Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce

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

MUDr. Zuzana Hladíková

Praha 2024

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., MBA

Školicí pracoviště: Institut klinické a experimentální medicíny

Školitel: prof. MUDr. František Saudek, DrSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Abstrakt

Náš výzkum byl zaměřen na novou metodu 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.

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 přihojení štěpu a udržení dlouhodobé funkce v omentu je využíváno metod tkáňového inženýrství.

V našem projektu jsme štěp ostrůvků transplantovali do omenta potkanů za použití biokompatabilního gelu, sestávajícím 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 inzulinu a obnovení vnímání hypoglykémie.

Abstract

Our research has been 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.

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
2. Hypotézy a cíle práce 5
3. Metody 6
3.1. Metodika transplantace LO do velkého omenta za použití fibrinové matrix 6
3.2. Metodika decelularizace pankreatu a implantace skeletů do omenta 7
3.3. Klinická transplantace Langerhansových ostrůvků do omenta 9
3.4. Statistické metody 10
4. Výsledky 11
4.1. Experimentální část 11
4.1.1. Transplantace LO do velkého omenta za použití fibrinové biomatrix 11
4.1.2. Decelularizace pankreatu a implantace skeletů do velkého omenta 13
4.2. Klinická transplantace 15
4. Diskuze 16
5. Závěr 20
6. Reference 21
8. Přehled publikací 26
8.1. Publikace s IF přímo související s tématem dizertační práce 26
8.2. Publikace s IF nesouvisející s tématem dizertační práce 26

1. Úvod

Transplantace inzulin-produkující tkáně

Transplantace pankreatu a 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 rozšířilo o tzv. hybridní polouzavřené okruhy spojující inzulinové pumpy s kontinuálními senzory hladiny glukózy, tyto systémy zatím nefungují autonomně a pro svou optimální funkci vyžadují aktivní spolupráci ze strany pacienta [2]. Transplantace je tedy zatím jedinou možností, která může pacienta zbavit neustálého rozhodování o vhodné dávce, načasování a způsobu aplikace inzulinu. Protože nabídka vhodných orgánů k transplantaci je omezená, provádí se transplantace pankreatu nebo LO nejčastěji u osob s diabetem 1. typu, které současně potřebují transplantovat i ledvinu. Mezi indikace transplantace samotného pankreatu nebo samotných LO patří zejména diabetes mellitus 1. typu se syndromem porušeného vnímání hypoglykémie, kdy byly vyčerpány možnosti dostupných prostředků jako prevence těžkých hypoglykémií. Kromě nedostatku dárců je limitem pro indikaci transplantace rozvaha, zda přínos normalizace glykémií, případně eliminace závažných hypoglykémií, vyváží rizika imunosupresivní léčby.

Transplantace Langerhansových ostrůvků

Hlavní indikací transplantace LO jsou opět konzervativně nezvládnutelné časté závažné hypoglykémie. 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 LO je ovšem obecně menší objem transplantované inzulin produkující tkáně, protože při izolaci LO od exokrinní tkáně dochází často k nadpoloviční ztrátě LO. To je také hlavní důvod, proč se v řadě případů nepodaří dosáhnout úplné nezávislosti na exogenním inzulinu, a je tedy nutno transplantaci opakovat. Hlavním úskalím transplantace je 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 [3].

Izolace LO probíhá ve specializované laboratoři. Dárcovský pankreas je cestou ductus pancreaticus naplněn směsí enzymů kolagenázy a neutrální proteázy, které naruší vazby strukturálních proteinů přednostně v acinární tkáni. Enzymy jsou inaktivovány v okamžiku uvolnění ostrůvků od exokrinní tkáně. 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 [4]. Transplantace samotných LO se provádí jako malý výkon v lokální anestezii. Intervenční radiolog zavede transhepatálně katetr do hlavního kmene portální žíly [5], přičemž se LO spontánně usazují v jejích periferních větvích.

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 pro přežívání a glukózou regulovanou sekreci inzulinu [6]. Během izolace se vazby mezi ostrůvky, exokrinními buňkami a proteiny ECM kompletně přeruší. Po transplantaci je štěp vystaven nízké tenzi kyslíku, vysoké koncentraci nutrientů, toxinů a léků. Kontakt transplantovaných ostrůvků s krví příjemce spouští tzv. nespecifickou zánětlivou odpověď. Tkáňový faktor na povrchu LO spouští koagulační 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 [7].

Současný stav vývoje metody

Počty osob na čekacích listinách před transplantací inzulin produkující tkáně převyšují počet orgánů vhodných k transplantaci. 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.

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. Na podkladě znalostí vývoje pankreatu se připravují postupy k řízené diferenciaci buněk až do fenotypu β buněk [8-10]. To se může odehrát i v případě implantace do podkožní dutiny [11]. Tato možnost byla testována již i v pilotní studii u lidí [12]. 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 [13]. Další z možností je použití reprogramovaných non-β buněk technologií transdiferenciace [14].

Záměrem tzv. makroenkapsulace je především ochrana štěpu před imunitními buňkami a protilátkami příjemce při zachování difuze kyslíku a metabolických produktů [15]. Některá implantabilní zařízení již prochází klinickými zkouškami [16-20].

Některá místa pro implantaci poskytují určitý stupeň tzv. imunoprotekce jako jsou varle

nebo přední oční komora, výsledky ale nejsou lepší, než při ověřené implantaci do jater [21, 22]. Výjimku zatím představuje, především z hlediska dobrého prokrvení a zachované žilní drenáže štěpu do jater, metoda transplantace do velkého omenta. Dalšími opakovaně testovanými místy jsou podkoží, sval, stěna gastrointestinálního traktu, transplantace pod renální kapsulu či do kostní dřeně. Transplantace do podkoží patří v současnosti mezi nejvíce studované alternativy. Studie na zvířatech však prokázaly, že pouhá aplikace LO do podkoží není funkční pravděpodobně vlivem nedostatečné vaskularizace a mechanického stresu [23]. K transplantačním experimentům a studiu metabolismu štěpu je využívána implantace pod pouzdro ledviny. Výsledky experimentálních transplantací pod renální kapsulu jsou uspokojivé, na malých i velkých zvířecích modelech dochází k rychlému navození normoglykémie. 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 LO vhodné [24].

Velké omentum jako alternativní místo transplantace LO

Vhodné alternativní místo pro transplantaci LO by mělo štěpu zajistit dostatečnou tenzi kyslíku [25], portální žilní drenáž inzulinu [26] a mělo by pojmout vyšší objemy tkáně [27]. Mikroprostředí by mělo příznivě ovlivňovat přihojení štěpu s minimálním rizikem rozvoje nespecifické zánětlivé reakce [28]. Operační výkon by měl být minimálně invazivní s možností biopsie či graftektomie. V těchto ohledech velkou naději představuje umístění štěpu LO do velkého omenta. Velké omentum je dobře vaskularizované a jedná se o imunitně aktivní orgán s komplexní strukturou unikátní v obraně proti patogenům. Během zánětu jsou v omentu produkovány proangiogenní a růstové faktory, které podněcují zvýšení cévní hustoty a průtoku krve [29]. První pokusy s implantací LO do omenta se odehrály již v 80. letech 20. století [30]. Štěp je možné aplikovat laparoskopicky či z minilaparotomie mezi listy omenta [31] 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 zánětlivou reakci. Určitým rizikem je vznik střevních adhezí.

Transplantace do velkého omenta za použití metod tkáňového inženýrství

Metabolická funkce ostrůvků uložených v omentu bez náležité fixace nebyla zatím uspokojivá [32]. 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 nebo hydrogelů [33-35].

Z přirozených materiálů pro podporu se vyvíjejí decelularizované skelety orgánů, včetně skeletů pankreatu, obsahující strukturální proteiny ECM. Zachované struktury decelularizovaných orgánů obsahují umožňují repopulaci pro buněčnou terapii a tvorbu arteficiálních orgánů. Decelularizací pomocí detergentů dojde k odstranění DNA a buněčného materiálu včetně imunogenních struktur. Zachované komponenty ECM obsahují především intersticiální proteiny a proteiny bazální membrány, polysacharidy, růstové faktory vázané na matrix a cytokiny. ECM 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 LO před transplantací jsou ECM a mikroprostředí štěpu narušeny. Nativní pankreatická ECM zprostředkovává interakce mezi buňkami a hraje důležitou roli pro přežívání a funkci LO [36, 37], stimuluje proliferaci buněk a váže růstové faktory [38]. Ačkoliv jsou cytokiny a růstové faktory přítomné v ECM zastoupeny pouze v malých koncentracích, působí jako signifikantní modulátory buněčného chování [39]. Laminin, fibronektin a kolagen IV stimulují sekreci inzulinu skrze specifické ECM-integrin interakce [6]. Použití acelulárních skeletů ECM bylo testováno na xenogenních modelech a je pravděpodobné, že v acelulárním skeletu chybí stimuly pro rejekční mechanismy [40]. Transplantace ostrůvků v nativním bezbuněčném proteinovém lešení do velkého omenta by tedy mohla usnadnit jejich přihojení, 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 [41]. 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. 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 [42] a na základě výsledků byla použita u 3 pacientů s diabetem 1. typu se syndromem porušeného

vnímání hypoglykémie. Bylo dosaženo redukce dávek inzulinu a zlepšení vnímání hypoglykémií [43]. 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 glykémií měla stačit transplantace štěpu s menší než standardní velikostí [44].

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 jeho 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. Porovnávali jsme několik decelularizačních postupů a testovali 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 MR 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.

3.1. Metodika transplantace LO do velkého omenta za použití fibrinové matrix

Izolace LO, příprava biodegradabilního lepidla a transplantace

Jako dárci LO byli použiti samci potkanů kmene Lewis. Polovina dárců byla transgenních, exprimující gen pro enzym luciferázu (LUC+). Jako příjemci transplantátu byly použity nebioluminiscenční (LUC-) samice potkanů kmene Lewis. Experimentální diabetes byl u příjemců navozen intraperitoneální injekcí streptozotocinu. LO určené k transplantaci byly získány od LUC+ a LUC- dárců. Pro zhodnocení účinnosti nové metody bylo použito optimální (10 LO na 1 g tělesné hmotnosti) a hraniční (4 LO/g) množství LO,[44-47]. Každý transplantát byl složen z 50 % LUC+ a 50 % LUC- LO. Izolované LO byly transplantovány do velkého omenta v plazma-thrombinové biomatrix [41]. Plazma byla získána ze syngenních zvířat. Lidský thrombin ze soupravy Surgiflo Hemostatic Matrix byl před transplantací rozpuštěn v aqua pro injectione v koncentraci 1000 IU/ml. Diabetičtí příjemci byli rozděleni do 3 experimentálních skupin. Zvířata ve skupině A (n=7) podstoupila transplantaci 4 LO/g tělesné hmotnosti do velkého omenta v plazma-thrombinové biomatrix. Ve skupině B (n = 10) bylo příjemcům transplantováno 10 LO/g do omenta s použitím biomatrix. Izolované LO byly ručně spočítány, resuspendovány v autologní plazmě a aplikovány na velké omentum. Lidský thrombin byl rozpuštěn v aqua pro injectione a nakapán na štěp. Vznikl gel a omentum bylo přeloženo a navráceno do dutiny břišní. Zvířatům ve skupině C (n=7) byly standardně do jater

transplantovány 4 LO/g: substernální minilaparotomií byly LO injikovány do ileocekální žíly. K prevenci krvácení byl použit mikrofibrilární kolagen Avitene®.

Metabolické sledování příjemců a zobrazování štěpu

Příznivá funkce LO byla definována glykémií < 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. 40. a 80. den po transplantaci byly provedeny intravenózní glukózové toleranční testy. Lačným příjemcům bylo do ocasní žíly i.v. aplikováno 0,5 g/kg glukózy. Glykémie byly měřeny v 0. min a poté po 5, 10, 20, 30, 40, 60, 90 a 120 min. Byl vypočten koeficient asimilace glukózy (K_G). C-peptid byl hodnocen v séru odebraném na lačno a 10 minut po podání glukózy pomocí souprav ELISA Rat C-peptide. 100. den experimentu bylo omentum obsahující štěp u zvířat ve skupinách A a B 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 sledování bylo ukončeno. Zobrazení BLI bylo provedeno 14, 30, 60 a 90 dní po transplantaci. Nejprve byla zvířata v celkové anestezii umístěna do kamerové komory k provedení snímků ve stupních šedi, poté jim byl intravenózně podán D-luciferin. Emise fotonů byla zachycena během 60s expozice. Snímky ve stupních šedi byly překryty snímky bioluminiscenčního signálu. Velká omenta se štěpy a játra příjemců byly 100. a 120. den experimentu excidovány a fixovány v 10 % formalínu. Parafinové řezy tkání 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.

3.2. Metodika decelularizace pankreatu a implantace skeletů do omenta

Techniky perfuze pankreatu

Jako příjemci a dárci pankreatu pro decelularizaci a izolaci LO byli použiti dospělí samci potkanů Lewis. Dárcovské pankreaty byly perfundovány katetrem z pankreatického duktu z duodena nebo jaterní strany, přes žaludeční tepnu a přes portální nebo slezinnou žílu. Pro perfuzi pankreatickým duktem přes papilu (PDP; n = 16) byla v duodenu pod papilou provedena incize a katetr byl zaveden antegrádně do žlučovodu. Ex vivo bylo duodenum propláchnuto fyziologickým roztokem, oba konce byly podvázány. Pro perfuzi přes pankreatický vývod z jaterní strany (PDH; n = 13) byl katetr zaveden retrográdně do společného žlučovodu. Ex vivo bylo duodenum vypláchnuto a oba konce byly podvázány. Vyústění vývodu do duodena bylo

uzavřeno svorkou. Pro perfuzi přes portální žílu (PV; n = 19) byl katétr zaveden retrográdně do portální žíly, celiakální, žaludeční a slezinné cévy byly podvázány, slinivka byla vyříznuta a vyjmuta z dutiny břišní. Pro perfuzi přes arteria gastrica (GA; n = 12) [54] byla exponována levá žaludeční tepna, do které byl fixován katetr. 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 a omentum. Poté byl ocas pankreatu pod svorkou naříznut a odstraněn z dutiny břišní. Ex vivo jsme do slezinné žíly zavedli a fixovali katétr. Následně byla od pankreatického ocasu odstraněna slezina, omentum a 3-4 a ocas pankreatu byl připraven k perfuzi a decelularizaci. Kanylované pankreaty byl 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. Proces byl ukončen perfuzí roztokem DNázy (0,4 U/l) po dobu 60 min.

Testování kvality decelularizace

Kvalitu decelularizace jsme porovnávali se slinivkami zdravých kontrolních potkanů a slinivkami diabetických potkanů. Obsah DNA po decelularizaci byl kvantifikován v tkáních v kontrolních i diabetických zvířat. Množství celkové DNA bylo stanoveno pomocí spektrofotometru NanoDropTM. Obsah inzulinu byl měřen v decelularizovaných tkáních a v kontrolních pankreatech zdravých a diabetických zvířat. Koncentrace hormonů byly měřeny pomocí soupravy ELISA Rat Insulin Ultrasensitive pro skelety ECM a soupravy ELISA Rat Insulin pro pankreaty.

Imunohistochemie a imunofluorescence

Připravené vzorky tkání k imunohistochemii byly obarveny buď H&E nebo specifickými protilátkami. Byly použity následující protilátky: anti-kolagen IV, rekombinantní anti-kolagen VI, anti-entaktin/NID, anti-laminin, anti-fibronektin, rekombinantní anti-inzulin, anti-glukagon, rekombinantní anti-somatostatin 28, anti-cytokeratin 7, rekombinantní anti-CD31, anti-vitronektin a anti-α-amyláza. Poté byl použit chromogen DAB Substrate Kit. Vzorky tkání, které obsahovaly LO označené nanočásticemi železa, byly obarveny roztokem pruské modři, aby se detekovala ložiska železa. Vzorky tkání k imunofluorescenčnímu barvení byly značeny primárními protilátkami: anti-laminin, anti-fibronektin, anti-kolagen IV, anti-kolagen VI, anti-entaktin/NID a anti-kolagen I. Buněčná jádra byla značena 4,6-diamidino-2-fenylindolem (DAPI).

Transplantační experimenty a zobrazování MR

LO jsme izolovali podle standardního protokolu. Po izolaci byly LO spočítány pod disekčním mikroskopem pro použití při repopulaci skeletů ECM, označeny nanočásticemi superparamagnetického oxidu železa (SPIO) přidáním MRI kontrastní látky, ferukarbotranu (Resovist®), do kultivačního média a kultivovány přes noc. LO ve skeletech ECM jsme transplantovali do velkého omenta (n = 4). LO byly manuálně infundovány do ECM skeletu přes SV. Omentum bylo přetaženo přes skelet ECM a zajištěno stehem. 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. Experimenty in vivo byly pořízeny na MR skeneru 4,7 T vybaveném duální povrchovou cívkou 1H/19F. 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.

3.3. Klinická transplantace Langerhansových ostrůvků do omenta

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. Transplantace LO do velkého omenta byla do roku 2023 provedena u 3 pacientů (Tabulka 1). Jeden pacient byl indikován ke kombinované transplantaci LO do omenta spolu s transplantací ledviny pro chronické onemocnění ledvin v terminálním stádiu.

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

Příprava biomatrix a izolace Langerhansových ostrůvků

Dvěma základními složkami biokompatibilní matrix jsou lidská autologní plazma (obsahující LO) a lyofilizovaný lidský thrombin. Autologní plazma k přípravě gelu byla pacientům odebrána na Transfúzní stanici IKEM. Humánní thrombin byl použit z komerčního setu chirurgického lepidla Surgiflo. Izolace LO z pankreatů od kadaverózních dárců proběhla

standardním způsobem. Po izolaci byly LO promyty, odstředěny a rekonstituovány v rozmražené plazmě příjemce. Humánní thrombin z komerčního setu Surgiflo byl naředěn aqua pro injectione dle návodu (1000 IU na 1 ml) a byl připraven do injekčních stříkaček.

Transplantace Langerhansových ostrůvků do velkého omenta

Transplantace LO do velkého omenta proběhla v celkové anestezii laparoskopicky. Na rozprostřené omentum na plochu přibližně 10 x 10 cm byl postupně aplikován štěp LO v autologní plazmě a překryt humánním thrombinem. Po vytvoření gelu bylo omentum následně přeloženo přes sebe, zavinuto kraniálně a uloženo subhepatálně. U pacienta ke kombinované transplantaci proběhla transplantace ledviny po laparoskopické transplantaci LO standardním způsobem z šikmého řezu v pravém hypogastriu.

Metabolické sledování pacientů

Po výkonu byly u pacientů 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. 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).

3.4. 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.

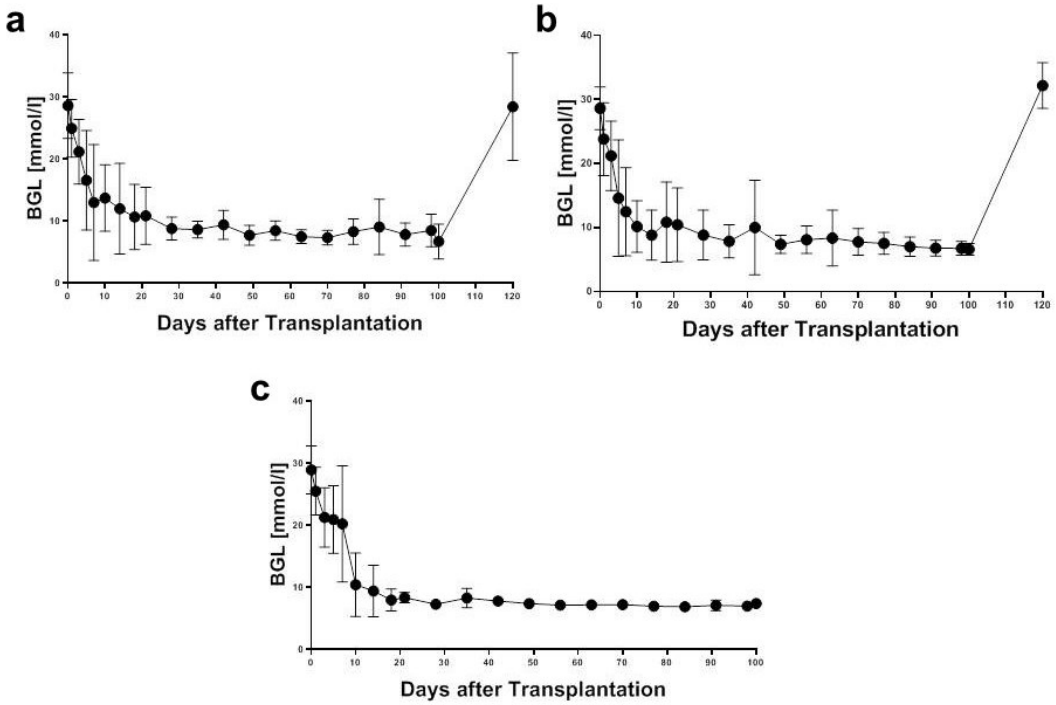
4. Výsledky

4.1. Experimentální část

4.1.1. Transplantace LO do velkého omenta za použití fibrinové biomatrix

Funkce ostrůvkového štěpu

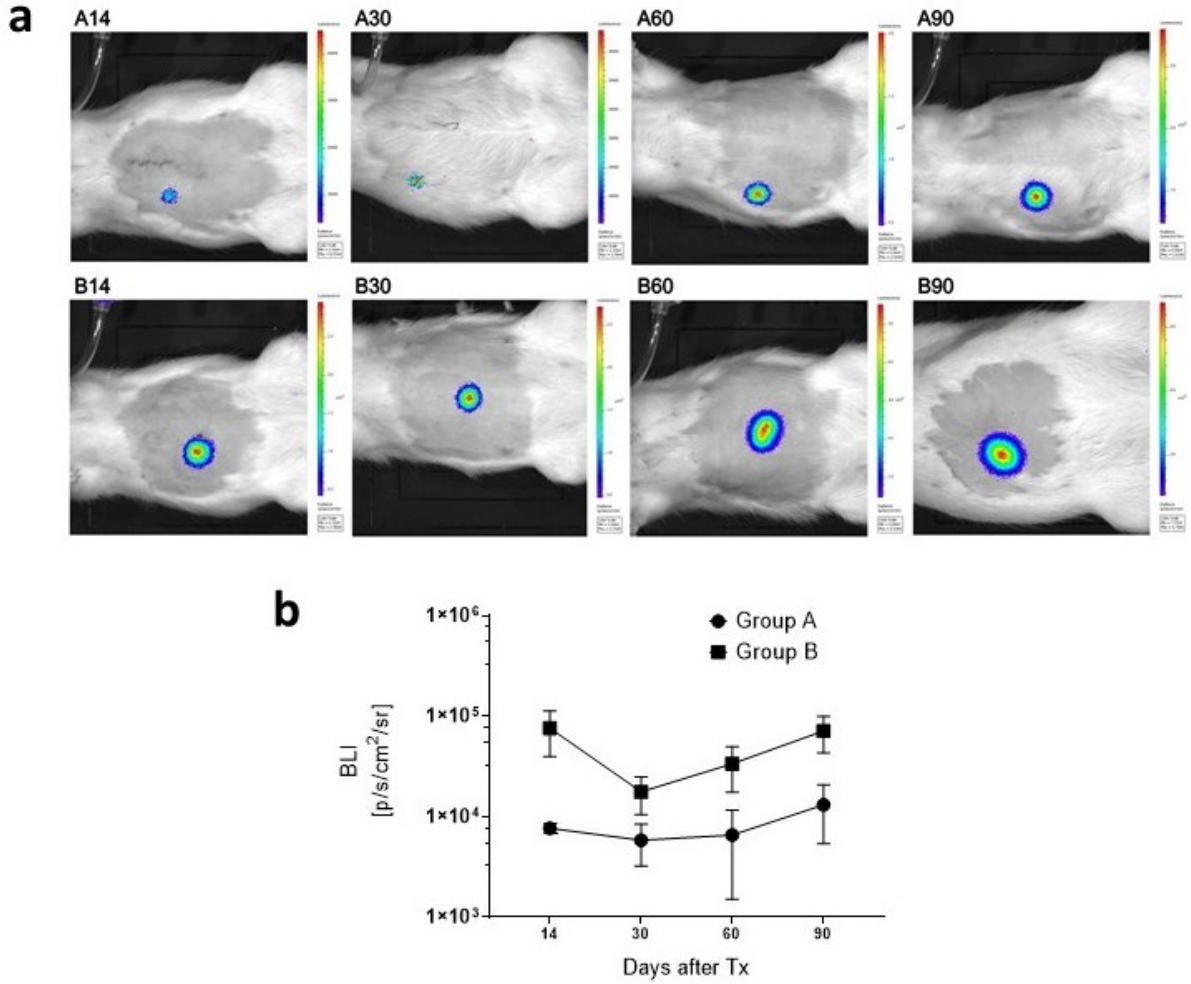
Nelačná glykémie < 10 mmol/l byla obnovena u všech zvířat, v průměru (± SD) nejprve u skupiny B (7 ± 3 dny) s 10 LO/g transplantovanými do omenta, následované skupinou C (11 ± 4 dny; 4 LO/g transplantované do jater) a skupinou A (14 ± 13 dní s velikostí štěpu 4 LO/g transplantovaného do omenta). Rozdíly mezi skupinami však nebyly statisticky významné (p > 0,05). Glykémie zůstávala po celou dobu experimentu v normálním rozmezí (Obrázek 1). 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 inzulínu v ostrůvkových štěpech v omentu. Tělesná hmotnost všech příjemců se po celou dobu studie postupně zvyšovala a zvířata prospívala. Testy IVGT provedené 40. a 80. den experimentu prokázaly normální konstanty asimilace glukózy (K_G, průměr) ve všech skupinách po intravenózní dávce 0,5 g/kg glukózy.



Obrázek 1. Vývoj glykémií 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.

Viabilita štěpu ostrůvků, histologie

Stabilní BLI signály potvrdily životaschopnost a umístění ostrůvkových štěpů u zvířat ve skupinách A i B po transplantaci do omenta (Obrázek 2). BLI signál se začal zvyšovat po 30 dnech experimentu. 90. den byla celková zářivost stejná nebo dokonce vyšší než při prvních měřeních po transplantaci. Údaje jsou shrnuty na obrázku 2. Naopak u zvířat ve skupině C, která podstoupila transplantaci ostrůvků do jater, nebyly zachyceny žádné BLI signály. Přítomnost LO v explantovaných omentech a játrech byla potvrzena histologicky. Ostrůvky v omentu byly nepravidelně rozprostřeny v biomatrix. Imunohistochemické barvení protilátkou anti-CD31 bylo použito ke zmapování neovaskulatury kolem štěpů a uvnitř nich. V omentálním i jaterním štěpu byly potvrzeny silně inzulin-pozitivní buňky. Obsah inzulinu v pankreatech byl velmi nízký a odpovídal účinku streptozotocinu,



Obrázek 2. BLI ve skupinách A a B. **a** - BLI signály prokazující viabilitu a umístění LO u zvířat s10 LO/g (panely B) a 4 LO/g (panely A). Vyšetření 14., 30., 60. a 90. den po transplantaci. **b** - Kvantifikace celkového záření ve skupinách A a B (p = 0,0098).

4.1.2. Decelularizace pankreatu a implantace skeletů do velkého omenta

Účinnost perfuzní decelularizace

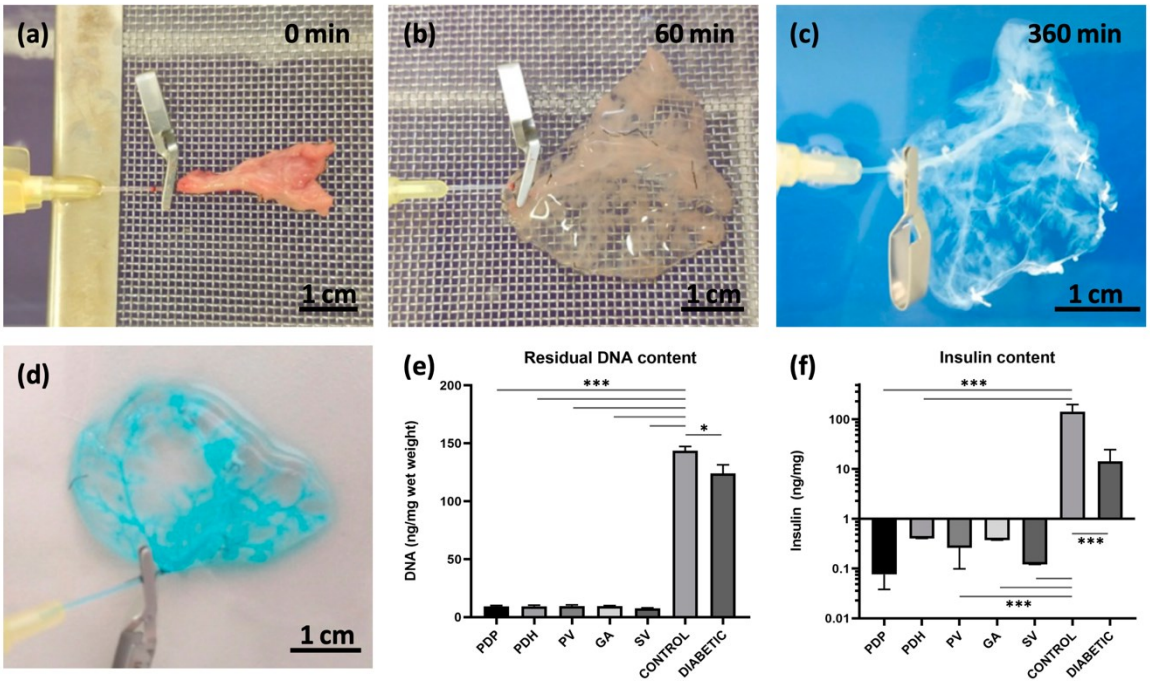
Dárcovské potkaní pankreaty jsme perfundovali přes ductus pancreaticus, portální žílu, žaludeční tepnu a slezinnou žílu. Nativní pankreas během procesu decelularizace průběžně měnil barvu (Obrázek 3a-c). Po 6 h jsme získali acelulární skelety s dobře zachovalou sítí cévám podobných struktur. Integrita cév v decelularizované slinivce byla testována aplikací zředěného roztoku Patent blue (Obrázek 3d). Kvalita decelularizace byla analyzována z hlediska obsahu zbytkového inzulínu (Obrázek 3f). Prokázali jsme významné snížení ($p < 0{,}001$) obsahu inzulinu a dvouvláknové DNA v decelularizovaných pankreatech (Obrázek 3e). Významný rozdíl v obsahu DNA byl také mezi kontrolními zdravými a diabetickými pankreaty ($p < 0{,}05$). Při histologickém vyšetření bylo potvrzeno acelulární složení skeletů. Barvení H&E neprokázalo žádné zbytky buněk a barvení DAPI ukázalo, že po dokončení procesu decelularizace nezůstaly žádné jaderné komponenty.

Zastoupení makromolekul ECM v decelularizovaných pankreatech

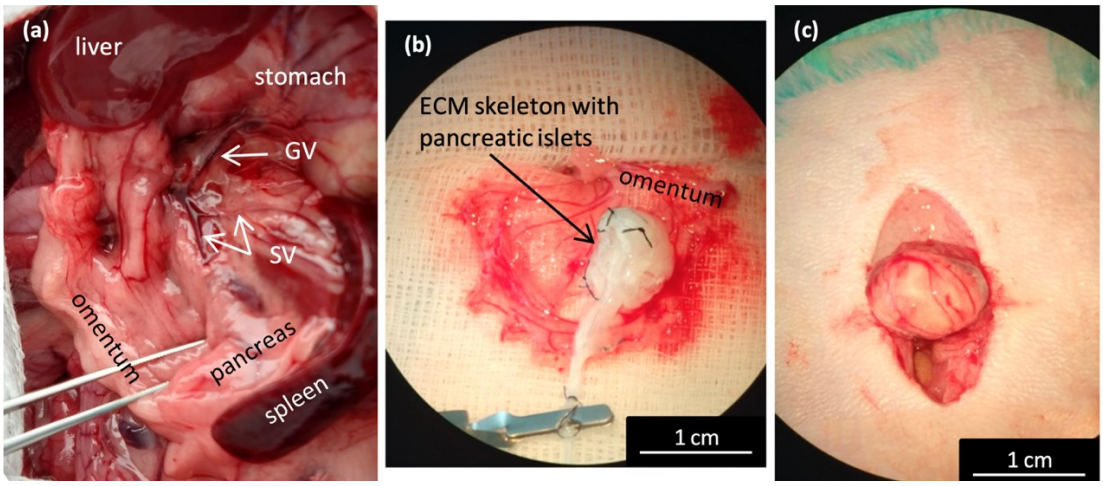
Skelety ECM měly velmi silný signál pro kolagen IV a laminin. Silné signály byly zjištěny pro entaktin, fibronektin a kolageny VI a I. Kolagen IV a VI byly zvláště hojné v duktech a cévách. Vitronektin vyvolával slabý signál. Podíly příslušných antigenů se nelišily mezi pankreaty decelularizovanými různými 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. Zbytkové fragmenty DNA byly ve skeletech pozorovány jen výjimečně. Naproti tomu v kontrolních nativních pankreatech byla hojně pozorována neporušená buněčná jádra.

Transplantace ECM skeletů s pankreatickými ostrůvky do omenta

K transplantaci jsme použili skelety získané perfuzí přes SV. Omentum bylo vytaženo z břišní dutiny a rozloženo. Na omentum byl umístěn skelet ECM a ostrůvky byly vpraveny do skeletu cestou katetru v SV (Obrázek 4b). Nakonec bylo omentum přetaženo přes skelet ze všech stran, aby byl skelet uzavřen (Obrázek 4c). Poté bylo omentum obepínající skelet zajištěno jedním stehem a vráceno zpět do dutiny břišní.



Obrázek 3. Decelularizace pankreatu. **(a-c)** Změna barvy během perfuzní decelularizace ocasu pankreatu přes SV; **(d)** hodnocení intaktního cévního systému byl infuzí Patent Blue; **(e)** kvantifikace DNA; **(f)** kvantifikace inzulínu. * $p < 0{,}05$ a *** $p < 0{,}001$.

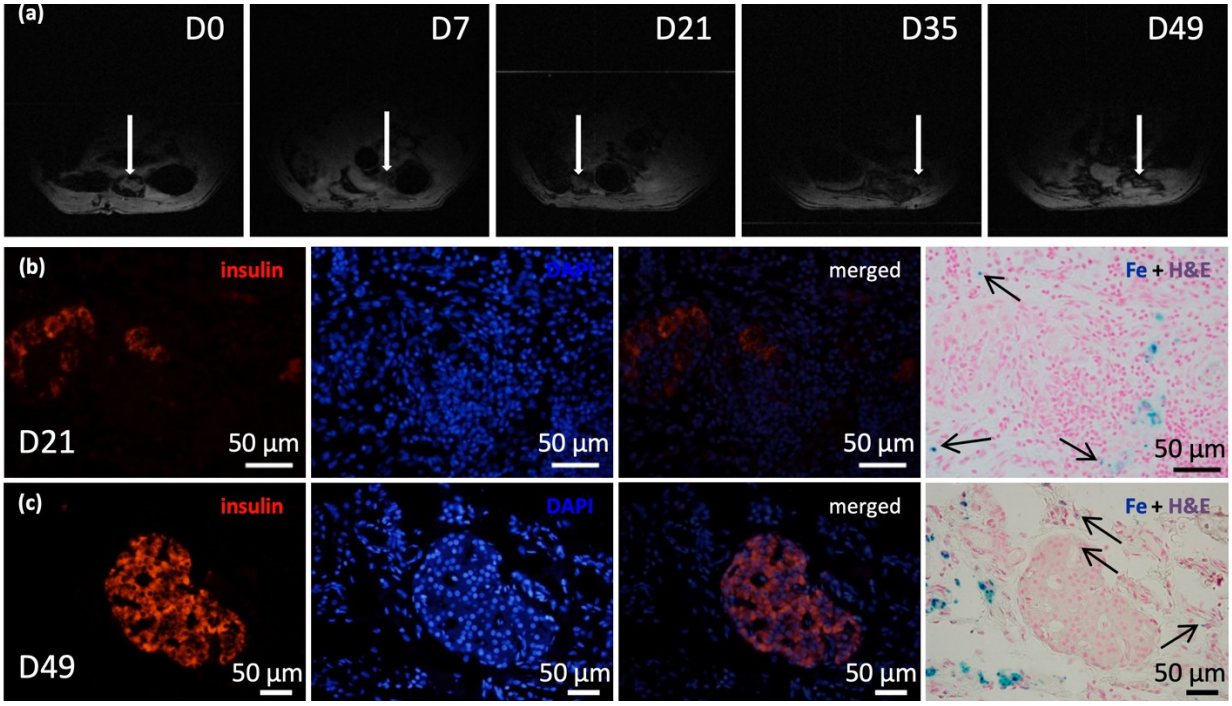


Obrázek 4. Implantace repopulovaného skeletu do omenta. **(a)** Ilustrační snímek anatomického umístění slezinných žil pro perfuzi; GV - žaludeční žíla, SV - slezinná žíla; **(b)** ECM skelet je umístěn na vytažené omentum; **(c)** Skelet je zabalen do omenta a zajištěn stehem.

Magnetická rezonance

Příjemci ECM skeletů s ostrůvky značenými nanočásticemi železa byli v několika časových bodech hodnoceni pomocí 1H MRI (Obrázek 5a). Během prvních dvou týdnů se průměrný objm štěpu zmenšil, což odpovídalo našemu předpokladu, že tekutina ve skeletu ECM preimplantačně a během transplantace bude odtékat do okolní tkáně. Ve 35. dni byl pozorován další pokles objemu a dále 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 štěpu ztěžoval jeho odlišení od jiných struktur v peritoneální oblasti, proto bylo hodnocení pomocí 1H MRI ukončeno. FSL vypočtená v každém časovém bodě zůstala stabilní, což naznačuje, že nanočástice SPIO nebyly translokovány ze skeletu ECM.



Obrázek 5. Osud LO značených SPIO ve skeletech. **(a)** MR snímky skeletu (šipky) s LO v omentu po dobu 7 týdnů; **(b)** fluorescenční snímky LO ve skeletech 21 dní po transplantaci; (vlevo) inzulin-pozitivní buňky (červeně) ve štěpu; (uprostřed vlevo) protibarvení jader DAPI (modře); (uprostřed vpravo) sloučený snímek – inzulin v buňkách s neporušenými jádry; (vpravo) histologické vyšetření ložisek železa (modrá skvrna a šipky); **(c)** fluorescenční snímky ostrůvků ve skeletech 49 dní po transplantaci do omenta.

4.2. Klinická transplantace

Transplantace ostrůvků do velkého omenta

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. 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.

Vývoj glykémií, metabolické sledování pacientů

Během prvního roku sledování po transplantaci nebyly u pacientů zaznamenány žádné závažné chirurgické komplikace. Hladiny lačného C-peptidu, hodnoty HbA1c a celková denní dávka inzulínu v prvním roce po transplantaci jsou uvedeny v tabulce 2.

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 po transplantaci LO do omenta byl 9 měsíců bez závažné hypoglykémie a klesla hodnota HbA1c. Pacientovi se navrátilo rozpoznávání mírných hypoglykémií. Od 9. měsíce po výkonu se funkce LO začala zhoršovat, protože 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. Pacient 2 neměl během 12 měsíců po transplantaci ani jednu závažnou hypoglykemickou příhodu, klesla mu denní dávka inzulínu, klesl HbA1c a zlepšila se kvalita života. Lačný C-peptid byl u tohoto pacienta po celou dobu po transplantaci pozitivní. U 3. pacienta po transplantaci LO do omenta klesly dávky inzulínu a hodnota HbA1c, 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 glykémií, tak i kvalita života. Funkce štěpu ledviny byla po celou dobu stabilní.

4. 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 povzbudivé výsledky transplantací na zvířecím modelu vedly náš tým k přípravě vlastního protokolu transplantace LO do velkého omenta ve fibrinovém gelu u osob s diabetes mellitus 1. typu se syndromem poruchy rozpoznávání hypoglykémií.

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. Citlivost testu umožnila jeho použití u standardní i u marginální velikosti štěpu. Všechna zvířata dosáhla normoglykémie a po intravenózním podání glukózy vykazovala normální nebo téměř normální koeficienty asimilace glukózy. 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 [48]. 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 implantaci do jater. Toto zjištění autoři připisují nízkému přísunu kyslíku [49] 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 přihojení 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 matrici pro implantaci LO, podpořit přihojení a urychlit 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 [50]. 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 [51, 52]. Napierala et al. [50] popsali úspěšnou metodu decelularizace celé slinivky potkana, srovnávali přístupy arteriální, PV a PDP perfuze. 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 [53, 54]. Zbývající nevyřešenou otázkou je, jaký je nejlepší způsob transplantace repopulované pankreatické matrix. Většina skupin zabývajících se decelularizací pankreatu však popisuje pouze in vitro experimenty zaměřené na funkci LO a cytokompatibilitu skeletů [51, 53]. Yu et al. [47] 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 studie prokázala průchodnost delikátní anastomózy cév decelularizovaného štěpu s oběhem příjemce. Zůstává však nejasné, zda by tato technika byla vhodná pro transplantaci celých LO. Ačkoli všechny dosavadní výsledky na poli decelularizace pankreatu mohou představovat krok směrem k přípravě tzv. „biarteficiálního“ pankreatu, doposud nebyly popsány žádné pokusy o repopulaci těchto 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 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 přikládané 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 vytvoření fibrinového lešení [55]. 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 [56]. 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. Do naší klinické studie jsme zahrnuli pacienty se syndromem porušeného vnímání hypoglykémie s hypoglykémiemi refrakterními k intenzivní léčbě. Tito pacienti obvykle trpí diabetem již mnoho let a vykazují abnormální regulaci hladiny glukózy. Mezi nimi pečlivě vybraná skupina s labilním diabetem nereagujícím na medikamentózní a technologické zásahy má z transplantační léčby zjevný prospěch [57]. 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 [43].
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 hypoglykémií 9 měsíců po transplantaci. Důvod nízké funkce štěpu u tohoto pacienta není jasný, ale mezi možná vysvětlení patří časná ztráta hmoty ß buněk z technických důvodů, recidiva autoimunity a rejekce. 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 inzulínu a k lepšímu vyrovnání glykémií. Aby dosáhl ještě lepších výsledků, byl časně po výkonu zařazen znovu na čekací listinu a podstoupil transplantaci ostrůvků znovu, tentokrát cestou portální žíly.

5. Závěr

V první části projektu se nám ve spolupráci s pracovištěm DRI v Miami podařilo vyvinout reproducibilní nový způsob podání ostrůvků v biodegradabilním gelu do velkého omenta u potkanů. Funkční výsledky charakterizované produkcí inzulínu u diabetických zvířat a stupněm normalizace glykémií odpovídají hodnotám, kterých lze dosáhnout při dosud nejvíce používané a z řady důvodů nevýhodné cestě podání do jaterního portálního řečiště. K normalizaci glykémií 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 nediabetických 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 podpůrných mezenchymálních kmenových buněk a endoteliálních buněk a podání agregátů buněk ostrůvků namísto nativních pankreatických ostrůvků [58].

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 inzulinu. 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).

6. 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] 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

[4] 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

[5] 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

[6] 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.

[7] 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.

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

[9] 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

[10] Rezania 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

[11] Bruin JE, Rezania 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

[12] 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

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

[14] 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.

[15] 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.

[16] 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.

[17] 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.

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

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

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

[21] 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

[22] 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.

[23] 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.

[24] 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.

[25] 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

[26] 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

[27] 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

[28] 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

[29] 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

[30] 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.

[31] 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.

[32] 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

[33] 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.

[34] 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.

[35] 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.

[36] 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

[37] 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

[38] 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.

[39] 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

[40] 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

[41] 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.

[42] 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.

[43] 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.

[44] 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

[45] 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

[46] 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

[47] 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

[48] 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

[49] 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

[50] 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

[51] 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

[52] Zacharovová K, Berková Z, Jirák 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/cmmi.1477

[53] 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

[54] 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

[55] 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

[56] 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

[57] 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

[58] 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., Jirák, 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 : mesicnik Ceskoslovenske chirurgicke spolecnosti*, *101*(1), 14–21. https://doi.org/10.33699/PIS.2022.101.1.14-21 (IF 0.21)

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 (IF 4.9)

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 (IF 0.9)

8.2. Publikace s IF nesouvisející s tématem dizertační práce

Voglová, B., **Hladíková, Z.,** Némétová, 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)