

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Ovlivnění kvality, funkce a výsledků transplantace pankreatických ostrůvků
pomocí RNA interference

Improvement of quality, function and transplantation outcomes of pancreatic
islets using RNA interference

Mgr. Lucie Kosinová

2022

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor:	Biochemie a patobiochemie
Předseda oborové rady:	prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.
Školící pracoviště:	1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM)
Školitel:	doc. MUDr. Jan Kříž, Ph.D. Institut klinické a experimentální medicíny (IKEM)

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.

OBSAH

ABSTRAKT.....	3
ABSTRACT.....	4
1. ÚVOD.....	5
1.1. Transplantace Langerhansových ostrůvků (LO).....	6
1.2. Instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR).....	6
1.3. Ovlivnění IBMIR.....	6
1.4. RNA interference.....	7
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	9
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST PRÁCE.....	10
4. METODY.....	11
5. VÝSLEDKY	
5.1. Část 1: Genová exprese v izolovaných potkaních LO a výběr vhodné endogenní kontroly pro genovou expresní analýzu.....	12
5.2. Experimentální model pro zobrazení ischemie jater po transplantaci LO u potkana <i>in vivo</i>	15
5.3. Inhibice exprese tkáňového faktoru v buňkách izolovaných potkaních LO pomocí RNA interference.....	17
6. DISKUZE.....	20
7. ZÁVĚR.....	23
8. REFERENCE.....	23
9. SEZNAM PUBLIKACÍ.....	25

Abstrakt

Transplantace inzulín produkující tkáně je v současnosti jedinou léčebnou metodou umožňující diabetikům 1. typu dosáhnout dlouhodobé nezávislosti na aplikaci inzulínu. Alternativní metodu k orgánové transplantaci pankreatu představuje transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků (LO) do jater, která je bezpečnější, ale méně účinná. Důvodem je výrazná ztráta LO během krátkého času po transplantaci způsobená nespecifickou zánětlivou reakcí IBMIR (z angl. instant blood-mediated inflammatory reaction). Hlavní příčinou této reakce je tkáňový faktor exprimovaný na povrchu buněk LO, který po kontaktu s krví příjemce přímo aktivuje koagulační kaskádu tzv. vnější cestou. Výsledkem je zničení až 60 % transplantované tkáně a vznik ischemických oblastí v játrech. Tkáňový faktor kromě koagulace ovlivňuje také angiogenezi a jeho přítomnost na povrchu buněk LO v pozdějším stádiu po transplantaci je naopak nezbytná pro jejich revaskularizaci. Inhibice genu pro tkáňový faktor v izolovaných LO pomocí RNA interference nabízí možnost krátkodobého potlačení exprese tohoto proteinu, což by znamenalo ochranu LO v raném posttransplantačním období a současně později nebránilo napojení kapilár na cévní systém příjemce. Zvýšení podílu přiložené tkáně by přitom mohlo vést ke zvýšení efektivity transplantace LO jakožto léčebné metody a tím i k významnému zvýšení dostupnosti transplantační léčby.

V předkládané práci byla v první části analyzována genová exprese v izolovaných potkaních LO, na jejímž základě byl vybrán gen *Ppia* jako vhodná endogenní kontrola pro experimenty zaměřené na potlačení exprese tkáňového faktoru. Následně byl vytvořen nový experimentální model pro zobrazování rozsahu ischemie jater po transplantaci LO u potkanů *in vivo* založený na podvazu jaterních tepen, který lze s výhodou využít pro monitorování rozsahu IBMIR. V poslední části práce byla využita metoda RNA interference pro potlačení exprese tkáňového faktoru v izolovaných LO pomocí transfekčních metod mikroporace a lipofekce a její účinnost *in vivo* byla ověřena transplantací diabetickým potkanům. Ukázalo se, že rozsah ischemie jater po transplantaci LO ošetřených siRNA proti tkáňovému faktoru je výrazně nižší než u nativních LO. V případě použití lipofekce jsou výsledky transplantace srovnatelné s nativními LO, dochází k rychlé a stabilní kompenzaci diabetu, a dokonce se ukazuje mírná výhoda LO ošetřených siRNA proti tkáňovému faktoru oproti nativním LO z hlediska dřívější normalizace glykémie příjemců.

Klíčová slova: transplantace Langerhansových ostrůvků (LO), IBMIR, ischemie jater, tkáňový faktor, RNA interference, siRNA

Abstract

Transplantation of insulin producing tissue is the only therapeutic method so far allowing type 1 diabetic patients to achieve long-term independence of insulin administration. Transplantation of isolated pancreatic islets (PI) into liver represents a safer but less effective alternative to whole-organ transplantation. This is caused by a significant loss of transplanted islets within a short time after transplantation due to the instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR). This reaction is triggered by molecules of tissue factor, abundantly expressed on the surface of PI cells. Tissue factor activates directly the coagulation pathway leading to a destruction of up to 60 % of transplanted tissue, and a formation of ischemic areas of downstream lying liver tissue. Tissue factor also stimulates angiogenesis which makes it necessary for revascularization of PI after transplantation. Inhibition of tissue factor gene in isolated PI using RNA interference provides an opportunity for short-term suppression of tissue factor expression, leading to protection of PI in the early post-transplantation period without hindering the connection of capillaries to the recipient vascular system later on. Increasing the portion of successfully engrafted tissue would bring a higher efficiency of PI transplantation as a therapeutic method, meaning a significantly better availability of transplant therapy.

In the first part of the presented work, we analyzed the gene expression in isolated rat PI and chose the *Ppia* gene as a suitable endogenous control for subsequent experiments focused of inhibition of tissue factor expression. In the second part, a new experimental model for *in vivo* imaging of posttransplant liver ischemia in rat was developed, utilizing arterial ligation and providing a useful tool for monitoring of IBMIR level. In the last part of the work, RNA interference was used to inhibit the tissue factor expression in isolated rat PI using microporation and lipofection as a transfection method, and *in vivo* efficacy was evaluated after transplantation into diabetic rats. It was found that after transplantation of PI treated with anti-tissue factor siRNA, liver ischemia was significantly reduced compared to native islets. Using lipofection, the transplantation outcome was comparable with native islets, diabetes compensation achieved was fast and stable, and the siRNA treated islets even showed a slight advantage over native islets in earlier onset of normoglycemia.

Key words: pancreatic islet (PI) transplantation, instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR), liver ischemia, tissue factor, RNA interference, siRNA

1. ÚVOD

V současné době je jedinou léčebnou metodou umožňující diabetikům 1. typu dosáhnout dlouhodobé nezávislosti na farmakologické léčbě inzulinem transplantace inzulin produkující tkáně. Transplantace pankreatu, která se v České republice provádí od roku 1983, představuje metodu volby v kombinaci s ledvinou pro pacienty se selháním ledvin v důsledku diabetické nefropatie. Velmi dobrých výsledků je dosahováno v přežívání pacientů i štěpu s nezávislostí na inzulinu u více než 80 % příjemců jeden rok po transplantaci (Gruessner A. C., 2011, Gruessner A. C. et al., 2012). Tato metoda je však výrazně limitována nedostatečným množstvím orgánů použitelných pro celoo rgánovou transplantaci a zůstává tak vyhrazena pro úzkou skupinu vybraných pacientů. Transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků (LO) do portální žíly jater představuje komplementární léčebnou metodu, která umožňuje využít další, stejně kvalitní, ale pro orgánovou transplantaci nevhodné orgány, a významně tak rozšiřuje dárcovskou základnu. Ve srovnání s celoo rgánovou transplantací je tato metoda méně invazivní, a tedy bezpečnější, ale také méně účinná. Nezávislosti na inzulinu je při léčbě ostrůvky z jednoho pankreatu dosaženo pouze u 10–15 % pacientů (McCall M., Shapiro A. M., 2012). Proto je určena téměř výlučně pacientům s diabetem 1. typu s komplikovaným syndromem poruchy rozpoznávání hypoglykemie, u kterých je hlavním cílem alespoň částečná obnova sekrece inzulinu. Důvodem nízké efektivity této metody je výrazná ztráta ostrůvků během izolace a následně značné poškození štěpu během několika hodin po transplantaci způsobené nespecifickou zánětlivou reakcí označovanou jako IBMIR (z angl. Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction), která má za následek zničení více než poloviny implantovaných ostrůvků (Bennet et al., 1999, 2000, Eich T. et al., 2007a,b, Jiráček D. et al., 2009, Toso C. et al., 2005, Saudek F. et al., 2010). Tato reakce je vyvolána molekulami tkáňového faktoru, exprimovanými na povrchu buněk LO, který při kontaktu s krví příjemce přímo aktivuje koagulační kaskádu zevní cestou a jehož výskyt negativně koreluje s výsledky klinických transplantací (Johansson H. et al., 2005, Moberg L. et al., 2002). Potlačení účinků tkáňového faktoru a snížení rozsahu zánětlivé reakce IBMIR má pozitivní vliv na přežívání transplantovaných LO a může tak zvyšovat účinnost transplantace LO jakožto léčebné metody s cílem vyléčení jednoho pacienta štěpem z jednoho pankreatu (Marzorati S. et al., 2006, Johansson H. et al., 2005). Výsledkem by tak mohlo být významné zvýšení dostupnosti transplantační léčby pro pacienty trpící poruchou rozpoznávání hypoglykemie nebo dokonce rozšíření indikace transplantace LO.

1.1. Transplantace LO

Transplantace LO u člověka jako léčba labilního diabetu mellitu 1. typu se začala objevovat od 80. let minulého století (Sutherland D. E. et al., 1980). Klinicky přijatelnou alternativou k celoo rgánové transplantaci pankreatu se však tato metoda stala až po zavedení tzv. Edmontonského protokolu v roce 2000 (Shapiro A. M. et al., 2000). Protokol zahrnoval jak vylepšený postup izolace a transplantace LO, tak i následný bezkortikoidový imunoprotektivní režim. Díky novým imunosupresivům bylo možné vynechat u pacientů léčbu diabetogenními glukokortikoidy a dosáhnout tak lepší dlouhodobé funkce štěpu ostrůvků i v klinické praxi. Příjemci po úspěšné transplantaci ostrůvků jednoznačně vykazují stabilnější glykémii a snížený výskyt život ohrožujících těžkých hypoglykemických epizod (Ryan E. A. et al., 2005, Voglová B. et al., 2017). K dosažení nezávislosti na inzulinu je však i nadále nutná léčba ostrůvky z pankreatů od 2–4 dárců (Shapiro A. M. et al., 2000), celkově odpovídající průměrnému množství 10–12 tisíc IEQ/kg váhy příjemce.

1.2. Instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR)

Ihned po aplikaci izolovaných ostrůvků do portální žíly příjemce dochází ke spuštění zánětlivé reakce označované jako IBMIR (z angl. instant blood-mediated inflammatory reaction). Tato nespecifická reakce je multifaktoriální obranou organismu a představuje komplexní odpověď na přítomnost nepřírodných antigenů v krvi. Hlavní příčinou je tkáňový faktor, exprimovaný na povrchu buněk ostrůvků, který přímo aktivuje koagulační kaskádu tzv. vnější cestou (Bennet W. et al., 1999 a 2000). Důležitou úlohu hraje i aktivace komplementu, stimulovaná agregace trombocytů a atrakce leukocytů. Výsledkem je vznik trombu a zničení až 60 % transplantovaných ostrůvků během desítek minut až několika málo hodin po transplantaci (Eich T. et al., 2007ab, Toso C. et al., 2005).

1.3. Ovlivnění IBMIR

V minulosti byla popsána řada pokusů o potlačení IBMIR, které lze principiálně rozdělit na dva základní přístupy. Prvním z nich je systémová léčba příjemce, která má zabránit koagulaci a aktivaci komplementu v místě transplantace. Druhý přístup je založen na manipulaci transplantované tkáně a minimalizaci faktorů, které vedou ke vzniku nebo zvyšování intenzity IBMIR. Výhodou prvního přístupu je snadná a okamžitá klinická aplikovatelnost, nevýhodou jsou pak celkové vedlejší účinky, především krvácení. V druhém

případě naopak můžeme zásah velmi dobře lokalizovat, ale je technologicky poměrně obtížné dosáhnout požadovaného efektu (Inverardi L., Ricordi C., 2006, Nilsson B. et al., 2011).

Relativně novým experimentálním přístupem je potlačení exprese genu pro tkáňový faktor pomocí techniky RNA interference (RNAi), která využívá principy epigenetiky. Tento fylogeneticky starý jev tvoří podstatnou složku regulace genové exprese vyšších organismů a původně představoval způsob obrany buněk proti virové infekci. RNA interference byla poprvé popsána v roce 1998 a od potvrzení účinnosti siRNA v savčích buňkách je tato technika široce využívána ke studiu funkce jednotlivých genů (Fire A. et al., 1998). V roce 2006 byla za objev RNA interference udělena Nobelova cena.

1.4. RNA interference

RNA interference (RNAi) je molekulárně biologický proces, při kterém dochází k navázání molekuly nekódující RNA na cílový úsek mRNA na základě jejich komplementarity, což má za následek potlačení translace této mRNA. Jedná se o vysoce účinný a specifický proces, který je aktivně vykonáván v buňce konkrétním mechanismem. RNAi probíhá u většiny eukaryot a tvoří významnou složku posttranskripční regulace genové exprese. Proces RNAi představuje biochemickou dráhu vrozeného imunitního systému a pravděpodobně původně vznikl jako obranný mechanismus buňky před virovou RNA a šířením transpozónů, čímž zabezpečuje genomovou stabilitu a integritu (Agrawal N. et al., 2003).

Klíčovou roli v RNA interferenci hrají dva typy molekul – siRNA (z angl. small/short interfering RNA nebo také silencer RNA) a miRNA (Carthew R. W., Sontheimer E. J., 2009). siRNA jsou 21–23 nukleotidů dlouhé molekuly RNA, které vznikají sestřihem dvouvláknové RNA a jsou původně exogenního původu. Oproti tomu endogenní miRNA jsou stejně dlouhé dvouvláknové úseky vznikající z vlásenkové struktury jednovláknové molekuly nekódující RNA (hpRNA) a jsou mezi příbuznými druhy a organismy vysoce konzervované. Zatímco siRNA vykazuje typicky úplnou komplementaritu s cílovou mRNA a vede přímo k její degradaci, v případě miRNA dochází většinou na základě neúplné komplementarity k jejímu navázání na nepřekládané oblasti na 3' konci (3' UTR) mRNA a tím pouze k inhibici translace z důvodu neefektivní vazby ribozomu. Uměle připravené molekuly siRNA umožňují díky své specifitě efektivní potlačení exprese prakticky libovolného cílového genu, aniž by zasahovaly do sekvence DNA. RNAi proto nabývá v současné době velkého významu nejen ve funkční

genomice, ale také v genové terapii, kde představuje důležitý terapeutický nástroj zacílený na geny spojené s rozličnými chorobami (Mello C. C., Conte D. Jr., 2004).

Použití techniky RNA interference pro snížení exprese tkáňového faktoru v buňkách LO bylo popsáno dvěma skupinami u prasečích neonatálních ostrůvkových buněčných klusterů (Neonatal Islet Cell Clusters, NICCs) v modelu xenotransplantace (Ji M. et al., 2011, Ma X. et al., 2012). K vpravení siRNA do buněk NICCs byla použita technika lipofekce a účinnost byla testována *in vitro* pomocí uzavřeného blood-loop systému po vystavení NICCs účinkům lidské AB0 kompatibilní krve. V obou případech bylo dosaženo významné redukce exprese genu (až 60 %) a proteinu tkáňového faktoru v buňkách NICCs, což mělo za následek inhibici tvorby krevní sraženiny, snížení spotřeby trombocytů, snížení množství vzniklého trombinu a inhibice aktivace komplementu *in vitro* při zachování viability a funkčnosti LO. Zároveň byla v krevních sraženinách vytvořených při kontaktu krve s NICCs transfekovanými siRNA proti tkáňovému faktoru pozorována snížená infiltrace neutrofilů. Efekt významného snížení exprese genu pro tkáňový faktor přitom přetrval po dobu 8 dní.

U potkaních nebo lidských LO nebyla dosud RNA interference k potlačení IBMIR použita, výše popsané experimenty však dokazují proveditelnost této studie. Revaskularizace transplantované tkáně je z hlediska dlouhodobého přežívání a funkce transplantovaných LO velmi důležitá (Carlsson P. O. et al., 2001), a proto by inhibice exprese tkáňového faktoru v buňkách LO měla být, vzhledem k jeho významu pro vývoj cév, pouze krátkodobá v rozsahu maximálně několika dní. Z poznatků o tkáňovém faktoru dále vyplývá, že pro dosažení maximální ochrany transplantovaných LO proti IBMIR je třeba selektivně utlumit syntézu extracelulární domény jeho molekuly. Předpokládáme proto, že hlavním přínosem využití metody RNA interference v případě transplantace LO do jater bude vysoce efektivní, ale pouze dočasná inhibice exprese genu pro tkáňový faktor, která může ochránit ostrůvky v časném posttransplantačním období a zároveň později nebude bránit napojení kapilár na cévní systém příjemce.

2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Hypotézy

Transfekce siRNA proti tkáňovému faktoru do buněk izolovaných LO povede k dočasnému a efektivnímu snížení exprese tohoto genu na úrovni mRNA a proteinu. Transplantace LO s nižší expresí tkáňového faktoru do portální žíly potkana způsobí nespecifickou zánětlivou reakci IBMIR o nižší intenzitě, a tím pádem menší rozsah ischemie jater po transplantaci ve srovnání s nativními LO. Transfekce siRNA do buněk LO nepoškodí jejich funkci (sekreci inzulínu) a takto ovlivněné LO normalizují glykémii diabetického příjemce se stejnou či vyšší účinností jako nativní ostrůvky.

Dílčí cíle práce

1. Stanovení exprese základních konstitutivně exprimovaných genů běžně užívaných v laboratorní praxi jako referenční geny v izolovaných potkaních LO po izolaci a během následné kultivace; ověření stability exprese těchto genů a nalezení vhodné endogenní kontroly použitelné pro následné studie zaměřené na potlačení exprese genu pro tkáňový faktor.
2. Vytvoření experimentálního modelu pro detekci ischemie jater po transplantaci LO u potkana *in vivo* za účelem stanovení biologického účinku inhibice exprese genu tkáňového faktoru na rozsah intenzity IBMIR.
3. Potlačení exprese genu pro tkáňový faktor v izolovaných potkaních LO pomocí specifické siRNA, stanovení rozsahu ischemie jater potkanů po transplantaci transfekovaných ostrůvků *in vivo* a ověření jejich funkce a účinnosti této metody transplantací diabetickým potkanům.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST PRÁCE

K provedení experimentů vedoucích k ověření platnosti předkládaných hypotéz bylo nejprve nutné stanovit genovou expresi v izolovaných LO a najít vhodné referenční geny pro genovou expresní analýzu, na základě které bylo možné vyhodnotit účinnost inhibice exprese genu pro tkáňový faktor na úrovni mRNA. V další fázi bylo třeba vytvořit experimentální model, který nám umožnil ověřit účinnost inhibice exprese tkáňového faktoru ve smyslu snížení intenzity IBMIR po transplantaci LO. V neposlední řadě bylo taktéž nutné optimalizovat transfekční metodu pro přenos siRNA do buněk LO. Následně byla vyhodnocena účinnost transfekce na úrovni mRNA a proteinu, byla ověřena funkce transfekovaných ostrůvků *in vitro* a stanoven vliv inhibice exprese tkáňového faktoru na intenzitu IBMIR prostřednictvím kvantifikace rozsahu ischemie jater. Závěrem práce pak bylo ověření funkce transfekovaných LO *in vivo* transplantací diabetickým potkanům a srovnání účinnosti léčby s transplantací nativních LO.

Experimentální práce je členěna do tří na sebe navazujících oddílů:

ČÁST 1.: Genová exprese v izolovaných potkaních LO a výběr vhodné endogenní kontroly pro genovou expresní analýzu

ČÁST 2.: Experimentální model pro zobrazení ischemie jater po transplantaci LO u potkana *in vivo*

ČÁST 3.: Inhibice exprese tkáňového faktoru v buňkách izolovaných potkaních LO pomocí RNA interference

4. METODY

Experimenty byly prováděny na potkanech kmene Brown Norway (Charles River, Německo) a byly schváleny Výborem pro ochranu zvířat používaných pro vědecké účely Institutu klinické a experimentální medicíny a Ministerstva zdravotnictví ČR (povolení č. 34/2012 a 83/2013). Potkaní Langerhansovy ostrůvky (LO) byly izolovány pomocí digescce kolagenázou a separace na hustotním gradientu podle obvyklého protokolu publikovaného dříve (Saudek F. et al., 1999). Viabilita LO byla v průběhu experimentů stanovována pomocí testu integrity buněčné membrány dvojitým fluorescenčním barvením propidium jodidem a akridinovou oranží a testem glukózou stimulované sekrece inzulinu (GSIS).

V první části práce byla izolovaná RNA z potkaních LO podrobena rozsáhlé genové expresní analýze s využitím kvantitativní polymerázové řetězové reakce s reverzní transkripcí (RT-qPCR) a byly porovnány metody relativní a absolutní kvantifikace genové exprese. Byla ověřena stabilita běžně užívaných referenčních genů pomocí softwaru GeNorm a vybrána vhodná kontrola pro následné experimenty zaměřené na potlačení exprese tkáňového faktoru.

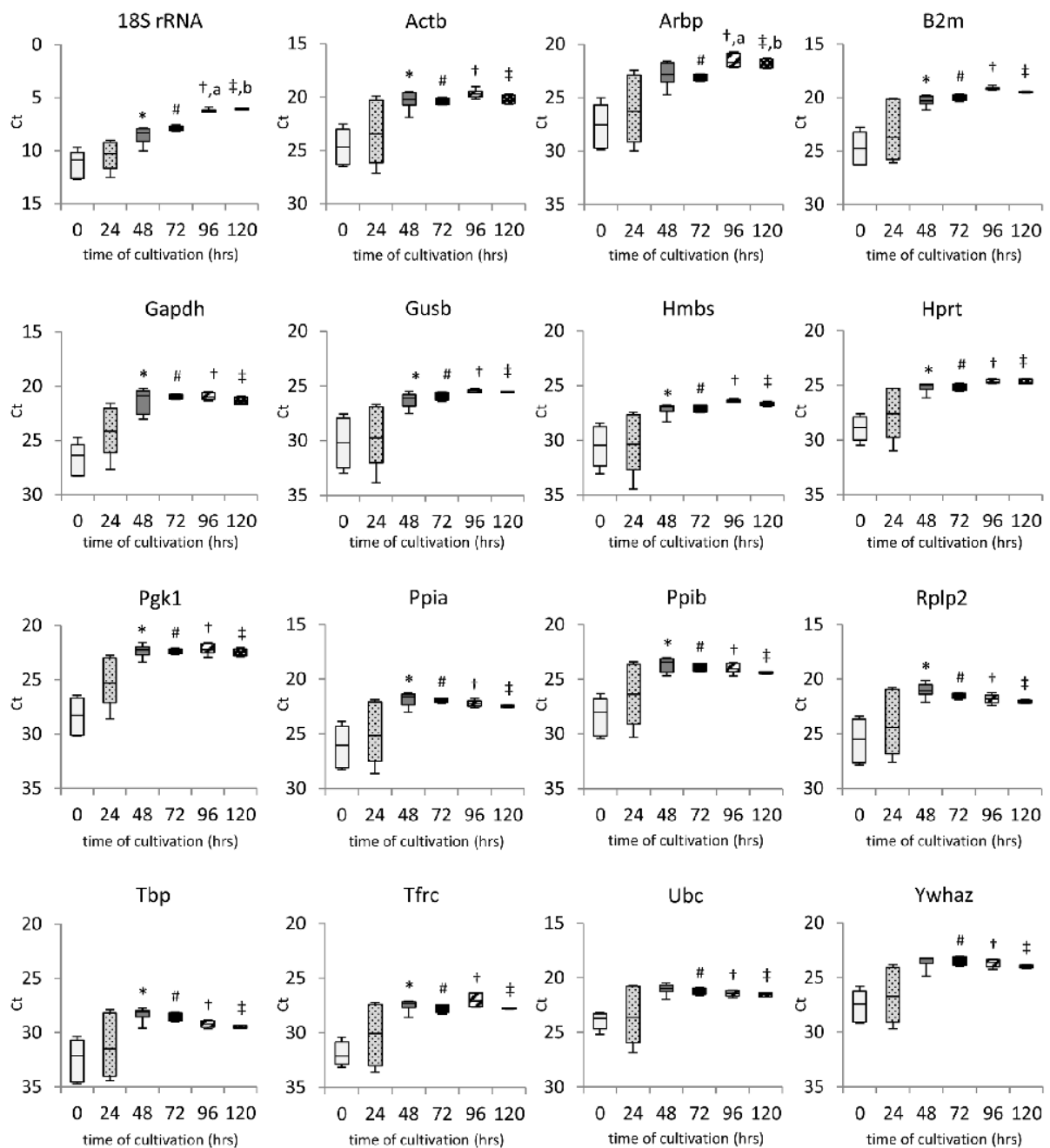
Ve druhé části práce je popsán nový experimentální model, který byl vytvořen za účelem vizualizace a kvantifikace ischemie jater po transplantaci LO pomocí magnetické rezonance *in vivo*. LO jsou v tomto modelu transplantovány do jater potkanů s podvázanými jaterními tepnami, což umožňuje využití kontrastní látky při následném vyšetření magnetickou rezonancí a zobrazení neperfundovaných oblastí v játrech, které vznikají po transplantaci LO jako následek mechanické obstrukce zesílené nespecifickou zánětlivou reakcí IBMIR.

V poslední části práce byla potlačena exprese proteinu tkáňového faktoru v buňkách izolovaných LO pomocí techniky RNA interference. Uměle připravené molekuly siRNA byly transfekovány do buněk LO pomocí mikroporace a lipofekce. Na základě optimalizace obou metod pomocí fluorescenčně značené Cy3-siRNA a mesenchymálních buněk exprimujících gen pro luciferázu byly vybrány nejvhodnější podmínky, které byly následně použity k inhibici exprese tkáňového faktoru v buňkách LO. Snížení exprese tkáňového faktoru bylo ověřeno na úrovni mRNA pomocí RT-qPCR a na úrovni proteinu pomocí metod western blot a ELISA. Takto ošetřené LO byly transplantovány potkanům s podvazem jaterních tepen a pomocí magnetické rezonance byl stanoven rozsah ischemických oblastí v játrech. Na závěr byla ověřena funkce LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru transplantací diabetickým potkanům a účinnost léčby srovnána s transplantací nativních LO.

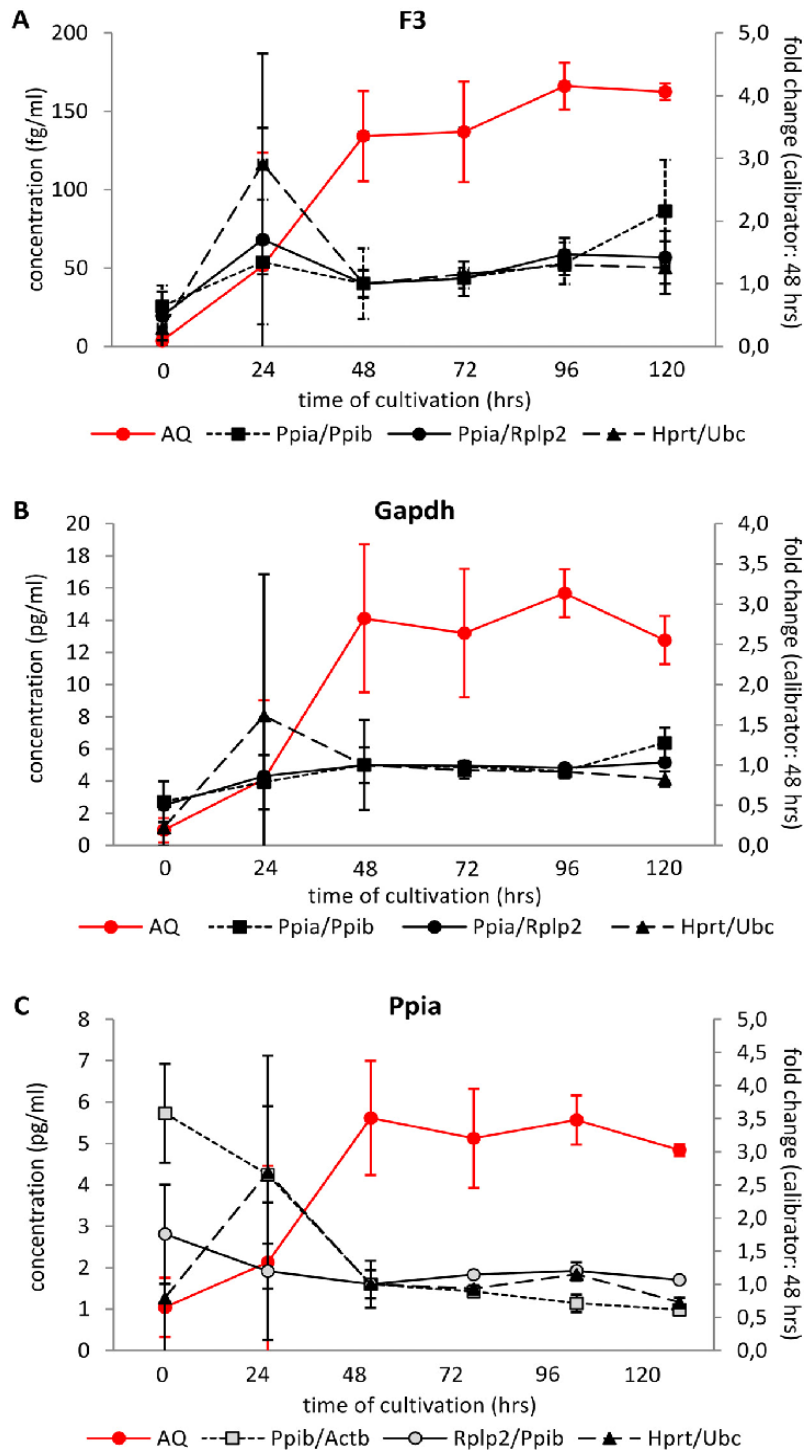
5. VÝSLEDKY

5.1. ČÁST 1.: Genová exprese v izolovaných potkaních LO a výběr vhodné endogenní kontroly pro genovou expresní analýzu

První část práce byla zaměřena na identifikaci a validaci vhodných referenčních genů pro normalizaci genové exprese během krátkodobé kultivace izolovaných potkaních LO. Bylo zjištěno, že žádný z 16 testovaných kandidátských genů nesplňuje stabilitní kritéria ($\Delta C_t \leq \pm 0,5$) během celé kultivační doby 120 hodin, průběh jejich exprese během této periody se však velmi podobá. Po izolaci LO dochází k výraznému poklesu obsahu specifické mRNA a celková RNA vykazuje značné známky degradace. Během následujících 48 hodin kultivace dochází k regeneraci RNA (její integrita stoupá) a postupnému zvyšování hladiny specifické mRNA testovaných genů, obsah mRNA v jednotlivých vzorcích je však extrémně variabilní. Během této doby žádný z testovaných genů nesplnil stabilitní kritéria ($\Delta C_t \leq \pm 0,5$). Naopak od 48 hodin kultivace dále je integrita RNA prakticky neporušená, hladina specifické mRNA všech testovaných genů se ustaluje na určité úrovni a po zbytek kultivační periody se již nemění. Také variabilita mezi jednotlivými vzorky ve skupině je po uplynutí 48 hodin kultivace velmi nízká. Naše data dokazují, že normalizace genové exprese v LO během prvních 48 hodin po izolaci je velmi problematická a nespolehlivá, a zpochybňují tak použití metody relativní kvantifikace genové exprese v LO za těchto podmínek. Na základě našich výsledků byl pro následné experimenty zaměřené na potlačení exprese tkáňového faktoru v buňkách LO jako nejvhodnější referenční gen v našem experimentálním uspořádání vybrán gen Ppia.



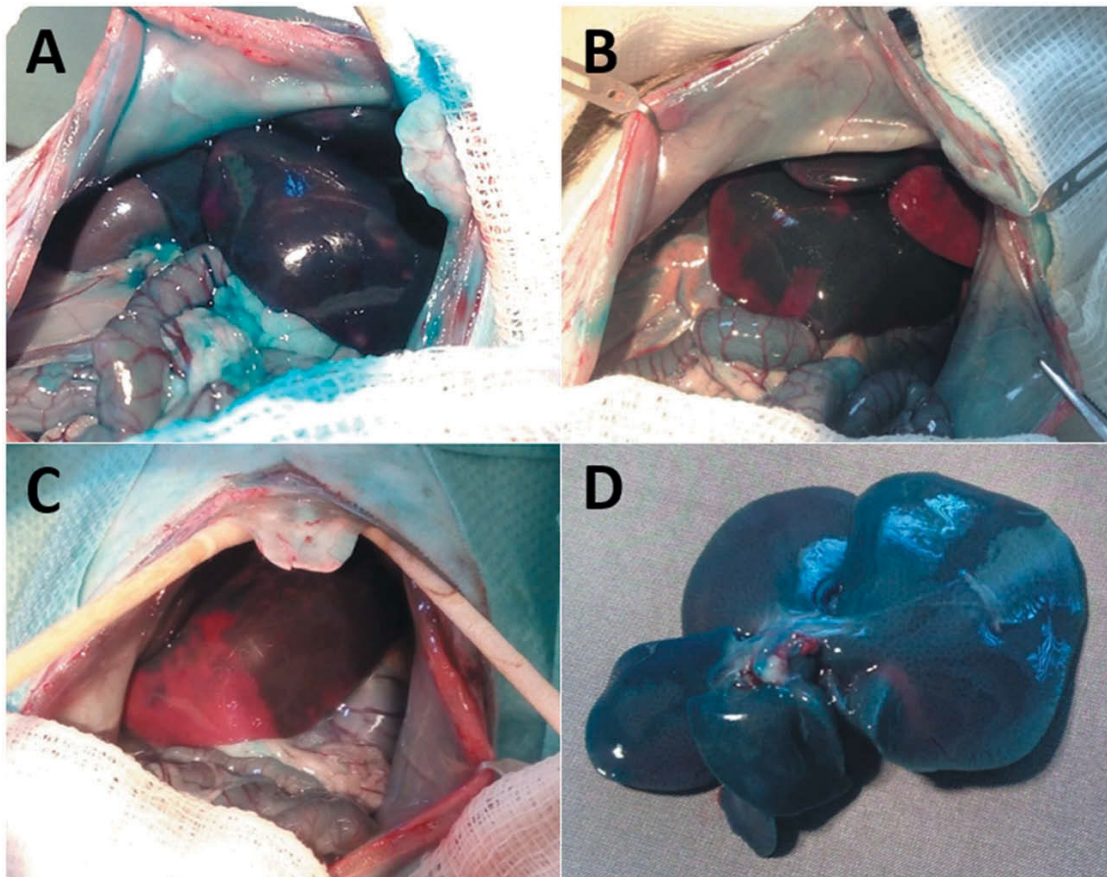
Obrázek 2: Expres 16 kandidátních referenčních genů v průběhu kultivace. Ct (z angl. *threshold cycle*, prahový cyklus) jednotlivých genů v různých časech kultivace jsou zobrazeny jako mediány (horizontální linie), 1. – 3. kvantil (boxy) a variační rozpětí (vousy). Data jsou založena minimálně na 6 nezávislých experimentech. K vyhodnocení statistické významnosti rozdílů v Ct hodnotách byla použita dvoucestná ANOVA a mnohonásobné porovnání; * $p < 0,05$ 48 vs. 0 h; # $p < 0,05$ 72 vs. 0 h; † $p < 0,05$ 96 vs. 0 h; ‡ $p < 0,05$ 120 vs. 0 h; †,a $p < 0,05$ 96 vs. 48 h; †,b $p < 0,05$ 120 vs. 48 h.



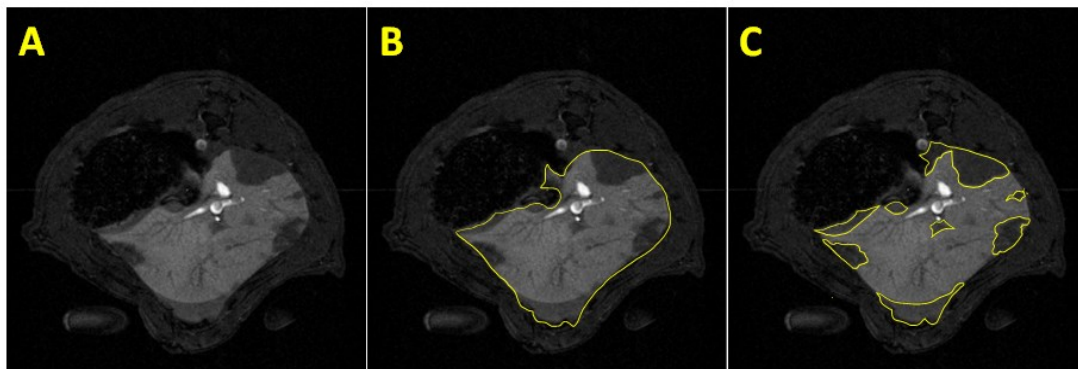
Obrázek 3: Relativní (černá) a absolutní (červená) kvantifikace exprese F3, Gapdh a Ppia v izolovaných LO během kultivace *in vitro*. Relativní kvantifikace byla vypočtena pomocí metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$ vzhledem k expresi v čase 48 h; absolutní exprese byla stanovena z kalibrační křivky sestavené pro daný transkript. Dvojice referenčních genů byly vybrány na základě softwaru GeNorm (Ppia/Ppib pro 24 h, Rplp2/Ppia pro celý interval 0–120 h) nebo podle pravidla $\pm 0,5 \Delta C_t$ (Hprt/Ubc). V případě použití Ppia jako genu zájmu byl jako referenční gen použit další nejstabilnější gen (Ppib/Actb pro 24 h, Rplp2/Ppia pro 0–120 h).

5.2. ČÁST 2.: Experimentální model pro zobrazení ischemie jater po transplantaci LO u potkana *in vivo*

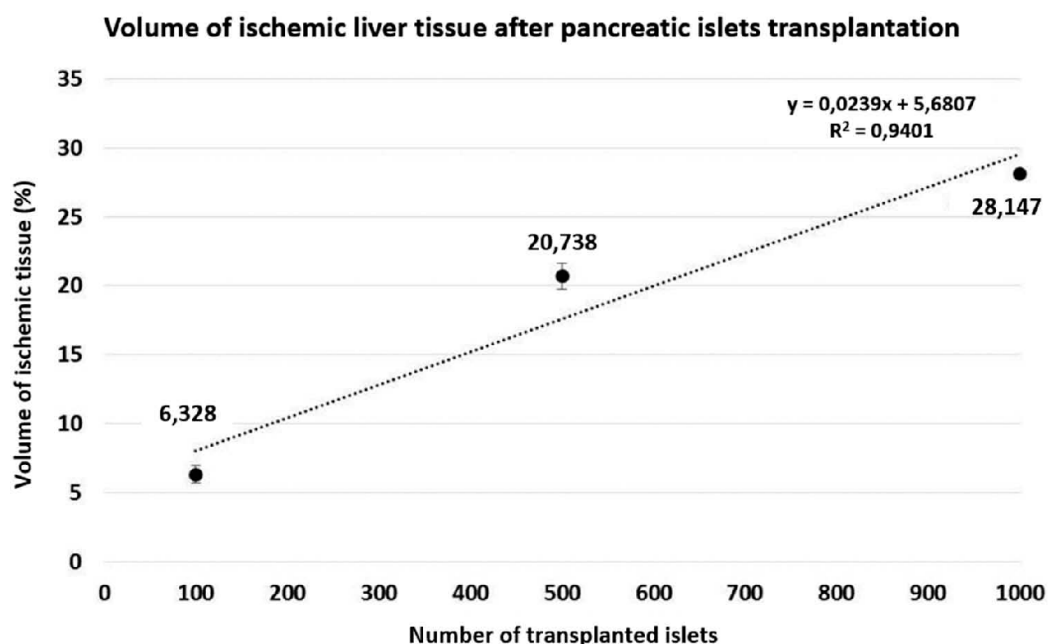
Ve druhé části práce byl vytvořen nový experimentální model pro zobrazování ischemie jater po transplantaci LO u potkana *in vivo*, který umožňuje kvantifikaci neperfundovaných oblastí jater pomocí magnetické rezonance přímo v živém zvířeti. To přináší možnost srovnání bezpečnosti a efektivity různých experimentálních přístupů v ovlivňování IBMIR v jakémkoliv čase po transplantaci. Ukázali jsme, že velikost neperfundovaného objemu jater jasně koreluje s počtem transplantovaných LO. Tento model představuje unikátní a užitečnou techniku pro vyhodnocení účinku různých experimentálních přístupů zacílených na IBMIR *in vivo*. Hlavním přínosem této studie je zavedení nové zobrazovací techniky umožňující kvantifikaci rozsahu ischemie jater v žijících zvířatech a bez škodlivých účinků na jejich zdraví.



Obrázek 4: Neprokrvené oblasti jater 2 hodiny po transplantaci 100 (A), 500 (B) a 1000 (C) syngenních LO s podvazem tepen a játra po transplantaci 1000 syngenních LO bez podvazu tepen (D) 2 minuty po aplikaci intravitálního kontrastního barviva (patentní modř V). Bez podvazu tepen barvivo rychle penetruje do oblastí s výpadkem portální perfuze přes arteriální jaterní krevní oběh.



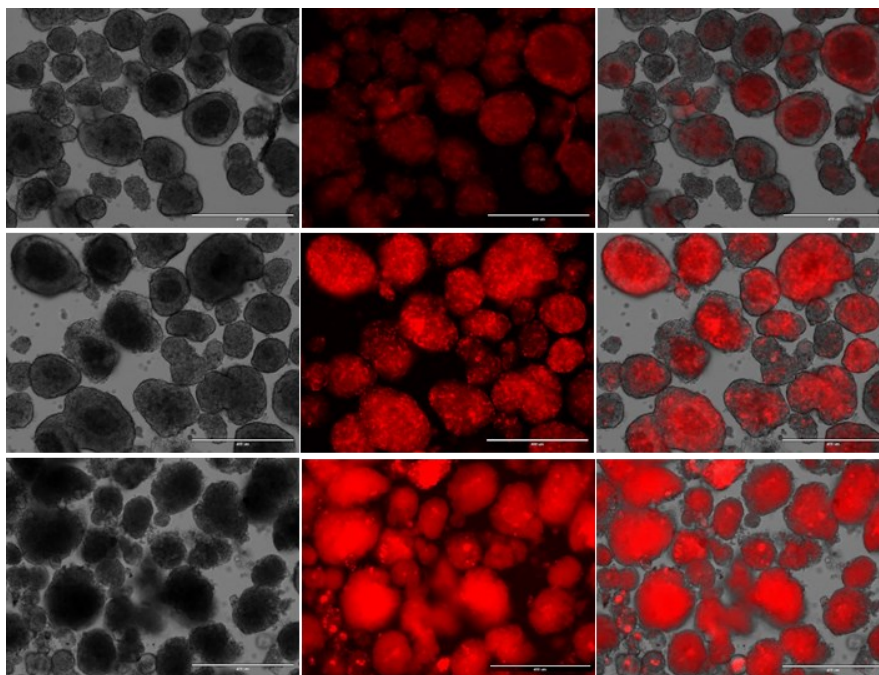
Obrázek 5: Snímek dutiny břišní potkana z magnetické rezonance (A) s ohraničenými játry (B) a ischemickými oblastmi jaterní tkáně (C) po transplantaci 1000 LO s použitím kontrastní látky pro zvýšení rozdílu intenzity signálu prokrvených a neprokrvených oblastí jater.



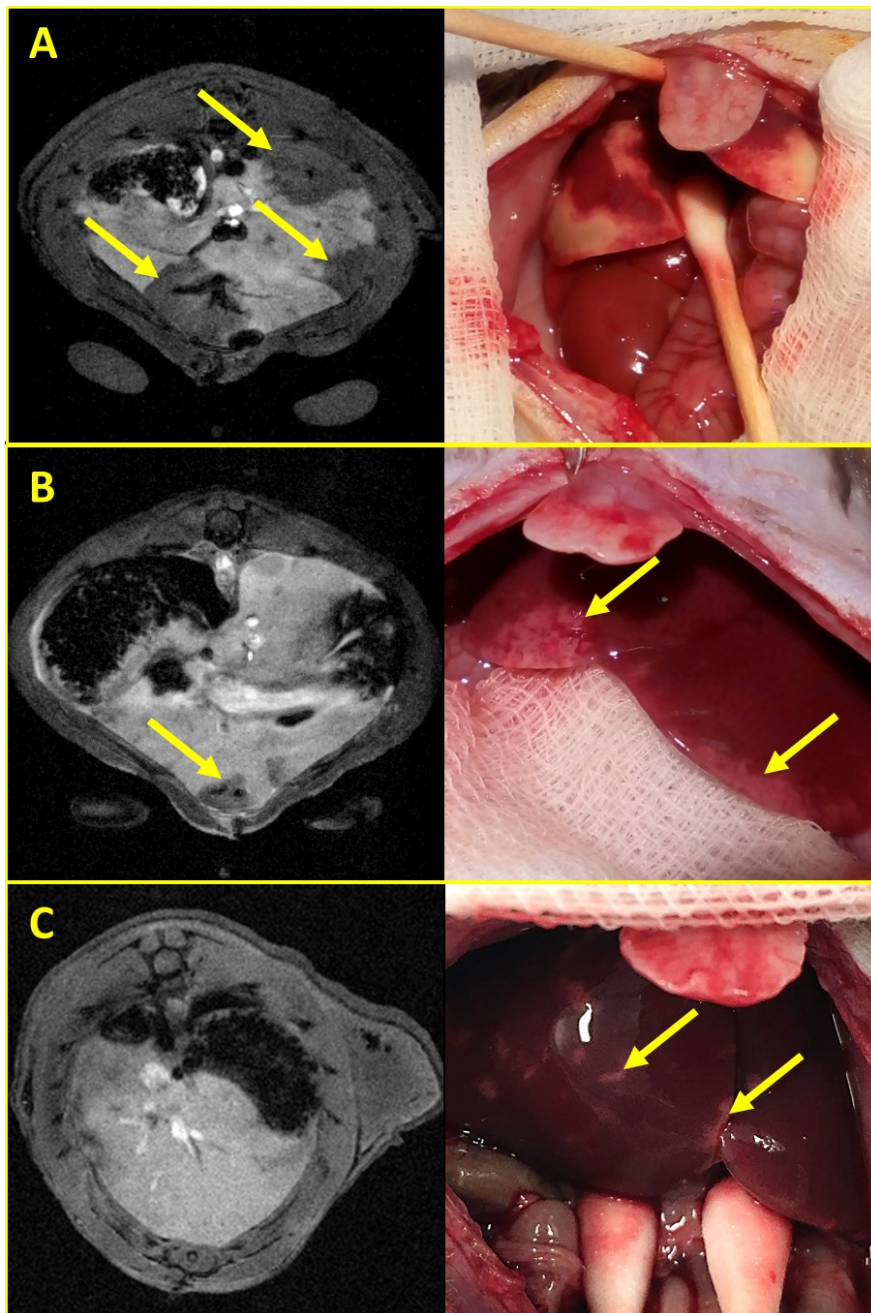
Obrázek 6: Kalibrační křivka ukazující přímou závislost mezi počtem transplantovaných ostrůvků a objemem ischemické jaterní tkáně 2 hodiny po transplantaci 100 (skupina A), 500 (skupina B) a 1000 (skupina C) syngenních LO do portální žíly zdravých potkanů (n = 6) s podvázanými jaterními tepnami. Graf ukazuje průměrné hodnoty ± směrodatnou odchylku.

5.3. ČÁST 3.: Inhibice exprese tkáňového faktoru v buňkách izolovaných potkaních LO pomocí RNA interference

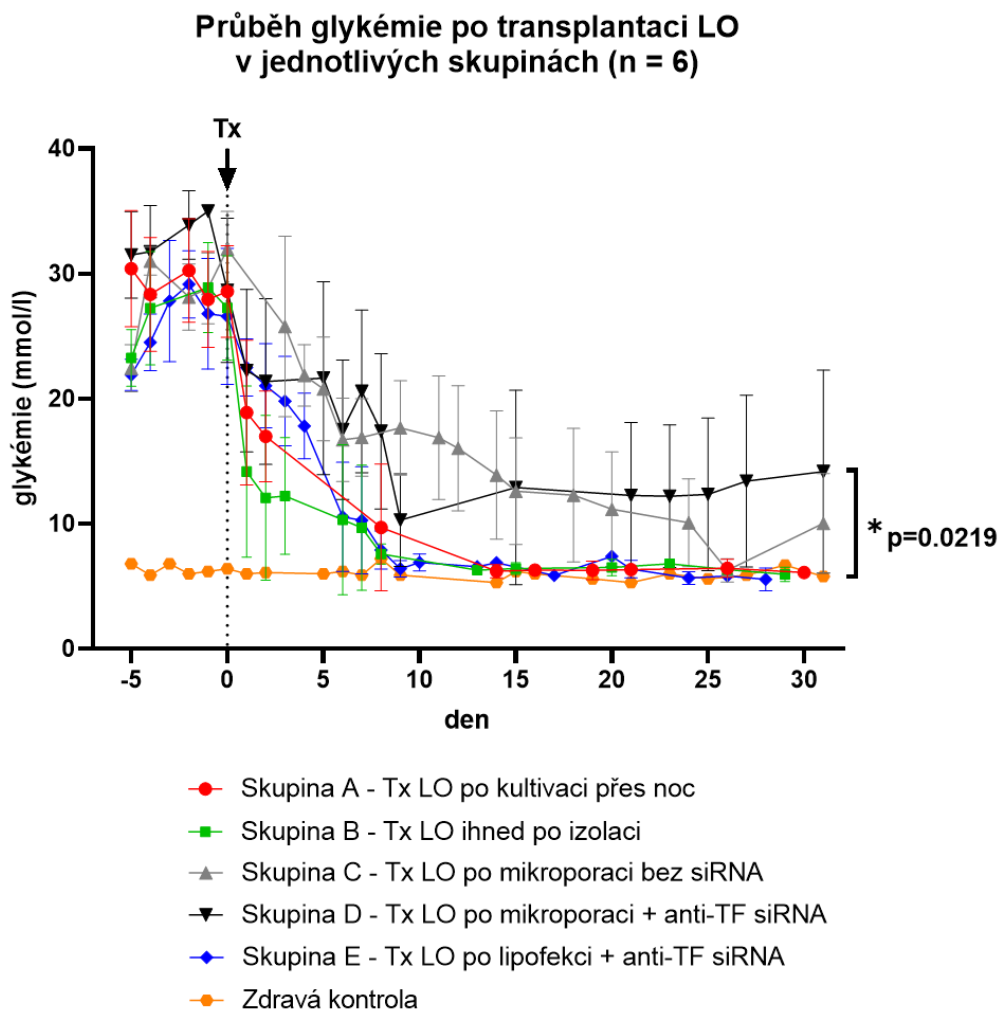
V této studii jsme použili metody mikroporace a lipofekce k transfekci siRNA proti tkáňovému faktoru do buněk izolovaných potkaních LO za účelem potlačení exprese proteinu tkáňového faktoru a snížení intenzity nespecifické zánětlivé reakce IBMIR po transplantaci LO do jater potkanů. V obou případech bylo docíleno významného snížení exprese tkáňového faktoru na úrovni mRNA a proteinu při současném zachování viability a funkce LO *in vitro*. Po transplantaci LO do jater potkanů bylo zjištěno významné snížení objemu neperfundované tkáně, které bylo ještě výraznější při použití lipofekce. Po transplantaci LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru lipofekcí došlo z rychlému a kompletnímu vyléčení všech potkanů ve skupině, kteří prospívali dokonce lépe než zvířata v kontrolních skupinách. Naopak po transplantaci LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací nedošlo k vyléčení žádného ze zvířat, což značí, že tato metoda má negativní vliv na přežívání a funkci LO po transplantaci a není tedy pro toto použití vhodná.



Obrázek 7: Fluorescence izolovaných potkaních LO po transfekci Cy3-siRNA bez transfekčního činidla (nahore, koncentrace 200 nM), lipofekcí činidlem Lipofectamine RNAiMAX (uprostřed, koncentrace 50 nM) a mikroporací (dole, koncentrace 200 nM). Fotky LO ve fázovém rozhraní – vlevo, fluorescence – uprostřed a kombinovaný snímek – vpravo. Měřítko = 400 μ m.



Obrázek 8: Snímky z magnetické rezonance 2 hodiny po transplantaci (vlevo) a makroskopické snímky jater potkanů (vpravo) 2 dny po transplantaci LO nativních (A), transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací (B) a lipofekcí (C).



Obrázek 9: Průběh glykémie potkanů po transplantaci LO v jednotlivých skupinách. Data jsou znázorněna jako průměr z hodnot ve skupině \pm směrodatná odchylka. Tx LO – transplantace Langerhansových ostrůvků, anti-TF siRNA – siRNA proti tkáňovému faktoru. Mann-Whitney U test prokázal statisticky významný rozdíl mezi skupinami D a E na úrovni $*p = 0.0219$. Rozdíl mezi ostatními experimentálními skupinami není signifikantní.

Tabulka 1: Výsledky IVGTT v jednotlivých skupinách 30 dní po transplantaci LO.

Koeficient asimilace glukózy K_G (%/min) v jednotlivých skupinách					
skupina	Tx LO ihned po izolaci	Tx LO po kultivaci přes noc	Tx LO mikroporace bez siRNA	Tx LO mikroporace + siRNA	Tx LO lipofekce + siRNA
zvíře					
1	1,86	1,2	1,15	0,63	1,45
2	1,67	1,51	1,13	0,7	2,06
3	1,84	1,86	1,75	0,9	1,32
4	1,66	1,27	1,02	0,66	1,25
5	1,72	1,3	1,08	0,86	2,06
6	1,5	1,47	1,56	0,84	1,93

diabetes < 0,8 porušená asimilace glukózy 0,8 - 1,2 normální glukózový metabolismus > 1,2

6. DISKUZE

Tato práce se věnuje možnosti zlepšení účinnosti metody transplantace LO zamezením rozvoje nespecifické zánětlivé reakce IBMIR, ke které dochází po kontaktu transplantované tkáně s krví příjemce. Během této reakce dochází k aktivaci koagulační kaskády tzv. vnější cestou, k aktivaci komplementu, agregaci trombocytů a infiltraci leukocytů do štěpu. Výsledkem je vznik trombu a zničení až 60 % LO v krátkém čase po transplantaci. Jedním z ústředních spouštěčů IBMIR je molekula tkáňového faktoru a jedním z hlavních projevů je vznik trombu kolem ostrůvků zachycených v terminálním větvení portální žíly. V této práci jsme se zaměřili na krátkodobé snížení množství tkáňového faktoru na povrchu buněk LO a na vývoj metody umožňující monitorovat změnu velikosti trombu, který vzniká po transplantaci ošetřených LO (se sníženou expresí tkáňového faktoru) v porovnání s nativními. Předpokládali jsme, že velikost trombu významně zvětšuje rozsah poruchy perfúze jaterní tkáně distálně od transplantovaných ostrůvků a současně prodlužuje revaskularizaci štěpu. Na základě předchozích pokusů bylo možné očekávat, že samotná mechanická obstrukce řečiště způsobí významně menší poruchu perfúze než obstrukce způsobená stejným tělískem v kombinaci s okolní trombózou.

V posledních 20 letech byla publikována řada studií zaměřených na potlačení IBMIR různými způsoby, ale žádný z nich nebyl krátkodobý, dostatečně účinný a bez významného rizika krvácení. V případě tkáňového faktoru nelze použít techniku přípravy dárce s knock-outem genu ani v experimentálním uspořádání, neboť tkáňový faktor je klíčový pro vývoj a dozrávání cév. Z těchto výsledků vyplývá potřeba inhibovat expresi tkáňového faktoru v ostrůvcích účinně, krátkodobě a bez celkového vlivu na koagulační systém příjemce. Takovou inhibici nabízí moderní metoda RNA interference, při které se do buněk cílové tkáně transfekují krátké molekuly siRNA, které se navážou na dokonale komplementární úseky mRNA a iniciují jejich degradaci. Tato vysoce specifická vazba umožní selektivní destrukci vybrané mRNA, a tedy zablokování translace vybraného genu. Nízká stabilita siRNA molekul umožňuje dosažení tohoto efektu na několik dní bez ovlivnění vlastní DNA štěpu a je tedy bezpečná.

V naší práci jsme zvolili transfekci třemi různými druhově specifickými siRNA proti tkáňovému faktoru, z nichž byla vybrána ta nejúčinnější. Pro samotnou transfekci jsme hledali metodu, která umožní šetrný a rovnoměrný průnik molekul několika vrstvami buněk ostrůvků. Porovnali jsme efektivitu a bezpečnost transfekčních metod mikroporace a lipofekce. Samotný průnik siRNA do buněk byl monitorován pomocí fluorescenčně značených

negativních kontrol. Byl prokázán jasný efekt RNA interference na syntézu mRNA i proteinu tkáňového faktoru a jeho snížený výskyt v buňkách ostrůvků po dobu nejméně 48 hodin po transfekci při zachováníviability LO a schopnosti beta buněk uvolňovat inzulín v reakci na stimulaci glukózou.

Informace získané hodnocením *in vitro* efektu jsou pro klinickou praxi stále nedostatečné, a proto bylo třeba vyvinout experimentální model pro posouzení biologického efektu RNA interference. Pro tento model jsme zvolili magnetickou rezonanci v kombinaci s intravenózní aplikací kontrastní látky do postranní ocasní žíly. Samotné vyšetření je však časově náročné, a tak nebylo možné zachytit zpomalení průniku kontrastní látky do hypoperfundovaných oblastí. Proto jsme na základě literárních dat využili skutečnosti, že potkanovi lze přerušit tepenné zásobení jater bez fatálních komplikací, a připravili model s přerušением tepen *arteria hepatica propria* a *arteria hepatooesophagica*. V tomto modelu lze spolehlivě zobrazit rozsah neperfundované tkáně jater, jejíž signál se po podání kontrastní látky nemění. Celkový objem ischemické tkáně přitom dobře koreloval s počtem transplantovaných ostrůvků (Tx 100 LO \approx výpadek perfúze 6,3 % objemu jater, Tx 500 LO \approx výpadek perfúze 20,7 % objemu jater, Tx 1000 LO \approx výpadek perfúze 28,1 % objemu jater). Při zobrazování poruchy perfúze jater po transplantaci LO ošetřených siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací i lipofekcí byl zaznamenán signifikantní rozdíl v rozsahu neprokrvených oblastí jater. Při transplantaci 1000 LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací byl objem ischemické tkáně cca 11,3 % oproti 28,1 % v případě nativních LO. Při transplantaci 1000 LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru lipofekcí byly dokonce hypoperfundované oblasti v játrech tak malé, že je nebylo možné pomocí této metody kvantifikovat, neboť nedošlo ke vzniku žádných lokalizovaných lézí, ale pouze ke vzniku difúzních oblastí s nižším signálem, a tedy s předpokládaným nižším prokrvením, které však nelze na snímcích z magnetické rezonance spolehlivě ohraničit. Toto zjištění potvrdilo, že laboratorně detekovaný efekt siRNA na expresi tkáňového faktoru buňkami ostrůvků (qRT-PCR, WB, ELISA) má prokazatelný ekvivalent i na biologické úrovni.

Posledním krokem práce byla transplantace ošetřených LO diabetickým potkanům a ověření účinnosti transfekce siRNA proti tkáňovému faktoru *in vivo* v modelu potkana ve srovnání s nativními LO. Transplantace LO byla provedena druhý den po izolaci ostrůvků, což je nyní běžná laboratorní praxe (transplantace LO po kultivaci přes noc, skupina A), dále ihned po izolaci ostrůvků (skupina B) a poté vždy 24 hodin po transfekci (skupina C – transfekce siRNA mikroporací, skupina D – mikroporace bez siRNA, skupina E – transfekce siRNA lipofekcí), a to v hraniční dávce 2 LO/g váhy potkana. Transplantace LO po kultivaci

přes noc je standardní zavedenou metodou s dobrými výsledky, při níž diabetičtí potkani dosáhnou normalizace glykémie běžně v průběhu druhého týdne po transplantaci LO (v naší práci skupina A, 8 dní $\pm 0,58$). V případě transplantace LO ihned po izolaci se jedná o ideální situaci, neboť víme, že během procesu izolace LO dochází k dočasnému potlačení genové exprese a k současnému poškození povrchové vrstvy LO v důsledku enzymatického působení, což má za následek, že množství tkáňového faktoru na buňkách LO je minimální. V takovém případě není výjimkou, že diabetický potkan dosáhne normoglykémie hned druhý den po transplantaci, a i v našem uspořádání tato skupina (skupina B) vykazuje nejlepší výsledky s dosažením normoglykémie průměrně za 6 dní ($\pm 2,38$). V klinické praxi však není ve většině případů z důvodu časové náročnosti procesu přivolání a přípravy příjemce takový postup možný. Z našich experimentů vyplývá, že nejhorších výsledků dosáhla skupina zvířat po transplantaci LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací (skupina C), ve které 3 zvířata dosáhla normoglykémie 15 dní po transplantaci a 3 zvířata vůbec. Přestože průběh glykemií zvířat v této skupině v průběhu sledovaného období byl lepší než u skupiny D (mikroporace bez siRNA), z výsledků IVGTT je patrné, že celková kompenzace diabetu u těchto zvířat byla zdaleka nejhorší. Výsledky skupiny D také dokazují, že špatný vliv na funkci LO má především samotná transfekční technika, když zvířata ve skupině dosáhla normoglykémie v průměru až za 23 dní ($\pm 7,88$). Skupina E, ve které byly transplantovány LO transfekované siRNA proti tkáňovému faktoru lipofekcí, vykazuje srovnatelné výsledky s transplantací nativních LO, avšak s dřívějším nástupem normoglykémie u jednotlivých potkanů (7 dní $\pm 1,15$), což dokazuje výhodu takto ošetřených ostrůvků oproti standardní transplantaci LO v časnějším přihojení. Stejně tak výsledky IVGTT a nárůst hmotnosti potkanů ve skupině E ukazují, že kompenzace diabetu v této skupině je 100 %, neboť koeficient asimilace glukózy, stejně jako váhový nárůst, jsou ve Skupině E dokonce vyšší než ve skupině kontrolní.

Z výsledků je patrné, že metoda mikroporace vede v určitém směru k narušení funkce ostrůvků, a přestože se jejich viabilita i produkce inzulínu po transfekci zdála být v pořádku, funkce LO se později po transplantaci ukázala jako nedostatečná. To může být způsobeno samotnou podstatou metody, která spočívá v aplikaci krátkých silných elektrických pulzů na vzorek. Tyto pulzy vedou nejspíše ke krátkodobé dezintegraci mikroorganové struktury LO, což usnadňuje vstup siRNA do vnitřku ostrůvku, je ale možné, že tento proces má na ostrůvku neblahý vliv a může v některých případech vést k rozpadu LO a jejich postupnému zániku. Metoda mikroporace se tak ukázala být nevhodná pro použití v LO, naopak metoda lipofekce

se zdá být velmi dobrou alternativou s dobrými výsledky a bez škodlivých účinků na funkci či přežití LO.

7. ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že námi navrhované hypotézy byly potvrzeny v celém rozsahu. Transfekce siRNA proti tkáňovému faktoru do buněk izolovaných LO vede k dočasnému a efektivnímu snížení exprese tohoto genu na úrovni mRNA a proteinu. Transplantace LO s nižší expresí tkáňového faktoru do portální žíly potkana způsobuje nespecifickou zánětlivou reakci IBMIR o nižší intenzitě než transplantace nativních LO, což vede k menšímu rozsahu ischemie jater po transplantaci. Transfekce siRNA do buněk LO nepoškozuje jejich funkci (v případě lipofekce) a takto ovlivněné LO normalizují glykémii diabetického příjemce se stejnou účinností jako nativní LO. Další optimalizace transfekčních podmínek by mohla vést k dalšímu zvýšení efektivity přihojení ostrůvků, a tedy k normalizaci glykemií příjemce menším štěpem.

8. REFERENCE

- Agrawal N., Dasaradhi P. V., Mohmmmed A., Malhotra P., Bhatnagar R. K., Mukherjee S. K. (2003). „RNA interference: biology, mechanism, and applications“. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(4): 657-85.
- Bennet W., Sundberg B., Groth C. G., Brendel M. D., Brandhorst D., Brandhorst H., Bretzel R. G., Elgue G., Larsson R., Nilsson B., Korsgren O. (1999). „Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation?“ *Diabetes* **48**(10): 1907-14.
- Bennet W., Groth C. G., Larsson R., Nilsson B., Korsgren O. (2000). „Isolated human islets trigger an instant blood mediated inflammatory reaction: implications for intraportal islet transplantation as a treatment for patients with type 1 diabetes“. *Ups J Med Sci* **105**(2): 125-33.
- Carlsson P. O., Palm F., Andersson A., Liss P. (2001). „Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site“. *Diabetes* **50**(3): 489-95.
- Carthew R. W., Sontheimer E. J. (2009). „Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs“. *Cell* **136**(4): 642-55.
- Eich T., Eriksson O., Lundgren T. (2007a). „Visualization of early engraftment in clinical islet transplantation by positron-emission tomography“. *N Engl J Med* **356**(26): 2754-2755.
- Eich T., Eriksson O., Sundin A., Estrada S., Brandhorst D., Brandhorst H., Langstrom B., Nilsson B., Korsgren O., Lundgren T. (2007b). „Positron emission tomography: a real-time tool to quantify early islet engraftment in a preclinical large animal model“. *Transplantation* **84**(7): 893-898.
- Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998). „Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*“. *Nature* **391**(6669): 806-11.
- Gruessner A. C. (2011). „2011 Update on Pancreas Transplantation: Comprehensive Trend Analysis of 25,000 Cases Followed Up Over the Course of Twenty-Four Years at the International Pancreas Transplant Registry (IPTR)“. *Rev Diabet Stud* **8**(1): 6–16.
- Gruessner A. C, Sutherland D., Gruessner R. W. G. (2012). „Long-term outcome after pancreas transplantation“. *Cur Opin Org Transplant* **17**(1): 100-105.

- Inverardi L., Ricordi C. (2006). „Therapeutic approaches to counteract immediate blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation“. *Transplantation* **82**(3): 312-3.
- Ji M., Yi S., Smith-Hurst H., Phillips P., Wu J., Hawthorne W., O'Connell P. (2011). „The importance of tissue factor expression by porcine NICC in triggering IBMIR in the xenograft setting“. *Transplantation* **91**(8): 841-6.
- Jirak D., Kriz J., Strzelecki M., Yang J., Hasilo C., White D. J., Foster P. J. (2009). „Monitoring the survival of islet transplants by MRI using a novel technique for their automated detection and quantification“. *J Magn Magn Mater* **22**(4): 257-65.
- Johansson H., Lukinius A., Moberg L., Lundgren T., Berne C., Foss A., Felldin M., Källén R., Salmela K., Tibell A., Tufveson G., Ekdahl K. N., Elgue G., Korsgren O., Nilsson B. (2005). „Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation“. *Diabetes* **54**(6): 1755-1762.
- Luan N. M., Teramura Y., Iwata H. (2010). „Immobilization of the soluble domain of human complement receptor 1 on agarose-encapsulated islets for the prevention of complement activation“. *Biomaterials* **31**(34): 8847-8853.
- Ma X., Ye B., Gao F., Liang Q., Dong Q., Liu Y., Rong P., Wang W., Yi S. (2012). „Tissue factor knockdown in porcine islets: an effective approach to suppressing the instant blood-mediated inflammatory reaction“. *Cell Transplant* **21**(1): 61-71.
- Marzorati S., Antonioli B., Nano R., Maffi P., Piemonti L., Giliola C., Secchi A., Lakey J. R., Bertuzzi F. (2006). „Culture Medium Modulates Proinflammatory Conditions of Human Pancreatic Islets Before Transplantation“. *Am J Transplant* **6**(11): 2791–2795.
- McCall M., Shapiro A. M. (2012). „Update on islet transplantation“. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(7):a007823.
- Mello C. C., Conte D. Jr. (2004). „Revealing the world of RNA interference“. *Nature* **431**(7006):338-42.
- Moberg L., Johansson H., Lukinius A., Berne C., Foss A., Källén R., Østraat Ø., Salmela K., Tibell A., Tufveson G., Elgue G., Nilsson Ekdahl K., Korsgren O., Nilsson B. (2002) „Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation“. *Lancet* **360**(9350): 2039-2045.
- Nilsson B., Ekdahl K. N., Korsgren O. (2011). „Control of instant blood-mediated inflammatory reaction to improve islets of Langerhans engraftment“. *Curr Opin Organ Transplant* **16**(6): 620-6.
- Ryan E. A., Paty B. W., Senior P. A., Bigam D., Alfadhli E., Kneteman N. M., Lakey J. R., Shapiro A. M. (2005) „Five-year follow-up after clinical islet transplantation“. *Diabetes* **54**(7): 2060-2069.
- Saudek F., Číhalová E., Karasová L., Kobylka P., Lomský R. (1999) „Increased glucagon-stimulated insulin secretion of cryopreserved rat islets transplanted into nude mice“. *J Mol Med* **77**(1): 107-10.
- Saudek F., Jirak D., Girman P., Herynek V., Dezortová M., Kříž J., Peregrin J., Berková Z., Zacharovová K., Hájek M. (2010). „Magnetic resonance imaging of pancreatic islets transplanted into the liver in humans“. *Transplantation* **90**(12): 1602-6.
- Shapiro A. M., Lakey J. R., Ryan E. A., Korbitt G. S., Toth E., Warnock G. L., Kneteman N. M., Rajotte R. V. (2000). „Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen“. *N Engl J Med* **343**(4): 230-8.
- Sutherland D. E., Matas A. J., Goetz F. C., Najarian J. S. (1980). „Transplantation of Dispersed Pancreatic Islet Tissue in Humans: Autografts and Allografts“. *Diabetes* **29**(Suppl 1): 31-44.
- Toso C., Zaidi H., Morel P., Armanet M., Andres A., Pernin N., Baertschiger R., Slosman D., Bühler L. H., Bosco D., Berney T. (2005). „Positron-emission tomography imaging of early events after transplantation of islets of Langerhans“. *Transplantation* **79**(3): 353-5.
- Voglová B., Zahradnická M., Girman P., Kříž J., Berková Z., Koblas T., Vávrová E., Némětová L., Kosinová L., Habart D., Fábryová E., Dovolilová E., Leontovyč I., Neškudla T., Peregrin J., Kováč J., Lipár K., Kočík M., Marada T., Svoboda J., Saudek F. (2017). „Benefits of Islet Transplantation as an Alternative to Pancreas Transplantation: Retrospective Study of More Than 10 Ten Years of Experience in a Single Center“. *Rev Diabet Stud* **14**(1): 10-21.

9. SEZNAM PUBLIKACÍ

1) publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace:

Kosinová L., Cahová M., Fábryová E., Týcová I., Koblas T., Leontovyč I., Saudek F., and Kříž J.: Unstable Expression of Commonly Used Reference Genes in Rat Pancreatic Islets Early After Isolation Affects Results of Gene Expression Studies. PLoS One. 2016 Apr 1;11(4):e0152664. doi: 10.1371/journal.pone.0152664. eCollection 2016. **IF 2,806 (2016)**

Kosinova L., Patikova A., Jirak D., Galisova A., Vojtiskova A., Saudek F., and Kriz J. A novel model for in vivo quantification of immediate liver perfusion impairment after pancreatic islet transplantation. Islets. 2019 Sep 9:1-12. doi: 10.1080/19382014.2019.1651164. **IF 1,9 (2018/2019)**

Herynek V., Gálisová A., Srinivas M., van Dinther EAW., **Kosinová L.**, Ruzicka J., Jirátová M., Kriz J., and Jirák D.: Pre-Microporation Improves Outcome of Pancreatic Islet Labelling for Optical and 19F MR Imaging. Biol Proced Online. 2017 Jun 28;19:6. doi: 10.1186/s12575-017-0055-4. eCollection 2017. **IF 3,6 (2017)**

Leontovyc I., Habart D., Loukotova S., **Kosinova L.**, Kriz J., Saudek F., Koblas T.: Synthetic mRNA is a more reliable tool for the delivery of DNA-targeting proteins into the cell nucleus than fusion with a protein transduction domain. PLoS One. 2017 Aug 14; 12 (8), e0182497. doi: 10.1371/journal.pone.0182497. **IF 2,8 (2017)**

Gálisová A., Herynek V., Swider E., Sticová E., Pátiková A., **Kosinová L.**, Kříž J., Hájek M., Srinivas M., Jirák D.: A Trimodal Imaging Platform for Tracking Viable Transplanted Pancreatic Islets In Vivo: F-19 MR, Fluorescence, and Bioluminescence Imaging. Mol Imaging Biol. 2018 Aug 30. doi: 10.1007/s11307-018-1270-3. **IF 3,3 (2018)**

2) publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace

Kosinová L., Veverka V., Novotná P., Collinsová M., Urbanová M., Moody N. R., Turkenburg J. P., Jiráček J., Brzozowski A. M., and Žáková L.: Insight into the Structural and Biological Relevance of the T/R Transition of the N-Terminus of the B-Chain in Human Insulin. Biochemistry. 2014 Jun 3;53(21):3392-402. doi: 10.1021/bi500073z. Epub 2014 May 22. **IF 3,015 (2014)**

Berkova Z., Girman P., Zacharovova K., Kriz J., Fabryova E., Leontovyc I., Koblas T., **Kosinova L.**, Neskudla T., Vavrova E., Loukotova S., Habart D., Zahradnicka M., Lipar K., Voska L., Skibova J. and Saudek F.: Combining Donor Characteristics with Immunohistological Data Improves the Prediction of Islet Isolation Success. Journal of Diabetes Research. 2016 Jan (7):1-8. doi:10.1155/2016/4214328. **IF 2,717 (2016)**

Patsula V., **Kosinová L.**, Lovric M., Ferhatovic L., Rabyk M., Konefal R., Paruzel A., Slouf M., Herynek V., Gajovic S. and Horak D.: Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles: Synthesis by Thermal Decomposition of Iron(III) Glucuronate and Application in Magnetic

Resonance Imaging. ACS Appl Mater Interfaces. 2016 Mar 23;8(11):7238-47. doi: 10.1021/acsami.5b12720. Epub 2016 Mar 9. **IF 7,504 (2016)**

Koblas T., Leontovyc I., Loukotova S., **Kosinova L.**, and Saudek F.: Reprogramming of pancreatic exocrine cells AR42J into insulin-producing cells using mRNAs for Pdx1, Ngn3 and MafA transcription factors. Mol Ther Nucleic Acids. 2016 May 17;5:e320. doi: 10.1038/mtna.2016.33. **IF 6,392 (2016)**

Herynek V., Turnovcová K., Veverka P., Dědourková T., Žvátora P., Jendelová P., Gálišová A., **Kosinová L.**, Jiráková K. and Syková E.: Using ferromagnetic nanoparticles with low Curie temperature for magnetic resonance imaging-guided thermoablation. Int J Nanomedicine. 2016; 11: 3801–3811. 2016 Aug 8. doi: 10.2147/IJN.S109582. **IF 4,3 (2016)**

Habart D., Svihlik J., Schier J., Cahova M., Girman P., Zacharovova K., Berkova Z., Kriz J., Fabryova E., **Kosinova L.**, Papackova Z., Kybic J., Saudek F.: Automated Analysis of Microscopic Images of Isolated Pancreatic Islets. Cell Transplant. 2016 Jun 9. doi:10.3727/096368916X692005. **IF 3,0 (2016)**

Zahradnická M., Girman P., Kříž J., Berková Z., Koblas T., Vávrová E., **Kosinová L.**, Habart D., Fábryová E., Dovolilová E., Neškudla T., Peregrin J., Kováč J., Lipár K., Kočík M., Némětová L., Svoboda J. a Saudek F.: Transplantace Langerhansových ostrůvků v léčbě syndromu porušeného vnímání hypoglykémie. Vyhodnocení pilotního programu a porovnání s transplantací pankreatu. Čas. Lék. čes. 2016; 155: 349-356. **IF 0,15 (2016)**

Voglová B., Zahradnická M., Girman P., Kříž J., Berková Z., Koblas T., Vávrová E., Némětová L., **Kosinová L.**, Habart D., Fábryová E., Dovolilová E., Leontovyc I., Neškudla T., Peregrin J., Kováč J., Lipár K., Kočík M., Marada T., Svoboda J., Saudek F.: Benefits of Islet Transplantation as an Alternative to Pancreas Transplantation: Retrospective Study of More Than 10 Ten Years of Experience in a Single Center. Rev Diabet Stud. 2017 Spring;14(1):10-21. doi: 10.1900/RDS.2017.14.10. Epub 2017 Jun 12. **IF 3,455 (2016)**

Gálišová A., Fábryová E., Sticová E., **Kosinová L.**, Jiráková M., Herynek V., Berková Z., Kříž J., Hájek M. and Jiráček D.: The optimal timing for pancreatic islet transplantation into subcutaneous scaffolds assessed by multimodal imaging. Contrast Media Mol Imaging. 2017 Dec 26. doi:10.1155/2017/5418495. **IF 2,9 (2017)**

Herynek V., Turnovcová K., Gálišová A., Kaman O., Mareková D., Koktan J., Vosmanská M., **Kosinová L.**, Jendelová P.: Manganese-Zinc Ferrites: Safe and Efficient Nanolabels for Cell Imaging and Tracking In Vivo. ChemistryOpen. 2019 Jan 23;8(2):155-165. doi: 10.1002/open.201800261. eCollection 2019 Feb. **IF 2,3 (2019)**

Dzianová P., Asai S., Chrudinová M., **Kosinová L.**, Potalitsyn P., Šácha P., Hadravová R., Selicharová I., Kříž J., Turkenburg J., Brzozowski A. M., Jiráček J., Žáková L.: The efficiency of insulin production and its content in insulin-expressing model β -cells correlate with their Zn^{2+} levels. Accepted for publication in Open Biology, manuscript reference number RSOB-20-0137. **IF 4,93 (2019)**

Patikova A., Vojtiskova A., Fabryova E., **Kosinova L.**, Heribanova A., Sticova E., Berkova Z., Hladikova Z., Kriz J. The optimal maturation of subcutaneous pouch can improve pancreatic islets engraftment in rat model. Transplantation. 2021 Jun 4. doi: 10.1097/TP.0000000000003844. Epub ahead of print. PMID: 34086655. **IF 4,743 (2020)**