

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta



Dizertační práce

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka

Vývoj šetrnějších postupů při transplantaci inzulin-produkující tkáně
Development of effective procedures for transplantation of insulin-producing tissue

MUDr. Zuzana Hladíková

Školitel: prof. MUDr. František Saudek, DrSc.

Praha 2024

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Tento projekt byl finančně podpořen granty GAUK projekt č.119, Ministerstva zdravotnictví České republiky č. 17-29009A, Grantové agentury České republiky č. 19-07661S a z Institucionální podpory Institutu klinické a experimentální medicíny IN 00023001, MZČR. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 15. března 2024

MUDr. Zuzana Hladíková

Podpis:

Identifikační záznam

HLADÍKOVÁ, Zuzana. *Vývoj šetrnějších postupů při transplantaci inzulin-produkující tkáně. [Development of effective procedures for transplantation of insulin-producing tissue].* Praha 2024. Počet stran: 59, počet příloh: 4.

Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Fyziologie a patofyziologie člověka.

Vedoucí práce prof. MUDr. František Saudek, DrSc., Centrum diabetologie IKEM.

Klíčová slova: transplantace Langerhansových ostrůvků, velké omentum, diabetes 1. typu, bioluminiscence

Key words: Pancreatic Islets Transplantation, Greater Omentum, Type 1 Diabetes, Bioluminescence

Konflikt zájmů

Prohlašuji, že nemám žádné konkurenční finanční ani jiné vztahy s žádnou organizací, která by mohla mít zájem na předložené práci v předchozích pěti letech.

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem svým kolegům z Laboratoře Langerhansových ostrůvků IKEM, kteří se mnou pracovali na projektech zmíněných v této práci, a to především MUDr. Barboře Hagerf. Společně jsme připravily a zavedly jak experimentální, tak klinickou část programu transplantace Langerhansových ostrůvků do velkého omenta. Velice děkuji RNDr. Zuzaně Berkové, Ph.D. a MVDr. Alžbětě Pátíkové za pomoc při chirurgických experimentech a metabolickém monitorování zvířat, RNDr. Alžbětě Vojtíškové a Mgr. Ivanu Leontovyčovi, Ph.D. za pomoc při zpracovávání histologických a imunofluorescenčních vzorků.

Velké poděkování patří také doc. MUDr. Janu Křížovi, Ph.D. za jeho pomoc při realizaci experimentů a podporu při mé klinické práci.

Taktéž bych chtěla poděkovat celé mé rodině za jejich neutuchající podporu, porozumění a trpělivost při mé práci a studiích.

A na závěr bych chtěla velmi poděkovat mému školiteli, prof. MUDr. Františkovi Saudkovi, DrSc., za jeho pomoc s disertační prací, mým postgraduálním studiem a za jeho profesionální, ale zároveň lidský přístup. Jsem velice vděčná, že jsem měla možnost pracovat na výzkumném pracovišti světové úrovně a svůj experimentální výzkum propojit s klinickou medicínou.

Seznam zkratek

ATP	Adenosin trifosfát
AUC	Plocha pod křivkou (area under curve)
BLI	Bioluminiscence
CGM	Kontinuální monitorace glukózy (continuous glucose monitoring)
CITR	Mezinárodní registr výsledků transplantací ostrůvků (Collaborative Islet Transplant Registry)
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidin fenylnol
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DRI	Diabetes Research Institute
ECM	Extracelulární matrix
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Entaktin/NID	Nidogen-1
FBS	Fetální bovinní sérum
FSL	Frakční ztráta signálu
GA	Žaludeční tepna (gastric artery)
GLUT	Glukózové přenašeče (glucose transporters)
HbA1c	Glykovaný hemoglobin
H ₂ O ₂	Peroxid vodíku
H&E	Hematoxylin&eosin
HEPES	Kyselina N'-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethansulfonová
IBMIR	Okamžitá nespecifická zánětlivá odpověď (instant blood-mediated inflammatory reaction)
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
IVGTT	Intravenózní glukózový toleranční test
KG	Koeficient asimilace glukózy
LO	Langerhansovy ostrůvky
LUC	Luminiscentní
MICA	Major-histocompatibility-complex (MHC) class I-related chain A
MR, MRI	Magnetická rezonance
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NFAT	Nukleární faktor aktivovaných T-buněk
PBS	Fosfátový pufr
PDH	Ductus pancreaticus (z hepatální strany)
PDP	Ductus pancreaticus (přes papilu)
PV	Portální žíla
SD	Směrodatná odchylka (standard deviation)
SPIO	Superparamagnetický oxid železa
ST	Doba skenování
SV	Splenická žíla (splenic vein)
TR	Doba opakování
TRIS	Trisaminomethan
TX	Transplantace
VEGF	Vaskulární endotelový růstový faktor

Souhrn

Předkládaná disertační práce je věnována nové metodě transplantace Langerhansových ostrůvků do velkého omenta. Transplantace Langerhansových ostrůvků je zavedenou možností léčby vybraných pacientů s nestabilním diabetem. Jako místo pro transplantaci ostrůvků se v klinickém prostředí používají téměř výhradně játra. Bohužel okamžitě po implantaci štěpu do portálního řečiště dochází ke ztrátě podstatné části ostrůvků a funkce štěpu v játrech se může v průběhu času dále zhoršovat. Další osud a umístění ostrůvků implantovaných do jater lze pouze obtížně sledovat pomocí radiologických metod nebo biopsií. Všechna tato omezení vedla k hledání alternativních míst pro transplantaci.

Náš výzkum byl zaměřen na transplantaci Langerhansových ostrůvků do velkého omenta. Velké omentum je dobře chirurgicky dostupné, splňuje nároky na vysoké krevní zásobení a pojme velké objemy tkáně k transplantaci. Metabolická funkce samotného štěpu ostrůvků v omentu bez fixace však v experimentu nikdy nedosahovala uspokojivých dlouhodobých výsledků. Ke zlepšení přijetí štěpu a udržení dlouhodobé funkce v omentu je využíváno metod tkáňového inženýrství.

V našem projektu jsme štěp ostrůvků transplantovali do omenta potkanů za použití biokompatibilního gelu, sestávajícího z plazmy příjemce a humánního trombinu. Transplantační experimenty jsme prováděli na diabetických potkanech a metabolické výsledky nové metody transplantace jsme porovnávali se standardní metodou transplantace do jater. Umístění a viabilitu štěpu v omentu jsme potvrdili pomocí kvantitativního bioluminiscenčního zobrazování. V druhé části experimentu jsme připravili decelularizovaný skelet pankreatu vhodný pro transplantaci do omenta potkana. Do skeletů jsme implantovali štěp značený nanočásticemi železa a tyto konstrukty jsme po transplantaci do omenta zobrazovali magnetickou rezonancí.

Vzhledem k úspěchu experimentálního modelu jsme připravili protokol pro transplantaci Langerhansových ostrůvků v plazma-trombinovém gelu do omenta u pacientů s diabetes mellitus 1. typu se syndromem porušeného vnímání hypoglykémie. Allogenní štěp byl pacientům transplantován do velkého omenta dispergovaný ve vlastní plazmě a překryt humánním trombinem. Výkon byl prováděn laparoskopicky. V rámci našeho projektu se podařilo transplantaci úspěšně provést u 3 osob. Transplantace do velkého omenta u nich vedla ke stabilizaci onemocnění, ke snížení dávek inzulínu a obnovení vnímání hypoglykémie.

Summary

The presented doctoral thesis is focused on a new method of transplantation of islets of Langerhans into the greater omentum. Transplantation of pancreatic islets is an established treatment option for selected patients with unstable diabetes. The liver is almost exclusively used as a site for islet transplantation in the clinical setting. Unfortunately, immediately after graft implantation into the portal circulation, a substantial portion of the islets is lost and graft function in the liver may further deteriorate over time. The fate and location of islets implanted in the liver can only be followed with difficulty by radiological methods or biopsies. All these limitations have led to the search for alternative sites for transplantation.

Our research has been focused on the transplantation of pancreatic islets into the greater omentum. The greater omentum is easily surgically accessible, meets the demands of a high blood supply and can accommodate large volumes of transplanted tissue. However, the metabolic function of the islet graft itself in the omentum without fixation never achieved satisfactory long-term results in the experiment. Tissue engineering techniques have been used to improve graft attachment and maintain long-term function in the omentum.

In our project, we transplanted islets into the rat omentum using a biocompatible gel consisting of recipient plasma and human thrombin. Transplantation experiments were performed in diabetic rats and the metabolic results of the new transplantation method were compared with the standard liver transplantation method. We confirmed the location and viability of the graft in the omentum by quantitative bioluminescence imaging. In the second part of the experiment, we prepared decellularized pancreatic skeletons suitable for transplantation into the rat omentum. We implanted an iron nanoparticle-labeled graft into the skeletons and mapped these constructs by magnetic resonance imaging after transplantation into the omentum.

Given the success of the experimental model, we developed a protocol for transplanting islets of Langerhans in plasma-thrombin gel into the omentum of patients with type 1 diabetes mellitus with impaired hypoglycemia awareness syndrome. The allogeneic graft was transplanted into the large omentum dispersed in their own plasma and overlaid with human thrombin. The procedure was performed laparoscopically. In our project, the transplantation was successfully performed in 3 persons. Transplantation into the greater omentum resulted in stabilization of the disease, reduction of insulin doses and restoration of hypoglycemia awareness.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Transplantace inzulin-produkující tkáně	1
1.2. Transplantace Langerhansových ostrůvků	2
1.3. Současný stav vývoje metody	4
1.4. Velké omentum jako alternativní místo transplantace Langerhansových ostrůvků... 7	
1.5. Transplantace do velkého omenta za použití metod tkáňového inženýrství	8
2. Hypotézy a cíle práce	11
3. Metody	12
3.1. Metodika transplantace Langerhansových ostrůvků do velkého omenta za použití plazma-thrombinové matrix	12
3.1.1. Zvířecí model	12
3.1.2. Izolace Langerhansových ostrůvků	12
3.1.3. Metodika decelularizace pankreatu a implantace skeletů do velkého omenta. 15	
3.2. Klinická transplantace Langerhansových ostrůvků do omenta	19
3.2.1. Výběr pacientů a zařazení na čekací listinu	19
3.2.2. Příprava biomatrix	20
3.2.3. Izolace Langerhansových ostrůvků	21
3.2.4. Příprava štěpu k transplantaci	21
3.2.5. Transplantace Langerhansových ostrůvků do velkého omenta	21
3.2.6. Imunosupresivní protokol	21
3.2.7. Metabolické sledování pacientů	22
3.3. Statistické metody	22
4. Výsledky	23
4.1. Experimentální část	23
4.1.1. Transplantace Langerhansových ostrůvků do velkého omenta za použití plazma-thrombinové matrix	23
4.1.2. Decelularizace pankreatu a implantace skeletů do velkého omenta	27
4.2. Klinická transplantace	32
4.2.1. Transplantace ostrůvků do velkého omenta	32
4.2.2. Vývoj glykemií, metabolické sledování pacientů	32
5. Diskuze	35
6. Závěr	40
7. Reference	41
8. Přehled publikací	48

8.1. Publikace s IF přímo související s tématem dizertační práce.....	48
8.2. Publikace s IF nesouvisející s tématem dizertační práce	48
9. Přílohy	49

1. Úvod

1.1. Transplantace inzulín-produkující tkáně

Orgánová transplantace pankreatu a transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků (LO) jsou dnes dvě dostupné metody, které jako jediné dokážou u pacientů s diabetem normalizovat metabolismus glukózy, a to bez rizika hypoglykémie [1]. Ač se v diabetologii portfolio léčebných prostředků v posledních letech rozšířilo o tzv. hybridní polouzavřené okruhy spojující inzulínové pumpy s kontinuálními senzory hladiny glukózy, tyto systémy zatím nefungují autonomně a pro svou optimální funkci vyžadují aktivní spolupráci ze strany pacienta [2] a nedokážou zcela zabránit rozvoji hypoglykémie. Transplantační léčba je tedy zatím jedinou možností, která může pacienta zbavit neustálého rozhodování o volbě vhodné dávky, složení, úpravy jídla, načasování a způsobu aplikace inzulínu.

Normální hodnoty glykémie navozené transplantací by mohly v dlouhodobém horizontu zabránit vzniku chronických komplikací diabetu [3]. V klinické praxi mají osoby podstupující transplantaci inzulín-produkující tkáně většinou mikrovaskulární i makrovaskulární komplikace rozvinuté v pokročilém stádiu, a tak je možné očekávat pouze jejich stabilizaci [4]. Mezi časté pokročilé komplikace patří tzv. diabetické onemocnění ledvin, které v mnoha případech vede k chronickému selhání jejich funkce, jež je možné léčit transplantací ledviny. Protože nabídka vhodných orgánů k transplantaci je omezená, provádí se transplantace pankreatu nebo ostrůvků nejčastěji právě u osob s diabetem 1. typu, které současně potřebují transplantovat i ledvinu.

Indikací transplantace samotného pankreatu nebo samotných ostrůvků je proto méně. Patří mezi ně zejména diabetes mellitus 1. typu se syndromem porušeného vnímání hypoglykémie, kdy byly vyčerpány možnosti dostupných technických prostředků jako prevence těžkých hypoglykemií. Kromě nedostatku dárců je limitem pro indikaci transplantace rozvaha, zda přínos normalizace glykemií, případně eliminace závažných hypoglykemií, vyváží riziko, které přináší celoživotní imunosupresivní léčba.

Při transplantaci pankreatu se dárcovský orgán s částí duodena heterotopicky ukládá do břišní dutiny příjemce, kdy drenáž pankreatické šťávy zajišťuje napojení štěpu na tenké střevo. Žíly štěpu se připojí k portální žíle a tepny k pánevní tepně příjemce. Jedná se o komplikovaný chirurgický výkon trvající 4–5 hodin. Transplantace pankreatu zpravidla bezprostředně vede k plné metabolické kontrole diabetu bez potřeby podávat exogenní inzulín. Transplantace Langerhansových ostrůvků se v principu provádí u stejného spektra pacientů. Hlavní indikací

jsou opět konzervativně nevládnutelné časté epizody závažných hypoglykemií, které mohou ohrožovat život. Ve srovnání s orgánovou transplantací je tento výkon mnohem méně invazivní. Je proto vhodný i pro pacienty s kardiovaskulárními chorobami, pro které by orgánová transplantace pankreatu byla příliš riziková. Nevýhodou transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků je ovšem obecně menší objem transplantované inzulin produkující tkáně, protože při izolaci ostrůvků od exokrinní tkáně dochází často k nadpoloviční ztrátě Langerhansových ostrůvků. To je také hlavní důvod, proč se v řadě případů nepodaří dosáhnout úplné nezávislosti na exogenním inzulinu, a je tedy někdy nutno transplantační výkon opakovat. I tato metoda je možná v kombinaci s transplantací ledviny. Podrobněji se touto metodou zabývá kapitola 1.2. Transplantace Langerhansových ostrůvků do jater.

Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM) v Praze je momentálně jediným transplantačním centrem v České republice a na Slovensku, kde se transplantace inzulin-produkující tkáně provádějí. Počtem provedených výkonů, který do roku 2023 přesahoval číslo 900, se řadí s ohledem na počet obyvatel mezi prvních 10 nejaktivnějších světových center [5]. Desetileté přežití pacientů po kombinované transplantaci se pohybuje kolem 83 %, přežití štěpů ledviny 72 % a štěpů slinivky 65 % (selhání štěpu ledviny je definováno jako úmrtí pacienta, návrat k dialýze, retransplantace nebo odstranění štěpu; selhání štěpu slinivky je definováno jako úmrtí pacienta, návrat k dlouhodobé léčbě inzulinem, odstranění či retransplantace štěpu slinivky). Příčinou úmrtí po transplantaci jsou nejčastěji kardiovaskulární příčiny a infekce [6].

Hlavními úskalími transplantační léčby jsou nedostatečný počet dárců a nutnost chronické imunosupresivní terapie. V zájmu dosažení dostatečné ochrany štěpu při minimálním riziku nežádoucích účinků se kombinují imunosupresiva s různým mechanismem účinku podávaná v malých dávkách. V rámci tzv. Edmontonského protokolu [7] se po transplantaci izolovaných Langerhansových ostrůvků zcela ustoupilo od podávání kortikosteroidů, ale i přesto má využívaná udržovací imunosuprese nežádoucí účinky vyplývající z mechanismu jejich působení.

1.2. Transplantace Langerhansových ostrůvků

Transplantace Langerhansových ostrůvků je již zavedenou metodou léčby osob s diabetes mellitus 1. typu se syndromem porušeného vnímání hypoglykémie, u kterých selhala léčba moderními technologiemi. V některých transplantačních centrech ve světě se již její výsledky začínají blížit výsledkům orgánové transplantace pankreatu [8].

Izolace LO probíhá ve specializované laboratoři. Dárce pankreatu nesmí mít v anamnéze diabetes mellitus a požadovaná kvalita orgánu je stejná jako pro transplantaci orgánovou. Častou překážkou pro úspěšnou izolaci ostrůvků bývá edém, fibróza, extrémní obsah tuku, poranění orgánu nebo příliš dlouhá manipulace při upřednostnění péče o život zachraňující orgány (plíce, srdce, játra) [9]. Odběr orgánu probíhá většinou v rámci multiorgánového odběru, za stejných podmínek jako pro orgánovou transplantaci. Orgány se zchladí pomocí konzervačního roztoku na teplotu 4–7 °C, v tomto roztoku sterilně zabalí a pro transport uloží do ledové tříště. Po převzetí izolační tým oddělí duodenum, slezinu a veškerou okolní tkáň tak, aby neporušil vnější pankreatickou kapsulu. Cestou ductus pancreaticus naplní pankreas směsí enzymů kolagenázy a neutrální proteázy, které po aktivaci při teplotě 37 °C naruší vazby kolagenu a dalších strukturálních proteinů přednostně v acinární tkáni. Během digesce se odebírají vzorky roztoku s částicemi tkáně a posuzuje se pokročilost digesce. Enzymy jsou inaktivovány v okamžiku uvolnění ostrůvků od exokrinní tkáně, aniž by došlo k jejich rozpadu. K oddělení exokrinní a endokrinní tkáně se využívá odlišná hustota obou složek. Po navrstvení roztoků s rostoucí koncentrací a přidání tkáňové suspenze dochází při centrifugaci k oddělení obou složek. Tkáňová suspenze LO s minimálním podílem exokrinní tkáně je poté připravena k transplantaci. Z celkového objemu pankreatu je získáno cca 1-2 ml žádoucí tkáně.

Transplantace samotných ostrůvků se provádí jako malý výkon v lokální anestezii nebo krátké analgosedaci. Intervenční radiolog zavede přes kůži transhepatálně katetr do hlavního kmene portální žíly [10]. Podání ostrůvkové suspenze trvá typicky 10–20 minut, přičemž se ostrůvky spontánně usazují v periferních větvích portální žíly. V rámci prevence krvácení se punkční kanál uzavírá tkáňovým lepidlem.

Po vložení ostrůvků obvykle dochází k přechodnému zvýšení portálního tlaku, které je tím větší, čím větší je celkový objem podané suspenze. Funkce jater po transplantaci nebývá alterována, ale mohou být přechodně zvýšené některé ukazatele jaterního poškození a v delším odstupu vznikat okrsky steatózy a amyloidózy [11]. Dlouhodobé přežití alogenního štěpu ostrůvků stejně jako všech ostatních orgánů a tkání vyžaduje chronickou imunosupresivní léčbu.

Pro správnou funkci β -buněk ostrůvků je zásadní mikroanatomie okolního prostředí, bohaté prokrvení, kontakt s proteiny extracelulární matrix (ECM) a autonomní nervové zásobení. β -buňky komunikují s ECM přes integrinové receptory. Tento kontakt je důležitý zejména pro přežívání a glukózou regulovanou sekreci inzulínu [12]. Během enzymatické a mechanické izolace se vazby mezi ostrůvkem, exokrinními buňkami a proteiny extracelulární matrix

kompletně přeruší. Po transplantaci do portální žíly je štěp vystaven nízké tenzi kyslíku, vysoké koncentraci nutrientů, toxinů a léků. Kontakt transplantovaných ostrůvků s krví příjemce spouští tzv. nespecifickou zánětlivou odpověď (instant blood-mediated inflammatory reaction, IBMIR). Tkáňový faktor na povrchu LO spouští hemokoagulační kaskádu, fibrin váže a aktivuje trombocyty, dochází k aktivaci komplementu a infiltraci štěpu neutrofilními granulocyty a monocyty. Díky kombinaci těchto nepříznivých faktorů zaniká časně po transplantaci nadpoloviční část štěpu [13].

Hlavním kritériem úspěšnosti transplantace LO není zatím úplná nezávislost na inzulinu, ale tzv. složený end-point (kompozitní Igls kritéria) [14]. O optimální funkci štěpu mluvíme v případě, kdy po transplantaci dochází k poklesu glykovaného hemoglobinu (HbA1c) pod 48 mmol/mol bez potřeby inzulinoaterapie, k vymizení těžkých hypoglykemií a k nárůstu sérového C-peptidu oproti hodnotám před transplantací (alespoň 0,2 ng/ml). Dobrá funkce štěpu je definována jako HbA1c < 53 mmol/mol, bez těžkých hypoglykemií, při redukci dávek inzulinu o 50 % při minimálně 75 % času v požadovaném rozmezí glykemií (3.9 - 10 mmol/l) dle glukózového senzoru a nárůstu C-peptidu. Optimální i dobrá funkce štěpu jsou považovány za úspěšnou transplantaci. Marginální funkce štěpu či jeho úplné selhání, tedy neúspěšná transplantace, je definována jako HbA1c > 53 mmol/mol, přetrvávání těžkých hypoglykemií či jejich pouze mírné snížení výskytu, minimální redukce v dávkování inzulinu (dávka nižší o méně než 50 % či vůbec než před transplantací) a minimální nárůst C-peptidu. Složený end-point splňuje dle mezinárodního registru výsledků transplantací LO (Collaborative Islet Transplant Registry, CITR) 1 rok po poslední infúzi LO až 80 % pacientů, s poklesem na 65 % po pěti letech [15]. U některých pacientů se alespoň po omezenou dobu daří dosáhnout úplné nezávislosti na injekcích inzulinu.

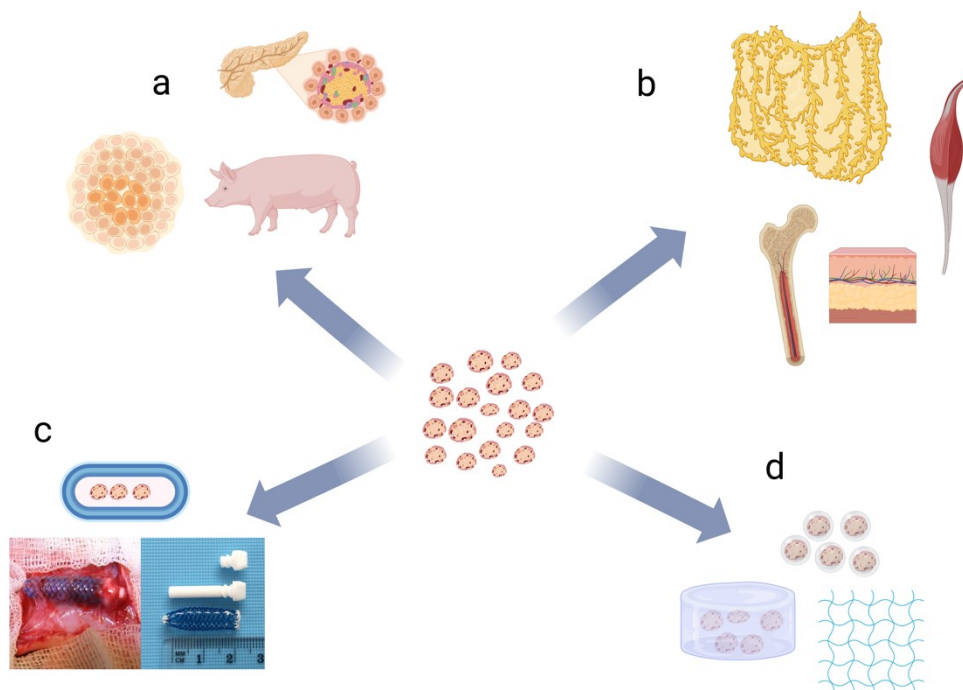
Program klinické transplantace ostrůvků byl v IKEM zahájen v roce 2005. Dosud bylo provedeno celkem 144 transplantací u 95 příjemců. U 47 z nich šlo o transplantaci samotných ostrůvků, 23 podstoupilo kombinovanou transplantaci ostrůvků a ledviny, 5 kombinaci ostrůvků a jater a u 21 pacientů byla provedena autotransplantace po izolaci ostrůvku z jejich vlastní slinivky po totální pankreatektomii.

1.3. Současný stav vývoje metody

Počty osob na čekacích listinách před transplantací inzulin produkující tkáně převyšují počet orgánů vhodných k transplantaci. K dosažení úplné nezávislosti na inzulinu jsou navíc potřeba opakované infuze ostrůvků od několika dárců. Proto se výzkum v této oblasti zaměřuje

nejen na využití alternativních zdrojů β -buněk, ale hledají se také nové techniky, jež by zlepšily bezprostřední i dlouhodobé přežívání oproti dosavadní metodě implantace do jater (Obrázek 1). To by se mohlo podařit pomocí uměle vytvořeného prostředí, jež by bylo také dobře prokrvené, ale zároveň by transplantované buňky chránilo před přímým stykem s krví příjemce.

Jako výchozí potenciální zdroj inzulín produkující tkáně se v posledních letech nabízejí lidské embryonální a pluripotentní kmenové buňky, z nichž se mohou vytvořit buňky všech tří zárodečných vrstev včetně vývojových stádií buněk pankreatu a potažmo i endokrinních buněk. Na podkladě znalostí vývoje pankreatu se připravují postupy k jejich řízené diferenciaci až do stádia pankreatického endodermu [17], jež se mohou dále diferencovat in vivo až do fenotypu β buněk [18, 19]. To se může odehrát i v případě implantace do podkožní dutiny, která brání potenciálnímu úniku buněk z místa transplantace [20]. Tato možnost byla testována již i v pilotní studii u lidí [21]. S nadějí jsou očekávány výsledky prvního podání plně diferencovaných inzulín produkujících buněk odvozených z lidských embryonálních kmenových buněk buď přímo do jater, anebo bez následné imunosuprese do polopropustných implantabilních zařízení, která brání přímému kontaktu s krví a imunitními buňkami [22].



Obrázek 1. Směry vývoje transplantace Langerhansových ostrůvků. **a** Alternativní zdroje inzulín-produkujících buněk (indukované pluripotentní kmenové buňky, reprogramování non- β -buněk, xenotransplantace). **b** Alternativní místa transplantace ostrůvků (velké omentum, příčně pruhovaný sval, kostní dřeň, podkoží). **c** Makroenkapsulace (umělé dutiny [16]). **d** Mikroenkapsulace (hydrogely). (Schéma vytvořeno pomocí aplikace www.biorender.com.)

Další z možností je použití reprogramovaných non- β buněk (např. endokrinních α buněk a exokrinních acinárních buněk). K indukci konverze fenotypu u těchto buněk se využívá technologií transdiferenciace, tzn. vnášení vhodné skupiny regulačních transkripčních faktorů [23], které způsobí v prvním kroku dediferenciaci buněk do méně vyzrálého stavu a následnou diferenciaci odlišným, požadovaným směrem.

Hlavní překážkou pro použití zvířecích ostrůvků je přítomnost vysoce imunogenních epitopů zvířecích glykanů, které vyvolávají akcelerovanou rejekci. Potenciální riziko též představuje přenos zvířecích retrovirových infekcí. Toto riziko však lze snížit úpravou štetu inaktivací retrovirových genů pomocí CRISPR-Cas9 [24]. Gene-editing technologie snižuje i riziko rejekce xenotransplantátu [25, 26].

Mikroenkapsulace mají potenciál obejít nutnost dlouhodobé imunosupresivní terapie. Využívají se především semipermeabilní hydrofilní polymery polysacharidů a peptidů jako jsou alginát, agaróza a polyethylen glykol. Obalené ostrůvky jsou chráněny proti velkým molekulám imunitního systému a zároveň jsou prostupné pro kyslík, inzulin a nutrienty. U kapsul je nutná mechanická stabilita a biokompatibilita, aby po transplantaci nedošlo k fibrotizaci [27]. V klinických studiích se obvykle využívají alginátové kapsle k transplantaci ostrůvků intraperitoneálně. Zkoušely se např. enkapsulované prasečí ostrůvky u osob s diabetem, jež přechodně vedly ke snížení dávek inzulinu [28, 29].

Záměrem tzv. makroenkapsulace je především ochrana štetu před imunitními buňkami a protilátkami příjemce při zachování obousměrné difuze kyslíku a metabolických produktů včetně inzulinu v odpovědi na hladinu glukózy. Jednodušší postupy se zatím zaměřují především na dostatečné prokrvení v místě implantace [30]. Některá implantabilní zařízení již prochází klinickými zkouškami. Jedná se většinou o tubulární nebo planární selektivně permeabilní difuzní komůrky. Mohou být implantovány do peritoneální dutiny, do velkého omenta nebo do podkoží [31]. Nejvýznamnějšími jsou β Air (Beta O₂Technologies, Rosh-Haayin, Israel) [32], ViaCyte (San Diego, USA) [33], Cell pouch (Sernova) [34] a MailPan (CEED, Defymed) [35].

Některá místa pro implantaci poskytují určitý stupeň tzv. imunoprotekce jako jsou varle (v přítomnosti Sertoliho buněk) nebo přední oční komora, výsledky ale nejsou lepší, než při ověřené implantaci do jater [16, 36]. Výjimku zatím představuje, především z hlediska dobrého prokrvení a zachované žilní drenáže štetu do jater, metoda transplantace do velkého omenta

(více viz Kapitola 1.4.). Dalšími opakovaně testovanými místy jsou podkoží a sval, pankreas a stěna gastrointestinálního traktu, transplantace pod renální kapsulu či do kostní dřevě.

Transplantace ostrůvků do podkoží patří v současnosti mezi nejvíce studované alternativy. Výhodou je minimálně invazivní přístup, jednoduché zobrazování a v případě potřeby snadná biopsie nebo graftektomie. Studie na zvířatech prokázaly, že pouhá aplikace ostrůvků do podkoží není funkční pravděpodobně vlivem nedostatečné vaskularizace, nízké tenze kyslíku a mechanického stresu [37]. Proto se výzkum v posledních letech zaměřuje na přípravu podkoží s použitím makroskeletů nebo na lokální aplikaci vaskulárních růstových faktorů. Transplantace do svalu má výhody jednoduchého přístupu, možnosti zobrazování, biopsie. Nevýhodou je nutnost rozdělit štěp na více částí malého objemu. Zatím však čelí ostrůvky ve svaly časné hypoxii, která vede k apoptóze, infiltraci makrofágy a fibrotizaci [38]. Transplantace ostrůvků do pankreatu je technicky náročná a riziková. I přes uspokojivé výsledky v experimentu u hlodavců byl tento přístup pro svou invazivitu u primátů i u jiných větších zvířat opuštěn [39]. K transplantačním experimentům a studiu metabolismu štěpu je využívána implantace ostrůvků pod pouzdro ledviny. Transplantovaný štěp lze po výkonu biopsie či jednoduše vyjmout k histologickému hodnocení. Výsledky experimentálních transplantací pod renální kapsulu jsou uspokojivé. Dochází k rychlému navození normoglykémie na malých i velkých zvířecích modelech. Pod pouzdro ledviny se však dá transplantovat pouze omezený objem štěpu, který navíc trpí hypoxií. Lidské pouzdro ledviny je málo elastické a není pro implantaci ostrůvků vhodné [40]. Kostní dřevě jako experimentální místo transplantace ostrůvků nabízí výborné cévní zásobení a dostatečnou tenzi kyslíku. Po transplantaci nedochází ke spuštění nespecifické zánětlivé odpovědi. Zároveň je kostní dřevě jednoduše přístupná k transplantaci i následnému sledování štěpu a nebyly pozorovány významné nežádoucí účinky na hematopoézu. Metabolické výsledky na zvířecích modelech mají nadějně výsledky. Jako příhodné místo se nabízí femur, tibia či lopata kosti kyčelní. [41].

1.4. Velké omentum jako alternativní místo transplantace Langerhansových ostrůvků

Vhodné alternativní místo pro transplantaci ostrůvků by mělo štěpu zajistit dostatečnou tenzi kyslíku [42], portální žilní drenáž inzulínu [43] a mělo by pojmout vyšší objemy tkáně (vhodné při vyšším obsahu exokrinní tkáně ve finálním štěpu, transplantaci štěpu ve skeletech – mikro a makroenkapsulace) [44]. Mikroprostředí by mělo příznivě ovlivňovat připojení štěpu s minimálním rizikem rozvoje nespecifické zánětlivé reakce. Operační výkon by měl být minimálně invazivní s možností biopsie či graftektomie. Snahou je připravit místo tzv.

imunopriviligované, které by štěp alespoň částečně chránilo před imunitním systémem příjemce [45].

V těchto ohledech velkou nadějí představuje umístění transplantovaných ostrůvků do velkého omenta. Velké omentum je dobře vaskularizovaná duplikatura peritonea tvořená dvěma vrstvami fibrózně tukové tkáně, která se táhne od velké křivky žaludku ke colon transversum. Liší se co do velikosti dle věku a individuálního habitu jedince. Jedná se o imunitně aktivní orgán s komplexní strukturou unikátní v obraně proti patogenům. Funguje jako zdroj zánětlivých a kmenových buněk, které se podílejí na lokální kontrole infekce, léčbě ran a regeneraci tkání. Cévní zásobení tvoří anastomotická arkáda mezi větvemi z truncus coeliacus a arteria mesenterica superior. Během zánětu jsou v omentu produkovány proangiogenní a růstové faktory, které podněcují zvýšení cévní hustoty a průtoku krve v odpovědi na zánět. Síť cév včetně fyziologické odpovědi na infekci podporují imunologické a regenerativní vlastnosti omenta a vytvářejí most mezi peritoneální dutinou a systémovou cirkulací [46].

První pokusy s implantací ostrůvků do omenta se odehrály již v 80. letech minulého století [47]. Štěp je možné aplikovat laparoskopicky či z minilaparotomie mezi listy omenta [48] i v případě většího objemu a je možné jej do omenta i „zabalit“. To je výhoda proti transplantaci do portální žíly, kdy při infuzi velkých objemů může dojít k portální hypertenzi či trombóze. Ostrůvkový štěp v omentu není v přímém styku s krví příjemce, což nespouští nežádoucí reakci IBMIR. Určitým rizikem je vznik střevních adhezí.

1.5. Transplantace do velkého omenta za použití metod tkáňového inženýrství

Metabolická funkce ostrůvků uložených v omentu bez náležité fixace nebyla zatím uspokojivá [49]. Zlepšení přinesly až určité metody „tkáňového inženýrství“ s cílem připravit vhodnou matrix, která by štěp stabilizovala na místě a byla dobře prostupná pro kyslík a živiny. Tato matrix je vyvíjena např. ve formě umělých komůrek, proteinových „lešení“ nebo hydrogelů – např. prevaskularizované komůrky z umělých materiálů obsahující pro-angiogenní růstový faktor VEGF implantované do velkého omenta [50]. Je možné je obohatit o další růstové faktory k podpoře lokální angiogeneze či přidat směsi mesenchymálních a endoteliálních kmenových buněk [51, 52].

Z přirozených materiálů pro podporu se vyvíjejí decelularizované skelety orgánů, včetně skeletů celých pankreatů, obsahující strukturální proteiny extracelulární matrix. Zachované struktury decelularizovaných orgánů obsahují extracelulární matrix jako trojrozměrné lešení a

umožňují repopulaci pro buněčnou terapii a tvorbu arteficiálních orgánů. Decelularizací orgánů pomocí detergentů dojde k odstranění DNA a buněčného materiálu včetně imunogenních struktur. Zachované komponenty extracelulární matrix obsahují především intersticiální proteiny a proteiny bazální membrány (např. kolageny, laminin, fibronectin), polysacharidy, růstové faktory vázané na matrix a cytokiny. Extracelulární matrix decelularizované tkáně si zachovává biochemické a prostorové uspořádání a intaktní vaskulaturu. Základním podnětem pro proliferaci repopulovaných buněk jsou interakce zprostředkované integriny s proteiny ECM. Nativní ECM představuje vhodnou platformu pro osidlování různými typy buněk, protože obsahuje informace pro buněčný růst a funkci.

Během izolace ostrůvků před transplantací jsou ECM a mikroprostředí ostrůvkového štěpu narušeny. Nativní pankreatická ECM zprostředkovává komplexní interakce mezi buňkami a hraje důležitou roli pro přežívání a funkci ostrůvků [53, 54], stimuluje proliferaci buněk a váže růstové faktory. Ostrůvky kultivované na 3D fibrinových gelech obohacených o růstové faktory vykazují zvýšenou proliferaci a neztrácejí schopnost reaktivity na glukózu. Předpokládá se, že interakce ostrůvky-ECM zvyšuje cytosolickou koncentraci ionizovaného kalcia Ca^{2+} , která zvyšuje aktivaci transkripčních faktorů (NFAT) a stimuluje proliferaci [55]. Ačkoliv jsou cytokiny a růstové faktory přítomné v ECM zastoupeny pouze v malých koncentracích, působí jako signifikantní modulátory buněčného chování. VEGF ovlivňuje kvalitu ostrůvkové kapilární sítě – nedostatek tohoto faktoru vede ke snížené fenestraci kapilár a porušené sekreci inzulinu. Narušení signální cesty FGF receptoru vede ke snížení počtu β -buněk, porušené expresi transportéru GLUT-2 a vzniku diabetu na myším modelu [56]. ECM má i efekt na sekreci inzulinu. Laminin, fibronectin a kolagen IV, komponenty pankreatické a peri-ostrůvkové ECM, stimulují sekreci inzulinu skrze specifické ECM-integrin interakce [12]. Použití acelulárních skeletů ECM bylo testováno na xenogenních modelech a je pravděpodobné, že v acelulárním skeletu chybí stimuly pro rejekční mechanismy [57], což by mohlo chránit štěp před imunitním systémem příjemce.

Transplantace ostrůvků v nativním bezbuněčném proteinovém lešení do velkého omenta by tedy mohla usnadnit jejich připojení, zlepšit funkci a zajistit delší přežívání, než je tomu v portálním řečišti. Navíc mohou být v budoucnu tyto konstrukty kromě ostrůvky znovu osídleny i podpůrnými typy buněk. Příprava decelularizovaných skeletů pankreatu u potkana a jejich implantace do velkého omenta je jedním z témat této práce.

Přežívání ostrůvků v omentu může také zlepšit úprava média, ve kterém jsou ostrůvky transplantovány. V Diabetes Research Institute (DRI) v Miami, USA, vznikl projekt

biodegradabilního fibrinového lepidla. Ostrůvky jsou transplantovány resuspendované v autologní plazmě příjemce a překryty rekombinantním thrombinem [58]. Plazma obsahuje cytokiny, interleukiny a růstové faktory, podporuje vaskularizaci a zajišťuje ukotvení štěpu. Fibrin se klinicky využívá k lepení hojících se tkání nebo jako buněčné lešení. Jedná se o tělu vlastní viskoelastický polymer poskytující mechanickou a trofickou podporu. Kontaktem plazmy s thrombinem se spustí koagulační kaskáda a tvorba fibrinového gelu. Omentum se po aplikaci gelu překlopí a ostrůvky zůstávají na místě bez nutnosti sutury. Viskozitu a propustnost materiálu lze ovlivnit koncentracemi jednotlivých složek. Mikroporézní stavba fibrinového gelu umožňuje difuzi kyslíku v časných fázích přihojení štěpu a nebrání prorůstání nových cév. Tato metoda byla úspěšně vyzkoušena v Miami na zvířecím modelu [59] a na základě výsledků byla použita u 3 pacientů s diabetem 1. typu se syndromem porušeného vnímání hypoglykémie. Bylo dosaženo redukce dávek inzulínu a zlepšení vnímání hypoglykemií [60]. Nicméně na dlouhodobé výsledky se teprve čeká.

Další testování této metody s použitím humánního thrombinu a zavedení transplantace LO do velkého omenta u lidských příjemců v České republice bylo umožněno úzkou spoluprací Laboratoře Langerhansových ostrůvků IKEM a DRI v Miami. Cílem bylo připravit v IKEM metodu, která zamezí vzniku nespecifické zánětlivé reakce, při které zaniká velká část transplantovaných ostrůvků. Proto by k normalizaci glykemií měla stačit transplantace štěpu s menší než standardní velikostí [61].

Díky svým vlastnostem je velké omentum také vhodným místem pro implantaci štěpu v biologické matrix či skeletech. V této práci jsme se dále zaměřili na přípravu decelularizovaných skeletů pankreatu potkana pro transplantaci do omenta a na možnosti jejich in vivo zobrazení pomocí magnetické rezonance.

2. Hypotézy a cíle práce

Hypotéza

Velké omentum může sloužit jako alternativní místo transplantace Langerhansových ostrůvků ke stávající metodě transplantace ostrůvků do portálního řečiště jater a je vhodným místem pro transplantaci štěpů v biomatricích v experimentu i v klinice.

Cíle práce

Hlavním cílem práce je testovat novou metodu transplantace Langerhansových ostrůvků do velkého omenta v experimentu a připravit protokol ke klinické transplantaci.

Dílčí cíle

1. Porovnat výsledky transplantace ostrůvků v biodegradabilní plazma-thrombinové matrix se standardní metodou transplantace do jater u potkanů, a to jak standardní, tak marginální velikosti štěpu.
2. Připravit vhodný decelularizovaný skelet k implantaci do velkého omenta u potkanů.
3. Provést klinickou transplantaci Langerhansových ostrůvků do velkého omenta u lidských příjemců.

3. Metody

Příprava transplantace LO do velkého omenta byla rozdělena na experimentální a klinickou část. V první části experimentu na zvířatech bylo nutné si osvojit chirurgickou techniku, testovat funkci biomatrix, ve které je štěp transplantován, a zobrazit štěp in vivo po transplantaci a tím potvrdit jeho viabilitu. Výsledky byly porovnávány se stávající metodou transplantace LO do portální žíly. V druhé části experimentu byla technika transplantace do omenta využita k implantaci decelularizovaného pankreatu ke zhodnocení možnosti využití této metody v dalším výzkumu a vývoji tzv. „bioarteficiálního pankreatu“. Porovnávali jsme několik decelularizačních postupů a následně testovali morfologické, biochemické a biologické vlastnosti získaných skeletů. Úspěšnou metodu jsme použili při transplantaci LO v ECM skeletech, které jsme ukládali do velkého omenta. LO byly značeny in vitro nanočásticemi superparamagnetického oxidu železa a osud štěpů po transplantaci byl sledován magnetickou rezonancí in vivo. Vitalitu LO jsme testovali pomocí bioluminiscenčního zobrazení in vivo a funkčními testy glukózové tolerance. Po zavedení funkčního experimentálního modelu jsme vypracovali protokol pro klinické použití nové metody u člověka. Po získání povolení Etické komise jsme zahájili klinický experiment u prvních pacientů s diabetem.

3.1. Metodika transplantace Langerhansových ostrůvků do velkého omenta za použití plazma-thrombinové matrix

3.1.1. Zvířecí model

Jako dárci ostrůvků byli použiti samci potkanů kmene Lewis (200-250 g). Polovina dárců byla transgenních, exprimující gen pro enzym luciferázu (LUC+). Jako příjemci transplantátu byly použity nebioluminiscenční (LUC-) samice potkanů kmene Lewis (180-200 g). Experimentální diabetes byl u příjemců navozen intraperitoneální injekcí streptozotocinu (60 mg/kg, rozpuštěného v 3,8 % citrátu sodného). Následně byla příjemcům tři dny za sebou měřena glykémie z krve z ocasní žíly a za úspěšné navození diabetu byly považovány opakované hodnoty glykémie během dne (bez lačnění) ≥ 20 mmol/l.

3.1.2. Izolace Langerhansových ostrůvků

LO určené k transplantaci byly získány od LUC+ a LUC- dárců. Slinivky dárců pod celkovou anestezií byly kanylovány přes žlučovod, naplněny roztokem kolagenázy a vypreparovány. Po 18-20 min digesce při 37 °C byly LO odděleny od exokrinní tkáně pomocí diskontinuálního hustotního gradientu Ficoll 400 1,108 g/ml, 1,096 g/ml, 1,069 g/ml a 1,037 g/ml. Izolované

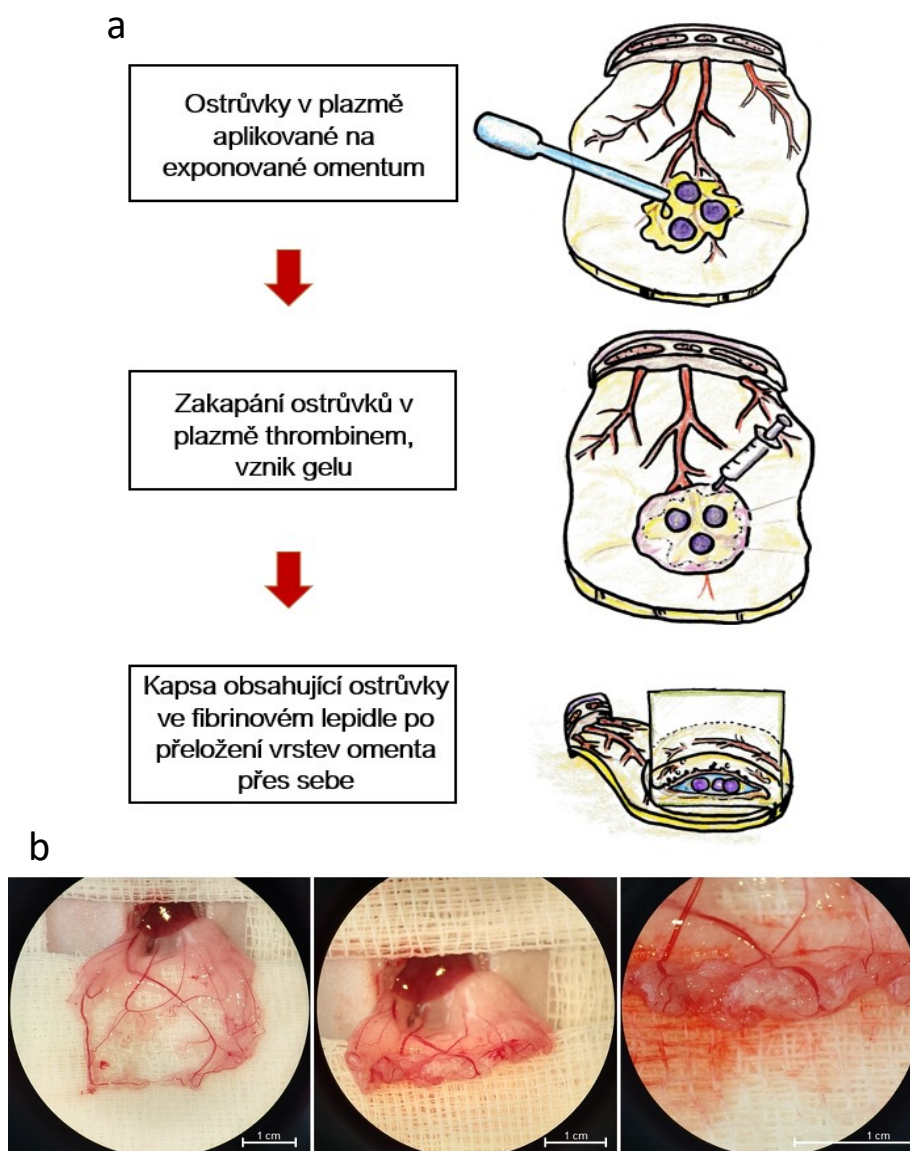
buňky byly přes noc kultivovány v médiu CMRL-1066 doplněném o 10 % FBS, 5 % HEPES a 1 % penicilin/streptomycin/glutamin při 37 °C a 5 % CO₂. Před transplantací byly LO ručně spočítány pod disekčním mikroskopem. Pro zhodnocení účinnosti nové metody transplantace do omenta bylo použito optimální (10 LO na 1 g tělesné hmotnosti) a hraniční (4 LO na 1 g tělesné hmotnosti) množství LO, o nichž je známo, že po intraportální transplantaci navozují normoglykémii [61-63]. Vzhledem k nutné nákladné a komplexní péči, kterou vyžadují transgenní zvířata, byl každý transplantát složen pouze z 50 % dárcovských ostrůvků LUC+ a zbylých 50 % bylo použito od LUC- dárců.

3.1.2.1. Příprava biodegradabilního lepidla

Izolované LO byly transplantovány do velkého omenta v plazma-thrombinové biomatrix [58]. Plazma byla získána ze syngenních zvířat. Odebraná krev ve zkumavkách s citrátem sodným byla centrifugována (1000 G po dobu 10 min při pokojové teplotě) a získané alikvoty plazmy byly uchovávány v mikrozkušavkách při -80 °C a rozmrazeny bezprostředně před použitím. Lidský thrombin ze soupravy Surgiflo Hemostatic Matrix (Johnson and Johnson) byl před transplantací rozpuštěn v aqua pro injectione v koncentraci 1000 IU/ml.

3.1.2.2. Transplantace

Diabetičtí příjemci byli rozděleni do 3 experimentálních skupin. Zvířata ve skupině A (n=7) podstoupila transplantaci 4 LO/g tělesné hmotnosti (přibližně 861 LO na zvíře) do velkého omenta v plazma-thrombinové biomatrix. Ve skupině B (n = 10) bylo příjemcům transplantováno 10 LO/g (přibližně 2085 LO na zvíře) do omenta s použitím biomatrix. U obou skupin byla provedena střední laparotomie k lokalizaci velkého omenta (v celkové anestezii - 5 % isofluran pro indukci + 2 mg/kg hmotnosti i.m. torbugesicu, 2,5 % isofluran pro udržování) s následným vyjmutím z dutiny břišní. Omentum bylo jemně rozloženo na sterilní pole. Izolované pankreatické ostrůvky byly ručně spočítány a resuspendovány v autologní plazmě (objem plazmy odpovídal objemu pelet). Ostrůvky v plazmě byly aplikovány na velké omentum. Lidský thrombin byl rozpuštěn v aqua pro injectione a nakapán na štěp. Vznikl gel přiléhající k povrchu omenta. Omentální řasa byla poté přeložena a navrácena do dutiny břišní (Obrázek 2). Laparotomie byla poté sešita po vrstvách. Zvířatům ve skupině C (n=7) byly standardně do jater transplantovány 4 LO/g (přibližně 830 LO na zvíře): v celkové anestezii byla provedena substernální minilaparotomie, lokalizována portální žíla a horní mezenterická žíla a LO byly injikovány do ileocekální žíly. K prevenci krvácení byl použit mikrofibrilární kolagen Avitene® (Bard Inc.). Břišní dutina byla poté sešita po vrstvách.



Obrázek 2. Transplantace LO do velkého omenta za použití biodegradabilního fibrinového lepidla. **a** – Schéma transplantačního postupu. **b** – Experiment na zvířecím modelu.

3.1.2.3. Metabolické sledování

Příznivá funkce LO byla definována hladinou glukózy v krvi < 10 mmol/l. Glykémie byla monitorována pomocí glukometru (vpich do ocasu) 1., 3., 5., 7., 10., 14., 18., 21. den po transplantaci a poté jednou týdně. Tělesná hmotnost příjemců byla sledována jednou týdně. 40. a 80. den po transplantaci byly provedeny intravenózní glukózové toleranční testy. Po nočním lačnění bylo příjemcům do ocasní žíly intravenózně aplikováno 0,5 g/kg glukózy. Glykémie byly měřeny během testu před podáním glukózy a poté po 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 a 120 minutách. Byl vypočten koeficient asimilace glukózy (K_G). Hladiny C-peptidu byly hodnoceny v séru odebraném na lačno a 10 minut po podání glukózy pomocí souprav ELISA Rat C-peptide

(Mercoxia). 100. den experimentu bylo velké omentum obsahující štěp u zvířat ve skupinách A a B v celkové anestezii operačně lokalizováno a explantováno. Zvířata byla poté sledována další týden, aby se potvrdila recidiva diabetu. Zvířata ve skupině C byla sledována do 100. dne. 120. den (100. den ve skupině C) byly všem příjemcům vyjmuty pankreaty a kryokonzervovány pro biochemické hodnocení obsahu inzulínu a sledování bylo ukončeno.

3.1.2.4. Bioluminiscence

Zobrazení bioluminiscence bylo provedeno 14, 30, 60 a 90 dní po transplantaci LO pomocí zařízení IVIS Lumina XR (Perkin Elmer, USA) a snímky byly zpracovány pomocí softwaru Living Image. Zvířata byla uvedena do celkové anestezie isofluranem (5 % pro indukci a 1,5 % pro udržování). Jejich břicho bylo oholeno, aby se eliminoval útlum optického signálu. Nejprve byla zvířata umístěna do kamerové komory k provedení snímků ve stupních šedi. Poté jim byl intravenózně podán D-luciferin (15 mg na zvíře, rozpuštěný ve sterilním PBS - 30 mg/ml). Emise fotonů byla zachycena během 60vteřinové expozice s otevřeným emisním filtrem. Snímky ve stupních šedi byly překryty snímky bioluminiscenčního signálu (celková zářivost; fotony/s/cm²/sr).

3.1.2.5. Histologie a imunofluorescence

Velká omenta se štěpy a játra příjemců byly 100. a 120. den experimentu chirurgicky odstraněny a fixovány v 10 % formalínu při 4 °C. Vzorky byly zpracovány pro histologické hodnocení a vloženy do parafinových bloků. Připravené parafinové řezy tkání (4 µm) byly obarveny hematoxylinem a eozinem (H&E). Pro imunochemickou detekci endoteliálních buněk byla použita protilátka antiCD31 a pro imunofluorescenční analýzu beta buněk protilátka proti inzulínu.

3.1.3. Metodika decelularizace pankreatu a implantace skeletů do velkého omenta

3.1.3.1. Zvířecí model

Jako dárci pankreatu pro decelularizaci a izolaci LO byli použiti dospělí samci potkanů Lewis. Další soubor dospělých samců potkanů Lewis sloužil jako příjemci pro transplantační experimenty. Dárcovské pankreaty byly vyňaty v celkové intramuskulární anestezii (dexmedetomidin 0,09 mg/kg a ketamin 36 mg/kg tělesné hmotnosti). Transplantační experimenty byly prováděny v celkové inhalační anestezii (isofluran 5 %/2 %) s

intramuskulární aplikací butorfanolu (1 mg/kg). Po operaci byla bolest tlumena subkutánní aplikací analgetik (meloxicam, 1-2 mg/kg).

3.1.3.2. Techniky perfuze pankreatu

Před samotnou decelularizací je nutné do dárcovského pankreatu zavést katetr a pankreas promýt. Pankreaty byly perfundovány 24 G katetrem z pankreatického vývodu z duodena nebo jaterní strany přes žaludeční tepnu a přes portální nebo slezinnou žílu. Po laparotomii jsme do dolní duté žíly aplikovali 1000 IU heparinu. Pro perfuzi pankreatickým vývodem přes papilu (PDP; n = 16) byla v duodenu 0,5 cm pod papilou provedena malá incize a katetr byl zaveden antegrádně do společného žlučovodu a fixován svorkou. Opačný konec vývodu byl podvázán, aby se zabránilo úniku tekutin. Slinivka s duodenem byla vyříznuta a vyjmuta z dutiny břišní. Ex vivo bylo duodenum propláchnuto fyziologickým roztokem a oba konce byly podvázány. Pro perfuzi přes pankreatický vývod z jaterní strany (PDH; n = 13) byl katetr zaveden retrográdně do společného žlučovodu a fixován svorkou. Následně byl celý pankreas s duodenem excidován a vyjmut z dutiny břišní. Ex vivo bylo duodenum vypláchnuto fyziologickým roztokem a oba konce byly podvázány. Vyústění vývodu do dvanáctníku bylo rovněž uzavřeno svorkou. Pro perfuzi přes portální žílu (PV; n = 19) byl katétr zaveden retrográdně do portální žíly, přišit na místě a fixován. Celiakální, žaludeční a slezinné cévy byly podvázány a celá slinivka byla vyříznuta a vyjmuta z dutiny břišní. Pro perfuzi přes arteria gastrica (GA; n = 12) [64] byla exponována levá žaludeční tepna, do které byl fixován katetr. Celiakální, jaterní a slezinná tepna byly podvázány. Před decelularizací bylo tělo pankreatu s ocasem naplněno roztokem detergentu, vyříznuto a odstraněno z břišní dutiny. Pro perfuzi přes slezinnou žílu (SV; n = 34) byl obnažen a vyříznut ocas pankreatu, slezina, lymfatické uzliny a omentum. Střeva byla posunuta na levou stranu, aby se obnažil ocas pankreatu, který byl poté otočen tak, aby distální stranou směřoval vzhůru. V oblasti větvících se žaludečních a slezinných žil byla umístěna svorka. Poté byl ocas pankreatu pod svorkou naříznut a odstraněn z dutiny břišní. SV má několik větví, pro proces decelularizace byla použita distální větev spolu se 3-4 větvemi, které vstupovaly do slezinného hilu. Ex vivo jsme do slezinné žíly zavedli a fixovali katétr. Poté byly podvázány větve ke slezině a další cévy, aby se zabránilo úniku tekutin. Následně byla od pankreatického ocasu odstraněna slezina, omentum a 3-4 malé lymfatické uzliny a pankreatický ocas byl připraven k perfuzi a decelularizaci.

3.1.3.3. Decelularizace pankreatu

Kanylované pankreaty byly připojeny k perfuznímu systému, jenž se skládá z peristaltické pumpy, hadiček a komory. Decelularizační protokol zahrnoval 60 min perfuzi s 1% Tritonem X-100, 120 min perfuzi s 0,5% dodecylsulfátem sodným a poté 120 min perfuzi s 1% Tritonem X-100, vše rychlostí průtoku 5 ml/min. Nakonec byl proces ukončen perfuzí roztokem DNázy (0,4 U/l) po dobu 60 min. Po decelularizaci se extracelulární matrix promyla fyziologickým roztokem s fosfátovým pufrem doplněným 1% roztokem antibiotika a antimykotika po dobu 18 h.

3.1.3.4. Testování kvality decelularizace

Kvalitu decelularizace jsme porovnávali se slinivkami zdravých kontrolních potkanů a slinivkami diabetických potkanů. Diabetes byl vyvolán intraperitoneální injekcí streptozotocinu rozpuštěného ve 3,8% citrátu sodném. Obsah DNA po decelularizaci byl kvantifikován v tkáních v kontrolních i diabetických zvířat. Tkáně byly přeneseny do lyzačního pufru, homogenizovány sonikátorem a množství celkové DNA bylo stanoveno ve trojicích pomocí spektrofotometru NanoDrop™ (Thermo Fischer Scientific). Obsah inzulinu byl měřen v decelularizovaných tkáních a v kontrolních pankreatech zdravých a diabetických zvířat. Tkáně byly zmrazeny, poté rozmělněny a homogenizovány v kyselém ethanolu. Koncentrace hormonů v extraktech byly měřeny duplicitně pomocí soupravy ELISA Rat Insulin Ultrasensitive pro skelety ECM a soupravy ELISA Rat Insulin pro pankreaty.

3.1.3.5. Imunohistochemie a imunofluorescence

Vzorky tkání (n = 2 pro každou perfuzní techniku) byly fixovány v 10% pufrovaném formaldehydu přes noc při 4 °C. Poté byly tkáně zpracovány v automatickém tkáňovém procesoru a následně vloženy do parafínu. 4 µm řezy byly deparafinovány v xylenu, rehydratovány v odstupňované sérii ethanolu a obarveny buď hematoxylinem a eozinem nebo specifickými protilátkami. Pro imunobarvení byly řezy promyty citrátovým nebo TRIS pufrem podle doporučení výrobce po dobu 20 min. Endogenní peroxidáza byla blokována 3% H₂O₂ v methanolu po dobu 20 min. Aby se zabránilo nespecifické vazbě, byly vzorky předem inkubovány s 1 % nebo 10 % kozím sérem v Tween-PBS. Řezy byly poté inkubovány s primárními protilátkami přes noc při 4 °C. Byly použity následující protilátky: anti-kolagen IV, rekombinantní anti-kolagen VI, anti-entaktin/NID, anti-laminin, anti-fibronectin, rekombinantní anti-inzulin, anti-glukagon, rekombinantní anti-somatostatin 28, anti-

cytokeratin 7, rekombinantní anti-CD31, anti-vitronektin a anti- α -amyláza. Sekundární protilátkou byla kozí protilátka proti králíkovi konjugovaná s peroxidázou, která byla aplikována po dobu 1 h při pokojové teplotě. Poté byl jako chromogen použit DAB Substrate Kit po dobu 4 min při pokojové teplotě. Dále byly řezy obarveny Mayerovým hematoxylinem, dehydratovány a upevněny pomocí Pertexu. Vzorky tkání, které obsahovaly pankreatické ostrůvky označené nanočásticemi železa, byly obarveny roztokem pruské modři (2 % kyselina chlorovodíková smíchaná s 2 % ferrokyanidem draselným) po dobu 30 min, aby se detekovala ložiska železa.

Vzorky tkání k imunofluorescenčnímu barvení ($n = 2$ pro každou perfuzní techniku) byly fixovány v pufrovaném 4 % formaldehydu přes noc při 4 °C a opláchnuty PBS. Poté byly tkáně přes noc ponořeny do 30 % sacharózy, vloženy do montážního média s optimální řeznou teplotou, zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy při -80 °C. Po opakovaném promytí v PBS byly 5 μm řezy inkubovány v blokovacím roztoku, který obsahoval 5 % kozí sérum v 0,2% Tritonu X-100, 0,1 mol/l glycinu a PBS po dobu 1 h při pokojové teplotě, aby se zabránilo nespecifické vazbě. Poté byly řezy inkubovány s primárními protilátkami v blokovacím roztoku po dobu 1 h. Byly použity následující primární protilátky: anti-laminin, anti-fibronektin, anti-kolagen IV, anti-kolagen VI, anti-entaktin/NID a anti-kolagen I. Po intenzivním promytí PBS byly řezy inkubovány se sekundární protilátkou po dobu 1 h. Sekundární protilátkou byl kozí anti-králičí imunoglobulin G Alexa Fluor Plus 555 zředěný v blokovacím roztoku. Buněčná jádra byla značena 4,6-diamidino-2-fenylyndolem (DAPI) v koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ po dobu 5 min při pokojové teplotě. Po opláchnutí PBS byly řezy vyšetřeny fluorescenčním mikroskopem.

3.1.3.6. Transplantační experimenty

LO jsme izolovali podle standardního protokolu, viz kapitola 3.1.1.2. Po izolaci byly LO spočítány pod disekčním mikroskopem pro použití při repopulaci skeletů ECM. Izolované LO byly označeny nanočásticemi superparamagnetického oxidu železa (SPIO) přidáním MRI kontrastní látky, ferukarbotranu (5 $\mu\text{l/ml}$; Resovist®), do kultivačního média a kultivovány přes noc. Toto značení umožnilo sledovat LO po transplantaci u vybraných příjemců.

LO ve skeletech ECM jsme transplantovali do velkého omenta ($n = 4$), viz kapitolu 3.1.1.4. Velké omentum bylo vytaženo z dutiny břišní a rozloženo na sterilní pole. Na omentum byl umístěn ECM skelet a LO (resuspendované v 0,2 ml Hanksova solného roztoku doplněného 1 % FBS) byly pomalu manuálně infundovány do ECM skeletu přes SV. Poté byl katétr

propláchnut a céva byla podvázána, aby se zabránilo úniku ostrůvků. Omentum bylo přetaženo přes skelet ECM a zajištěno stehem. Omentum se skeletem ECM bylo navraceno do dutiny břišní. Příjemci byli sledováni pomocí MRI in vivo bezprostředně po transplantaci a poté každý týden po dobu 49 dnů. Ve dnech 21 a 49 byly štěpy explantovány pro histologické vyšetření.

3.1.3.7. Magnetická rezonance

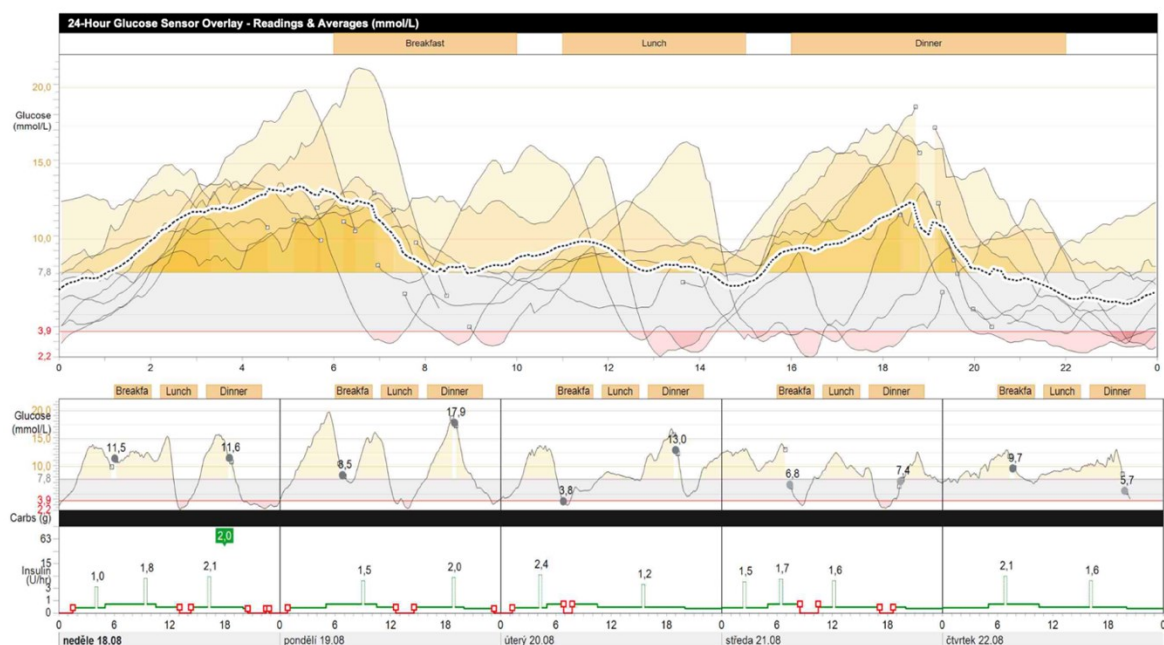
Experimenty in vivo byly pořízeny na MR skeneru 4,7 T vybaveném duální povrchovou cívkou $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ navrženou a zkonstruovanou na zakázku v MR laboratoři. Protokol měření se skládal ze standardní rychlé nízkoúhlové sekvence MR s následujícími parametry: prostorové rozlišení = $254 \times 254 \mu\text{m}^2$, tloušťka řezu = 1 mm, doba skenování (ST) = 8 min 56 s, doba opakování (TR) = 130 ms a doba echa (TE) = 3,715 ms, a to v axiální i koronární orientaci řezu. Ve dnech 0 a 21 bylo provedeno zobrazení s vyšším prostorovým rozlišením ($127 \times 127 \mu\text{m}^2$) s delším ST (18 min 14 s). Zpracování MRI a analýzy byly provedeny pomocí softwaru ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>, verze 1.46r, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Měřili jsme objem štěpu a frakční ztrátu signálu (FSL), která indikuje přítomnost železa ve štěpu. FSL byla vypočtena jako rozdíl intenzity signálu mezi skeletem ECM a referenční okolní tkání vydělený intenzitou referenčního signálu a vyjádřený v procentech.

3.2. Klinická transplantace Langerhansových ostrůvků do omenta

3.2.1. Výběr pacientů a zařazení na čekací listinu

Ke klinické transplantaci LO do velkého omenta jsme vybrali pacienty z čekací listiny ke standardní transplantaci LO, kteří po náležitém poučení souhlasili s účastí ve studii. Zahájení studie bylo povoleno 1. 4. 2017. Jedná se o pacienty s dlouhotrvajícím diabetes mellitus 1. typu se syndromem porušeného vnímání hypoglykémie, který se nepodařilo zvládnout dostupnými prostředky. Opakované hypoglykémie a vysoká variabilita glykemií při syndromu porušeného vnímání hypoglykémie u jednoho z vybraných pacientů jsou zaznamenány na obrázku č. 3. Kontraindikací pro zařazení byla anamnéza velkého intraabdominálního chirurgického zákroku, abychom vyloučili možnost srůstů omenta. Transplantace LO do velkého omenta byla do roku 2023 provedena u 3 pacientů. Charakteristika pacientů je uvedena v Tabulce 1. Jeden pacient byl indikován ke kombinované transplantaci LO do omenta spolu s transplantací ledviny pro chronické onemocnění ledvin v terminálním stádiu. Před transplantací pacienti podstoupili standardní laboratorní, zobrazovací a funkční vyšetření dle protokolu. Imunologická vyšetření (panelové reaktivní protilátky, specifické protilátky Luminex a anti-

MICA MHC Class I polypeptide-related-sequence antibodies) byla negativní a cytotoxický crossmatch závislý na komplementu byl u příjemců před transplantací taktéž negativní.



Obrázek 3. Data ze CGM a inzulínové pumpy pacienta před plánovanou transplantací LO do velkého omenta. Na grafech lze vidět opakované hypoglykémie a vysokou variabilitu hladiny glukózy i přes používání pokročilých technologií.

Tabulka 1. Charakteristika příjemců.

	Pacient 1	Pacient 2	Pacient 3
Věk (roky)	43	66	58
Trvání diabetu (roky)	34	38	16
Body mass index (kg/m²)	26	28.7	24.6
Vypočítaná glomerulární filtrace (ml/min)	69	111	12

3.2.2. Příprava biomatrix

Dvěma základními složkami použitými pro přípravu biokompatibilního fibrinového gelu jsou lidská autologní plazma (obsahující izolované LO) a lyofilizovaný lidský thrombin. Thrombin aktivuje fibrin v plazmě s následnou tvorbou gelovité biomatrix. Autologní plazma k přípravě gelu byla pacientům odebrána na Transfúzní stanici IKEM a zde řádně skladována v mrazícím zařízení v -80 °C. Pacientům bylo odebráno cca 150 ml plazmy. Humánní thrombin byl použit z komerčního setu chirurgického lepidla Surgiflo (Ethicon).

3.2.3. Izolace Langerhansových ostrůvků

Izolace LO z pankreatů od kompatibilních kadaverózních dárců proběhla standardním způsobem (viz kapitolu 1.2. Transplantace Langerhansových ostrůvků). Pro digesci pankreatu bylo použito balení soupravy GMP Cell Isolation Kit AF1 (Serva, Německo) obsahující kolagenázu s aktivitou podle Wunch 2 725 U/vial a neutrální proteázu AF GMP Grade (aktivita 140 DMC U/vial). Přes noc po dobu 12 hodin byly LO v médiu při teplotě 37 °C. Štěp ke kombinované transplantaci (spolu s ledvinou) byl připraven k transplantaci ihned po izolaci, aby se neprodlužoval čas studené ischemie štěpu ledviny.

3.2.4. Příprava štěpu k transplantaci

Přímo po izolaci či po kultivaci byly LO promyty, odstředěny a umístěny do transplantačního média. Krátce před transplantací byly LO přeneseny do stříkačky a sedimentovány. Transplantační médium bylo odstraněno, ve dvou krocích promyto a LO byly rekonstituovány v rozmražené autologní plazmě příjemce. Konečný poměr objemu LO a plazmy byl 2:1. LO v plazmě byly ve stříkačkách sterilně dopraveny na operační sál. Humánní thrombin z komerčního setu Surgiflo byl naředěn aqua pro injectione dle návodu (1000 IU na 1 ml) a k výkonu byl připraven do injekčních stříkaček.

3.2.5. Transplantace Langerhansových ostrůvků do velkého omenta

Transplantace LO do velkého omenta proběhla u všech příjemců v celkové anestezii laparoskopicky. Do břišní dutiny byla zavedena kamera a jeden či dva pracovní porty. Na rozprostřené omentum na plochu přibližně 10 x 10 cm byl postupně aplikován štěp LO v autologní plazmě a překryt humánním thrombinem (Obrázek 4). Po vytvoření gelu bylo omentum následně přeloženo přes sebe, zavinuto kraniálně a uloženo subhepatálně. V jednom případě bylo fixováno dvěma stehy, jinak bez fixace. U pacienta ke kombinované transplantaci proběhla transplantace ledviny po laparoskopické transplantaci LO standardním způsobem z šikmého řezu v pravém hypogastriu.

3.2.6. Imunosupresivní protokol

Imunosupresivní režim se skládal ze 3 indukčních dávek anti-T-lymfocytárního globulinu (Grafalon, Neovii). První dávka byla pacientům podána přibližně 8-10 h před transplantací. Profylaktická imunosuprese se skládala z kombinace takrolimu (cílová hladina 8 -10 ng/ml, po 3 měsících po transplantaci 6-10 ng/ml) a mykofenolát mofetilu (1-2 g denně). Dále byl

pacientům před transplantací podán etanercept (inhibitor tumor nekrotizujícího faktoru A, 50 mg subkutánně) s následnými dávkami 25 mg 3., 7. a 10. den po transplantaci. Před první infuzí anti-T-lymfocytárního globulinu byla podána jednorázová dávka metylprednisolonu 250 mg, dále kortikoidy nebyly používány.

3.2.7. Metabolické sledování pacientů

Po výkonu byly u pacientů kromě vitálních funkcí a stavu vnitřního prostředí pravidelně sledovány glykémie pomocí glukometru a CGM. Hladina C-peptidu byla měřena 1., 2., 3., 7. den po transplantaci a 1, 3, 6, 9, 12 měsíců po transplantaci a dále je odebírán při pravidelném sledování na ambulantní kontrolách. Za 90 dní po transplantaci byl proveden pacientům mixed meal test (obdoba orálního glukózového tolerančního testu s nápojem s obsahem sacharidů, tuků a proteinů, při testu je měřena glykémie, hladina inzulínu a lačný a stimulovaný C-peptid v 0., 30., 60., 90., 120., 150. a 180. minutě testu). Pacientům byl navrácen jejich inzulínový režim s úpravou dávek dle aktuální potřeby.



Obrázek 4. Obrazová dokumentace z laparoskopického výkonu transplantace LO do velkého omenta za použití biomatrix. Na obrázcích je pod katetrem vidět ostrůvkový štěp (světle žlutá tkáň) resuspendovaný v autologní plazmě. Štěp byl následně překryt humánním thrombinem.

3.3. Statistické metody

Popisné údaje jsou vyjádřeny jako průměr, směrodatná odchylka, medián a variabilita. Srovnání mezi skupinami v experimentu bylo provedeno Kruskalovým-Wallisovým testem a poté Steelovou-Dwassovou metodou párů. Časové změny Gaussových proměnných byly hodnoceny pomocí ANOVA s opakovanými měřeními a jedním faktorem seskupení. Ostatní hodnoty byly hodnoceny Friedmanovým a Kruskal-Wallisovým testem. Pro úpravu hladin významnosti byla použita Bonferroniho korekce. Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Výpočty byly provedeny pomocí statistického softwaru JMP 11.0.0.

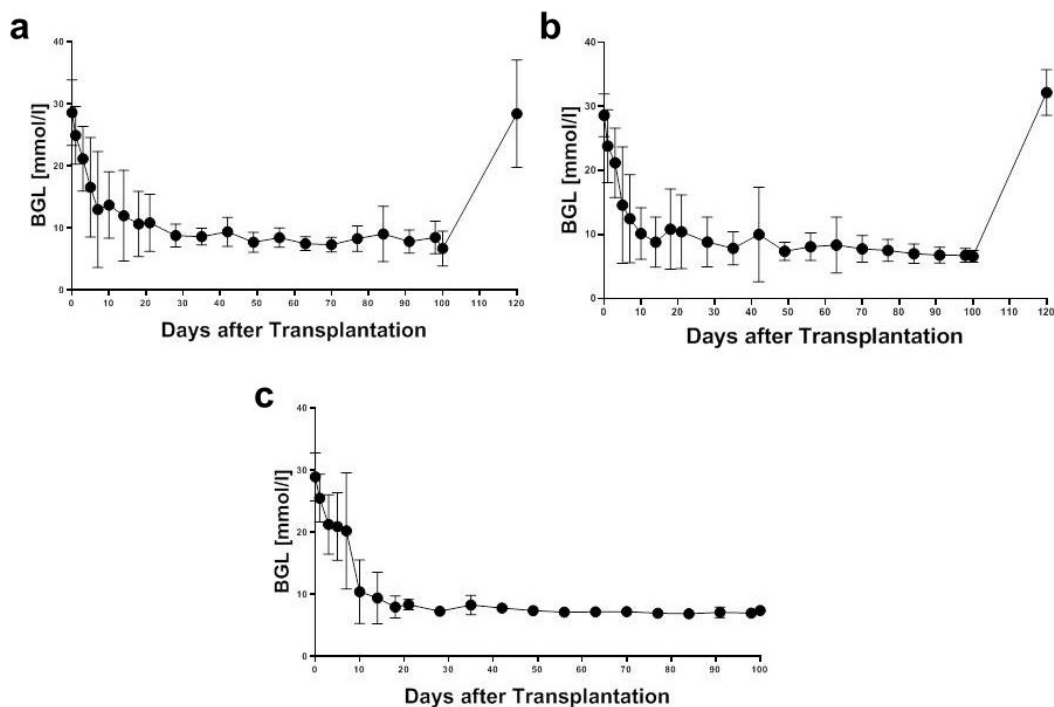
4. Výsledky

4.1. Experimentální část

4.1.1. Transplantace Langerhansových ostrůvků do velkého omenta za použití plazma-thrombinové matrix

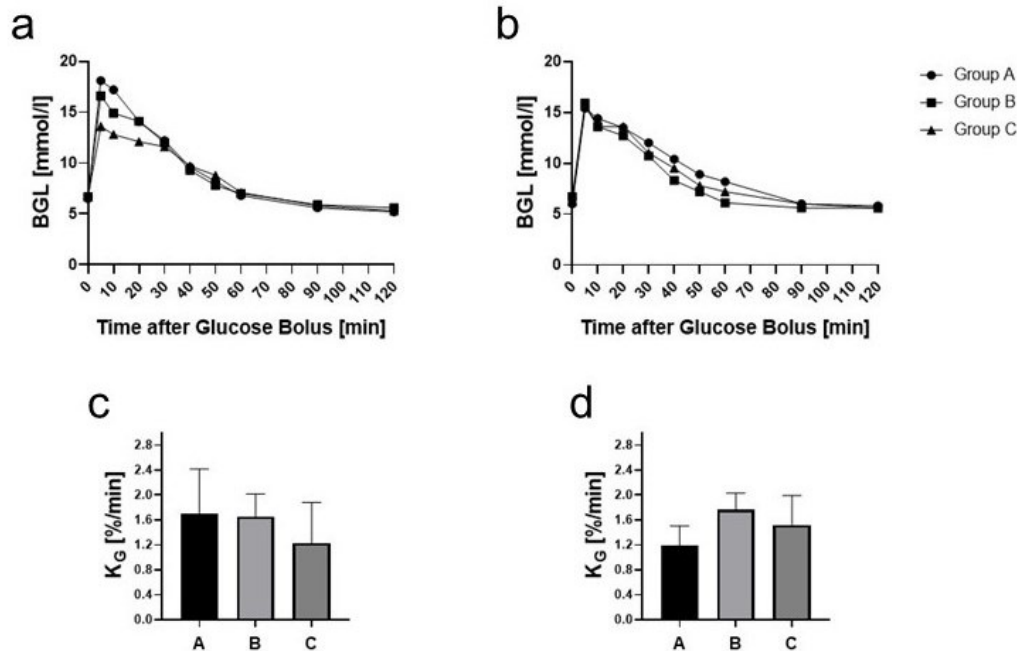
4.1.1.1. Funkce ostrůvkového štěpu

Nelačná glykémie < 10 mmol/l byla obnovena u všech zvířat, v průměru (\pm SD) nejprve u skupiny B (7 ± 3 dny) s 10 LO/g transplantovanými do omenta, následované skupinou C (11 ± 4 dny; 4 LO/g transplantované do jater) a skupinou A (14 ± 13 dní s velikostí štěpu 4 LO/g transplantovaného do omenta). Rozdíly mezi skupinami však nebyly statisticky významné ($p > 0,05$). Glykémie zůstávala po celou dobu experimentu v normálním rozmezí (Obrázek 5). 100. den po transplantaci byla omenta se štěpy ve skupinách A a B explantována a zvířata byla metabolicky sledována další týden. Byl u nich zaznamenán návrat hyperglykémie, což potvrdilo jistou produkci inzulinu v ostrůvkových štěpech v omentu. Tělesná hmotnost všech příjemců se po celou dobu studie postupně zvyšovala a zvířata prospívala.

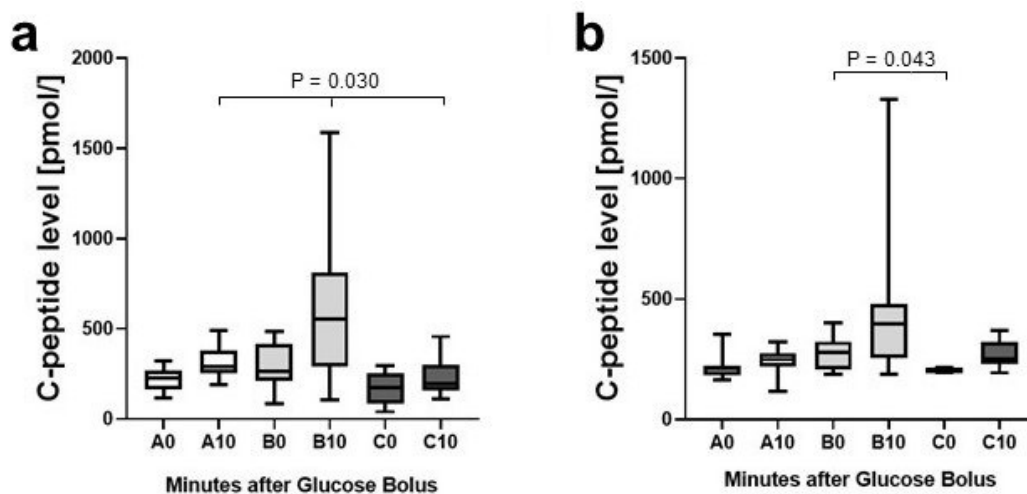


Obrázek 5. Vývoj glykémii během studie. U všech zvířat byla obnovena normoglykémie (glykémie < 10 mmol/l). Ve skupinách A a B byl 100. den po transplantaci štěp explantován a u zvířat byla potvrzena hyperglykémie. **a** - Skupina A - transplantace 4 LO/g do omenta; **b** - Skupina B - 10 LO/g do omenta; **c** - Skupina C - 4 LO/g do jater.

Testy IVGT provedené 40. a 80. den experimentu prokázaly normální konstanty asimilace glukózy (K_G , průměr) ve všech skupinách (Obrázek 6) po intravenózní dávce 0,5 g/kg glukózy. Hladiny C-peptidu nalačno a stimulované hladiny C-peptidu naznačily, že stimulační schopnost štěpů byla dostatečná ($p > 0,05$; Obrázek 7).



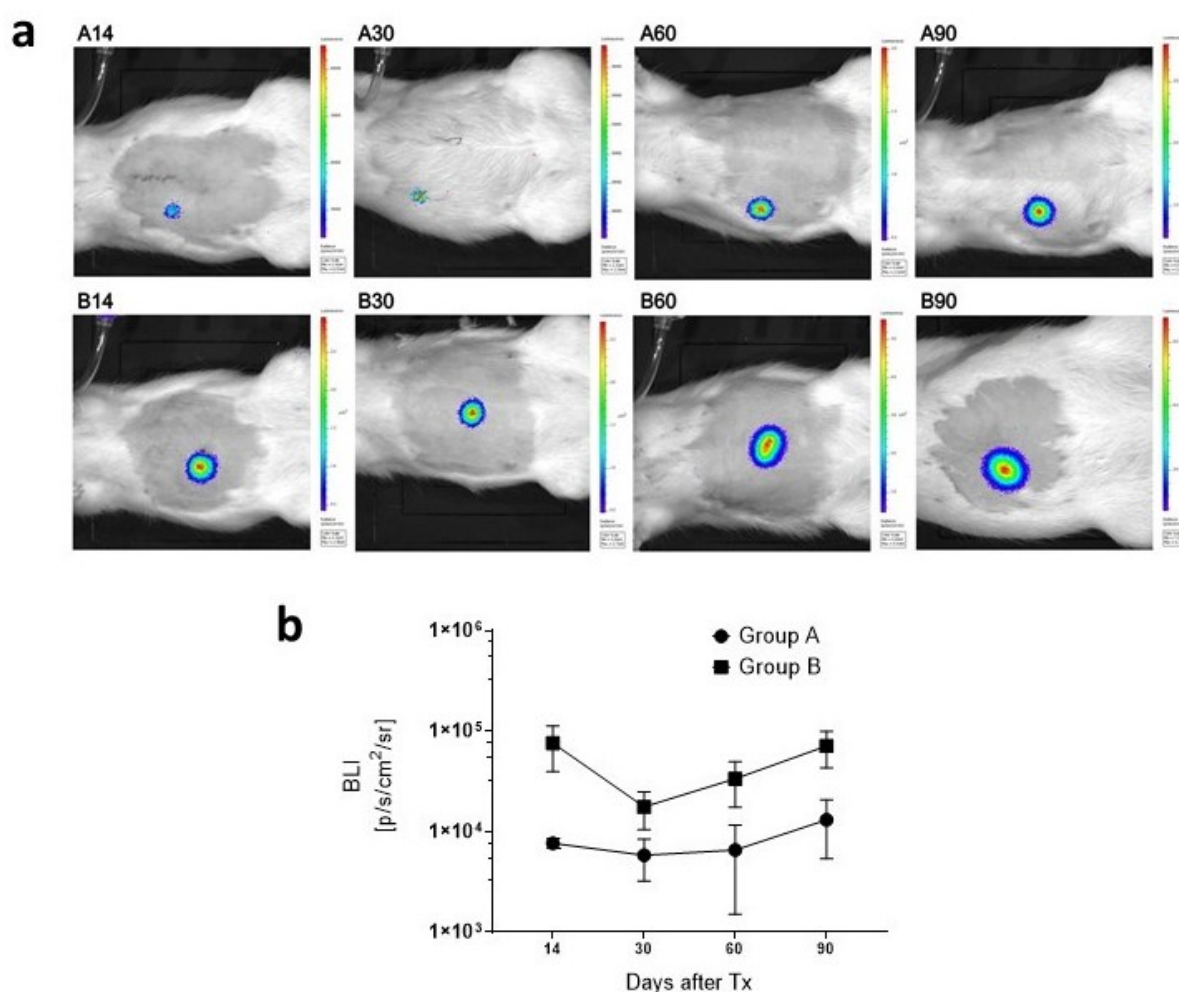
Obrázek 6. Glykemické profily během IVGTT a koeficient asimilace glukózy (K_G). **a** - IVGTT 40 dní po transplantaci. **b** - IVGTT 80 dní po transplantaci. **c** - K_G u skupiny A, skupiny B a skupiny C 40 dní po transplantaci (průměr, $p > 0,05$); **d** - K_G u skupin A, B a C 80 dní po transplantaci (průměr, $p > 0,05$).



Obrázek 7. Hladiny C-peptidu nalačno a stimulovaného C-peptidu měřené v 0. a 10. minutě testu IVGT. **a** - IVGTT 40. den po transplantaci. Skupina A nalačno (A0) a stimulovaný (A10) C-peptid 10 min po bolusu glukózy; skupina B nalačno (B0) a stimulovaný (B10) C-peptid; skupina C nalačno (C0) a stimulovaný (C10) C-peptid. **b** - IVGTT 80. den.

4.1.1.2. Viabilita štěpu ostrůvků

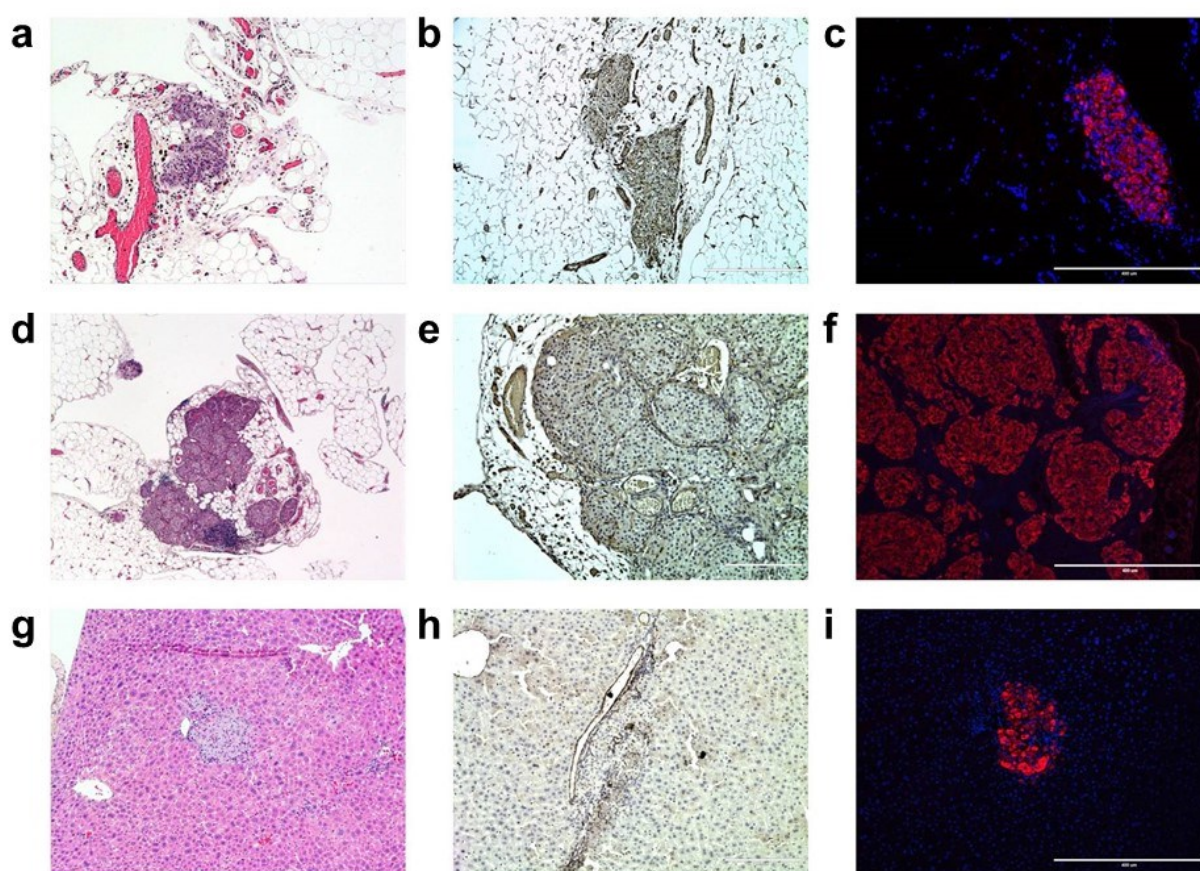
Stabilní bioluminiscenční signály potvrdily životaschopnost a umístění ostrůvkových štěpů u zvířat ve skupinách A i B po transplantaci do omenta (Obrázek 8). 14. den po transplantaci bylo naměřeno průměrné záření $7,66 \times 10^3$ p/s/cm²/sr u skupiny A a $7,61 \times 10^4$ p/s/cm²/sr u skupiny B. Bioluminiscenční signál se začal zvyšovat po 30 dnech experimentu. 90. den byla celková zářivost stejná nebo dokonce vyšší než při prvních měřeních po transplantaci (skupina A: $1,31 \times 10^4$ p/s/cm²/sr (průměr); skupina B: $7,14 \times 10^4$ p/s/cm²/sr (průměr)). Údaje jsou shrnuty na obrázku 8. Naopak u zvířat ve skupině C, která podstoupila transplantaci ostrůvků do jater, nebyly zachyceny žádné bioluminiscenční signály.



Obrázek 8. Příklady bioluminiscenčního zobrazování ve skupinách A a B. **a** - BLI signály prokazující viabilitu a umístění ostrůvků u zvířat se standardním počtem ostrůvků 10 LO/g (panely B) i s marginálním počtem ostrůvků 4 LO/g (panely A). Vyšetření bylo provedeno 14., 30., 60. a 90. den po transplantaci. **b** - Kvantifikace celkového záření ve skupinách A a B ($p = 0,0098$).

4.1.1.3. Histologie

Přítomnost pankreatických ostrůvků v explantovaných omentech a jaterním parenchymu byla potvrzena histologicky. Ostrůvky v omentu byly nepravidelně rozprostřeny v biomatrix. Imunohistochemické barvení protilátkou anti-CD31 bylo použito ke zmapování rozsáhlé neovaskulatury kolem štěpů a uvnitř nich. V omentálním i jaterním štěpu byly potvrzeny silně inzulin-pozitivní buňky (Obrázek 9). Obsah inzulinu v pankreatech byl velmi nízký a odpovídal účinku streptozotocinu (skupina A 149,6 $\mu\text{g/l}$ (průměr), skupina B 105,3 $\mu\text{g/l}$ (průměr), skupina C 133,4 $\mu\text{g/l}$ (průměr); průměrný obsah inzulinu u potkanů bez diabetu byl 795 $\mu\text{g/l}$).

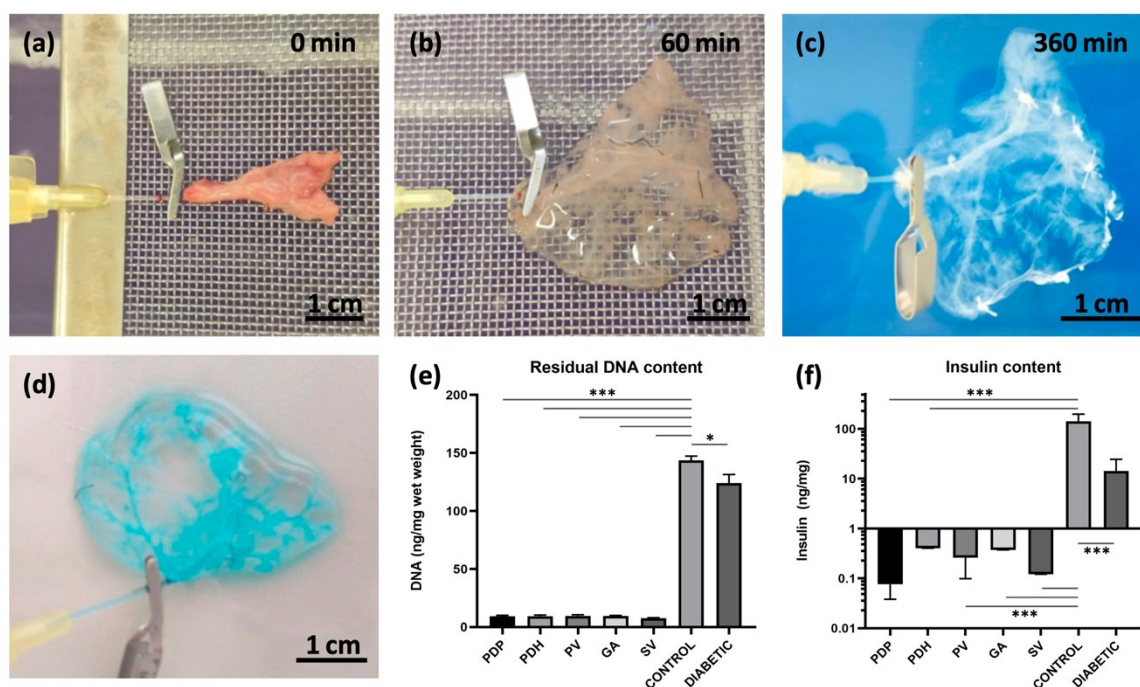


Obrázek 9. Histologie. Explantovaná omenta (den 120) a játra (den 100) byla obarvena pomocí H&E (a, d, g; a omentum 4 LO/g, d omentum 10 LO/g, g játra 4 LO/g). Vaskulatura byla potvrzena imunohistochemicky pomocí protilátky anti-CD31 (b, e, h; b omentum 4 LO/g, e omentum 10 LO/g, h játra 4 LO/g). K zobrazení pankreatických ostrůvků byla použita imunofluorescenční protilátka proti inzulinu (c, f, i; měřítko představuje 400 μm ; c Omentum 4 LO/g, f Omentum 10 LO/g, i Játra 4 LO/g; červené fluorescenční barevení - inzulin, modré fluorescenční barvení – DAPI - jádra).

4.1.2. Decelularizace pankreatu a implantace skeletů do velkého omenta

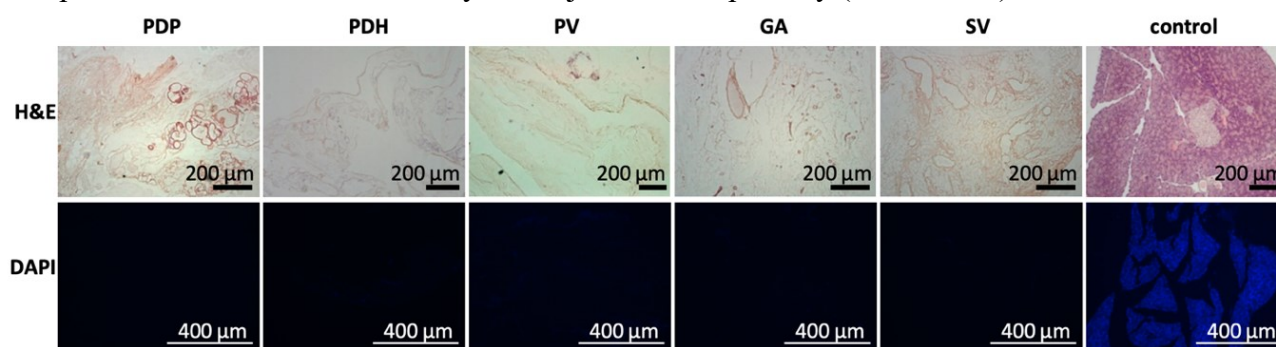
4.1.2.1. Účinnost perfuzní decelularizace

Dárcovské potkaní pankreaty jsme perfundovali přes ductus pancreaticus, portální žílu, žaludeční tepnu a slezinnou žílu. Nativní pankreas během procesu decelularizace průběžně měnil barvu (Obrázek 10a-c). Po 6 h jsme získali acelulární skelety s viditelnou dobře zachovalou sítí cévám podobných struktur. Integrita cév v decelularizované slinivce byla testována aplikací 400× zředěného roztoku Patent blue V (2,5 % w/v) (Obrázek 10d). Kvalita decelularizace byla analyzována také z hlediska obsahu zbytkového inzulínu v β -buňkách produkujících inzulín (Obrázek 10f). Prokázali jsme významné snížení ($p < 0,001$) obsahu inzulínu v decelularizovaných pankreatech (PDP $0,076 \pm 0,036$, PDH $0,405 \pm 0,499$, PV $0,260 \pm 0,156$, GA $0,374 \pm 0,397$ a SV $0,121 \pm 0,174$ ng/mg). V průměru se obsah inzulínu snížil na 0,17 % celkového inzulínu v kontrolních zdravých pankreatech ($142,745 \pm 53,7$ ng/mg). Naproti tomu po aplikaci STZ zůstalo v diabetických pankreatech asi 10 % ($14,317 \pm 10,0$ ng/mg) celkového inzulínu naměřeného před aplikací STZ.



Obrázek 10. Postup a hodnocení decelularizace pankreatu. **(a-c)** Snímky ilustrují postupnou změnu barvy během perfuzní decelularizace ocasu pankreatu přes SV **(a)** na začátku, **(b)** po 60 min **(c)** na konci procesu decelularizace (360 min); **(d)** intaktní cévní systém byl hodnocen infuzí roztoku patentní modři a detekcí případného úniku; **(e)** kvantifikace DNA; decelularizované pankreaty obsahovaly významně nižší množství dvouvláknové DNA ve srovnání s intaktními zdravými kontrolními a diabetickými pankreaty; **(f)** kvantifikace inzulínu; decelularizované a diabetické pankreaty obsahovaly významně nižší obsah inzulínu ve srovnání s kontrolními zdravými pankreaty. * $p < 0,05$ a *** $p < 0,001$.

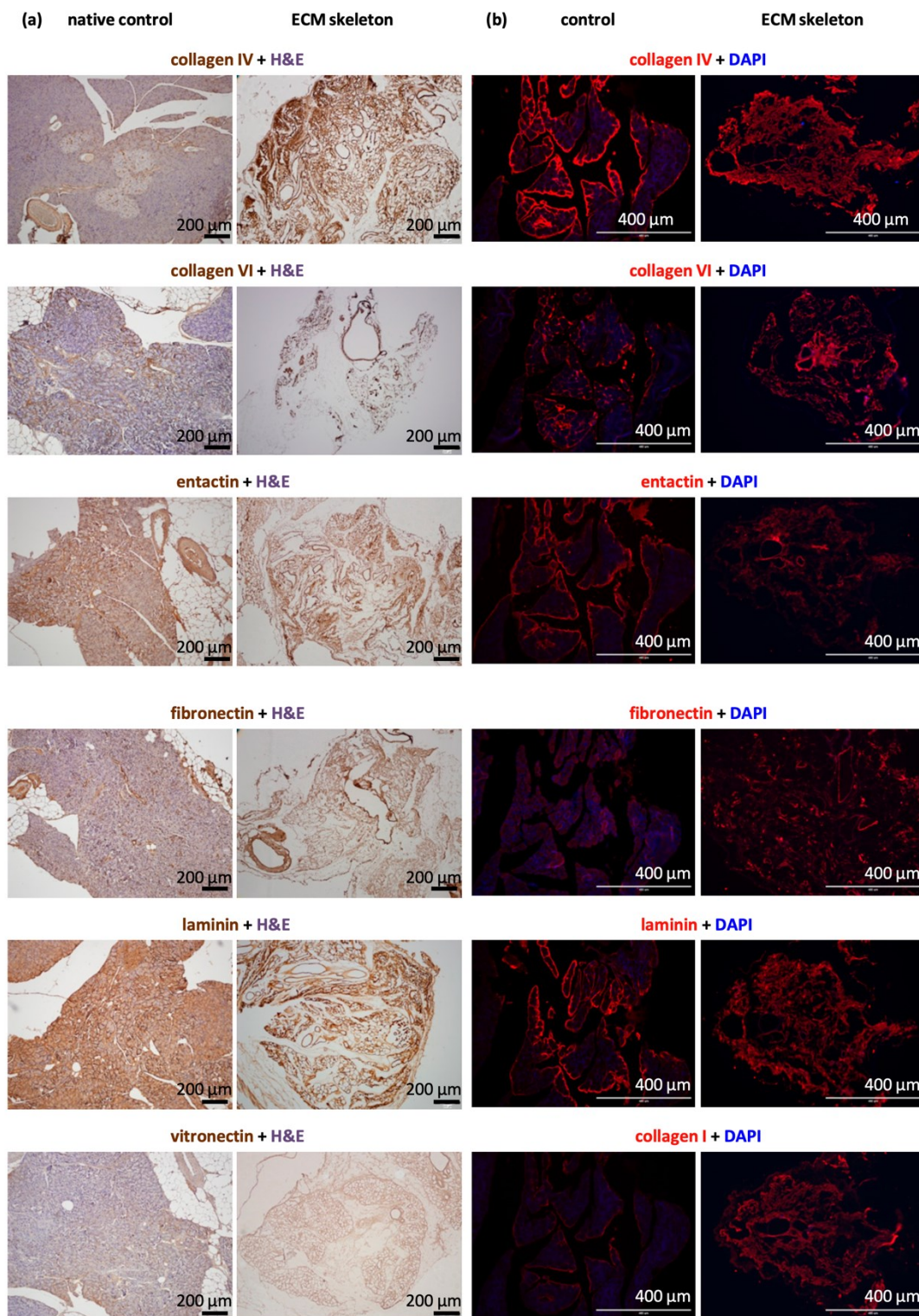
Kvalitu decelularizace jsme prokázali významným snížením ($p < 0,001$) obsahu dvouvláknové DNA v decelularizovaných pankreatech (PDP $9,2 \pm 1,9$, PDH $9,4 \pm 2,1$, PV $9,6 \pm 2,6$, GA $9,5 \pm 0,9$ a SV $7,6 \pm 1,1$ ng/mg) ve srovnání s intaktními kontrolními zdravými pankreaty ($143,6 \pm 15,4$ ng/mg) a diabetickými pankreaty ($124,0 \pm 18,2$ ng/mg) (Obrázek 10e). Významný rozdíl v obsahu DNA byl také mezi kontrolními zdravými a diabetickými pankreaty ($p < 0,05$). Kromě toho bylo při histologickém vyšetření potvrzeno acelulární složení pankreatických skeletů. Barvení H&E neprokázalo žádné zbytky buněk a barvení DAPI ukázalo, že po dokončení procesu decelularizace nezůstaly žádné jaderné komponenty (Obrázek 11).



Obrázek 11. Snímky morfologie decelularizovaných pankreatů. Horní řada – H&E řezy ukazují absenci zbytkových buněk; dolní řada – DAPI řezy ukazují absenci jaderných komponent v pankreatických skeletech perfundovaných různými přístupy.

4.1.2.2. Zastoupení makromolekul ECM v decelularizovaných pankreatech

Decelularizované skelety se skládají z ECM specifické pro danou tkáň. Použití detergentů však může proteiny ECM narušit. Morfologické analýzy odhalily složení proteinů ECM ve skeletech pankreatu (Obrázek 12). Na základě intenzity barvy DAB a červené fluorescence jsme byli schopni rozpoznat tři úrovně signálu: velmi silný (jasně prezentovaný ve všech částech řezu), silný (prezentovaný ve většině částí řezu) a slabý (prezentovaný v některých částech řezu). Skelety ECM měly velmi silný signál pro kolagen IV a laminin. Silné signály byly zjištěny pro entaktin, fibronektin a kolageny VI a I. Kolagen IV a VI byly zvláště hojné v duktech a cévách. Vitronektin vyvolával slabý signál, což naznačuje téměř nulový výskyt v nativním pankreatu. Podíly příslušných antigenů se nelišily mezi pankreaty decelularizovanými různými způsoby ani při srovnání s nativními pankreaty. Absence protilátky anti-CD31 prokázala ve skeletech ECM nepřítomnost endotelových buněk. Chyběly i hormony pankreatických ostrůvků (inzulin, glukagon, somatostatin) a exokrinní enzym amyláza. Účinnosti decelularizace potvrdila také absence cytokeratinu 7, markeru duktálních buněk a negativní barvení jader pomocí DAPI. Zbytkové fragmenty DNA byly ve skeletech pozorovány jen výjimečně. Naproti tomu v kontrolních nativních pankreatech byla hojně pozorována neporušená buněčná jádra.

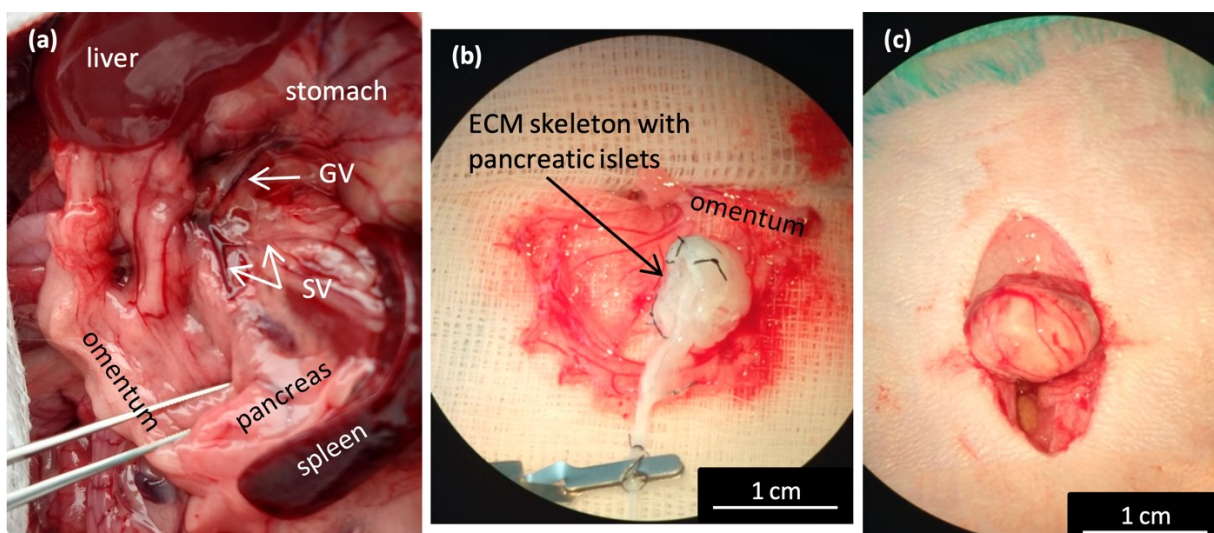


Obrázek 12. Snímky strukturálních proteinů v nativním a decelularizovaném pankreatu perfundovaném přes SV. (a) Imunohistologie vybraných proteinů v kontrolním pankreatu a ve skeletu pankreatu, obarvených specifickými protilátkami a vizualizovaných pomocí detekčního systému DAB; (b) imunofluorescence vybraných proteinů v kontrolním pankreatu a pankreatickém skeletu, obarvených specifickými fluorescenčními protilátkami (červeně); řezy byly pro detekci buněčných jader kontrastně obarveny DAPI (modře).

4.1.2.3. Transplantace ECM skeletů s pankreatickými ostrůvky do omenta

Transplantace LO do omenta se v předchozích experimentech ukázala jako slibná alternativní metoda, která byla stejně účinná jako konvenční metoda transplantace do jater. Omentum má velký povrch, který je snadno přístupný pro operaci. U potkanů však omentum není dostatečně velké, aby pokrylo celý skelet pankreatu. Proto byla navržena nová technika perfuze přes SV (Obrázek 13a). Skelety připravené touto technikou jsou menší a pro transplantaci do omenta vhodnější. K transplantaci jsme tedy použili pouze ECM skelety získané perfuzí přes SV. Nejprve bylo omentum vytaženo z břišní dutiny a opatrně rozloženo. Poté byl na omentum umístěn skelet ECM a ostrůvky byly vpraveny do skeletu cestou katetru v SV (Obrázek 13b).

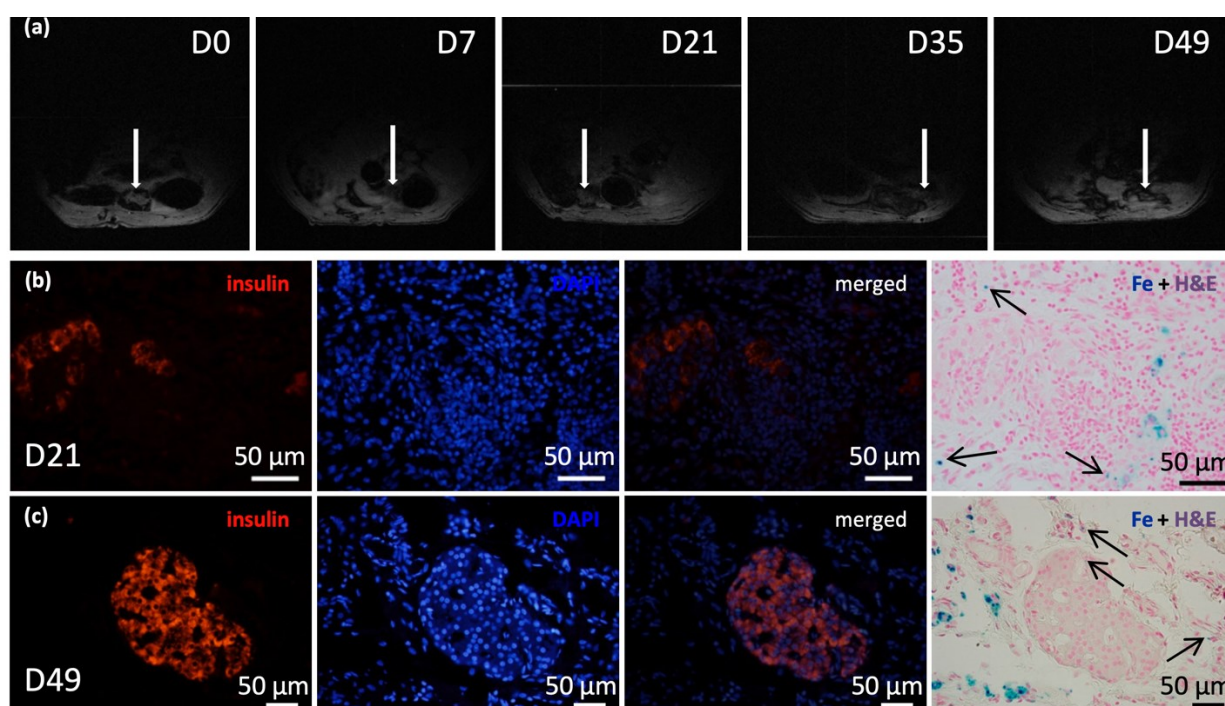
Infuzi ostrůvků do skeletů ECM jsme nejprve testovali *in vitro*, abychom zabránili ztrátě štěpu. Aplikace ostrůvků injekční stříkačkou v objemu 1 ml vedla ke ztrátě $11,4 \pm 4,6$ % ostrůvků. Účinnějším přístupem byla aplikace ostrůvků mikropipetou v objemu 0,2 ml s následným proplachováním. Tím se ztráty ostrůvků snížily pod 1 % ($0,7 \pm 0,5$ %). Po aplikaci ostrůvků byla SV podvázána a katétr byl odstraněn. Nakonec bylo omentum přetaženo přes skelet pankreatu ze všech stran, aby byl skelet uzavřen (Obrázek 13c). Poté bylo omentum obepínající skelet zajištěno jedním stehem a vráceno zpět do dutiny břišní. Na základě našich praktických zkušeností jsme zjistili, že příjemci ECM skeletu by měli mít podobnou nebo vyšší hmotnost než dárci slinivky, aby byl zajištěn dostatečný obal.



Obrázek 13. Implantace repopulovaného skeletu do omenta. (a) Ilustrační snímek anatomického umístění slezinných žil pro perfuzi; GV - žaludeční žíla, SV - slezinná žíla; (b) ECM skelet je umístěn na vytažené omentum; (c) Skelet je zabalen do omenta a zajištěn stehem.

4.1.2.4. Magnetická rezonance

Příjemci ECM skeletů s ostrůvky značenými nanočásticemi železa byli v několika časových bodech hodnoceni pomocí 1H MRI (Obrázek 14a). Počáteční průměrný objem štetu bezprostředně po transplantaci byl 348,61 mm³ a do prvních dvou týdnů se jeho velikost výrazně zmenšila na průměrných 55,51 mm³. To odpovídalo našemu předpokladu, že tekutina obsažená ve skeletu ECM v preimplantačním stavu a během transplantace ostrůvků bude odtékat do okolní tkáně. Objem skeletu ECM pak zůstal nezměněn až do 21. dne. Ve 35. dni byl pozorován další pokles objemu na průměrnou hodnotu 32,88 mm³ a dále zůstal se již objem neměnil. V posledním časovém bodě, 49. den, bylo velmi obtížné detekovat implantované ECM skelety, a to díky nízké specifitě 1H MRI. Malý objem štetu ztěžoval jeho odlišení od jiných struktur v peritoneální oblasti, jako jsou střeva; proto bylo hodnocení pomocí 1H MRI ukončeno. FSL vypočtená v každém časovém bodě zůstala stabilní, 28,32 ± 2,3 %, po celou dobu studie, což naznačuje, že nanočástice SPIO nebyly translokovány ze skeletu ECM.



Obrázek 14. Časový průběh LO značených SPIO v transplantovaných ECM skeletech. **(a)** MR snímky ukazují skelet (šipky) obsahující LO v omentu po dobu 7 týdnů; **(b)** fluorescenční snímky LO ve skeletech 21 dní po transplantaci do omenta; (vlevo) inzulin-pozitivní buňky (červeně) ve štetu; (uprostřed vlevo) protibarvení DAPI (modře) označuje buněčná jádra; (uprostřed vpravo) sloučený snímek ukazuje inzulin v buňkách s neporušenými jádry; (vpravo) histologické vyšetření ložisek železa (modrá skvrna a šipky) ve tkáni obklopující LO; **(c)** fluorescenční snímky ostrůvků ve skeletech 49 dní po transplantaci do omenta.

4.2. Klinická transplantace

4.2.1. Transplantace ostrůvků do velkého omenta

V poměru k tělesné hmotnosti obdrželi pacienti 12 350, 5 350 a 3 780 ekvivalentů LO na 1 kg (LO ekvivalent odpovídá hmotě ostrůvku o průměru 150 μ m specifického tvaru). To bylo více, než je v IKEM stanovena hranice jako minimální počet pro realizaci transplantace. Pro poloautomatickou kvantitativní analýzu byl použit program IsletNet vyvinutý naší skupinou [65]. U všech pacientů trval laparoskopický zákrok přibližně 60 min bez komplikací. Pacienti po výkonu strávili 2 h na jednotce intenzivní péče a byli převezeni na intermediární jednotku Kliniky diabetologie, kde strávili 24 h. Pacienti po izolované transplantaci byli propuštěni z nemocnice 5. pooperační den. Příjemce LO současně s ledvinou byl propuštěn po 14 dnech. Dále byli příjemci intraomentálního štěpu ambulantně sledováni podle standardního protokolu.

4.2.2. Vývoj glykemií, metabolické sledování pacientů

Během prvního roku sledování po transplantaci nebyly u pacientů zaznamenány žádné závažné chirurgické komplikace. Hladiny lačného C-peptidu, hodnoty glykovaného hemoglobinu a celková denní dávka inzulínu v prvním roce po transplantaci jsou uvedeny v tabulce 2. U všech pacientů došlo alespoň k mírnému snížení celkové dávky inzulínu a k poklesu glykovaného hemoglobinu.

Tabulka 2. Základní metabolické parametry pacientů po transplantaci.

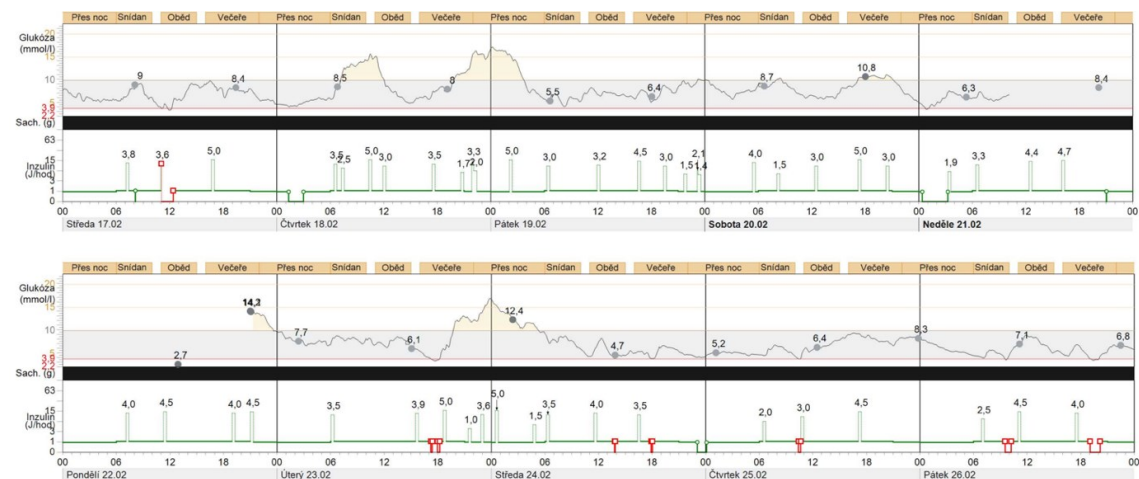
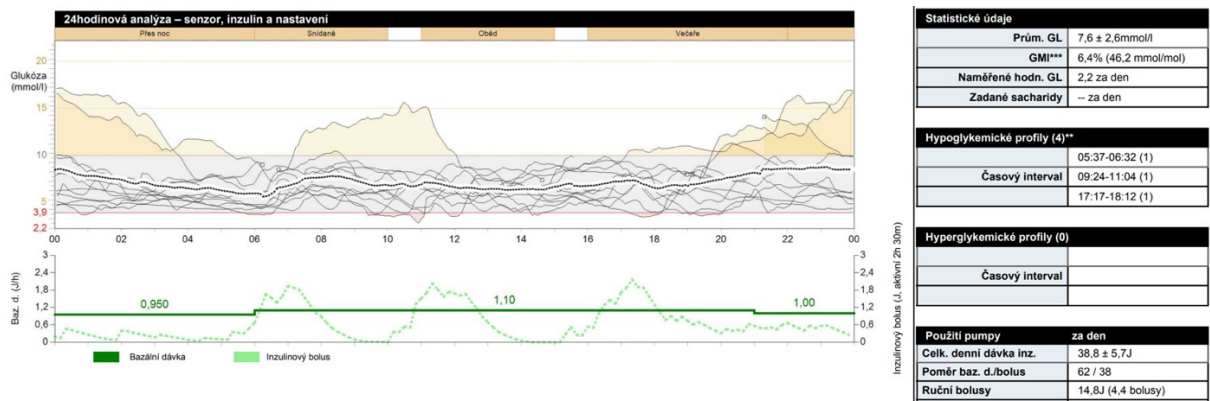
	Pacient	Před Tx	6 týdnů	6 měsíců	12 měsíců
Lačný C-peptid (nmol/l)	1	0.04	0.49	0.58	0.22
	2	0.00	0.17	0.10	0.14
	3	0.37	0.23	0.1	0.68
HbA1c (mmol/mol)	1	57	43	50	48
	2	64	46	53	52
	3	55	48	54	55
Denní dávka inzulínu (IU/kg)	1	0.55	0.32	0.28	0.30
	2	0.31	0.14	0.16	0.19
	3	0.7	0.64	0.46	0.43

Pacient 1 během 12 měsíců před transplantací zaznamenal 6 závažných epizod hypoglykémie, které vyžadovaly pomoc jiné osoby nebo hospitalizaci. Po transplantaci ostrůvků do omenta byl 9 měsíců bez závažné hypoglykémie a klesla hodnota glykovaného hemoglobinu. Pacientovi se navrátilo rozpoznávání mírných hypoglykemií. Od 9. měsíce po výkonu se funkce ostrůvkového štěpu začala pravděpodobně zhoršovat, protože postupně hlásil středně závažné

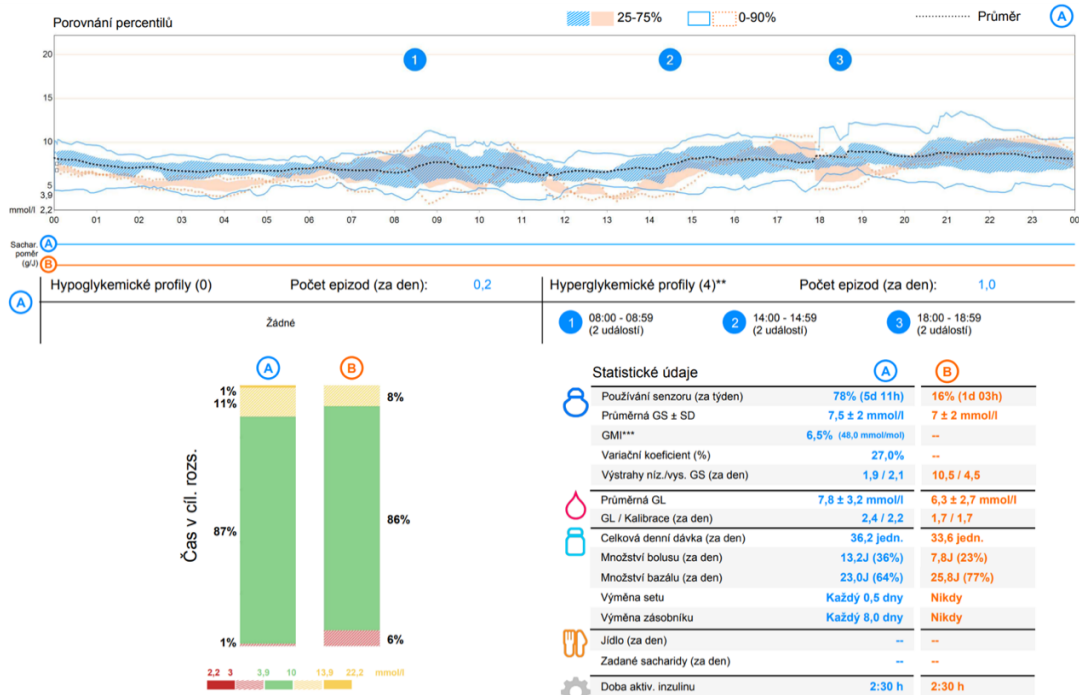
hypoglykemické příhody, které však nevyžadovaly pomoc druhé osoby. I přes tyto epizody hypoglykémie došlo u pacienta ke zlepšení kvality života. Hladiny lačného C-peptidu zůstávaly pozitivní, což svědčí o pokračující funkci ostrůvků. Během roku pacient podstoupil opakovanou edukaci s lékaři a edukačními sestrami specificky zaměřenou na prevenci a léčbu hypoglykémie.

Pacient 2 hlásil 3 epizody závažné hypoglykemie během 12 měsíců před transplantací. Během 12 měsíců po transplantaci pacient 2 neměl ani jednu závažnou hypoglykemickou příhodu, klesla denní dávka inzulínu, klesl glykovaný hemoglobin a ke zlepšila se kvalita života (Obrázek 15). Lačný C-peptid byl u tohoto pacienta po celou dobu po transplantaci pozitivní. Jedenáct měsíců po transplantaci začal pacient využívat hybridní uzavřený okruh propojení inzulínové pumpy s glukózovým senzorem. Na této léčbě se dále snížila denní dávka inzulínu, zlepšily se glykemické profily a klesla variabilita (Obrázek 16).

U 3. pacienta byla před transplantací hlavní obtíží labilita diabetu a progrese mikrovaskulárních komplikací (retinopatie, nefropatie). Po transplantaci ostrůvků do omenta klesly dávky inzulínu a hodnota glykovaného hemoglobinu, a to i přes pokles hladiny lačného C-peptidu. Během prvního půl roku po transplantaci zaznamenal pouze mírné hypoglykémie bez nutnosti pomoci další osoby a zlepšily se jak variabilita glykemií, tak i kvalita života. Po půl roce od výkonu byl zařazen znovu na čekací listinu k další implantaci, kterou záhy (standardním způsobem) podstoupil. Funkce štěpu ledviny byla po celou dobu stabilní.



Obrázek 15. Záznam z inzulínové pumpy a CGM pacienta č. 2 po transplantaci LO do velkého omenta. Na horním souhrnném grafu i na grafech jednotlivých dnů lze vidět poměrně uspokojivé vyrovnání diabetu po transplantaci bez těžkých hypoglykemií.



Obrázek 16. Souhrnný záznam z hybridního uzavřeného okruhu u pacienta č. 2 po transplantaci LO do velkého omenta. Na tomto systému došlo u pacienta k dalšímu poklesu času stráveném v hypoglykémii a ke snížení variability hladin glukózy.

5. Diskuze

Náš výzkum byl zaměřen na testování nové metody transplantace LO do velkého omenta v biokompatibilních lešeních. LO jsme v experimentu transplantovali v plazma-fibrinovém gelu, testovali jsme omentum jako místo implantace decelularizovaných pankreatických skeletů pro další budoucí výzkum a vývoj tzv. „bioarteficiálního“ pankreatu. Povzbudivé výsledky transplantací na zvířecím modelu vedly náš tým k přípravě vlastního protokolu transplantace LO do velkého omenta v plazma-trombinovém gelu u osob s diabetes mellitus 1. typu se syndromem poruchy rozpoznávání hypoglykemií.

V přehledové publikaci Finding Eden - alternative transplantation sites for pancreatic islets. (Hladíková et al., 2022) jsme popsali současné trendy ve výzkumu transplantace inzulin-produkující tkáně se zaměřením na alternativní místa transplantace. Zmínili jsme zde výhody a nevýhody transplantace do velkého omenta.

Studie popsaná ve článku Bioluminescence Imaging In Vivo Confirms the Viability of Pancreatic Islets Transplanted into the Greater Omentum (Hladíková et al., 2021) prokázala, že se výsledky experimentální transplantace LO do omenta pomocí specifického protokolu neliší od výsledků konvenční transplantace do jater. Nejen standardní, ale i marginální počty LO spolehlivě normalizovaly hladinu glukózy v krvi u zvířat s diabetem. Použití nízkého počtu LO již od 4 LO/g vedlo k podobným glykemickým profilům a rychlosti asimilace glukózy jakých bylo dosaženo transplantací do jater. Histologické vyšetření ukázalo zachovalou anatomii LO a bohatou kapilární síť uvnitř bioarteficiálního lešení v omentu. Třicet dní po transplantaci jsme zachytili zvýšený BLI signál, který lze vysvětlit úspěšnou postupnou revaskularizací štěpu.

BLI byla testována jako zobrazovací metoda, která by mohla sledovat životaschopnost a umístění LO transplantovaných do velkého omenta v experimentu. Na preklinickém modelu malých zvířat jsme prokázali, že BLI nabízí bezpečnou a reprodukovatelnou techniku pro potvrzení přežívání LO. Zachycená BLI jednoznačně prokázala přítomnost vitálního štěpu LO v omentu po celou dobu studie. Naše výsledky ukazují, že BLI je jasně schopna rozlišit různá množství transplantovaných LO. Bioluminiscenční signály byly ve všech měřených časových bodech méně rozsáhlé u zvířat, která dostala hraniční počet LO než u zvířat, která dostala standardní počet LO. Ačkoli jsme si vědomi toho, že BLI není použitelná u lidí kvůli nutným genetickým modifikacím buněk štěpu, tento zobrazovací přístup umožnil upravit postup transplantace a potvrdit funkci biologického lešení, což přispělo k jeho dalšímu klinickému využití při léčbě diabetu u lidí.

Zobrazování BLI má své důležité místo v preklinickém výzkumu, např. při analýzách dynamiky růstu nádorových buněk. Na rozdíl od nádorových buněk se nepředpokládá, že by se endokrinní buňky pankreatických ostrůvků po transplantaci výrazněji množily [66]. BLI byla s úspěchem použita k detekci LO umístěných v podkožní umělé polymerní komůrce [58] nebo v játrech, pod pouzdem ledviny či v podkoží u myši [67]. Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují detekční limit BLI u živých zvířat, a jedním z nejdůležitějších je tloušťka překrývající tkáň [68]. V našem experimentu jsme u zvířat po transplantaci LO do jater nezaznamenali žádný bioluminiscenční signál. Předpokládáme, že to bylo způsobeno především poměrně nízkým počtem LUC+ ostrůvků, které byly po transplantaci do portální žíly rozptýleny v celých játrech.

V našem experimentu byl štěp exprimující luciferázu umístěn do nově vytvořeného omentálního vaku přiléhajícího k přední břišní stěně, což umožnilo použít kvantitativní hodnocení. Ukázalo se, že BLI detekce viability štěpu je rychlá a spolehlivá a nevyžaduje žádné invazivní postupy kromě anestezie, což je výhodné pro longitudinální sledování. Citlivost testu umožnila jeho použití u standardní i u marginální velikosti štěpu. V našich pokusech pocházelo 50 % syngenních LO z transgenního syngenního plemene. Viabilní LO transplantované do omenta byly detekovatelné pomocí BLI u všech zvířat v průběhu celé studie.

Všechna zvířata dosáhla normoglykémie a po intravenózním podání glukózy vykazovala normální nebo téměř normální koeficienty asimilace glukózy. Na druhou stranu se nám nepodařilo detekovat žádné bioluminiscenční signály u zvířat s ostrůvkou transplantovanými do jater navzdory jejich plné funkci hodnocené pomocí monitorování glukózy a glukózových tolerančních testů pravděpodobně z důvodu silné absorpce světla v jaterním parenchymu, jak bylo zmíněno výše. Jiní autoři však uvádějí úspěšnou detekci bioluminiscenčních LO v játrech u myši [69].

Mezi výhody velkého omenta patří jeho vysoká vaskularizace, snadná chirurgická dostupnost a velký povrch, který umožňuje transplantaci větších a méně purifikovaných štěpů a možnost explantace štěpu v případě potřeby [70]. Nejdůležitější výhodou však je, že transplantace do omenta eliminuje riziko přímého kontaktu štěpu s krví příjemce. Na druhou stranu v literatuře nalezneme i experimentální a klinické práce, které neprokázaly žádnou výhodu implantace do omenta ve srovnání s tradiční implantací do jater. Toto zjištění autoři připisují nízkému přísunu kyslíku [71] a migrací LO z původního umístění, a to i přes použití biokompatibilního plazma-trombinového gelu k fixaci LO v omentálním laloku a použití biokompatibilního lešení pro podporu připojení a revaskularizaci. V našem experimentu jsme díky BLI potvrdili, že v horizontu minimálně 90 dní po transplantaci byl štěp v omentu stále integrovaný.

Pro další výzkum jsme se rozhodli testovat implantaci LO do omenta v decelularizovaném skeletu pankreatu, který by mohl poskytnout bezpečnější matici pro implantaci LO, podpořit připojení štěpu a urychlit jeho revaskularizaci. Náš kompletní výzkum, včetně zobrazování skenovacím mikroskopem, je popsán v publikaci Decellularized Pancreatic Tail as Matrix for Pancreatic Islet Transplantation into the Greater Omentum in Rats. (Berková et al., 2022).

Dříve popsané techniky přípravy skeletu slinivky vždy vedly k jeho nadměrné velikosti, která přesahovala technickou proveditelnost pro umístění do omenta. Proto jsme vyvinuli novou metodu pro decelularizaci pouze ocasu pankreatu s přístupem přes SV. Prokázali jsme, že skelety připravené naší novou metodou měly přiměřenou velikost a jejich složení proteinů, kvalita decelularizace, zbytkový obsah DNA a anatomická integrita byly srovnatelné nebo lepší než u jiných dříve popsaných decelularizačních technik [72]. Přestože je potkaní omentum snadno přístupné pro operaci, není dostatečně velké na to, aby se do něj vešel skelet celé slinivky břišní připravený konvenční metodou. V této studii jsme proto do omenta implantovali pouze skelety ocasu slinivky břišní připravené pomocí perfuze přes SV.

Opakovaným MRI sledováním ostrůvků, které byly in vitro označeny nanočásticemi železa, jsme potvrdili, že jejich poloha je v omentu stabilní. Nanočástice železa byly histologicky detekovány uvnitř buněk LO i v lokálních makrofázích v jejich okolí. Toto zjištění je v souladu s našimi předchozími výsledky, které ukazují, že nanočástice jsou částečně translokovány z cytoplazmatických vezikul endokrinních buněk do mezibuněčného prostoru s následnou fagocytózou hostitelskými makrofágy [73, 74]. Obtížná detekce implantovaných LO 49. den na MRI může mít různé příčiny. Na základě výsledků histologického vyšetření předpokládáme, že to bylo způsobeno spíše limity citlivosti metody 1H MRI než nepřítomností LO ve štěpu. Vizualizace nanočástic železa (hypointenzní skvrny) v peritoneální oblasti může být ovlivněna artefakty způsobenými přítomností vzduchu nebo střevními pohyby.

Napierala et al. [72] popsali úspěšnou metodu decelularizace celé slinivky potkana. Srovnávali přístupy arteriální, PV a PDP perfuze a ve shodě s našimi zjištěními ukázali, že volba techniky decelularizace má na účinnost decelularizace jen malý vliv. Na druhou stranu repopulační přístupy vykazovaly variabilní účinky. Když byly intaktní LO vloženy do cévního systému, měly tendenci uvíznout uvnitř cév, a když byly LO vstříknuty do vývodu, měly tendenci unikat do pankreatického parenchymu. Tato zjištění naznačují, že zachování makroskopické struktury decelularizovaného orgánu je méně důležité než biochemické vlastnosti skeletu [75, 76]. V dalším výzkumu a vývoji metody by proto bylo vhodné testovat možnosti injekce LO do exokrinního traktu. Zbývající nevyřešenou otázkou je, jaký je nejlepší

způsob transplantace repopulované pankreatické matrix. Většina skupin zabývajících se decelularizací pankreatu ve svých publikacích však popisuje pouze in vitro experimenty zaměřené na funkci LO a cytokompatibilitu skeletů [72, 75]. Yu et al. [64] popsali krátkodobou funkčnost buněk INS-1E, které byly použity k repopulaci pankreatického skeletu u potkanů. Popsali složitou cévní anastomózu mezi cévami skeletu a cévami hostitelské ledviny. Tato unikátní studie prokázala proveditelnost a průchodnost delikátní anastomózy cév decelularizovaného štěpu s oběhem příjemce. Zůstává však nejasné, zda by tato technika byla vhodná pro transplantaci celých ostrůvků. Guo et al. [51] vyvinuli metodu pro in vitro endotelizaci decelularizovaných potkaních skeletů pomocí bioreaktoru. Připravený skelet implantovali do dorzálního podkožního prostoru u myší. Ačkoli všechny dosavadní výsledky na poli decelularizace pankreatu mohou představovat důležitý krok směrem k přípravě tzv. „biarteficiálního“ pankreatu, doposud nebyly popsány žádné pokusy o repopulaci těchto pankreatických matrix β -buňkami s důrazem na metabolickou funkci štěpu.

S ohledem na úspěšné výsledky funkce LO ve velkém omentu a uspokojivé biologické a mechanické vlastnosti biokompatibilního plasma-thrombinového lešení na zvířecím modelu, postoupila tato nová technika transplantace do klinické fáze experimentu. Průběh a výsledky prvních dvou transplantací LO do velkého omenta v IKEM jsou popsány v publikaci *Transplantation of Pancreatic Islets Into the Omentum Using a Biocompatible Plasma-Thrombin Gel: First Experience at the Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague*. (Saudek et al., 2022). Výsledky třetího pacienta jsou součástí této dizertační práce.

V roce 2017 Baidal et al. oznámili povzbudivé výsledky u prvních 3 pacientů s diabetem 1. typu léčených intraomentální transplantací LO s použitím rekombinantního thrombinu k intraoperačnímu vytvoření fibrinového lešení [77]. Méně sofistikovaný přístup byl použit u série 4 pacientů, kteří podstoupili autotransplantaci LO po totální pankreatektomii. V těchto případech bylo 25 % až 36 % objemu neočištěných LO umístěno do omenta a zbytek do jater [78]. V této skupině bylo omentum vybráno z důvodu stoupajícího portálního tlaku během infuze velkého objemu nepurifikované tkáně do portální žíly. Pro fixaci LO v omentálním vaku bylo použito chirurgické fibrinové lepidlo. Výsledky u těchto 4 pacientů nebyly horší než u kontrolní skupiny, která dostala autologní LO pouze do portální žíly.

Experimentální výsledky včetně technologie tvorby biologického lešení prezentované v této práci byly zásadní pro zahájení klinického programu v našem transplantačním centru. Protože rekombinantní lidský thrombin nebyl v Evropě k dispozici, použili jsme k aktivaci tvorby fibrinu humánní thrombinovou složku klinicky schválené sady chirurgického lepidla.

Do naší klinické studie jsme zahrnuli pacienty se syndromem porušeného vnímání

hypoglykémie s hypoglykémiami refrakterními k intenzivní léčbě pomocí komplexní edukace a CGM. Tito pacienti obvykle trpí diabetem již mnoho let a vykazují abnormální regulaci hladiny glukózy v důsledku snížené odpovědi sérového glukagonu a adrenalinu na hypoglykémii a dalších abnormalit autonomního nervového systému. Mezi nimi pečlivě vybraná skupina s labilním diabetem nereagujícím na medikamentózní a technologické zásahy má z transplantační léčby zjevný prospěch [79]. Lze sem zařadit i pacienty s diabetem 1. typu, kteří mají konečné stadium onemocnění ledvin vhodné pro transplantaci ledviny, protože doplňková transplantace celého orgánu slinivky představuje velké chirurgické riziko. Bohaté arteriální zásobení a velký povrch jsou předpokladem rychlé revaskularizace ostrůvkového štěpu v omentu. Chybí však jasné informace o tom, zda mají LO v této lokalitě dostatečné zásobení kyslíkem pro své přežití v časném pooperačním období ve srovnání se zásobením v portálních sinusoidách. Dosud byly popsány pouze 3 případy z jednoho centra, z nichž 2 dosáhly primárního cílového ukazatele $HbA1c \leq 6,5 \%$ (47,5 mmol/mol) po 1 roce a u jednoho došlo k nezávislosti na inzulinu [60].

U všech našich pacientů byla transplantace LO do omenta bezpečná a obnovila endogenní produkci inzulinu. Přestože efekt nebyl dostatečný, aby umožnil vysazení exogenního inzulinu, vedl k dobré metabolické kontrole, úplnému vymizení středně těžkých a těžkých hypoglykemických epizod, návratu vnímání blížící se hypoglykémie a k přibližně 50% snížení dávky inzulinu. Tento relativní úspěch se u pacienta 2 udržel i po 1. roce, ale u pacienta 1 došlo k recidivě středně těžkých hypoglykemií 9 měsíců po transplantaci. Důvod nízké funkce štěpu u tohoto pacienta není jasný, ale mezi možná vysvětlení patří časná ztráta hmoty β buněk z technických důvodů, recidiva autoimunity a rejekce. V transplantovaném štěpu byl poměrně vysoký index velikosti LO, který naznačuje vysoký podíl větších ostrůvků, které mohou být citlivější na omezení kyslíku a živin před přihojením [80]. Pacient 3 podstoupil světově unikátní kombinovanou transplantaci LO do velkého omenta společně s transplantací ledviny. I přes nízké hladiny C-peptidu u něj došlo ke snížení dávek inzulinu a k lepšímu vyrovnání glykemií. Aby dosáhl ještě lepších výsledků, byl časně po výkonu zařazen znovu na čekací listinu a podstoupil transplantaci ostrůvků znovu, tentokrát cestou portální žíly.

6. Závěr

V první části projektu se nám ve spolupráci s pracovištěm DRI v Miami podařilo vyvinout reprodučibilní nový způsob podání ostrůvků v biodegradabilním gelu do velkého omenta u potkanů. Funkční výsledky charakterizované produkcí inzulínu u diabetických zvířat a stupněm normalizace glykemií odpovídají hodnotám, kterých lze dosáhnout při dosud nejvíce používané a z řady důvodů nevýhodné cestě podání do jaterního portálního řečiště. K normalizaci glykemií postačoval stejný nebo dokonce nižší počet LO ostrůvků, než je tomu při užití metody implantace do jater. Druhým významným výsledkem byl návrh nové rychlé neinvazivní metody pro ověření vitality transplantovaných ostrůvků založené na bioluminiscenci. Technika je vhodná při hledání nových způsobů implantace a v našem případě urychlila ověření vhodnosti uložení LO do omenta.

Dalším výsledkem byla příprava nového způsobu decelularizace segmentu pankreatu, který svou velikostí a kvalitou může sloužit jako matrix pro repopulaci izolovaných LO a následnou implantaci do omenta. Sériové magnetické rezonance LO označených oxidem železa prokázaly, že si LO udržely svou polohu v omentu. Histologické hodnocení a imunofluorescenční zobrazení potvrdilo jejich životaschopnost a trvalou produkci inzulínu u nediatetických syngenních příjemců. Jedině další výzkum ukáže, zda použití decelularizovaných skeletů pro transplantaci LO poskytne lepší výsledky při léčbě experimentálního diabetu ve srovnání s přímou transplantací do jater nebo transplantací do omenta s podporou plazmatického trombinového gelu. Navrhovaný model představuje také platformu pro testování dalších modifikací, jako je intravaskulární či intraduktální aplikace LO, statické či dynamické metody recelularizace, použití podpurných mezenchymálních kmenových buněk a endoteliálních buněk a podání agregátů buněk ostrůvků namísto nativních pankreatických ostrůvků [81].

Na základě úspěšných výsledků experimentu jsme připravili protokol pro klinickou transplantaci. Transplantaci Langerhansových ostrůvků do omenta na Klinice diabetologie IKEM v letech 2019–2021 podstoupili tři pacienti s diabetes mellitus 1. typu se syndromem porušeného vnímání hypoglykémie. Prokázali jsme proveditelnost a bezpečnost transplantace a schopnost štěpu v omentu obnovit produkci inzulínu. Náš příspěvek k vývoji této nové metody transplantace ostrůvků je však vzhledem k nízkému počtu provedených výkonů zatím omezený. V dalších krocích by měl být tento postup testován na větší skupině pacientů. Transplantace do omenta však jistě rozšiřuje portfolio léčebných možností pro osoby, které nemohou podstoupit transplantaci do portální žíly (hepatopatie, portální hypertenze).

7. Reference

- [1] Choudhary P, Rickels MR, Senior PA, et al. Evidence-informed clinical practice recommendations for treatment of type 1 diabetes complicated by problematic hypoglycemia. *Diabetes Care*. 2015;38(6):1016-1029. doi:10.2337/dc15-0090
- [2] Carlson AL, Sherr JL, Shulman DI, et al. Safety and Glycemic Outcomes During the MiniMed™ Advanced Hybrid Closed-Loop System Pivotal Trial in Adolescents and Adults with Type 1 Diabetes. *Diabetes Technol Ther*. 2022;24(3):178-189.
- [3] Gremizzi C, Vergani A, Paloschi V, Secchi A. Impact of pancreas transplantation on type 1 diabetes-related complications. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010;15(1):119-123. doi:10.1097/MOT.0b013e32833552bc
- [4] Seo DK, Lee HS, Park J, Ryu CH, Han DJ, Seo SG. Diabetic Foot Complications Despite Successful Pancreas Transplantation. *Foot Ankle Int*. 2017;38(6):656-661. doi:10.1177/1071100717696246
- [5] Berney T, Andres A, Bellin MD, et al. A Worldwide Survey of Activities and Practices in Clinical Islet of Langerhans Transplantation. *Transpl Int*. 2022;35:10507. Published 2022 Aug 11. doi:10.3389/ti.2022.10507
- [6] Meirelles Júnior RF, Salvalaggio P, Pacheco-Silva A. Pancreas transplantation: review. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(2):305-309. doi:10.1590/S1679-45082015RW3163
- [7] Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006;355(13):1318-1330. doi:10.1056/NEJMoa061267
- [8] Rickels MR, Robertson RP. Pancreatic Islet Transplantation in Humans: Recent Progress and Future Directions. *Endocr Rev*. 2019 Apr 1;40(2):631-668. doi: 10.1210/er.2018-00154.
- [9] Witkowski, Piotr et al. "Islet autotransplantation and total pancreatectomy." *Advances in surgery* vol. 48 (2014): 223-33. doi:10.1016/j.yasu.2014.05.006
- [10] Gaba RC, Garcia-Roca R, Oberholzer J. Pancreatic islet cell transplantation: an update for interventional radiologists. *J Vasc Interv Radiol*. 2012;23(5):583-594. doi:10.1016/j.jvir.2012.01.057
- [11] Westermarck GT, Westermarck P, Berne C et al. Widespread amyloid deposition in transplanted human pancreatic islets. *N Engl J Med*. 2008 Aug 28;359(9):977-9. doi: 10.1056/NEJMc0802893.
- [12] Kaido T, Yebra M, Cirulli V, Rhodes C, Diaferia G, Montgomery AM. Impact of defined matrix interactions on insulin production by cultured human beta-cells: effect on insulin content, secretion, and gene transcription. *Diabetes*. 2006 Oct;55(10):2723-9. doi: 10.2337/db06-0120.
- [13] Shapiro AM, Gallant HL, Hao EG et al. The portal immunosuppressive storm: relevance

to islet transplantation? *Ther Drug Monit.* 2005 Feb;27(1):35-7. doi: 10.1097/00007691-200502000-00008.

[14] Landstra CP, Andres A, Chetboun M, Conte C, Kelly Y, Berney T, de Koning EJP, Piemonti L, Stock PG, Pattou F, Vantyghem MC, Bellin MD, Rickels MR. Examination of the Igls Criteria for Defining Functional Outcomes of β -cell Replacement Therapy: IPITA Symposium Report. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021 Sep 27;106(10):3049-3059

[15] Scientific Summary of the Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) 2015 (Tenth) Annual Report, https://citregistry.org/system/files/10AR_Scientific_Summary.pdf

[16] Patikova A, Vojtiskova A, Fabryova E, et al. The Optimal Maturation of Subcutaneous Pouch Can Improve Pancreatic Islets Engraftment in Rat Model. *Transplantation.* 2022;106(3):531-542. doi:10.1097/TP.0000000000003844

[17] D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2006;24(11):1392-1401

[18] Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol.* 2008;26(4):443-452

[19] Rezanian A, Bruin JE, Riedel MJ, et al. Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. *Diabetes.* 2012;61(8):2016-2029

[20] Bruin JE, Rezanian A, Xu J, et al. Maturation and function of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors in macroencapsulation devices following transplant into mice. *Diabetologia.* 2013;56(9):1987-1998

[21] Ramzy A, Thompson DM, Ward-Hartstonge KA, et al. Implanted pluripotent stem-cell-derived pancreatic endoderm cells secrete glucose-responsive C-peptide in patients with type 1 diabetes. *Cell Stem Cell.* 2021;28(12):2047-2061

[22] <https://clinicaltrials.vrtx.com/search-results?keywords=Vertex>

[23] Koblas T, Leontovyc I, Loukotová S, Saudek F. Reprogramming of Human Pancreatic Organoid Cells into Insulin-Producing β -Like Cells by Small Molecules and in Vitro Transcribed Modified mRNA Encoding Neurogenin 3 Transcription Factor. *Folia Biol (Praha).* 2019;65(3):109-123.

[24] Niu D, Wei HJ, Lin L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science.* 2017;357(6357):1303-1307. doi:10.1126/science.aan4187

[25] Zheng, Hanrui et al. "Promising potentials of Tibetan macaques in xenotransplantation." *Xenotransplantation* vol. 26,1 (2019): e12489. doi:10.1111/xen.12489

[26] Safley SA, Kenyon NS, Berman DM, et al. Microencapsulated adult porcine islets transplanted intraperitoneally in streptozotocin-diabetic non-human

primates. *Xenotransplantation*. 2018;25(6):e12450. doi:10.1111/xen.12450

[27] Omami M, McGarrigle JJ, Reedy M, et al. Islet Microencapsulation: Strategies and Clinical Status in Diabetes. *Curr Diab Rep*. 2017;17(7):47. doi:10.1007/s11892-017-0877-0

[28] Matsumoto, Shinichi et al. "Clinical Benefit of Islet Xenotransplantation for the Treatment of Type 1 Diabetes." *EBioMedicine* vol. 12 (2016): 255-262. doi:10.1016/j.ebiom.2016.08.034

[29] Development to Date. Living Cell Technologies Website. 2016. Available at: <http://www.lctglobal.com/products/diabecell/development-to-date>.

[30] de Vos P, Spasojevic M, Faas MM. Treatment of diabetes with encapsulated islets. *Adv Exp Med Biol*. 2010;670:38-53. doi: 10.1007/978-1-4419-5786-3_5.

[31] Scharp DW, Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: history, current progress, and critical issues requiring solution. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014 Apr;67-68:35-73. doi: 10.1016/j.addr.2013.07.018.

[32] Barkai U, Weir GC, Colton CK et al. Enhanced oxygen supply improves islet viability in a new bioartificial pancreas. *Cell Transplant*. 2013;22(8):1463-76. doi: 10.3727/096368912X657341.

[33] One-Year Follow-up Safety Study in Subjects Previously Implanted With VC-01™ (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02939118)

[34] A Safety, Tolerability and Efficacy Study of Sernova's Cell Pouch™ for Clinical Islet Transplantation (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03513939)

[35] Thomas M, Moriyama K, Ledebro I. AN69: Evolution of the world's first high permeability membrane. *Contrib Nephrol*. 2011;173:119-129. doi: 10.1159/000328961.

[36] Liljebäck H, Espes D, Carlsson PO. Unsurpassed Intrahepatic Islet Engraftment - the Quest for New Sites for Beta Cell Replacement. *Cell Med*. 2019 Jun 24;11:2155179019857662. doi: 10.1177/2155179019857662.

[37] Wang W, Gu Y, Tabata Y et al. Reversal of diabetes in mice by xenotransplantation of a bioartificial pancreas in a prevascularized subcutaneous site. *Transplantation*. 2002 Jan 15;73(1):122-9. doi: 10.1097/00007890-200201150-00023.

[38] Christoffersson G, Henriksnäs J, Johansson L et al. Clinical and experimental pancreatic islet transplantation to striated muscle: Establishment of a vascular system similar to that in native islets. *Diabetes*. 2010;59:2569–2578. doi: 10.2337/db10-0205.

[39] Stagner J, Ahren B, Sundler F et al. Reconstructing the pancreas: restoration of normoglycemia, exocrine function, and islet innervation by islet transplantation to the pancreas. *Transplant Proc*. 2008 Mar;40(2):452-4. doi: 10.1016/j.transproceed.2008.01.031

[40] Jindal RM, Sidner RA, McDaniel HB et al. Intraportal vs kidney subcapsular site for human pancreatic islet transplantation. *Transplant Proc*. 1998 Mar;30(2):398-9. doi:

10.1016/s0041-1345(97)01327-4.

[41] Cantarelli E, Citro A, Pellegrini S et al. Transplant Site Influences the Immune Response After Islet Transplantation: Bone Marrow Versus Liver. *Transplantation*. 2017 May;101(5):1046-1055. doi: 10.1097/TP.0000000000001462.

[42] Bonner-Weir S, Orci L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes*. 1982;31(10):883-889. doi:10.2337/diab.31.10.883

[43] Guan J, Zucker PF, Behme MT, Zhong R, Atkinson P, Dupré J. Insulin resistance prevented by portal delivery of insulin in rats with renal subcapsular islet grafts. *Diabetes*. 1997;46(3):372-378. doi:10.2337/diab.46.3.372

[44] Vaithilingam V, Bal S, Tuch BE. Encapsulated Islet Transplantation: Where Do We Stand?. *Rev Diabet Stud*. 2017;14(1):51-78. doi:10.1900/RDS.2017.14.51

[45] Wang X, Brown NK, Wang B, et al. Local Immunomodulatory Strategies to Prevent Allo-Rejection in Transplantation of Insulin-Producing Cells. *Adv Sci (Weinh)*. 2021;8(17):e2003708. doi:10.1002/advs.202003708

[46] Wang, Andrew W et al. “The Greater Omentum-A Vibrant and Enigmatic Immunologic Organ Involved in Injury and Infection Resolution.” *Shock (Augusta, Ga.)* vol. 53,4 (2020): 384-390. doi:10.1097/SHK.0000000000001428

[47] Yasunami Y, Lacy PE, Finke EH. A new site for islet transplantation--a peritoneal-omental pouch. *Transplantation*. 1983 Aug;36(2):181-2. doi: 10.1097/00007890-198308000-00014.

[48] Schaschkow A, Mura C, Pinget M et al. Intra-Omental Islet Transplantation Using h-Omental Matrix Islet filling (hOMING). *J Vis Exp*. 2019 Mar 14;(145). doi: 10.3791/58898.

[49] Ao Z, Matayoshi K, Lakey JR et al. Survival and function of purified islets in the omental pouch site of outbred dogs. *Transplantation*. 1993;56(3):524-529. doi:10.1097/00007890-199309000-00007

[50] Kasoju N, Pátíková A, Wawrzynska E et al. Bioengineering a pre-vascularized pouch for subsequent islet transplantation using VEGF-loaded polylactide capsules. *Biomater Sci*. 2020 Jan 21;8(2):631-647. doi: 10.1039/c9bm01280j. Erratum in: *Biomater Sci*. 2019 Dec 12.

[51] Guo Y, Wu C, Xu L et al. Vascularization of pancreatic decellularized scaffold with endothelial progenitor cells. *J Artif Organs*. 2018 Jun;21(2):230-237. doi: 10.1007/s10047-018-1017-6.

[52] Cito M, Pellegrini S, Piemonti L et al. The potential and challenges of alternative sources of β cells for the cure of type 1 diabetes. *Endocr Connect*. 2018 Mar;7(3):R114-R125. doi: 10.1530/EC-18-0012.

[53] Hammar E, Parnaud G, Bosco D, et al. Extracellular matrix protects pancreatic beta-cells against apoptosis: role of short- and long-term signaling pathways. *Diabetes*.

2004;53(8):2034-2041. doi:10.2337/diabetes.53.8.2034

[54] Parnaud G, Hammar E, Rouiller DG, Armanet M, Halban PA, Bosco D. Blockade of beta1 integrin-laminin-5 interaction affects spreading and insulin secretion of rat beta-cells attached on extracellular matrix. *Diabetes*. 2006;55(5):1413-1420. doi:10.2337/db05-1388

[55] Parnaud G, Hammar E, Ribaux P et al. Signaling pathways implicated in the stimulation of beta-cell proliferation by extracellular matrix. *Mol Endocrinol*. 2009 Aug;23(8):1264-71. doi: 10.1210/me.2009-0008.

[56] Kilkenny DM, Rocheleau JV. Fibroblast growth factor receptor-1 signaling in pancreatic islet beta-cells is modulated by the extracellular matrix. *Mol Endocrinol*. 2008;22(1):196-205. doi:10.1210/me.2007-0241

[57] Allman AJ, McPherson TB, Badylak SF, et al. Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response. *Transplantation*. 2001;71(11):1631-1640. doi:10.1097/00007890-200106150-00024

[58] Berman DM, Molano RD, Fotino C et al. Bioengineering the Endocrine Pancreas: Intraomental Islet Transplantation Within a Biologic Resorbable Scaffold. *Diabetes*. 2016 May;65(5):1350-61. doi: 10.2337/db15-1525.

[59] Berman DM, O'Neil JJ, Coffey LC et al. Long-term survival of nonhuman primate islets implanted in an omental pouch on a biodegradable scaffold. *Am J Transplant*. 2009 Jan;9(1):91-104. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02489.x.

[60] Baidal D, Berman DM, Ricordi C et al. Stable Graft Function and Glycemic Control after Clinical Islet Transplantation on the Omentum. *Diabetes* 2019 Jun; 68 (Supplement 1) 259-LB; doi: 10.2337/db19-259-LB.

[61] Kakabadze Z, Gupta S, Pileggi A, et al. Correction of diabetes mellitus by transplanting minimal mass of syngeneic islets into vascularized small intestinal segment. *Am J Transplant*. 2013;13(10):2550-2557. doi:10.1111/ajt.12412

[62] Gálisová A, Herynek V, Swider E, et al. A Trimodal Imaging Platform for Tracking Viable Transplanted Pancreatic Islets In Vivo: F-19 MR, Fluorescence, and Bioluminescence Imaging. *Mol Imaging Biol*. 2019;21(3):454-464. doi:10.1007/s11307-018-1270-3

[63] Papas KK, Colton CK, Qipo A, et al. Prediction of marginal mass required for successful islet transplantation. *J Invest Surg*. 2010;23(1):28-34. doi:10.3109/08941930903410825

[64] Yu H, Chen Y, Kong H, et al. The rat pancreatic body tail as a source of a novel extracellular matrix scaffold for endocrine pancreas bioengineering. *J Biol Eng*. 2018;12:6. Published 2018 Apr 27. doi:10.1186/s13036-018-0096-5

[65] IsletNet. IsletNet, <https://isletnet.com>; [accessed 15.06.21].2021

[66] Montaña E, Bonner-Weir S, Weir GC. Beta cell mass and growth after syngeneic islet cell transplantation in normal and streptozocin diabetic C57BL/6 mice. *J Clin Invest*. 1993;91(3):780-787. doi:10.1172/JCI116297

- [67] Chen X, Zhang X, Larson CS, Baker MS, Kaufman DB. In vivo bioluminescence imaging of transplanted islets and early detection of graft rejection. *Transplantation*. 2006;81(10):1421-1427. doi:10.1097/01.tp.0000206109.71181.bf
- [68] Virostko J, Chen Z, Fowler M, Poffenberger G, Powers AC, Jansen ED. Factors influencing quantification of in vivo bioluminescence imaging: application to assessment of pancreatic islet transplants. *Mol Imaging*. 2004;3(4):333-342. doi:10.1162/15353500200404133
- [69] Chen X, Kaufman DB. Bioluminescent imaging of transplanted islets. *Methods Mol Biol*. 2009;574:75-85. doi:10.1007/978-1-60327-321-3_7
- [70] Damyar K, Farahmand V, Whaley D, Alexander M, Lakey JRT. An overview of current advancements in pancreatic islet transplantation into the omentum. *Islets*. 2021;13(5-6):115-120. doi:10.1080/19382014.2021.1954459
- [71] Cayabyab F, Nih LR, Yoshihara E. Advances in Pancreatic Islet Transplantation Sites for the Treatment of Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:732431. Published 2021 Sep 13. doi:10.3389/fendo.2021.732431
- [72] Napierala H, Hillebrandt KH, Haep N, et al. Engineering an endocrine Neo-Pancreas by repopulation of a decellularized rat pancreas with islets of Langerhans. *Sci Rep*. 2017;7:41777. Published 2017 Feb 2. doi:10.1038/srep41777
- [73] Berkova Z, Jirak D, Zacharovova K, et al. Labeling of pancreatic islets with iron oxide nanoparticles for in vivo detection with magnetic resonance. *Transplantation*. 2008;85(1):155-159. doi:10.1097/01.tp.0000297247.08627.ff
- [74] Zacharovová K, Berková Z, Jiráček D, et al. Processing of superparamagnetic iron contrast agent ferucarbotran in transplanted pancreatic islets. *Contrast Media Mol Imaging*. 2012;7(6):485-493. doi:10.1002/cmim.1477
- [75] Guruswamy Damodaran R, Vermette P. Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(5):1230-1237. doi:10.1002/term.2655
- [76] Peloso A, Urbani L, Cravedi P, et al. The Human Pancreas as a Source of Protolerogenic Extracellular Matrix Scaffold for a New-generation Bioartificial Endocrine Pancreas. *Ann Surg*. 2016;264(1):169-179. doi:10.1097/SLA.0000000000001364
- [77] Baidal DA, Ricordi C, Berman DM, et al. Bioengineering of an Intraabdominal Endocrine Pancreas. *N Engl J Med*. 2017;376(19):1887-1889. doi:10.1056/NEJMc1613959
- [78] Stice MJ, Dunn TB, Bellin MD, Skube ME, Beilman GJ. Omental Pouch Technique for Combined Site Islet Autotransplantation Following Total Pancreatectomy. *Cell Transplant*. 2018;27(10):1561-1568. doi:10.1177/0963689718798627
- [79] Rickels MR. Hypoglycemia-associated autonomic failure, counterregulatory responses, and therapeutic options in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1454(1):68-79. doi:10.1111/nyas.14214

[80] Lehmann R, Zuellig RA, Kugelmeier P, et al. Superiority of small islets in human islet transplantation. *Diabetes*. 2007;56(3):594-603. doi:10.2337/db06-0779

[81] Hashemi J, Barati G, Bibak B. Decellularized Matrix Bioscaffolds: Implementation of Native Microenvironment in Pancreatic Tissue Engineering. *Pancreas*. 2021;50(7):942-951. doi:10.1097/MPA.0000000000001868

8. Přehled publikací

8.1. Publikace s IF přímo související s tématem dizertační práce

Hladíková, Z., Voglová, B., Pátíková, A., Berková, Z., Kříž, J., Vojtíšková, A., Leontovyč, I., Jiráček, D., & Saudek, F. (2021). Bioluminescence Imaging In Vivo Confirms the Viability of Pancreatic Islets Transplanted into the Greater Omentum. *Molecular imaging and biology*, 23(5), 639–649. <https://doi.org/10.1007/s11307-021-01588-y> (IF 3.484)

Hladíková, Z., Berková, Z., Pátíková, A., Hagerf, B., Leontovyč, I., Kříž, J., Marada, T., Froněk, J., & Saudek, F. (2022). Finding Eden - alternative transplantation sites for pancreatic islets. Hledání ztraceného ráje - alternativní místa pro transplantaci izolovaných Langerhansových ostrůvků. *Rozhledy v chirurgii : měsíčník Československé chirurgické společnosti*, 101(1), 14–21. <https://doi.org/10.33699/PIS.2022.101.1.14-21> (IF 0.21)

Berková, Z., Zacharovová, K., Pátíková, A., Leontovyč, I., **Hladíková, Z.,** Cervený, D., Tihlaríková, E., Nedela, V., Girman, P., Jiráček, D., & Saudek, F. (2022). Decellularized Pancreatic Tail as Matrix for Pancreatic Islet Transplantation into the Greater Omentum in Rats. *Journal of functional biomaterials*, 13(4), 171. <https://doi.org/10.3390/jfb13040171> (IF 4.9)

Saudek, F., **Hladíková, Z.,** Hagerf, B., Nemetová, L., Girman, P., Kriz, J., Marada, T., Habart, D., Berková, Z., Leontovyč, I., & Froněk, J. (2022). Transplantation of Pancreatic Islets Into the Omentum Using a Biocompatible Plasma-Thrombin Gel: First Experience at the Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague. *Transplantation proceedings*, 54(3), 806–810. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2021.11.037> (IF 0.9)

8.2. Publikace s IF nesouvisející s tématem dizertační práce

Voglová, B., **Hladíková, Z.,** Nemetová, L., Zahradnická, M., Kesslerová, K., Sosna, T., Lipár, K., Kožnarová, R., Girman, P., & Saudek, F. (2020). Early worsening of diabetic retinopathy after simultaneous pancreas and kidney transplantation-Myth or reality?. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 20(10), 2832–2841. <https://doi.org/10.1111/ajt.15924> (IF 8)

9. Přílohy

- 9.1. Publikace Hladíková, Z., Voglová, B., Pátíková, A., Berková, Z., Kříž, J., Vojtíšková, A., Leontovyč, I., Jiráček, D., & Saudek, F. (2021). Bioluminescence Imaging In Vivo Confirms the Viability of Pancreatic Islets Transplanted into the Greater Omentum. *Molecular imaging and biology*, 23(5), 639–649. <https://doi.org/10.1007/s11307-021-01588-y>
- 9.2. Publikace Hladíková, Z., Berková, Z., Pátíková, A., Hagerf, B., Leontovyč, I., Kříž, J., Marada, T., Froněk, J., & Saudek, F. (2022). Finding Eden - alternative transplantation sites for pancreatic islets. Hledání ztraceného ráje - alternativní místa pro transplantaci izolovaných Langerhansových ostrůvků. *Rozhledy v chirurgii : mesicnik Ceskoslovenske chirurgicke společnosti*, 101(1), 14–21. <https://doi.org/10.33699/PIS.2022.101.1.14-21>
- 9.3. Publikace Berkova, Z., Zacharovova, K., Patikova, A., Leontovyc, I., Hladikova, Z., Cerveny, D., Tihlarikova, E., Nedela, V., Girman, P., Jirak, D., & Saudek, F. (2022). Decellularized Pancreatic Tail as Matrix for Pancreatic Islet Transplantation into the Greater Omentum in Rats. *Journal of functional biomaterials*, 13(4), 171. <https://doi.org/10.3390/jfb13040171>
- 9.4. Publikace Saudek, F., Hladiková, Z., Hagerf, B., Nemetova, L., Girman, P., Kriz, J., Marada, T., Habart, D., Berkova, Z., Leontovyc, I., & Fronek, J. (2022). Transplantation of Pancreatic Islets Into the Omentum Using a Biocompatible Plasma-Thrombin Gel: First Experience at the Institute for Clinical and Experimental Medicine in Prague. *Transplantation proceedings*, 54(3), 806–810. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2021.11.037>