich jednotlivých definovaných pozic (spotů). 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). 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, ale specifická obrazová informace. Jednotlivé obrazové soubory dosahují úměrně množství později využitelných dat značných velikostí. Obvyklá velikost jednoho tohoto TIFF souboru byla okolo 250 megabytů. Archivování a zpracovávání tak kladlo nemalé nároky na výpočetní techniku. Software GenePix Pro 5.0 nám posloužil k víceméně automatickému vytvoření datových souborů z primárních obrazových výstupů. Datové 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. Ve výrobcem poskytovaných podkladech k čipům byly obsaženy kromě detailů rozmístění

jednotlivých druhů sond na nosičích i několikeré užitečné údaje z genomických databází. Ty jsme využívali při pozdějších interpretačních krocích práce.

Kvantifikace obrazové informace

Datová matrice získaná experimentem na DNA čipech může být s různou měrou uživatelského komfortu hodnocena některým z komerčních softwarových prostředků či bezplatně dostupných bioinformatických nástrojů. Pragmaticky jsme se 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 (např. Girke, [2009])); případně knižních publikací dostupných v angličtině i češtině (Becker *et al.*, 1988, Pekár a Brabec, 2009, Stekel, 2003, Venables a Ripley, 2002).

Normalizace a intergrace dat

Zpracování a interpretace dat, počínaje tímto krokem, byly jistě nejkomplicovanějšími částmi naší práce. 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 (Stekel, 2003, van Bakel and Holstege, 2007).

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).

V našem experimentu jsme používali DNA čipy se sondami nanášenými na nosič jehlami do definovaných pozic. 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 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 pramenící z technické nedokonalosti, nikoliv z biologických odlišností (Smyth a Speed, 2003). Tuto metodu normalizace dat v rámci čipů (*within array*) jsme využili.

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 logFC) byly normalizovány v rámci čipů metodou *print tip loess* (Smyth a Speed, 2003). Průměrné koeficienty diferenciální exprese mezi všemi skupinami zvířat podrobenými hepatektomii 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 vplynuly z hierarchického shlukování a analýzy hlavní složky. Geny

s logaritmovanými poměry fluorescenčních intenzit ($\log FC$) vyššími než 1 nebo nižšími než -1 byly dále hodnoceny. Z nich geny označené za signifikantně diferencially 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 čípech. 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 ([2009]).

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. 1. 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 cyklu a následně používanou k výpočtům.

Samotné vzorky byly připraveny tak, že vždy 1 mikrogram celkové RNA z jaterní tkáně 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 1. 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

Provedení kvantifikačních PCR reakcí

Kvantifikační RT-PCR byla prováděna na optickém termálním cyklu 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 Mg^{2+} na gradientovém termálním cyklu při použití TrueStart Taq DNA polymerázy (Fermentas UAB, Vilnius, Litva). Produkty optimalizačních reakcí byly hodnoceny elektroforézou na 2% agarózovém gelu.

Interpretace výsledků qPCR

Při stanovování míry genové exprese metodou RT-PCR 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 odlehlym 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). Data o genové expresi byla normalizována vůči geometrickému průměru hodnot exprese tří referenčních (*housekeeping*) genů. Nakonec jsme normalizované údaje získané o každém studovaném genu provedením RT-PCR porovnali pro všechny pooperační intervaly s výsledky hybridizací na DNA čipech.

Výsledky

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.

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 2.

Tabulka 2. 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 [μkat/l]	0,7±0,2	2,1±1,1	2,2±0,7	1,9±0,9	1,1±0,2	0,8±0,6	1,0±0,3	0,9±0,2	0,8±0,2
AST [μkat/l]	1,5±0,5	6,4±1,7	5,5±4,0	2,7±1,1	1,8±0,1	2,0±0,4	1,7±0,1	2,3±0,6	1,6±0,1

Data jsou uvedena jako průměr ± S.D. (n = 3 v každé skupině). Výsledek statisticky signifikantně 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.

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 resekcii.

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±4,5 g činila 11,4±1,2 g (n = 3). Ostatní hmotnostní údaje jsou shrnuty v tabulce 3. 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 resekci (Hata *et al.*, 2007, Michalopoulos, 2010).

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

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.

Tabulka 3. Souhrn hmotnostních údajů a parametrů postupu morfologické regenerace jater po parciální hepatektomii

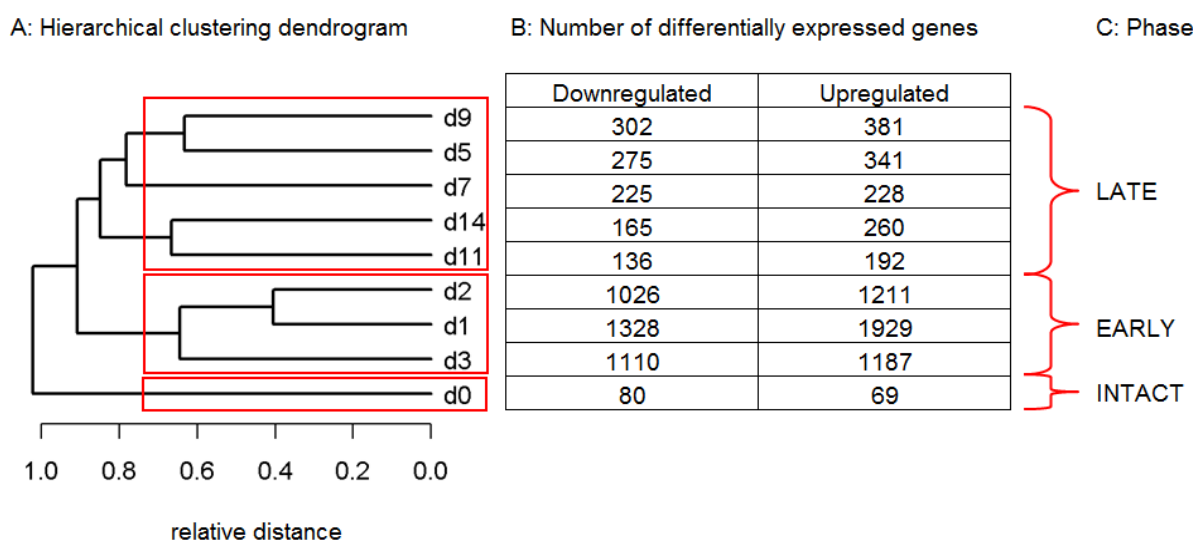
Parametr	Den 0	Den 1	Den 2	Den 3	Den 5
TH1 [g]	220,7±4,5	230,7±23,4	219,3±12,5	230,0±27,8	233,3±15,6
J1 [g]	---	7,9±0,9	7,0±1,0	7,3±0,5	7,7±0,5
J1* [g]	11,4±1,2	11,3±1,3	10,0±1,4	10,5±0,8	11,0±0,7
TH2 [g]	220,7±4,5	213,3±18,1	221,3±9,1	224,0±23,3	250,7±12,2
J2 [g]	11,4±1,2	4,3±0,5	6,6±0,3	6,5±0,2	8,9±0,7
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 3 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.

Microarray analýzy

Bylo provedeno 27 hybridizací v souladu s počtem pokusných potkanů (9 skupin po 3). Diferenciální genová exprese, primární výstup naší čipové studie, byla hodnocena biostatistickým balíčkem *limma* prostředí R, jak bylo uvedeno výše. Tuto sadu dat jsme podrobili dvěma nezávislým metodám redukce dimenzionality s cílem blíže časově ohraničit terminační fázi regenerace jater v našem modelu. První metodou bylo hierarchické shlukování bez učitele, použité k odhalení skupin vzorků s celkově podobným průběhem změn genové exprese. Druhou naší metodou byla analýza hlavní složky (PCA). Porovnáním výstupů obou metod jsme zjistili následující: 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 vyplynuly z analýzy hlavní složky, čímž jsme se ubezpečili, že toto rozdělení bude racionálním podkladem další interpretace (viz obrázky 1 a 2).

Obrázek 1. Výsledky hierarchického shlukování a mnohočetného testování dat z DNA čipů

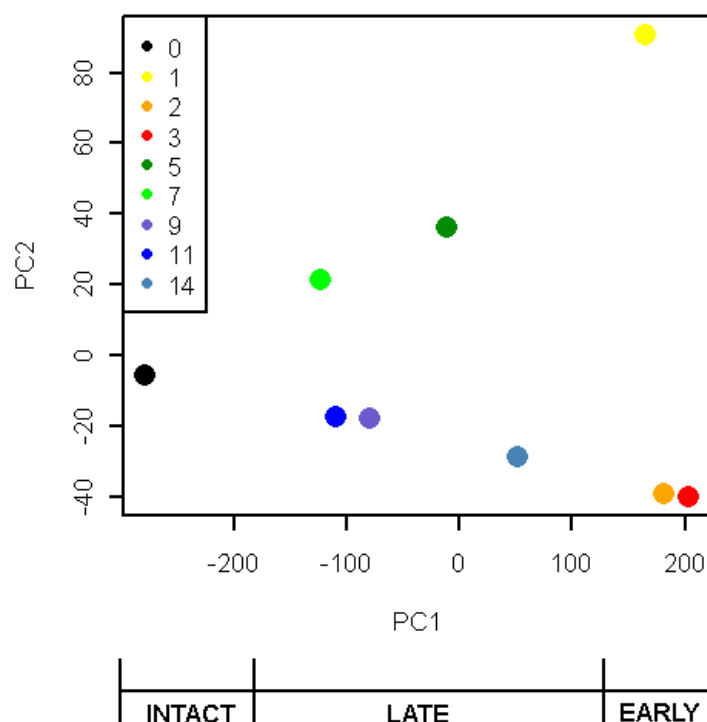


A: Navzájem podobnější intervaly (pooperační dny; dx) leží na dendrogramu blíže a naopak, čímž jsou názorně vyjádřeny jejich vztahy. Větve dendrogramu se sbíhají a tak ukazují skupiny popsané v textu. Rozlišení „intaktní“, „časné“ a „pozdní“ skupiny je dobře zřejmé.

B: Počty genů se signifikantně sníženou (vlevo) nebo zvýšenou (vpravo) expresí ve srovnání s referenčním poolom. 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.

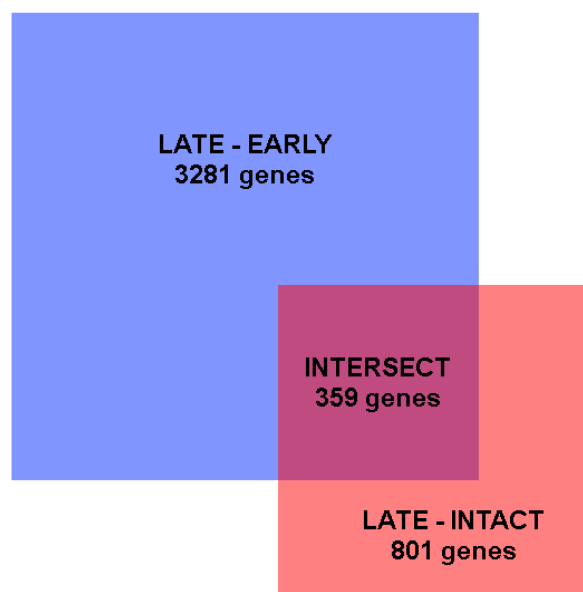
Obrázek 2. Vizualizace výsledků analýzy hlavní složky dat z DNA čipů



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.

V následujících krocích 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“. Data používaná počínaje tímto stadiem analýzy byla již druhotným výstupem z DNA čipů, tzv. časovými kontrasty. V prostředí R jsme provedli nezávislá párová srovnání genů se změněnou expresí "pozdní" skupiny intervalů vůči oběma ostatním fázím a průběh získaný těmito srovnáními byl předmětem našeho největšího zájmu a dalšího interpretačního úsilí (viz obrázek 3). Bylo tomu tak proto, že našim cílem bylo nalezení genů s expresí specificky změněnou v „pozdní“ skupině, které by ji co nejlépe odlišovaly od obou ostatních skupin. Výsledkem našeho hledání - oním průběhem - byla množina 359 genů splňujících toto kritérium. Jejich úplný výčet je elektronickou přílohou naší původní publikace (Rychtmoc *et al.*, 2012), v autoreferátu jej z důvodu obtížného podání v přehledné tištěné podobě neuvádíme.

Obrázek 3. 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 změněnou expresí 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). Záměrem tohoto kroku bylo rozředit 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.

Real-time PCR

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. Tři geny: Surf1, Nup54 a Hmbs 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 4, 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 vytipovali 7 a pročitáním čipových výsledků a publikací další 4 geny do skupiny k ověření real-time PCR.

Tabulka 4. 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
Lypl1	<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 4 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.*, 2011). 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.

Jak již bylo uvedeno, 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. Provedením plánovaných jedenácti PCR reakcí ke stanovení exprese genů našeho největšího zájmu jsme získali kvalitativně vyhovující hrubá data pro všechny geny uvedené v tabulce 4. 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).

Diskuse

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.

V popisované práci jsme se věnovali analýze dosud relativně opomíjené pozdní fáze jaterní regenerace po 2/3 hepatektomii u potkanů. Biochemické změny vyvolané touto resekci u zdravých a jinak neovlivněných potkanů mají většinou krátké trvání. Signifikantní zvýšení sérové aktivity ALT ani AST netrvalo 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.

Jednou z důležitých motivací nám byla kontroverze panující ohledně načasování ukončení regeneračního děje. Ani posuzování úplnosti strukturní a funkční obnovy jaterního parenchymu není zcela dořešenou problematikou. Dostupné laboratorní i zobrazovací metody mají svá úskalí a limitace a závěry získávané jejich uplatněním jsou někdy v rozporu. Z vícečetných studií u lidí i u pokusných zvířat se zdá, že cílový objem jater po dokonané regeneraci je menší než před hepatektomií (Hockings *et al.*, 2002, Humar *et al.*, 2004, Kaibori *et al.*, 2008, Pomfret *et al.*, 2003). Nabízí se vysvětlení, že funkční kapacita nově namnožených jaterních buněk může být vyšší, než těch odstraněných dospělým jedincům při resekci. To by dovolovalo játrům s nižší hmotností resp. objemem vůči velikosti těla pracovat pro organismus dostatečně výkonně k zajištění všech homeostatických funkcí. Toto potenciální zdůvodnění však není dosud bezpečně experimentálně podloženo. Právě popsána 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 nejdélším 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 3). 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.

Rovněž studie využívající molekulárně biologické metody se na poli výzkumu jaterní regenerace ve většině zabývaly jejími časnými obdobími (Cimica *et al.*, 2007, Juskeviciute *et al.*, 2008, Su *et al.*, 2002, Togo *et al.*, 2004). Důležitým cílem naší práce proto bylo, pokusit se tuto mezeru vyplnit a věnovat se terminaci regenerace. 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 (podrobněji viz obrázky 4 a Rychtrmoc *et al.*, 2012). 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.

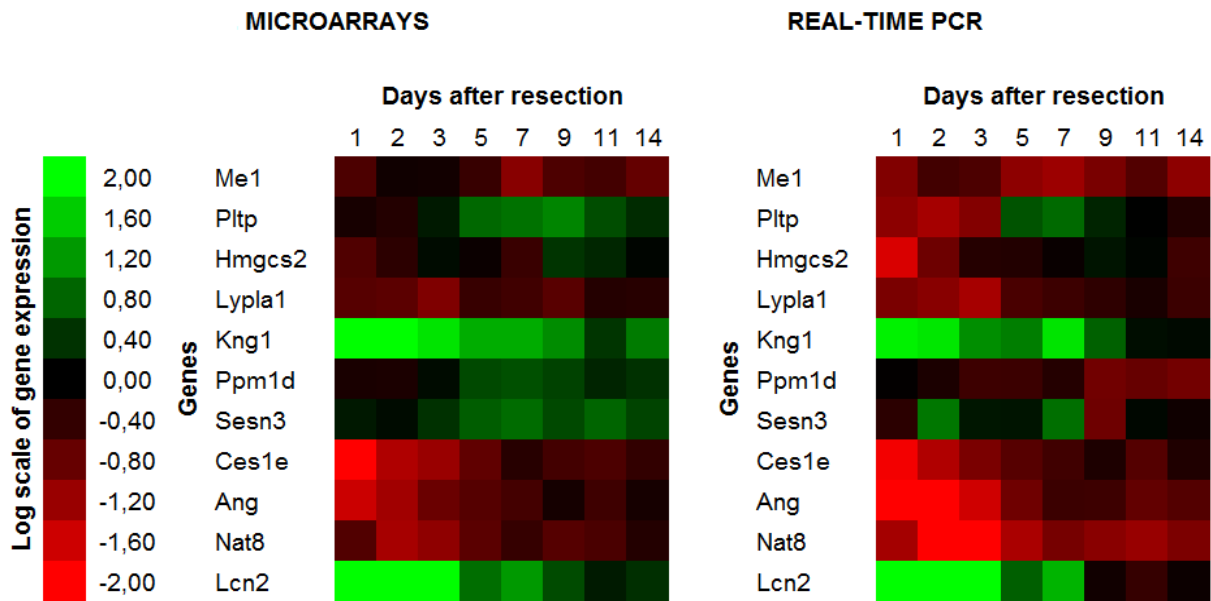
Čtyři z ověřovaných funkčních drah byly výsledkem bioinformatické analýzy genomového obohacení. Pátá funkční dráha, zastoupená genem *Ces1e*, byla vytipována na základě posouzení dat z DNA čipů a dohledáváním údajů v publikacích (viz tabulka 5). Naopak jednu ze drah vytipovanou automatizovanou anotací jsme se rozhodli do real-time PCR validace nezahrnout. Šlo o funkční skupinu rno03010 – ribozom. Vynechali jsme ji 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) a nověji například Alonim a kol. (1992) a Donatim a kol. (2011). Přes biologicky velmi zajímavé souvislosti popsané v těchto pracích je jejich nevýhodou 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.

O třech ze čtyřech zbývajících námi posuzovaných KEGG drah můžeme shrnout, že změny exprese jejich zásupců v pozdní fázi regenerace byla alespoň částečně potvrzeny oběma metodami, zatímco u jedné dráhy byly výsledky z čipů a PCR v rozporu. Neshoda se týkala dvou genů příslušných ke dráze signalizace p53 (rno04115). Níže uvedeme podrobněji své nálezy týkající se jednotlivých genů a jejich diskusi ve světle údajů jiných autorů.

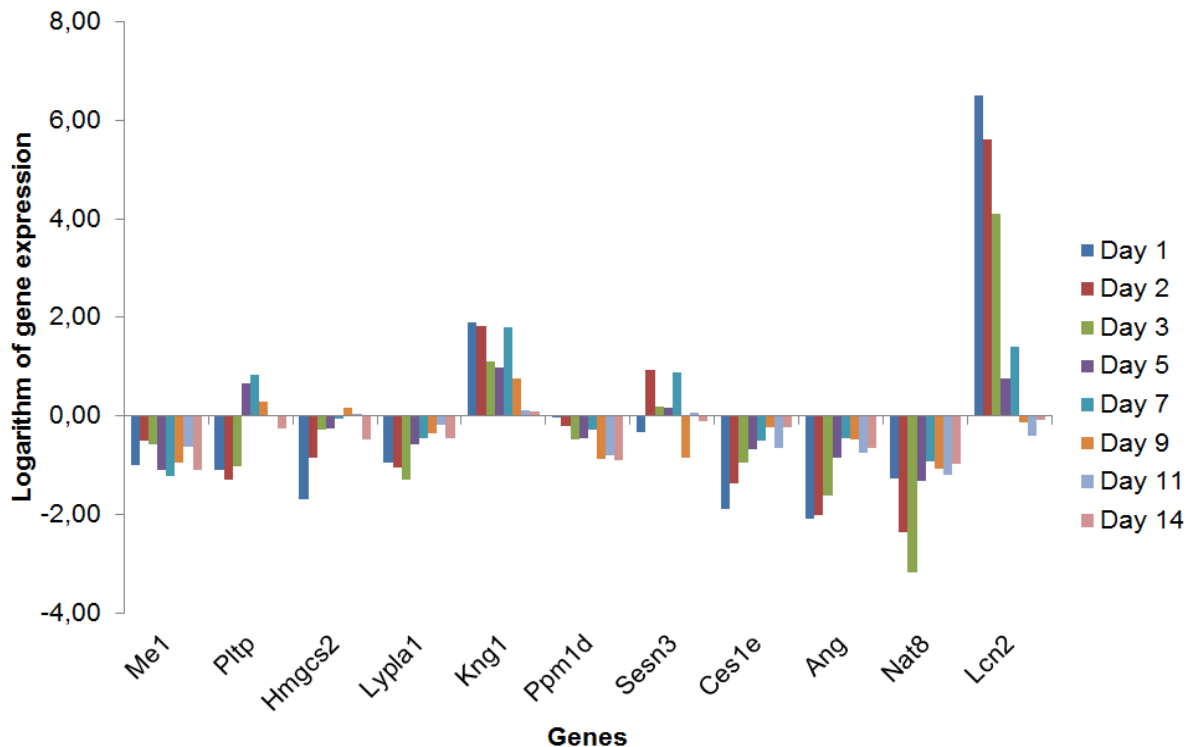
Mitochondriální 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA syntetáza (*Hmgcs2*) katalyzuje první reakci ketogeneze, metabolické dráhy, která poskytuje extrahepatálním orgánům energii získanou katabolizmem lipidů v dobách sacharidové deprivace (Robinson a Williamson, 1980). Expresa *Hmgcs2* byla v prvních dvou dnech po PH snížena a v pozdějších dnech jen zanedbatelně změněna oproti kontrolám. Takovýto vývoj je v souladu s výsledky Yuana a kol. (2011) a Asinse a kol. (1994). Popsaná dynamika exprese *Hmgcs2* může 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).

Obrázek 4. 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 nejtmašími 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 (Rychtrmoc *et al.*, 2012).

Protein přenášející fosfolipidy (Pltp) se účastní transportu fosfolipidů z VLDL a LDL v plazmě a hraje roli v transportu cholesterolu 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. Navzdory zdokumentovanému nárůstu koncentrace cholesterolu v regenerujícím jaterním parenchymu (Abel *et al.*, 2001, Yoshida *et al.*, 1993), lze nalézt pro tento paradoxně působící vývoj exprese Pltp dvě vysvětlení. Jedním je potenciální obrana před transportem lipopolysacharidu zvýšeně po hepatektomii uvolňovaného ze střev (Massey *et al.*, 1984). Druhým je fakt, že exprese Pltp podléhá regulaci 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).

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 námi sledovaných intervalech. Ve 2. a 3. pooperačním dni bylo snížení nejmírnější, naopak nejvýraznější bylo v 5. a 7. 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. (2011), kteří udávají pro Me1 zvýšenou expresi za 168 hodin po PH a nezměněnou expresi oproti laparotomované kontrole za 6 hodin po PH.

Gen pro lyzofosfolipázu 1 (Lypla1), měl v naší studii ve všech „časných“ intervalech progresivně klesající expresi. V „pozdních“ intervalech byla jeho exprese oproti kontrolní skupině také snižena ale méně výrazně. Lypla1, známá také jako acyl-protein thioesteráza 1 (APT-1), hydrolyzuje pestré škály 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). Dynamika její exprese je v souladu se zvýšenou dodávkou mastných kyselin z periferních zásob v počátečních obdobích regenerace (Ockner, 2004) a s celkovým útlumem katabolismu fosfolipidů během jaterní regenerace, doloženým v práci Xua a kol. (2008).

Tabulka 5. Seznam genů validovaných real-time PCR se stručným přehledem výsledků

Symbol genu	KEGG dráha	Maximum / minimum genové exprese podle fází regenerace	Odkazované publikace	
			ve shodě	v rozporu
Hmgcs2 *	rno03320	--- / časná	1, 2, 3	
Pltp *	rno03320	pozdní / časná	4, 5, 6	7, 8
Me1 *	rno03320	--- / pozdní		1, 2
Lypla1 *	rno00564	--- / časná	1, 2, 9	
Kng1 *	rno04610	časná i pozdní / ---	10, 11	
Ppm1d *	rno04115	--- / pozdní		12, 13
Sesn3 *	rno04115	časná i pozdní / pozdní		12, 13
Ces1e	rno00983	--- / časná	1, 2	
Lcn2	---	časná / ---	14 - 19	
Ang	---	--- / časná	14, 20	
Nat8	---	--- / časná	21	
Legenda k odkazovaným publikacím				
Číslo	Autoři a roky vydání (podrobně viz seznam použité literatury)			
1	Ockner 2004			
2	Yuan <i>et al.</i> 2011			
3	Asins <i>et al.</i> 1994			
4	Massey <i>et al.</i> 1984			
5	Cao <i>et al.</i> 2002			
6	Lo Sasso <i>et al.</i> 2010			
7	Abel <i>et al.</i> 2001			
8	Yoshida <i>et al.</i> 1993			
9	Xu <i>et al.</i> 2008			
10	Aravena <i>et al.</i> 2005			
11	Perez <i>et al.</i> 2006			
12	Sakamoto <i>et al.</i> 1999			
13	Masson <i>et al.</i> 2000			
14	Mohammed a Khokha 2005			
15	Bolignano <i>et al.</i> 2010			
16	Playford <i>et al.</i> 2006			
17	Zhang <i>et al.</i> 2009			
18	Jayaraman <i>et al.</i> 2005			
19	Lai <i>et al.</i> 2013			
20	Hu a Riordan 1993			
21	Veiga-da-Cunha <i>et al.</i> 2010			

Tabulka 5 uvádí výčet jedenácti genů, jejichž dynamiku exprese jsme stanovovali jak na DNA čipech, tak pomocí real-time PCR. Výběr byl v sedmi případech založen na analýze genového obohacení – tyto geny jsou označeny *. Zbývající čtyři geny byly vybrány podle posouzení dat z DNA čipů a článků. Většina uvedených byla mezi 359 geny charakteristicky exprimovanými v pozdní fázi, které jsme hledali popsány bioinformatickými analýzami v prostředí R. Výjimkami v tomto směru 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.*, 2011). 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.

V naší studii jsme dále 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 čtyřem genům zvoleným pro validaci nikoliv výpočetní analýzou genomového obohacení, ale vlastním pročitáním publikací a posuzováním dat z DNA čipů. Prvním z nich byla karboxylesteráza 1e (Ces1e), jež má několik funkcí blízce spjatých 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. (2011) ohledně exprese Acs11 (člen 1 rodiny acyl-CoA syntetáz s dlouhým řetězcem), také se účastní katabolizmu mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Pokles exprese obou genů pavděpodobně souvisí se zesílenou signalizací zprostředkovanou PPAR α a podporující extramitochondriální oxidaci mastných kyselin (Ockner, 2004).

Další validovaný gen, lipokalin 2 (Lcn2), byl prvním z oněch tří našich kandidátů, postrádajících funkční asociaci v databázi KEGG. 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*. Časně po resekci se může Lcn2 uplatňovat díky svým prozánětlivým a bakteriostatickým vlastnostem a spojitosti s časně indukovanými cytokiny (interleukinem 6 a interleukinem 1 β) (Jayaraman *et al.*, 2005). Lcn2 také brání inaktivaci MMP-9 a tím se podílí na přestavbě mezibuněčné hmoty (Bolignano *et al.*, 2010, Playford *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2009). Četné biologické role Lcn2 znesnadňují dohady o jeho úloze v „časné“ a „pozdní“ fázi 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). Naše data svědčí pro podstatný pokles exprese Ang ve všech „časných“ dnech a mírnější snížení exprese oproti kontrolám po dobu celé „pozdní“ fáze. Ang má přesvědčivě prokázanou schopnost urychlovat tvorbu plazminu (Hu a Riordan, 1993). Plazmin zase aktivuje prekurzory matrix metaloproteáz se signálními konsekvencemi v průběhu regenerace jater (Mohammed a Khokha, 2005). Novější poznatky poukazují na možné širší uplatnění Ang jako regulátoru translace cíleně upřednostňujícího anti-apoptotické a další proteiny podporující přežití buněk v podmínkách zvýšené zátěže (Li a Hu, 2012).

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.

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 tkáně 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 (2011) 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.

Použitá literatura

- 1) ABEL, S., SMUTS, C. M., DE VILLIERS, C. a GELDERBLUM, 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.
- 2) 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.
- 3) ALVARADO, A. S. a P. A. TSONIS. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nature Reviews Genetics*, 2006, **7**873-884.
- 4) 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.
- 5) APPLIED BIOSYSTEMS INC. *Amino Alkyl MessageAmp™ Kit: RNA Amplification and Labeling for Array Analysis*. P/N 1752M Revision C. [s.l.], 2010.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) BRDIČKA, R. a H. BRUCHOVÁ VOTAVOVÁ. Vznik a rozmach čipových technologií. *Klinická onkologie*, 2006, **19**(Supplement 2), 331 - 332.
- 12) BRODANOVÁ, M. Historie. *Hepatologie*. Jiří Ehrmann, Petr Hůlek (eds). Praha: Grada, 2010, s. 3-16. ISBN 978-80-247-3118-6.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) DOBBIN, K. a R. SIMON. Comparison of microarray designs for class comparison and class discovery. *Bioinformatics*, 2002, **18**(11), 1438-1445.

- 18) 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.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) FAUSTO, N. a K. J. RIEHLE. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2005, **12**(3), 181-189.
- 23) 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.
- 24) GAUB, J. a J. IVERSEN. Rat liver regeneration after 90% partial hepatectomy. *Hepatology*, 1984, **4**(5), 902-904.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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
- 28) GORDON, A. D. *Classification*. London: Chapman & Hall/CRC, 1999. ISBN 9781584888536.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) HOLASOVÁ, Š., RADILOVÁ, H. a BUNČEK, M. *Praktická cvičení z molekulární genetiky*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1072-8.
- 34) HU, G. F. a J. F. RIORDAN. Angiogenin enhances actin acceleration of plasminogen activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **197**(2), 682-687.

- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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.
- 39) 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.
- 40) JIROUTOVÁ, A., SLAVKOVSKÝ, R., ČERMAKOVÁ, M., MAJDIKOVÁ, 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) KANEHISA, M., GOTO, S., KAWASHIMA, S. a NAKAYA, A. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(1), 42-46.
- 45) 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.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.

- 49) LIEBERMAN, I. a P. KANE. Synthesis of Ribosomes in the Liver after Partial Hepatectomy. *J Biol Chem*, 1965, **240**(4), 1737-1741.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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.
- 53) 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.
- 54) 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.
- 55) MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration. *J Cell Physiol*, 2007, **213**(2), 286-300.
- 56) MICHALOPOULOS, G. K. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*, 2010, **176**(1), 2-13.
- 57) MOHAMMED, F. F. a R. KHOKHA. Thinking outside the cell: proteases regulate hepatocyte division. *Trends Cell Biol*, 2005, **15**(10), 555-563.
- 58) 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.
- 59) MULLIS, K.B. a F. A. FALOONA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 1987, **155**, 335-350.
- 60) 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.
- 61) 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.
- 62) 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.
- 63) PALMES, D. a H. U. SPIEGEL. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials*, 2004, **25**(9), 1601-1611.
- 64) 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.

- 65) PEKÁR, S. a M. BRABEC. *Moderní analýza biologických dat. Zobecněné lineární modely v prostředí R*. Biologie dnes. Praha: Scientia, 2009.
- 66) 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.
- 67) PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(9), e45.
- 68) 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.
- 69) 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.
- 70) 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.
- 71) 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.
- 72) 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.
- 73) 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.
- 74) 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.
- 75) 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.
- 76) 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.
- 77) 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.
- 78) 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).
- 79) SMYTH, G. K. a T. SPEED. Normalization of cDNA microarray data. *Methods*, 2003, **31**(4), 265-273.
- 80) 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.
- 81) STEKEL, D. *Microarray Bioinformatics*. Cambridge University Press, 2003. ISBN 0-521-52587-X.

- 82) 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.
- 83) 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.
- 84) TAUB, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**(10), 836-847.
- 85) TINIAKOS, D. G., KANDILIS, A. a GELLER, S. A. Tityus: a forgotten myth of liver regeneration. *J Hepatol*, 2010, **53**(2), 357-361.
- 86) 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.
- 87) TOM, C. T. a B. R. MARTIN. Fat chance! Getting a grip on a slippery modification. *ACS Chem Biol*, 2013, **8**(1), 46-57.
- 88) 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.
- 89) 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>
- 90) 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.
- 91) 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.
- 92) 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.
- 93) 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.
- 94) 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.

- 95) 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.
- 96) WATSON, J. D. a F. H. CRICK. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 1953, **171**(4361), 964-967.
- 97) XU, C., LIN, F. a QIN, S. Relevance between lipid metabolism-associated genes and rat liver regeneration. *Hepatol Res*, 2008, **38**, 825-837.
- 98) 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.
- 99) 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.
- 100) 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.
- 101) 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*, 2011, **10**(3), 1179-1190.
- 102) 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.
- 103) 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.

Přehled publikační činnosti autora

Původní články

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. **IF (2012) = 1,531**

RYCHTRMOC, D., LIBRA, A., BUNČEK, M., GARNOL, T., ČERVINKOVÁ, Z. Studying liver regeneration by means of molecular biology: how far we are in interpreting the findings? *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2009, 52(3), 91-99. ISSN: 1211-4286.

DRAHOTA, Z., ENDLICHER, R., STAŇKOVÁ, P., RYCHTRMOC, D., MILEROVÁ, M., ČERVINKOVÁ, Z. Characterization of calcium, phosphate and peroxide interactions in activation of mitochondrial swelling using derivative of the swelling curves. *J Bioenerg Biomembr*, 2012, 44(3), 309-315. **IF (2012) = 1,604**

DRAHOTA, Z., MILEROVÁ, M., ENDLICHER, R., RYCHTRMOC, D., ČERVINKOVÁ, Z., OŠŤÁDAL, B. Developmental changes of the sensitivity of cardiac and liver mitochondrial permeability transition pore to calcium load and oxidative stress. *Physiol Res*, 2012, 61, Suppl 1, S165-172. **IF (2012) = 1,531**

KUČERA, O., AL-DURY, S., LOTKOVÁ, H., ROUŠAR, T., RYCHTRMOC, D., ČERVINKOVÁ, Z. Steatotic rat hepatocytes in primary culture are more susceptible to the acute toxic effect of acetaminophen. *Physiol Res*, 2012, 61, Suppl 2, S93-101. **IF (2012) = 1,531**

BOLEHOVSKÁ, R., POSPÍŠILOVÁ, M., RYCHTRMOC, D., HUBÁLKOVÁ, L., ČERVINKOVÁ, Z. Induction of uncoupling protein-2 mRNA by triiodothyronine in rat liver. *Acta Veterinaria Brno*, 2012, 81(1), S75-81. **IF (2012) = 0,393**

Statě ve sbornících

RYCHTRMOC, David, LIBRA, Antonín, POSPÍŠILOVÁ, Monika, BUNČEK, Martin, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Zavedení metody DNA čipů pro hodnocení jaterní regenerace po parciální hepatektomii. XXXVI. Májové hepatologické dny, 14. - 16. 5. 2008, Karlovy Vary (přednáška), abstrakt publikován v časopise *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie* 2008, roč. 62, č. 2, s. 118. ISSN 1213-323X.

RYCHTRMOC, David, LIBRA, Antonín, POSPÍŠILOVÁ, Monika, BUNČEK, Martin, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Změny exprese transkriptů se vztahem k funkci mitochondrií během jaterní regenerace po parciální hepatektomii. XXXVII. Májové hepatologické dny, 13. - 15. 5. 2009, Karlovy Vary (poster), abstrakt publikován v časopise *Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie* 2009, roč. 63, č. 3 (Supplementum), s. 155. ISSN 1213-323X.

RYCHTRMOC, David, LIBRA, Antonín, HUBÁLKOVÁ, Lenka, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Quantitative whole genome gene expression analysis in a rat partial hepatectomy model. XIV. Vědecká konference LF UK v Hradci Králové a FN Hradec Králové, 20. 1. 2010, Hradec Králové (přednáška), abstrakt publikován v časopise *Acta medica (Hradec Králové)* 2010, 53(1), s. 61-62. ISSN 1211-4286.

RYCHTRMOC, David, HUBÁLKOVÁ, Lenka, VÍŠKOVÁ, Alena, LIBRA, Antonín, BUNČEK, Martin, STAŇKOVÁ, Pavla, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Expression of mitochondria-related genes during liver regeneration in a rat 2/3 partial hepatectomy model evaluated by DNA microarray analysis. Prague Hepatology Meeting 2010, 17. 9. 2010, Praha (poster), abstrakt publikován ve sborníku Prague Hepatology Meeting 2010, Book of Abstracts, s. 105. ISBN 978-80-254-7885-1.

HUBÁLKOVÁ, Lenka, RYCHTRMOC, David, LIBRA, Antonín, POSPÍŠILOVÁ, Monika, BUNČEK, Martin, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Ukončení jaterní regenerace: příspěvek k odhalování dlouho opomíjených mechanismů. XXXIX. Májové hepatologické dny, 13. 5. 2011, Karlovy Vary (přednáška), abstrakt publikován v časopise *Gastroenterologie a hepatologie* 2011, 65 (Suppl 1), s. S28-S29. ISSN 1804-7874 (Print). ISSN 1804-803X (Online).

RYCHTRMOC, David, HUBÁLKOVÁ, Lenka, VÍŠKOVÁ, Alena, LIBRA, Antonín, BUNČEK, Martin, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Insights from Transcriptional Analysis of Liver Regeneration Termination. 8th International Medical Postgraduate Conference Hradec Kralove, 10. - 12. 11. 2011, Hradec Králové (přednáška), abstrakt publikován ve sborníku The 8th International Medical Postgraduate Conference: New Frontiers in the Research of PhD Students, Hradec Králové: Astraprint, 2011, s. 95-97. ISBN 978-80-260-0922-1.

RYCHTRMOC, David, HUBÁLKOVÁ, Lenka, VÍŠKOVÁ, Alena, LIBRA, Antonín, BUNČEK, Martin, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Transcriptome temporal and functional analysis of liver regeneration termination. 88. Fyziologické dny, 7. - 9. 2. 2012, Hradec Králové (přednáška), abstrakt publikován ve sborníku 88. Fyziologické dny, Brno: Tribun EU, 2012, s. 71. ISBN 978-80-263-0210-0.

Sdělení na odborných setkáních

RYCHTRMOC, David, LIBRA, Antonín, POSPÍŠILOVÁ, Monika, BUNČEK, Martin, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Zavedení metody DNA čipů pro hodnocení jaterní regenerace po parciální hepatektomii. XXXVI. Májové hepatologické dny, 14. 5. 2008, Karlovy Vary (přednáška)

RYCHTRMOC, David, LIBRA, Antonín, POSPÍŠILOVÁ, Monika, BUNČEK, Martin, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Změny exprese transkriptů se vztahem k funkci mitochondrií během jaterní regenerace po parciální hepatektomii. XXXVII. Májové hepatologické dny, 13.-15. 5. 2009, Karlovy Vary (poster)

RYCHTRMOC, David, LIBRA, Antonín, HUBÁLKOVÁ, Lenka, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Quantitative whole genome gene expression analysis in a rat partial hepatectomy model. XIV. Vědecká konference LF UK v Hradci Králové a FN Hradec Králové, 20. 1. 2010, Hradec Králové (přednáška)

RYCHTRMOC, David, HUBÁLKOVÁ, Lenka, VÍŠKOVÁ, Alena, LIBRA, Antonín, BUNČEK, Martin, STAŇKOVÁ, Pavla, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Expression of mitochondria-related genes during liver regeneration in a rat 2/3 partial hepatectomy model evaluated by DNA microarray analysis. Prague Hepatology Meeting 2010, 17. 9. 2010, Praha (poster)

RYCHTRMOC, David, HUBÁLKOVÁ, Lenka, VÍŠKOVÁ, Alena, LIBRA, Antonín, BUNČEK, Martin, STAŇKOVÁ, Pavla, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Mechanisms of liver regeneration termination after 2/3 partial hepatectomy in rats: a DNA microarray study. Practical Course on Analysis and Informatics of Transcriptomics Data, 22. 10. 2010, Hinxton (Velká Británie), (poster)

RYCHTRMOC, David, HUBÁLKOVÁ, Lenka, VÍŠKOVÁ, Alena, LIBRA, Antonín, BUNČEK, Martin, STAŇKOVÁ, Pavla, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Expression of mRNA processing-related genes during liver regeneration in a rat 2/3 partial hepatectomy model evaluated by DNA microarray analysis. RNA Club 2010, 5. 11. 2010, České Budějovice (poster)

RYCHTRMOC David. Budeme se všichni věnovat systémové biologii? A co to vlastně je? 472. plenární zasedání Fyziologické sekce ČLS JEP v HK a pobočky Československé biologické společnosti v HK. 1. 12. 2010, Hradec Králové (přednáška)

RYCHTRMOC, David, HUBÁLKOVÁ, Lenka, VÍŠKOVÁ, Alena, LIBRA, Antonín, BUNČEK, Martin, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Insights from Transcriptional Analysis of Liver Regeneration Termination. 7. fakultní konference studentů doktorského studia, 17. 10. 2011, Hradec Králové (přednáška)

RYCHTRMOC, David, HUBÁLKOVÁ, Lenka, VÍŠKOVÁ, Alena, LIBRA, Antonín, BUNČEK, Martin, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Insights from Transcriptional Analysis of Liver Regeneration Termination. 8th International Medical Postgraduate Conference Hradec Kralove, 10.-12. 11. 2011, Hradec Králové (přednáška)

RYCHTRMOC, David, HUBÁLKOVÁ, Lenka, VÍŠKOVÁ, Alena, LIBRA, Antonín, BUNČEK, Martin, ČERVINKOVÁ, Zuzana. Transcriptome temporal and functional analysis of liver regeneration termination. 88. Fyziologické dny, 7.-9. 2. 2012, Hradec Králové (přednáška)