

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Biochemie a patobiochemie



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**Mgr. Lucie Kosinová**

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

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

Disertační práce

Vedoucí: doc. MUDr. Jan Kříž, PhD.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

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

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 11. 3. 2022

Mgr. Lucie Kosinová

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala mému trpělivému a laskavému školiteli doc. MUDr. Janu Křížovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, pomoc a podporu během celého mého doktorského studia. Dále bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Františku Saudkovi, DrSc. a celému kolektivu Laboratoře Langerhansových ostrůvků IKEM za vytvoření skvělého odborného a zároveň přátelského pracovního prostředí a za pomoc během experimentálních prací i mimo ně. Stejně tak bych chtěla poděkovat spolupracovníkům z jiných oddělení a laboratoří, kteří se podíleli na experimentální práci a na uvedených publikacích.

V neposlední řadě patří velké díky také mé rodině a přátelům za obrovskou podporu a pomoc během celého mého dlouhého studia.

**Identifikační záznam:**

KOSINOVÁ, Lucie. *Ovlivnění kvality, funkce a výsledků transplantace pankreatických ostrůvků pomocí RNA interference. [Improvement of quality, function and transplantation outcomes of pancreatic islets using RNA interference]*. Praha, 2022. 134 s., 2 příl. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Institut klinické a experimentální medicíny. Vedoucí práce doc. MUDr. Jan Kříž, Ph.D.

## 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 ostrůvků 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. Dochází k agregaci trombocytů, aktivaci komplementu a infiltraci ostrůvků leukocyty, což má za následek 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 ostrůvků v raném posttransplantačním období a současně později nebránilo napojení kapilár na cévní systém příjemce. Zvýšení podílu přihojené 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 následné experimenty zaměřené na potlačení exprese tkáňového faktoru. Poté 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 ostrůvky, 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 platelet aggregation, complement activation, and infiltration of islet graft by leukocytes which results in 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 on 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



## Obsah:

1. ÚVOD – LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	1
1.1. Diabetes mellitus.....	2
1.2. Langerhansovy ostrůvky (LO).....	3
1.3. Izolace lidských LO.....	6
1.4. Transplantace LO.....	10
1.5. Transplantace LO v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM).....	11
1.6. Výsledky klinického programu transplantace LO v IKEM (2005–2020).....	13
1.7. Instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR).....	15
1.8. Tkáňový faktor.....	17
1.9. Ovlivnění IBMIR.....	20
1.10. Epigenetické mechanismy regulace genové exprese.....	22
1.11. RNA interference.....	23
2. HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	28
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST PRÁCE.....	29
3.1. ČÁST 1.: Genová exprese v izolovaných LO a výběr vhodné endogenní kontroly pro genovou expresní analýzu	
3.1.1. ÚVOD.....	30
3.1.2. MATERIÁL A METODY	
3.1.2.1. Laboratorní zvířata.....	33
3.1.2.2. Izolace a kultivace potkaních LO.....	33
3.1.2.3. Stanovení viability LO.....	34
3.1.2.4. Test glukózou stimulované inzulínové sekrece (GSIS).....	34
3.1.2.5. Izolace RNA a reverzní transkripce.....	35
3.1.2.6. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR).....	35
3.1.2.7. Analýza dat a statistické metody.....	37
3.1.3. VÝSLEDKY	
3.1.3.1. Analýza kvality RNA.....	38
3.1.3.2. Metabolická charakterizace LO.....	38
3.1.3.3. Stanovení exprese kandidátních referenčních genů.....	40
3.1.3.4. Stabilita referenčních genů během kultivace LO.....	44
3.1.3.5. Srovnání metody relativní a absolutní kvantifikace genové exprese v izolovaných LO.....	47

3.1.3.6. Výběr vhodné endogenní kontroly pro genovou expresní analýzu v izolovaných LO.....	50
3.1.4. DISKUZE.....	51
3.1.5. ZÁVĚR.....	57
3.2. ČÁST 2.: <i>In vivo</i> model zobrazování ischemie jater po transplantaci LO u potkana	
3.2.1. ÚVOD.....	58
3.2.2. MATERIÁL A METODY	
3.2.2.1. Design studie.....	60
3.2.2.2. Laboratorní zvířata.....	60
3.2.2.3. Izolace a kultivace potkaních LO.....	60
3.2.2.4. Příprava modelu pro zobrazování ischemie jater <i>in vivo</i> .....	60
3.2.2.5. Transplantace LO.....	64
3.2.2.6. Makroskopické vyšetření intraportální trombózy.....	64
3.2.2.7. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO intravitálním barvením patentní modří V.....	64
3.2.2.8. Zorazení ischemie jater po transplantaci LO pomocí MRI.....	65
3.2.2.9. Kvantifikace objemu ischemické jaterní tkáně.....	65
3.2.2.10. Vyšetření séra.....	66
3.2.3. VÝSLEDKY	
3.2.3.1. Makroskopické vyšetření intraportální trombózy.....	66
3.2.3.2. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO intravitálním barvením patentní modří V.....	68
3.2.3.3. MRI a kvantifikace objemu ischemické jaterní tkáně.....	69
3.2.3.4. Vyšetření séra.....	70
3.2.4. DISKUZE.....	72
3.2.5. ZÁVĚR.....	76
3.3. ČÁST 3.: Inhibice tkáňového faktoru v buňkách LO pomocí RNA interference	
3.3.1. ÚVOD.....	77
3.3.2. MATERIÁL A METODY	
3.3.2.1. Laboratorní zvířata.....	80
3.3.2.2. Izolace a kultivace LO.....	80
3.3.2.3. Izolace a kultivace mesenchymálních kmenových buněk.....	80
3.3.2.4. Transfekce siRNA do buněk LO.....	81
3.3.2.4.1. Mikroporace.....	82
3.3.2.4.2. Lipofekce.....	83

3.3.2.4.3. Optimalizace transfekce pomocí bioluminiscence.....	83
3.3.2.4.4. Optimalizace transfekce pomocí Cy-3 siRNA.....	83
3.3.2.5. Stanovení exprese tkáňového faktoru na úrovni mRNA.....	84
3.3.2.5.1. Izolace RNA a reverzní transkripce.....	84
3.3.2.5.2. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR).....	84
3.3.2.6. Stanovení exprese tkáňového faktoru na úrovni proteinu.....	85
3.3.2.6.1. SDS-PAGE a western blot.....	85
3.3.2.6.2. ELISA.....	85
3.3.2.7. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO intravitálním barvením patentní modří V.....	86
3.3.2.8. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO pomocí MRI.....	86
3.3.2.9. Transplantace LO diabetickým potkanům.....	86
3.3.2.10. Intravenózní glukózový toleranční test (IVGTT).....	87
3.3.3. VÝSLEDKY	
3.3.3.1. Optimalizace transfekce siRNA do buněk LO a stanovení exprese tkáňového faktoru na úrovni mRNA.....	88
3.3.3.1.1. Mikroporace.....	88
3.3.3.1.2. Lipofekce.....	89
3.3.3.1.3. Optimalizace transfekce pomocí Cy-3 siRNA.....	90
3.3.3.2. Stanovení exprese tkáňového faktoru na úrovni proteinu.....	94
3.3.3.3. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO intravitálním barvením patentní modří V.....	97
3.3.3.4. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO pomocí MRI.....	97
3.3.3.5. Transplantace L diabetickým potkanům.....	100
4. SOUHRNNÁ DISKUZE K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PRÁCE.....	110
5. ZÁVĚRY DISERTAČNÍ PRÁCE.....	119
5. SEZNAM ZKRATEK.....	122
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	125
7. PŘÍLOHY	
PŘÍLOHA 1 – PUBLIKACE V ODBORNÝCH ČASOPISECH.....	135
PŘÍLOHA 2 – PLNÉ ZNĚNÍ PRVOAUTORSKÝCH PUBLIKACÍ.....	138

# 1. ÚVOD

V současné době je jedinou léčebnou metodou umožňující diabetikům 1. typu dosáhnout dlouhodobé nezávislosti na farmakologické léčbě inzulinem transplantace inzulin produkující tkáň. 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 celoorgánovou 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 celoorgánovou 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. Diabetes mellitus**

Diabetes mellitus je souhrnné označení pro heterogenní skupinu chronických onemocnění, jejichž hlavním projevem je hyperglykémie. Příčinou je porucha metabolismu sacharidů, která vzniká jako důsledek absolutního (diabetes mellitus 1. typu) či relativního (diabetes mellitus 2. typu) nedostatku inzulínu. Diabetes mellitus 1. typu je autoimunitní onemocnění s narůstající prevalencí v rozvinutých společnostech, jeho původ tkví pravděpodobně v kombinaci genetických a environmentálních příčin, přesné důvody vzniku tohoto onemocnění jsou však stále nejasné. Lidé trpící diabetem 1. typu tvoří zhruba 10 % všech pacientů s diabetem, v České republice to představuje zhruba 64 tisíc nositelů této diagnózy (Ústav zdravotnických informací a statistiky, 2017). Zbýlých 90 % představuje diabetes mellitus 2. typu, který vzniká na základě poruchy tvorby inzulínu na pozadí inzulínové rezistence, a dále sekundární a další typy diabetu. Výskyt diabetu 2. typu je spojován

především s nezdravým životním stylem, genetickými predispozicemi a obezitou, které mohou společně vyústit v tzv. metabolický syndrom.

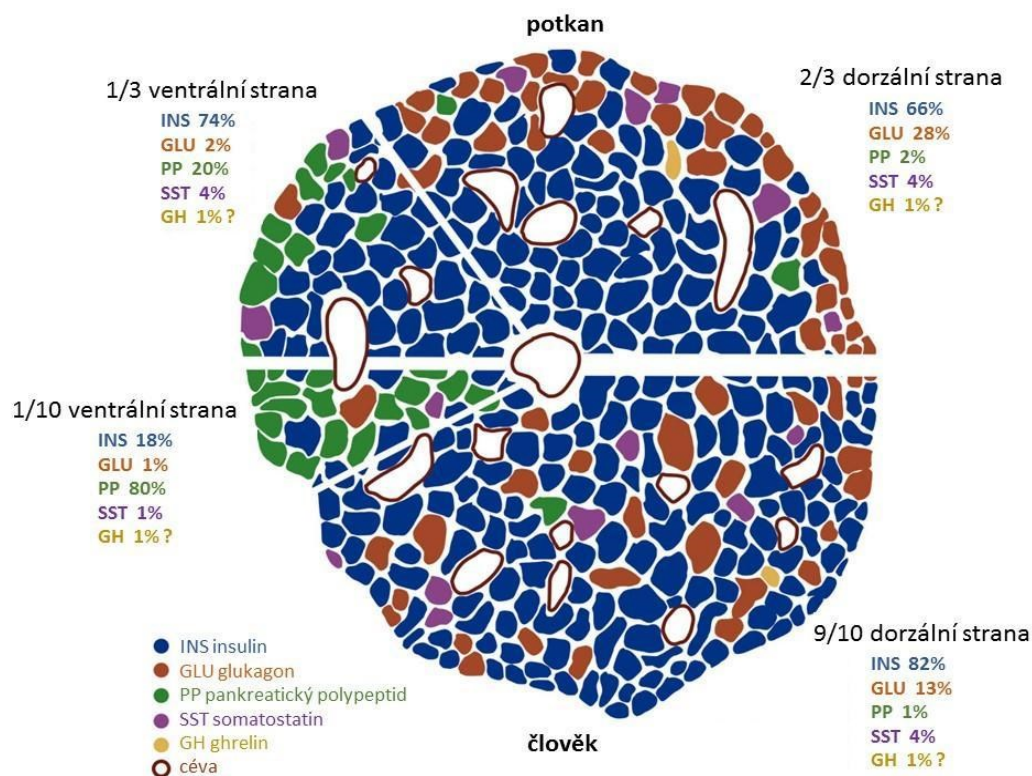
Díky léčbě inzulínem přestal být diabetes mellitus smrtelnou chorobou, ale ani moderní léčba založená na kombinaci častého měření glykemie a substituci inzulínu nedokáže spolehlivě zabránit rozvoji pozdních komplikací diabetu, jako jsou diabetická retinopatie, nefropatie, neuropatie a makroangiopatie (pokročilá ateroskleróza) s konkrétními projevy ve formě ischemie myokardu, mozku nebo syndromu diabetické nohy a dalších. Současná technologie umožňuje prakticky kontinuální sledování glykemie kapesním glukometrem nebo senzorem a aplikaci inzulínu programovatelnou pumpou. V kombinaci obou přístrojů může pumpa předdefinované dávkování korigovat podle výkyvů glykemie naměřených senzorem (Continual Glucose Monitoring Systems). Limitující zůstává zpoždění naměřených výkyvů glykemie, která je měřena v podkoží, oproti skutečnému stavu v krvi (cca 10 minut) a také farmakokinetika injekčních inzulínů, které se aplikují do podkoží namísto přirozené sekrece do krve (5–15 minut). Díky algoritmům pracujícím s trendy a predikcí glykemie nabízí současná technologie většině pacientů poměrně dobré vyhlídky na kvalitní život do pozdního věku, stále se však jedná o léčbu symptomatickou a ne kauzální. Tu představuje v dnešní době pouze zmíněná transplantace inzulín produkující tkáň.

## **1.2. Langerhansovy ostrůvky (LO)**

Slinivka břišní neboli pankreas je šedorůžová laločnatá žláza uložená v dutině břišní. Radíme ji mezi orgány trávicí soustavy. U člověka měří v průměru 12–16 cm a váží zhruba 60–100 g. Slinivka je tzv. podvojná žláza, podle druhu sekrece u ní

rozlišujeme exokrinní a endokrinní část. Exokrinní tkáň představuje asi 98 % orgánu a je tvořena acinárními buňkami, produkujícími trávicí enzymy v jejich neaktivní formě, a sítí duktálních buněk, které secernují vodu a hydrogenuhličitanu a spolu s trávicími enzymy je odvádí do duodena jako tzv. pankreatickou šťávu (Čihák R., 2002, Dokládal M., Páč L., 2003).

Endokrinní funkci pankreatu plní Langerhansovy ostrůvky, mikroorgány o velikosti 50–500  $\mu\text{m}$ . Přestože tvoří jen asi 1–2 % pankreatické tkáně (1–2 g), spotřebují 10–15 % z celkového objemu přivedené krve (Carlsson P. O. et al., 2001). Důvodem je funkce ostrůvků jako senzorů hladiny glukózy v krvi, kdy kyslík přiváděný krví nesmí být regulujícím faktorem, a potřeba promptní distribuce inzulínu do celého těla. Každý ostrůvek je napojen přímo na krevní řečiště a od exokrinní části pankreatu je oddělen tenkou kapsulou z vazivové tkáně. Pankreas dospělého člověka obsahuje průměrně 1–2 miliony ostrůvků, jejich počet se však mezi jedinci výrazně liší. Ostrůvky jsou tvořeny několika sty až tisíci endokrinních buněk, které dělíme na pět základních typů a které produkují nejméně pět peptidů s hormonální aktivitou. Zastoupení jednotlivých typů buněk v ostrůvcích v různých částech pankreatu i jejich uspořádání v rámci ostrůvku je u člověka variabilní a liší se oproti uspořádání u potkana, který je nejčastěji používaným výzkumným modelem (**Obrázek 1**, str. 5) (Suckdale J., Solimena M., 2008).



**Obrázek 1:** Rozdílné uspořádání buněk v rámci lidského a potkaního Langerhansova ostrůvku. INS –  $\beta$  buňky, GLU –  $\alpha$  buňky, PP – PP neboli  $\gamma$  buňky, SST –  $\delta$  buňky, GH –  $\epsilon$  buňky. Upraveno dle Suckdale J., Solimena M., 2008.

Majoritní zastoupení v rámci ostrůvku mají  $\beta$  buňky, které tvoří u člověka průměrně 67 % buněk (Suckdale J., Solimena M., 2008). Jejich hlavní funkcí je produkce inzulínu, hlavního anabolického hormonu organismu, v závislosti na aktuální koncentraci glukózy v krvi. Inzulín snižuje hladinu glukózy v krvi stimulací jejího využití v játrech, ve svalové a tukové tkáni, dále pak inhibicí glykogenolýzy a glukoneogeneze. Zvyšuje míru proteosyntézy, lipogeneze a prostřednictvím mitogenní signalizační dráhy podporuje buněčný růst a proliferaci. V malé míře produkují  $\beta$  buňky také peptid amylin, který navozuje pocit sytosti a zpomaluje vyprazdňování žaludku, čímž podporuje plynulejší vstřebávání glukózy ze stravy a zmenšuje postprandiální výkyvy glykémie. Druhým nejdůležitějším typem jsou  $\alpha$  buňky, které tvoří asi 10 % z celkového počtu buněk ostrůvků. Jejich hlavní funkcí je produkce glukagonu – antagonisty inzulínu – působícího zvýšením hladiny glukózy v krvi.



Glukagon je označován jako hlavní katabolický hormon. Spouští glykogenolýzu, glukoneogenezi a zvyšuje odbourávání lipidů.

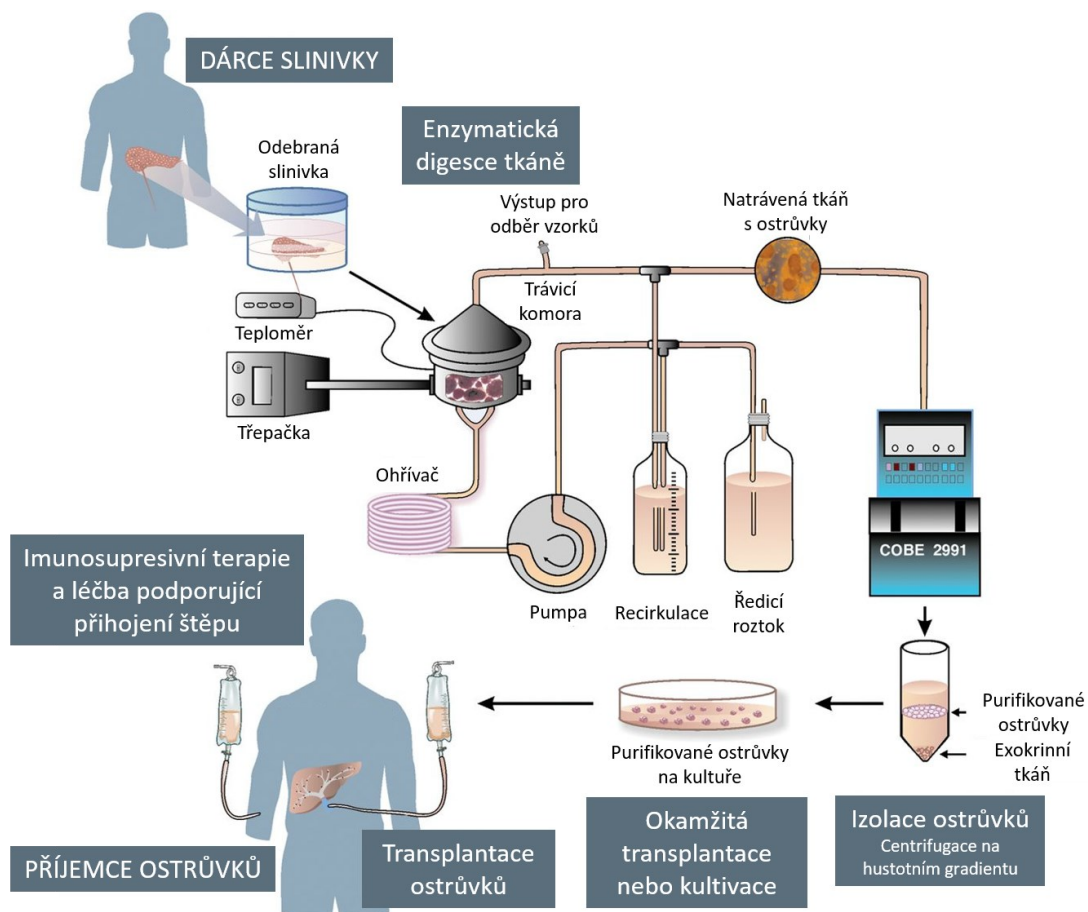
Další typy buněk v ostrůvku mají minoritní význam. Jedná se především o PP buňky, označované také jako  $\gamma$  buňky, které tvoří asi 19 % z celkového počtu buněk ostrůvků a jejich hlavní funkcí je produkce pankreatického polypeptidu (Suckdale J., Solimena M., 2008). Úloha tohoto hormonu není zcela objasněna, předpokládá se však, že hraje úlohu v regulaci exokrinní sekrece pankreatu. Dále se jedná o  $\delta$  buňky, které tvoří cca 3 % z celkového počtu buněk LO a jejich hlavní funkcí je produkce somatostatinu, který parakrinně reguluje sekreci ostatních hormonů, především inzulínu a glukagonu. Účastní se také metabolismu kostí. Nejméně zastoupené jsou  $\epsilon$  buňky, které tvoří přibližně 1 % buněk ostrůvků a produkují hormon ghrelin, označovaný také jako „hormon hladu“. Ghrelin je jediný známý orexigenně působící peptid gastrointestinálního traktu, jeho zvýšená hladina vede ke zvýšení množství přijímané potravy, stimuluje apetit a gastrické vyprazdňování (Müller T. D. et al., 2015).

### **1.3. Izolace lidských LO**

Proces automatické izolace lidských Langerhansových ostrůvků ze slinivky zemřelého dárce tak, jak ho známe dnes, popsal v roce 1988 italský lékař prof. Camillo Ricordi (Ricordi et al., 1988). Metoda je založena na digesci pankreatické tkáně proteolytickým enzymem kolagenázou a oddělení exokrinní tkáně od ostrůvků separací na hustotním gradientu. Postup byl v následujících více než třiceti letech postupně vylepšován a zdokonalován. Celý proces izolace lze rozdělit do několika fází: preparace, digesce, sběr tkáně, purifikace, kvantifikace a kultivace izolovaných

Langerhansových ostrůvků. Schéma izolace ostrůvků s následnou transplantací je znázorněno na **Obrázku 2** (str. 8).

Pankreas je nejprve za stálého chlazení očištěn od okolní vazivové tkáně, tuku, cév a přilehlých orgánů (duodenum, slezina). Následně je do slinivky hlavním duktem pomocí peristaltické pumpy a kanyly pod kontrolovaným tlakem napuštěn roztok enzymů kolagenázy a neutrální proteázy. Orgán je rozdělen na malé kousky a umístěn do zařízení označovaného jako Ricordiho komora, kde se při teplotě 37 °C a soustavném třepání během 10–20 minut působením enzymů rozpadne. Fáze digescce je ukončena na základě mikroskopického vyhodnocení vzorků tkáně odebíraných v pravidelných intervalech během procesu trávení, a to především v závislosti na velikosti fragmentů exokrinní tkáně, počtu uvolněných ostrůvků a poměru zastoupení uvolněných ostrůvků vůči ostrůvkům obaleným v exokrinní tkáni. Účinnost enzymů je zastavena prudkým ochlazením celé aparatury a rychlým odčerpáním natrávené tkáně s jejím současným promýváním studeným roztokem. Tkáňová suspenze exokrinní a endokrinní tkáně je shromažďována ve sběrných zkumavkách, zkoncentrována pomocí centrifugace a následně přenesena na několik hodin do prezervačního roztoku a uložena do speciálních vaků. Inkubace v prezervačním roztoku při 4 °C zajišťuje ochranu natrávené tkáně a také zvýšení rozdílu hustoty exokrinní a endokrinní složky.

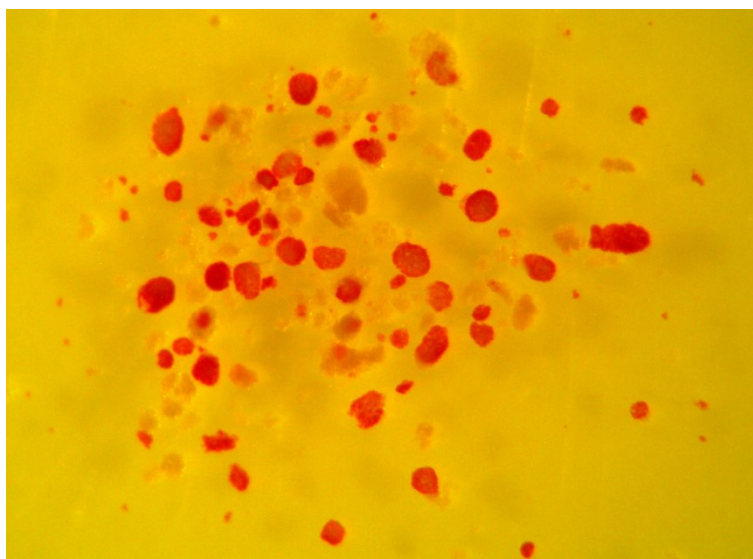


**Obrázek 2:** Schéma izolace a transplantace Langerhansových ostrůvků. Upraveno dle Merani S., Shapiro A. M., 2006.

Jednotlivé složky tkáňové suspenze jsou rozděleny pomocí separace v kontinuálním hustotním gradientu v rozsahu 1.065–1.095 g/ml. V naší laboratoři se pro tento účel využívá buněčný separátor COBE 2991. Endokrinní a exokrinní složka se zde rozdělí na základě své specifické hmotnosti, která teoreticky odpovídá hustotě 1.059 g/ml pro endokrinní tkáň (stabilní interindividuálně) a 1.059-1.074 g/ml pro exokrinní tkáň (nestabilní) (Riccardi et al., 1992). V praxi je však z důvodu vysoké variability třeba před každou separací ověřit hustotu tkáňové suspenze pomocí tzv. testovacího gradientu a rozsah hustoty roztoku přizpůsobit tak, aby bylo dosaženo co nejlepšího rozdělení tkání. Po separaci je tkáň najímána do 12–15 frakcí, u nichž je individuálně posouzena čistota a množství přítomných ostrůvků. Podle počtu ostrůvků

a stupně oddělení exokrinní tkáně jsou pak jednotlivé frakce použity pro přípravu štěpu, nebo vyřazeny. Před uložením purifikovaných ostrůvků na kulturu se odebírají reprezentativní vzorky pro kvantifikaci tkáně. Samotný štěp je pak uložen do speciálního kultivačního média v tkáňovém inkubátoru s 5 % CO<sub>2</sub> atmosférou při 37 °C v kultivačních lahvích nebo vacích.

Celý proces izolace Langerhansových ostrůvků z pankreatu trvá průměrně 8 hodin a účastní se ho tři pracovníci. Pro standardní vyjádření výsledku izolace a počtu získaných LO slouží tzv. ostrůvkové ekvivalenty IEQ (z angl. islet equivalent), kdy 1 IEQ odpovídá objemu 1 ostrůvku o průměru 150 μm. Množství ostrůvků se hodnotí ve 3–5 reprezentativních vzorcích (ředění 1:1000 až 1:5000). Pro spolehlivé odlišení ostrůvků od kousků exokrinní tkáně se využívá dithizon, organická sloučenina obsahující síru, která tvoří stabilní červené komplexy se zinkem přítomným ve velkém množství v inzulínových granulích beta buněk. To umožňuje odlišení ostrůvků od exokrinní tkáně, která se dithizonem nebarví (**Obrázek 3**, str. 10). Samotná kvantifikace se provádí manuálně s využitím disekčního mikroskopu a kalibrovaného měřítka nebo pomocí digitální analýzy obrazu fotografií získaných pomocí invertovaného mikroskopu. Kvalitativně a kvantitativně splňuje kritéria pro transplantaci štěp obsahující ostrůvky v počtu odpovídajícím cca 300 tisícům IEQ ve vysoké čistotě. Maximální možný objem transplantované tkáně je asi 20 ml.



**Obrázek 3:** Vzorek izolovaných lidských Langerhansových ostrůvků (červeně) s příměsí exokrinní tkáně (světlé fragmenty) po obarvení dithizonem. Zvětšení 1000×.

#### **1.4. Transplantace LO**

Transplantace Langerhansových ostrůvků 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 celoorgánové 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 inzulínu 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.

Transplantace Langerhansových ostrůvků se provádí infuzí buněčné suspenze perkutánně transhepatální katetrizací portální žíly příjemce pod skiaskopickou navigací. Zákrok se provádí v lokální anestezii a je tedy mnohem méně náročný pro pacienta i lékaře. Ve srovnání s celoorgánovou transplantací je transplantace ostrůvků spojena s výrazně nižším rizikem zdravotních komplikací u příjemce, a to jak během zákroku, tak i po něm. Nejčastější komplikace v minulosti představovaly hlavně trombózu portální žíly, poranění močového měchýře, žlučníku a intraperitoneální krvácení, které se však již dnes po zavedení nových chirurgických kolagenových lepidel objevuje jen výjimečně. Hlavním důvodem nízkého rozšíření transplantace LO v klinické praxi je kromě omezeného počtu dárců i nízká efektivita této léčebné metody v porovnání s celoorgánovou transplantací. Ta je způsobena jak ztrátou ostrůvků během procesu izolace, tak nedostatečně efektivním přihojením ostrůvků v portálním řečišti v důsledku nespecifické zánětlivé reakce IBMIR, ke které dochází při kontaktu ostrůvků s krví příjemce a která má za následek zničení až 60 % transplantované tkáně v krátkém čase po její aplikaci do portální žíly (Eich T. et al., 2007a, Jiráček D. et al., 2009, Saudek F. et al., 2010).

### **1.5. Transplantace LO v IKEM**

Klinický program transplantace Langerhansových ostrůvků byl zahájen v Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM) v roce 2005 po několikaleté experimentální přípravě. K izolaci Langerhansových ostrůvků se používají pankreaty od zemřelých dárců, které splňují přísná kritéria pro odběr orgánů, ale z jiných důvodů je nelze použít pro celoorgánovou transplantaci (nevhodné uspořádání cév, věk dárce nad 45 let, BMI nad 30 kg/m<sup>2</sup>, atd.). Ostrůvky jsou izolovány dle Edmontonského protokolu, postup je adaptován na místní pracovní podmínky a laboratoř je vybavena

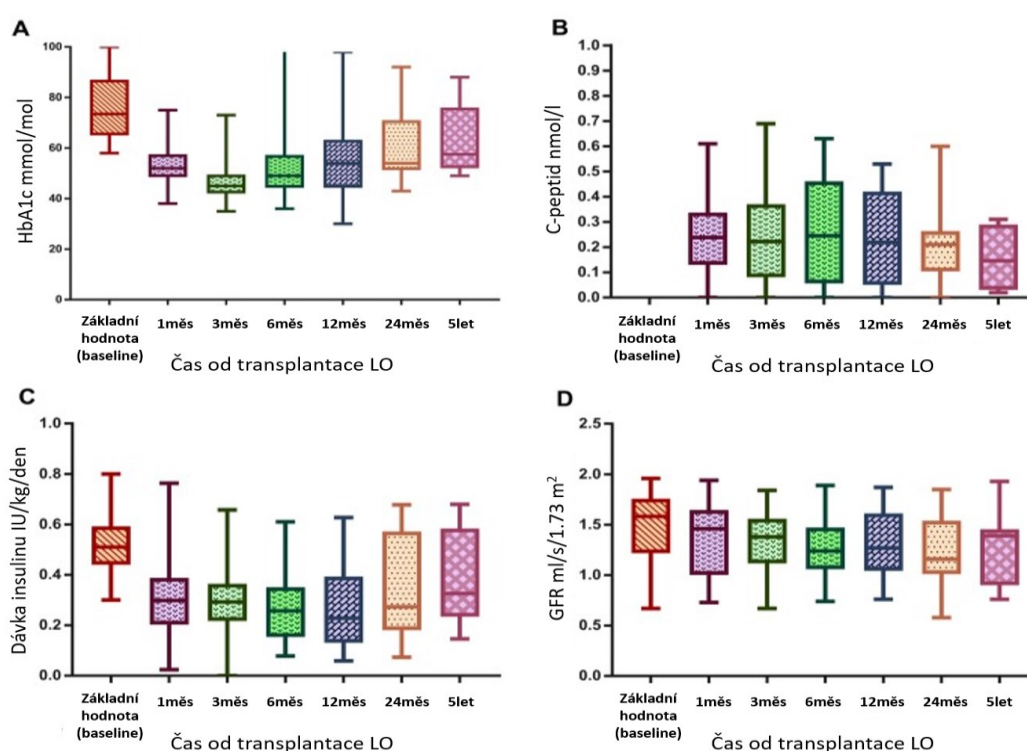
vlastními prototypy izolačních zařízení. Hlavní indikací pro tuto léčbu v IKEM je syndrom poruchy rozpoznávání hypoglykemie. Druhou indikací je totální pankreatektomie z nemaligní příčiny, kdy autotransplantace vlastních Langerhansových ostrůvků umožňuje zachování alespoň části sekrece inzulínu s možností její inhibice při hypoglykemii (již aplikovaný inzulín není možné vyjmout) a sekrece kontra-regulačního glukagonu. Okrajovou indikací je léčba diabetes mellitus 1. typu se selháním ledvin u pacienta, který má významně zhoršenou funkci kardiovaskulárního systému a orgánová transplantace pankreatu by znamenala příliš velkou zátěž. V takovém případě může být řešením simultánní transplantace ostrůvků s ledvinou ze zemřelého dárce. V několika případech proběhla v IKEM také transplantace LO současně s játry. V případě kombinovaných transplantací se ostrůvky aplikují chirurgicky přímo do větve portální žíly vzápětí po transplantaci orgánu (Lehmann R. et al., 2004).

Z důvodu nízké dostupnosti kvalitních orgánů zůstává transplantace LO vyhrazena pro úzkou skupinu pacientů trpících syndromem poruchy vnímání hypoglykémie, kterým transplantace vrátí schopnost zastavit vyplavování inzulínu do krve při klesající glykémii. Představuje reálnou pomoc pro pacienty ohrožené fatální hypoglykemií, které se nedovedou vyvarovat ani s použitím nejmodernější technologie (kontinuální monitorace glykemie a inzulínová pumpa). Primárním cílem této léčebné metody zůstává u těchto pacientů tedy spíše odstranění hypoglykemických kómat nežli dosažení nezávislosti na podávání exogenního inzulínu.

## 1.6. Výsledky klinického programu transplantace LO v IKEM (2005–2020)

Od roku 2005 do konce roku 2020 proběhlo v IKEM celkem 429 izolací LO. Uskutečněno bylo 131 transplantací Langerhansových ostrůvků celkem 85 příjemcům, z nichž 45 pacientů podstoupilo transplantaci samotných LO (1–4 aplikace), 18 pacientů podstoupilo kombinovanou transplantaci LO a ledviny a 5 pacientů transplantaci LO s játry; 19 pacientů podstoupilo autotransplantaci vlastních LO.

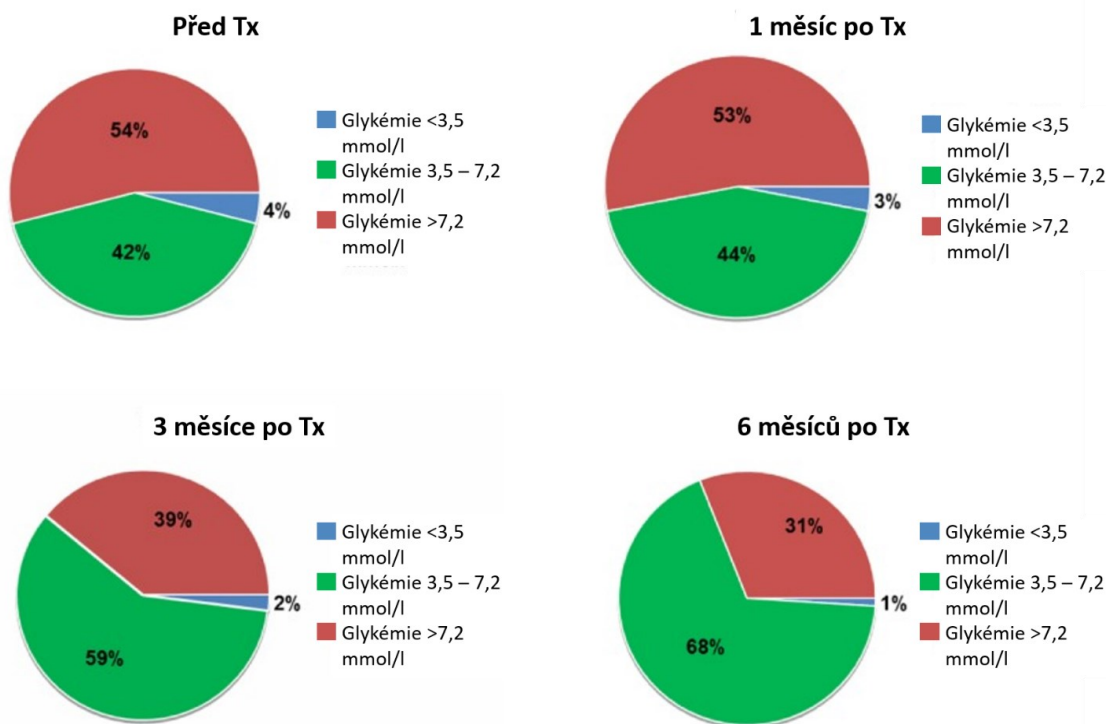
Jeden a dva roky po transplantaci LO bylo u většiny příjemců dosaženo významného zlepšení metabolických parametrů a kompenzace diabetu s výrazným poklesem glykovaného hemoglobinu, zvýšením hladiny lačného i stimulovaného C-peptidu, značným snížením dávek inzulínu (**Obrázek 4**) a poklesem času stráveného v hypoglykémii nebo hyperglykémii (**Obrázek 5**, str. 14).



**Obrázek 4:** (A) Glykovaný hemoglobin (HbA1c), (B) C-peptid, (C) denní dávky inzulínu a (D) renální funkce (GFR – gomerular filtration rate, odhad glomerulární filtrace) u pacientů před a po transplantaci LO. Upraveno dle: Voglová et al., 2017.



Nejčastější komplikací transplantace LO bylo krvácení, které se objevilo zhruba u třetiny pacientů, a to zejména v prvních letech transplantačního programu (Zahradnická M. et al., 2016, Voglová B. et al., 2017).



**Obrázek 5:** Čas strávený v hypoglykémii (<3,5 mmol/l, modře), normoglykémii (3,5–7,2 mmol/l, zeleně) a hyperglykémii (>7,2 mmol/l, červeně) u pacientů před a po transplantaci LO. Upraveno dle: Voglová et al., 2017.

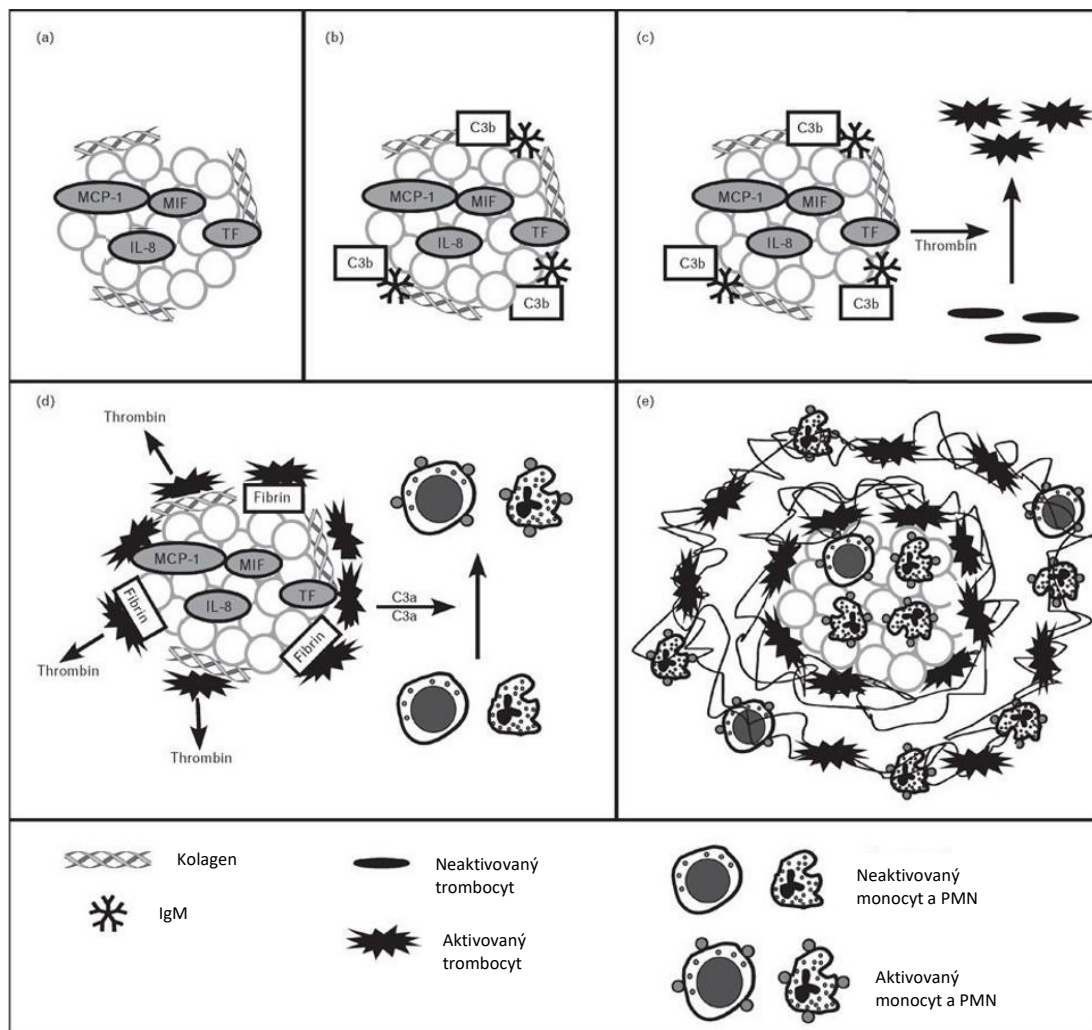
Z výsledků je patrné, že transplantace LO vede k částečné obnově sekrece inzulínu a tím i možnosti při hypoglykémii sekreci zastavit, k lepší metabolické kompenzaci diabetu a eliminaci závažných hypoglykemických epizod. Právě snížení četnosti závažných hypoglykemických epizod s nutností asistence je přitom hlavním cílem transplantace LO. V porovnání s dobře zavedeným programem transplantace pankreatu je však tato metoda stále málo efektivní a je potřeba ji i nadále zlepšovat. U celoorgánové transplantace pankreatu pozorujeme delší přežívání štěpu, stejně jako vyšší procento pacientů nezávislých na inzulínu, to však za cenu vyšší zátěže pacienta během i po zákroku a vyššího rizika závažných komplikací (Voglová B. et al., 2017).

### **1.7. 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).

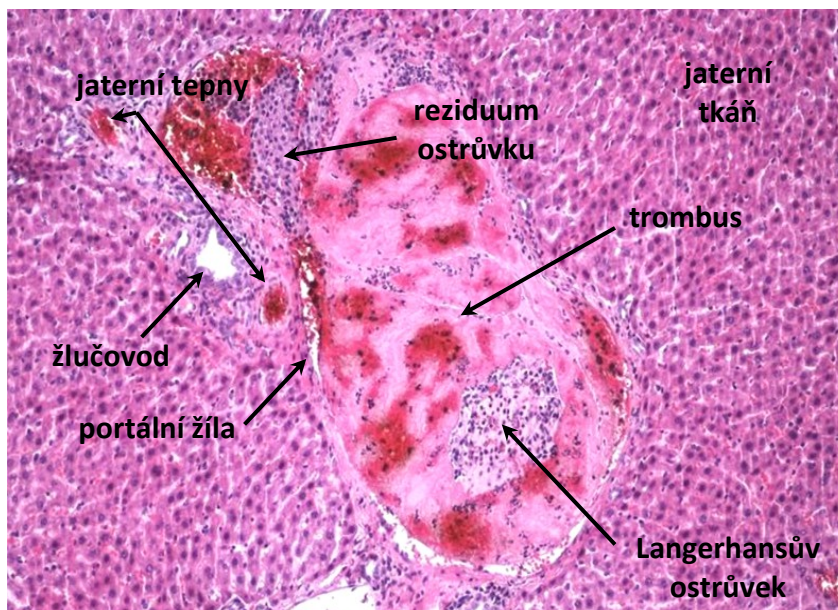
Po vpravení ostrůvků do portální žíly příjemce dochází k navázání přirozených protilátek přítomných v krvi (imunoglobuliny IgG a IgM) na povrchové struktury štěpu, jako je kolagen nebo laminin, které nejsou běžně exponovány (Nilsson B. et al., 2011). To vede k aktivaci komplementu, depozici C3 fragmentů (C3b/iC3b) na povrchu buněk ostrůvků a podnícení zánětlivé reakce. Molekuly tkáňového faktoru mezitím reagují přímo s faktorem VII koagulační kaskády. Vzniklý trombin spouští formaci fibrinu a agregaci trombocytů vedoucí ke vzniku trombu. Aktivace trombocytů zvyšuje afinitu integrinů GPIIb-IIa a  $\alpha 2\beta 1$  pro jejich ligandy fibrin a kolagen, což vede k vazbě aktivovaných trombocytů na povrch ostrůvků. Aktivace trombocytů dále podněcuje aktivaci komplementu a intenzitu zánětlivé reakce v okolí ostrůvků uvolňováním chondroitinsulfátu, což vede ke vzniku anafylatoxinů C3 a C5a, které atrahují aktivované monocyty a polymorfonukleární leukocyty (PMN). Velké množství vznikajícího fibrinu nakonec utvoří kolem ostrůvků síť zachycující trombocyty a imunitní buňky. Chemotaktické faktory uvolňované přímo z buněk LO

(IL-8, MIF, MCP-1 a další) nebo vznikající aktivací komplementu (C5a) během několika desítek minut způsobí infiltraci velkého množství monocytů a PMN do ostrůvků, čímž dojde k narušení jejich integrity a následnému zániku (Bennet W. et al., 1999, Johansson H. et al., 2005, Moberg L. et al., 2002, Ozmen L. et al., 2002). Komplexní schéma nespecifické zánětlivé reakce IBMIR je uvedeno na **Obrázku 6**.



**Obrázek 6:** Schéma nespecifické zánětlivé reakce IBMIR. (a) Izolované Langerhansovy ostrůvky uvolňují chemotaktické faktory jako např. IL-8, MIF, MCP-1, které přitahují buňky imunitního systému. Tkáňový faktor (TF), exprimovaný na povrchu LO, spouští koagulační kaskádu vnější cestou. (b) Při kontaktu LO s krví příjemce dochází k navázání protilátek na povrch LO a depozici fragmentů C3b na povrchu ostrůvků. (c) V důsledku koagulace dochází k aktivaci trombocytů, přeměně fibrinogenu na fibrin a vzniku trombu. (d) Aktivované trombocyty se vážou na povrch LO, zvyšuje se aktivace komplementu vedoucí k produkci anafylatoxinů C3a a C5a, které přitahují další monocyty a polymorfonukleární leukocyty (PMN) z okolí LO. (e) Dochází k uvolňování velkého množství trombinu a vzniku fibrinové kapsy obklopující nejen ostrůvky, ale i PMN a monocyty. Ty následně infiltrují do ostrůvku a způsobí jeho rozpad a zánik. Upraveno dle Nilsson B. et al., 2011.

Výsledkem je vznik trombu a ischemických oblastí v játrech distálně za obstrukcí. Následuje degradace buněk ostrůvků a jejich postupné odbourání spolu s trombem. Na **Obrázku 7** je zobrazen histologický řez játry potkana 2 hodiny po transplantaci. Ostrůvky a jejich části jsou zachyceny v trombu vyplňujícím větev portální žíly.



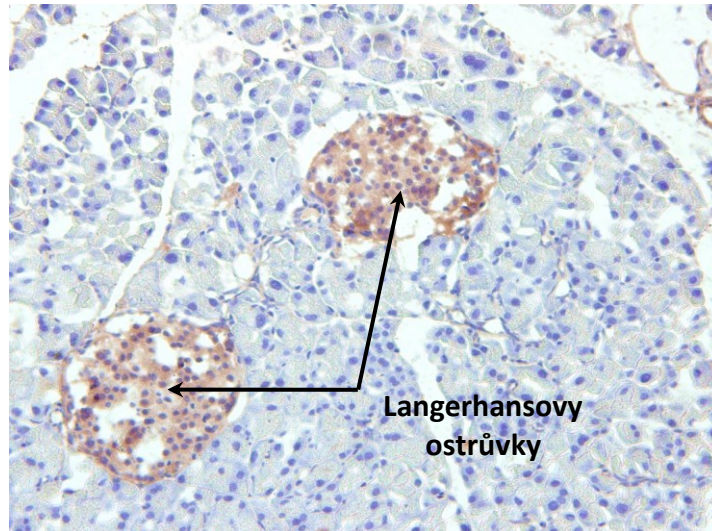
**Obrázek 7:** Histologický řez játry potkana 2 hodiny po transplantaci 1000 Langerhansových ostrůvků. Ostrůvek je zachycen uprostřed rozsáhlého trombu, který vyplňuje celou větvičku portální žíly. Barvení hematoxylin-eosin, zvětšení 100×.

### 1.8. Tkáňový faktor

Tkáňový faktor neboli koagulační faktor III, povrchový znak CD142, dříve nepřesně označovaný jako tkáňový tromboplastin, je asi 35kDa velký membránový glykoprotein nezbytný pro život savců (Butenas S., 2012). Gen pro tkáňový faktor nese označení F3 a nachází se u člověka na pozici 1p21.3 chromozomu 1. Přirozeně se tkáňový faktor nachází především na povrchu extravaskulárně lokalizovaných buněk (vaskulární hladké svalové buňky, adventiciální fibroblasty, pericyty), nicméně byla prokázána i solubilní forma tkáňového faktoru vznikající alternativním splicingem a

cirkulující v krvi (Bogdanov V. Y. et al., 2003). Hlavní úlohou tkáňového faktoru je aktivace hemokoagulační kaskády tzv. vnější cestou (Butenas S., Mann K. G., 2002). Při narušení cévní stěny exponovaný tkáňový faktor funguje jako vysokoafinitní receptor pro koagulační faktor VII, čímž zprostředkovává více než stonásobnou amplifikaci jeho přeměny na faktor VIIa. Tkáňový faktor s navázaným faktorem VIIa tvoří enzymatický komplex, který iniciuje srážení krve aktivací zymogenů faktoru IX a faktoru X na serinové proteázy IXa a Xa. Faktory IXa a Xa tvoří enzymatické komplexy s příslušnými kofaktory (faktory VIIIa a Va) na povrchu membrán obsahujících kyselé fosfolipidy, robustně produkující trombin, finální enzymatický produkt celého procesu. Trombin akceleruje svojí vlastní produkci množstvím zpětnovazebných reakcí, štěpí fibrinogen a aktivuje faktor XIII, což vede ke vzniku nerozpustné fibrinové sraženiny (Butenas S., Mann K. G., 2002, Mann K. G. et al., 2009).

Distribuce tkáňového faktoru v dalších tkáních je velmi rozdílná, za fyziologických podmínek se ve větší míře nachází například v astrocytech, epitelálních buňkách plic nebo kardyomyocytech (Drake T. A. et al., 1989, Eddlestone M. et al., 1993, Fleck R. A., 1990, Flossel C. et al. 1994). Endokrinními buňkami LO je v klidovém stavu exprimováno jen malé množství tkáňového faktoru, snadno však dochází k jeho výrazné indukci (Marzorati S. et al., 2006). Kromě transmembránového proteinu tkáňového faktoru se v buňkách LO vyskytuje i jeho solubilní forma, která se nachází v cytoplazmě a uvolňuje se v malém množství při exocytóze sekrečních granul inzulínu a glukagonu (Johansson H. et al., 2005). Nitrobuněčná doména není přitom pro známé funkce tkáňového faktoru nezbytná (Melis E. et al., 2001). Exprese tkáňového faktoru v Langerhansových ostrůvcích potkaního pankreatu je imunohistochemicky zobrazena na **Obrázku 8** (str. 19).



**Obrázek 8:** Potkaní pankreatická tkáň (modře) obarvená specifickou protilátkou proti tkáňovému faktoru (hnědě). Jasně jsou patrné Langerhansovy ostrůvky exprimující tkáňový faktor ve větší míře nežli okolní buňky. Zvětšení 200×.

Kromě udržování normální hemostázy a trombózy hraje tkáňový faktor důležitou roli také ve vývoji cév (Versteeg H. H. et al., 2003). Myší embrya s knock-outem genu pro tkáňový faktor hynou devátý až desátý den nitroděložního vývoje pro poruchu angiogeneze a krvácení do žloutkového vaku (Carmeliet P. et al., 1996). Důležitost tkáňového faktoru v embryogenezi dokládá také fakt, že se jedná o jediný koagulační faktor, u kterého není dokumentován výskyt vrozeného deficitu a jeho absence je tedy neslučitelná se životem (Toomey J. R. et al., 1996). Význam tkáňového faktoru v angiogenezi byl popsán taktéž v modelech růstu a metastazování některých tumorů (Zhang Y. et al., 1994, López-Pedreira C. et al., 2006, Rak J. et al., 2008) a při proliferaci intimálních buněk po cévních poraněních (Marmur J. D. et al., 1993). Dále se podílí například na vzniku aterosklerózy (Wilcox J. N., 1989, Tremoli E. et al., 1999).

V kontextu transplantace Langerhansových ostrůvků to znamená, že ačkoli tkáňový faktor aktivací koagulační kaskády významně přispívá ke vzniku IBMIR a destrukci ostrůvků imunitním systémem v raném posttransplantačním období,

z hlediska dlouhodobého přežívání LO je však jeho přítomnost z důvodu jeho významu v neoangiogenezi v pozdějším stádiu po transplantaci nezbytná pro revaskularizaci a napojení ostrůvků na cévní systém příjemce.

### **1.9. Ovlivnění IBMIR**

V minulosti bylo popsáno již mnoho 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).

U žádného z doposud vyzkoušených přístupů se nepotvrdila dostatečná účinnost a zároveň bezpečnost tak, aby metodu bylo možné aplikovat ve větším rozsahu v klinické praxi. V současném uspořádání je ostrůvkový štěp podáván pacientům v roztoku obsahujícím heparin, což dokládá, že již před formálním průkazem IBMIR byl postup intuitivně cílen na prevenci koagulace v portálním řečišti. Systémové podání vysoké dávky heparinu se však ukázalo jako nedostatečně účinné a zároveň výrazně zvyšuje riziko krvácení (Bennet W. et al., 1999), proto se již v minulosti objevily návrhy na použití vhodnějších alternativ, zacílených proti koagulaci a aktivaci komplementu, jako je např. nízkomolekulární dextransulfát (Goto M. et al., 2004, Johansson H. et al., 2006) nebo melagatran (Ozmen L. et al., 2002).

Nadějně výsledky vykazuje také použití lidského rekombinantního antitrombinu (Gmyr V. et al., 2017), trombomodulinu (Cui W. et al., 2009 a 2010) nebo  $\alpha$ -1 antitrypsinu (Wang J. et al., 2017), je však potřeba další výzkum zaměřený na bezpečnost a účinnost daných látek v klinickém provedení. Stejný problém jako u heparinu se objevuje i u použití N-acetylcysteinu (Beuneu C. et al., 2007) nebo interferujících monoklonálních protilátek (Berman D. M. et al., 2007), které inhibují prokoagulační aktivitu tkáňového faktoru.

Jiným způsobem inhibice exprese tkáňového faktoru je kultivace ostrůvků v médiu s nikotinamidem, který blokuje jeho syntézu. Takto lze snížit výskyt tkáňového faktoru až o 50 %, což se projevuje snížením intenzity IBMIR a zlepšením dlouhodobé funkce transplantovaných ostrůvků (Moberg L. et al., 2003). Účinek nikotinamidu se však uplatňuje pouze po dobu přímého vlivu na ostrůvky, a tudíž po vpravení do krve efekt inhibice tkáňového faktoru končí. Principiálně zcela odlišný přístup představuje povrchová úprava ostrůvků, popř. jejich „enkapsulace“, tedy obalení do speciálních konstruktů, které tvoří bariéru mezi ostrůvkem a krví příjemce. Prvním počinem v této oblasti byla heparinizace ostrůvků pomocí speciálního proteoglykanového nosiče fixovaného avidin-biotin technikou na povrch ostrůvku (Cabric S. et al., 2007). Tento princip lze využít kromě antikoagulantů (heparin, trombomodulin) také k navázání dalších podpůrných látek na povrch ostrůvků, jako např. růstových faktorů (VEGF), imunomodulačních látek nebo enzymů (urokináza). Jako alternativní materiál pro obalení ostrůvků může sloužit například agaróza (Luan N. M. et al., 2010), chondroitin sulfát (Yang J. et al., 2019), nebo alginát (Safley S. A. et al., 2018). Hlavním nedostatkem metod zaměřených na manipulaci transplantované tkáně je uvolňování solubilní formy tkáňového faktoru při exocytóze granul spolu s



inzulínem a glukagonem (Nillson B. et al., 2005) a dále technologická náročnost a vyšší cena ve srovnání s metodami využívajícími systémové podání.

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. Je založený na interakci malých interferujících molekul RNA s mRNA cílového genu a umožňuje velmi specificky utlumit expresi prakticky jakéhokoli genu bez zásahu do jaderné DNA.

### **1.10. Epigenetické mechanismy regulace genové exprese**

Genová exprese je složitý proces, při kterém se genetická informace uložená v jednotlivých genech realizuje jako funkční molekuly kódovaných proteinů. Exprese konkrétních genů je v buňkách vysoce regulovaná na několika úrovních tak, aby mohlo docházet k efektivnímu fungování buněk a organismů (adaptace na změny podmínek prostředí, diferenciaci v rozdílné typy buněk apod.).

Epigenetika je vědní obor genetiky, který se zabývá studiem dědičných změn v genové expresi (a tedy fenotypu), které nezahrnují změny DNA. Původní definice zahrnovala všechny molekulární dráhy regulující expresi genotypu v určitý fenotyp, v posledních letech se však zúžila právě na změny ve funkci genů, které jsou mitoticky či meioticky dědičné a které nejsou spojené se změnou v nukleotidové sekvenci DNA (Dupont C. et al., 2009). Epigenetickými mechanismy regulace genové exprese tedy rozumíme především dědičné kovalentní modifikace DNA nebo histonových proteinů a dále regulační mechanismy zprostředkované úseky kódující i nekódující RNA (RNA

interference). Velmi důležitá je regulace pomocí molekul microRNA (miRNA), které ovlivňují expresi až 60 % lidských genů kódujících proteiny a sama jejich exprese je často řízena epigeneticky. miRNA jsou krátké molekuly o délce 19–25 nukleotidů a u člověka jich bylo nalezeno již kolem 2000, z nichž každá může být zacílena na 100–200 různých mRNA přítomných v buňce (Friedman R. C. et al., 2009). Epigenetické mechanismy jsou ovlivněny mnoha faktory v průběhu života, především vývojem organismu (vývoj *in utero*, dospívání a stárnutí) a také prostředím, ve kterém tento vývoj probíhá (chemické sloučeniny v okolním prostředí, léky, dieta atp.).

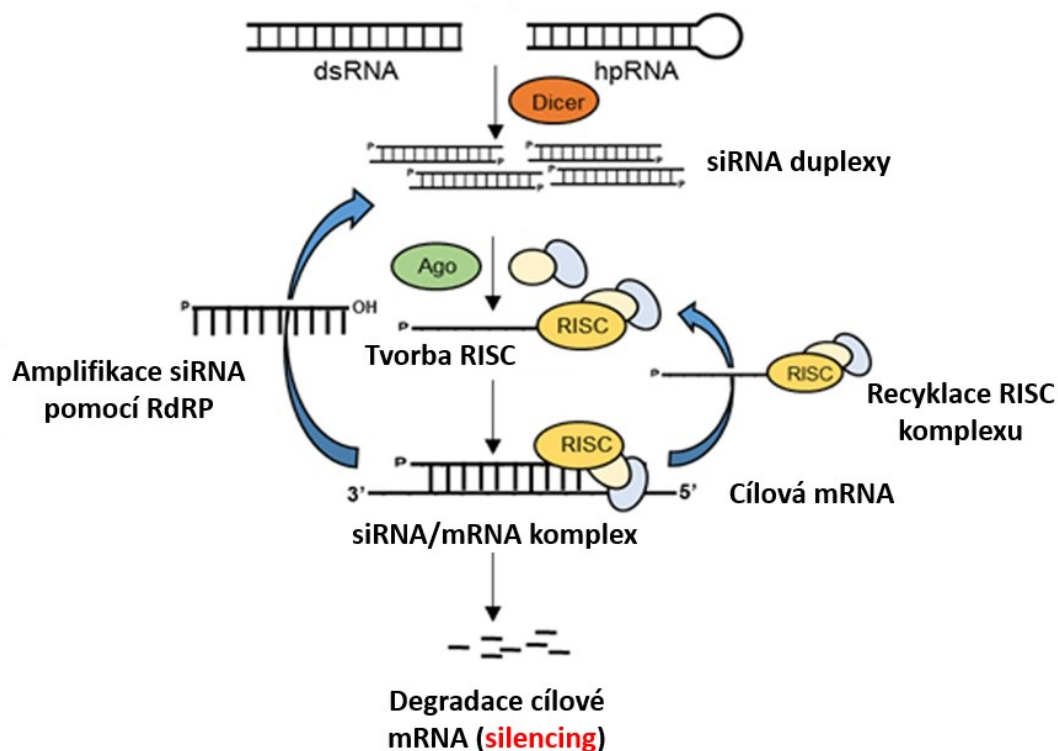
### 1.11. RNA interference

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 transpozonů, 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

vlásečkové struktury jednovláčkové 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 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).

Proces RNAi je zahájen rozštěpením dvouvláčkové RNA na krátké úseky siRNA s charakteristickým přesahem dvou nukleotidů na 3'konci enzymem Dicer s aktivitou podobnou RNáze III (**Obrázek 9**, str. 25). V druhém kroku se siRNA připojí k ribonukleoproteinovému komplexu RISC (z angl. RNA-induced silencing complex). Ten nejprve způsobí rozdělení krátké dvoušroubovice siRNA na jednotlivá vlákna, z nichž jedno je odbouráno a druhé (to, k němuž zůstane navázán) je použito k sekvencně specifické vazbě na cílovou mRNA. Komplementární sekvence je rozpoznána pomocí proteinu Argonaut (Ago), jehož součástí je nukleáza Slicer, která po navázání komplexu RISC cílovou mRNA rozštěpí (zhruba uprostřed komplementárního úseku). Takto rozštěpená mRNA je dále buněčnými mechanismy rozpoznána jako poškozená a odbourána, zatímco komplex RISC je recyklován pro další použití (Majumdar R. et al., 2017).



**Obrázek 9:** Schéma mechanismu RNA interference. Dvouvláknový úsek dsRNA nebo hpRNA je rozštěpen enzymem Dicer za vzniku duplexu siRNA, který je dále připojen k ribonukleoproteinovému komplexu RISC. Protein Argonaut (Ago) rozpozná komplementární úsek mRNA a rozštěpí ho. Takto znehodnocená mRNA je následně buňkou degradována. U mnoha organismů může být efekt zesílen působením RNA-dependentní RNA polymerázy (RdRP), která zvyšuje populaci siRNA. Upraveno dle Majumdar R. et al., 2017.

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 obdrželi Andrew Fire a Craig Mello za objev RNA interference Nobelovu cenu. Možnost snížení exprese genu pro tkáňový faktor pomocí RNA interference byla studována na modelu lidských i zvířecích primárních i immortalizovaných buněk. Poločasy mRNA a samotného proteinu tkáňového faktoru umožňují během 24 hodin dosáhnout maximální inhibice až na 15 % výchozího stavu a tento efekt přetrvává 3-5 dní (Holen T. et al., 2002 a 2003). U modelu neovaskularizace byla v lidských umbilikálních žilních endoteliálních buňkách snížena exprese tkáňového faktoru pomocí siRNA o téměř

80 %, což mělo za následek potlačení proliferace a migrace buněk a inhibici tvorby sraženiny (Peng W. et al., 2013). V případě *in vitro* transfekce siRNA do buněk disociovaných myších LO bylo dosaženo snížení množství mRNA pro gen *c-Abl* na 24 %, přičemž byla zachována viabilita ostrůvků. Tento efekt přetrval 7 dní (Hagerkvist R. et al., 2005). V jiné studii byla porovnána účinnost *in vitro* transfekce siRNA proti inzulinovému genu *Ins2* do izolovaných myších LO lipofekcí a *in vivo* transfekce metodou hydrodynamické injekce do ocasní žíly myši. V prvním případě bylo dosaženo snížení exprese *Ins2* o 55 % s efektivitou transfekce více než 45 %, v druhém případě pak snížení exprese o 33 % při transfekční efektivitě 19 % (Bradley S. P. et al., 2005).

Použití techniky RNA interference pro snížení exprese tkáňového faktoru v buňkách LO bylo popsáno dvěma skupinami u prasečích neonatálních ostrůvkových buněčných klasterů (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 a 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 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**



### 3.1. ČÁST 1.: Genová exprese v izolovaných potkaních LO a výběr vhodných endogenních kontrol pro genovou expresní analýzu

#### 3.1.1. ÚVOD

Jak již bylo popsáno v úvodu, transplantace Langerhansových ostrůvků do jater diabetických pacientů představuje slibnou léčebnou alternativu v léčbě inzulin-dependentního diabetu 1. typu, a to od jejího znovuobjevení Edmontonskou skupinou v roce 2000 (Shapiro A. M. et al., 2000). Přestože metoda byla od té doby již značně vylepšena, její celkovou účinnost je potřeba i nadále zvyšovat. Jedním z možných přístupů je podpora viability LO během procesu izolace i transplantace pomocí krátkodobého umlčení specifických genů (tzv. silencingu), např. genů účastnících se apoptózy, koagulace, IBMIR apod. Tento proces vyžaduje manipulaci a kultivaci izolovaných LO *in vitro* po dobu několika hodin nebo dní, přičemž přesná kvantifikace exprese cílového genu během všech fází izolace, kultivace a transplantace LO je stěžejní podmínkou pro posouzení úspěšnosti celého přístupu.

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí v reálném čase (RT-qPCR) je dobře zavedená metoda kvantifikace mRNA v biologických vzorcích. Její výhody zahrnují vysokou citlivost, velký dynamický rozptyl, možnost zpracování velkého množství vzorků a přesného stanovení expresního profilování mnoha vybraných genů. Přestože se jedná o velmi robustní a výkonnou techniku, RT-qPCR je nepřímá metoda náchylná na chyby, které mohou být snadno zavedeny během jednotlivých kroků v průběhu experimentu (zpracování vzorků, množství výchozího materiálu, izolace RNA a její kvalita, účinnost enzymů, vlastnosti primerů atd.) a zvyšují tak riziko chybného výkladů získaných výsledků (Dheda et al., 2004 a 2005).

Pro přesné určení hladiny genové exprese s minimální experimentální chybou je proto zapotřebí spolehlivá normalizace. Nejběžnější metodou pro normalizaci dat získaných z buněčné mRNA je použití referenčních genů jako vnitřní kontroly, zde je však nezbytné, aby exprese vybraných genů byla stálá a nebyla ovlivněna experimentálními podmínkami (Dheda et al., 2004 a 2005, Karge et al., 1998, Thellin et al., 1999). Dále je potřeba vybrat adekvátní kontrolní vzorek, aby bylo možné určit veškeré změny nebo posuny v genové expresi způsobené experimentálními zásahy.

Izolace Langerhansových ostrůvků z exokrinní tkáně je komplikovaný proces, který je kritický pro přežití endokrinních buněk použitelných pro následnou transplantaci. Představuje však pro ostrůvky také závažný mechanický a metabolický stres a může vést k buněčnému poškození a změnám genové exprese. Marselli et al. (2008) ve své studii ukazuje, že ihned po izolaci byla v buňkách izolovaných LO zvýšená exprese u 4560 genů a snížená exprese u 1226 genů ve srovnání s ostrůvky získanými mikrodisekcí z intaktní tkáně pankreatu. Negi et al. (2012) prokázali, že v čerstvě izolovaných LO dochází k výraznému (21,6x) zvýšení exprese genů zahrnutých v katabolismu mRNA, zatímco exprese genů asociovaných s transkripcí je naopak snížena (2,5x). I přesto čerstvě izolované Langerhansovy ostrůvky – myší, potkaní i lidské – často slouží jako kontrola v různých genových expresních a intervenčních studiích bez ohledu na možné změny v genové expresi v důsledku procesu izolace (Quan et al., 2012, Tang et al., 2012, Planas et al., 2010, Rodriguez-Mulero et al., 2005).

Některé konvenční referenční geny, jako např. 18S rRNA, GAPDH nebo  $\beta$ -aktin, jsou klasicky považovány za konstitutivně exprimované v různých tkáních a často jsou automaticky používány k normalizaci kvůli jejich robustní expresi. Roste však množství důkazů o tom, že i exprese těchto „klasických“ referenčních genů se

může významně měnit v důsledku rozdílných experimentálních podmínek, a tedy že jejich rutinní použití není vhodné pro přesnou kvantitativní normalizaci kvůli velké chybě měření (Dheda et al., 2005, Karge et al., 1998, Thellin et al., 1999, Bas et al. 2004, Tricarico et al. 2002), a to zejména u Langerhansových ostrůvků (Rodriguez-Mulero et al., 2005, Vasir et al., 2014). Z tohoto důvodu je naprosto zásadním požadavkem pro zamezení desinterpretace výsledků validace referenčních genů, neboť ty se ukazují být vysoce specifické pro každé jednotlivé experimentální uspořádání (Dheda et al., 2004).

Pro izolované Langerhansovy ostrůvky nebylo doposud provedeno žádné komplexní srovnání stability často používaných referenčních genů, ani vyhodnocení změn jejich exprese v časném období po izolaci. V naší studii jsme se proto rozhodli stanovit genovou expresi 16 nejběžněji používaných referenčních genů (18S rRNA, Actb, Arbp, B2m, Gapdh, Gusb, Hmbs, Hprt, Pgk1, Ppia, Ppib, Rplp2, Tbp, Tfrc, Ubc a Ywhaz) (Zhan et al., 2014, Turabelidze et al., 2010) a genu F3 pro tkáňový faktor, který je předmětem našeho výzkumu (tzv. gen zájmu, gene of interest, GOI), v čerstvě izolovaných LO, během prvních 24 h a poté po 48, 72, 96 a 120 h kultivace, abychom porovnali stabilitu jejich exprese a identifikovali referenční geny vhodné pro použití při kvantifikaci genové exprese v izolovaných LO.

### **3.1.2. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1.2.1. Laboratorní zvířata**

Experimenty byly prováděny na potkanech kmene Brown Norway, samcích o váze 250–350 g (Charles River, Německo). Experimenty 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). Zvířata byla chována podle podmínek Evropské dohody o ochraně zvířat v konvenčním chovném zařízení s 12/12 světelným cyklem a volným přístupem k vodě a krmným peletám. Všechny chirurgické zákroky byly prováděny v celkové anestezii vyvolané intramuskulárně aplikovanou směsí ketaminu (Narketan, Vétoquinol S. A., Francie; 1,5 mg/100 g), dexmedetomidinu (Dexdomitor, Orion Pharma, Česká republika; 0,005 mg/100 g) a butorphanolu (Torbugesic Vet, Zoetis, Španělsko; 0,05 mg/100 g).

#### **3.1.2.2. Izolace a kultivace potkaních LO**

Potkaní Langerhansovy ostrůvky byly izolovány pomocí digesce kolagenázou a separace na hustotním gradientu podle obvyklého protokolu publikovaného dříve (Saudek F. et al., 1999). Do hlavního žlučového zvířat v hluboké anestezii (Narketan/Dexdomitor 4:1, 0,065 ml/100 g váhy) byla cestou Vaterské papily zavedena kanyla 24G a po uzavření žlučového v oblasti jaterní branky svorkou byl pankreas naplněn roztokem kolagenázy v HBSS (Sigma-Aldrich, Německo; 1 mg/ml). Po vystřížení byly pankreaty inkubovány cca 18 minut ve vodní lázni při 37 °C a frekvenci třepání 130×/min. Enzymatické trávení bylo zastaveno několikanásobným promytím chladným roztokem HBSS s 1 % FBS a tkáňová suspenze byla přefiltrována přes sítko s póry o velikosti 500 µm. Langerhansovy ostrůvky byly pak od exokrinní tkáně odděleny centrifugací v diskontinuálním hustotním gradientu (Ficoll, Sigma-

Aldrich, Německo) tvořeném vrstvami o hustotě 1.108 g/ml, 1.096 g/ml, 1.069 g/ml a 1.037 g/ml. Purifikované ostrůvky byly uloženy do kultivačního média CMRL-1066 obohaceného o 10 % FBS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamax, 100 U/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu (vše od Sigma-Aldrich, Německo) a uchovány v inkubátoru s 5 % CO<sub>2</sub> atmosférou při 37°C.

### **3.1.2.3. Stanovení viability LO**

Viabilita izolovaných potkaních LO byla v průběhu všech experimentů stanovována pomocí testu integrity buněčné membrány dvojitým fluorescenčním barvením propidium jodidem a akridinovou oranží. Propidium jodid proniká do buněk pouze přes narušenou (permeabilizovanou) membránu, a značí tak nekrotické a pozdně apoptické buňky, v nichž se v jádře váže na DNA. Akridinová oranž naopak prostupuje intaktní membránou a váže se na nukleové kyseliny životoschopných buněk. Obsah inzulínu v potkaních LO byl v průběhu experimentů ověřován pomocí barvení dithizonem.

### **3.1.2.4. Test glukózou stimulované inzulínové sekrece (GSIS)**

Schopnost stimulované sekrece inzulínu u izolovaných potkaních LO byla stanovena pomocí statických inkubací v médiu s rozdílnou koncentrací glukózy. Test byl prováděn u čerstvě izolovaných LO a poté po 6, 24, 48, 72, 96 a 120 hodinách kultivace. Jako médium pro test GSIS byl použit Krebsův-Ringerův hydrogenuhličitanový pufr obohacený o glukózu o nízké (3 mM) nebo vysoké (22 mM) koncentraci. Všechny inkubace byly prováděny při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> v objemu 4 ml. Alikvoty po 20 LO byly umístěny na polyesterové membrány s póry o velikosti 8 µm (Transwell cell culture inserts, Corning, USA) v šestijamkové kultivační desce a poté inkubovány 60 minut v médiu s nízkou koncentrací, vysokou koncentrací a

následně znovu nízkou koncentrací glukózy. Po každé inkubační periodě byl z každé jamky odebrán vzorek média a v něm stanoven obsah inzulínu metodou RIA (Insulin Coated Tube RIA Kit, MP Biomedicals, USA). Po ukončení testu GSIS byly LO z každé jamky promyty PBS, posbírány a zlyzovány pomocí proteinkinázy K, EDTA a SDS (Sigma-Aldrich, Německo). Následně byl v každém alikvotu stanoven celkový obsah DNA pomocí specifického testu k detekci dsDNA (PicoGreen kit, Invitrogen, USA).

### **3.1.2.5. Izolace RNA a reverzní transkripce**

RNA z purifikovaných potkaních LO bez příměsi exokrinní tkáně byla izolována pomocí kitu RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Německo) zahrnujícího kolonku na eliminaci genomové DNA. Koncentrace RNA byla stanovena pomocí kitu Qubit RNA HS Assay Kit (Life Technologies, USA). Čistota RNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop 2000 UV-Vis jako poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm. Kvalita RNA byla stanovena jako RNA Integrity Number (RIN) pomocí kitu Agilent RNA 600 Nano Kit (Agilent Technologies, USA). Tato metoda na základě elektroforetické separace poskytuje informaci o velikosti, množství a kvalitě analyzované RNA. Fixní množství RNA (250 ng) bylo přepsáno reverzní transkripcí do cDNA pomocí kitu High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies, USA) a cDNA byla uskladněna při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do provedení genové expresní analýzy.

### **3.1.2.6. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)**

V prvním experimentu byla vyhodnocena exprese 16 kandidátních referenčních genů (18S rRNA, Actb, Arbp, B2m, Gapdh, Gusb, Hmbs, Hpvt, Pgk1, Ppia, Ppib, Rplp2, Tbp, Tfrc, Ubc, Ywhaz) normalizovaná na množství RNA pomocí 384jamkových mikrofluidních karet TaqMan Rat Endogenous Control Array na

přístroji AbiPrism 7900 (Life Technologies, USA). Celé názvy genů a jejich funkce jsou popsány v **Tabulce 1** (str. 37).

Ve druhém experimentu byla pomocí metody absolutní kvantifikace stanovena exprese genů Gapdh, Ppia, a F3 (tkáňový faktor, GOI). K amplifikaci definovaného segmentu příslušné mRNA byly použity specifické primery pro tyto geny (Gapdh: 50-GTAACCAGGCGTCCGATAC-30, 50-TCTCTGCTCCTCCCTG TTC-30; Ppia 50-CCATTATGGCGTGTGAAGTC-30, 50-GCAGACAAAGTTCCA AAGACAG-30; F3: 50-GATAAAGACAGTGACCAGGAACA-30, 50-CTAACCA CAAGAGCCC-AGAA-30) od firmy Integrated DNA Technologies (IDT, USA). Amplifikované úseky mRNA byly separovány na 2 % agarózovém gelu a purifikovány pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Německo). Koncentrace DNA byla stanovena pomocí Qubit DNA Assay Kit (Life Technologies, USA). Purifikovaná DNA byla použita k sestavení kalibračních křivek. Jako templát pro amplifikaci DNA byla použita mRNA získaná z purifikovaných LO 72 h po izolaci. Absolutní kvantifikace genové exprese Gapdh, Ppia a F3 byla provedena na Real-Time PCR Systému ViiA™ 7 (Applied Biosystems, USA) s použitím PrimeTime1 qPCR probe based gene expression assays (IDT, USA).

**Tabulka 1:** Symboly, názvy a funkce 16 kandidátních referenčních genů.

Symbol	Název genu	Funkce genu
18S rRNA	18S ribozomální RNA	Ribozomální podjednotka
Actb	β-aktin	Cytoskeletální strukturní protein
Arbp	Kyselý ribozomální fosfoprotein PO	Ribozomální strukturní protein/ vazba nukleových kyselin
B2m	β-2-mikroglobulin	Hlavní histokompatibilní komplex
Gapdh	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza	Glykolytický enzym
Gusb	β-glukuronidáza	Exoglykosidáza v lysozomech
Hmbs	Hydroxymethylbilansyntáza	Biosyntéza hemu
Hprt	Hypoxantinguaninfosforibosyl- transferáza	Metabolická recyklace purinů
Pgk1	Fosfoglycerátkináza 1	Glykolytický enzym
Ppia	Peptidylprolylisomeráza A (cyklofilin A)	Skládání proteinů
Ppib	Peptidylprolylisomeráza B (cyklofilin B)	Skládání proteinů
Rplp2	Velký ribozomální protein P2	Biosyntéza proteinů
Tbp	TATA box vážící protein	Obecný transkripční faktor
Tfrc	Transferinový receptor	Buněčná absorpce železa
Ubc	Ubikvitin C	Katabolismus proteinů
Ywhaz	Protein zeta aktivující tyrosin 3- /tryptofan 5-monooxygenázu	Specifická vazba proteinových domén

### 3.1.2.7. Analýza dat a statistické metody

Data z genové exprese byla vyhodnocena pomocí softwaru RQ Manager (Applied Biosystems, USA) a ViiA™ (Thermo Fisher Scientific, USA). Absolutní kvantifikace cDNA byla vyhodnocena na základě příslušných kalibračních křivek. Stabilita jednotlivých referenčních genů byla vyhodnocena pomocí programu GeNorm dostupného volně na <https://genorm.cmgg.be/>. K porovnání genové exprese v jednotlivých časových bodech (0, 24, 48, 72, 96 and 120 hodin kultivace) byly použity Friedmanův test (dvoucestná ANOVA) a metoda mnohonásobného porovnání. Rozdíly byly vyhodnoceny jako statisticky významné na hladině pravděpodobnosti  $p < 0,05$ .



### 3.1.3. VÝSLEDKY

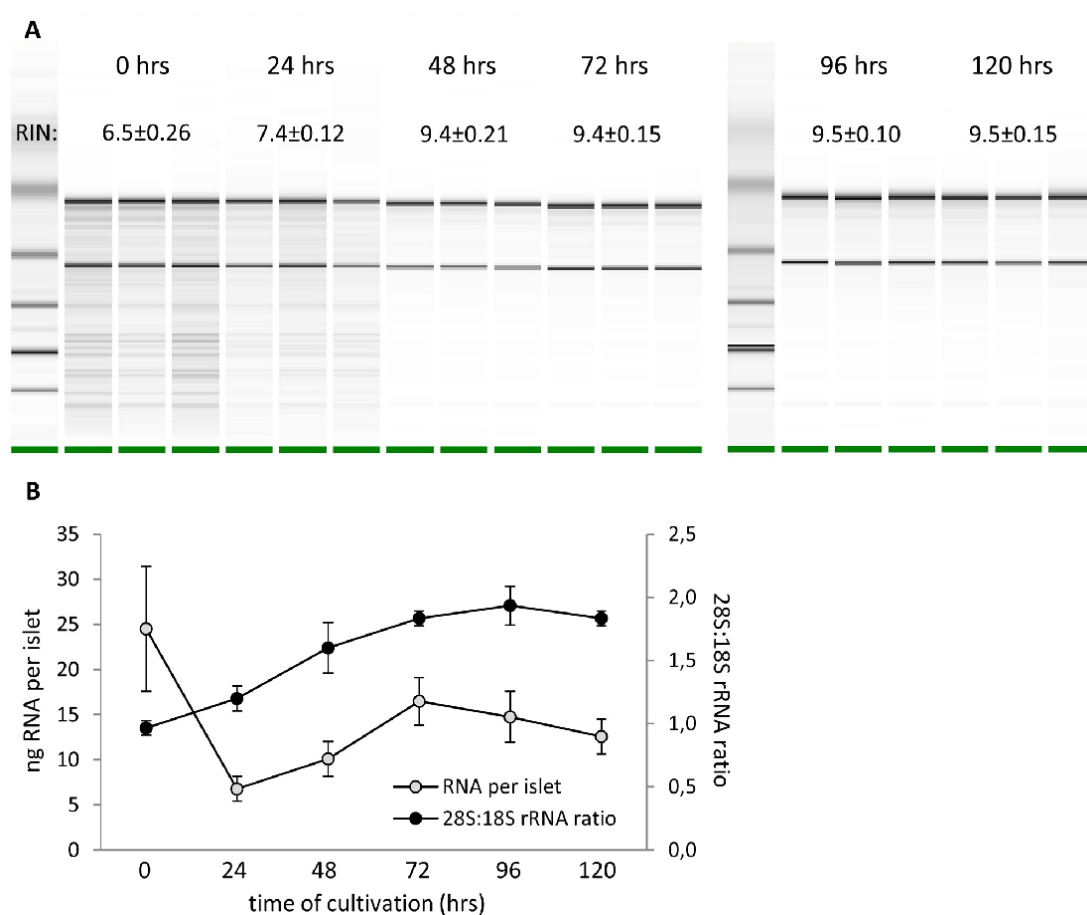
#### 3.1.3.1. Analýza kvality RNA

Čistota RNA stanovená jako poměr absorbance při 260 a 280 nm byla  $\geq 1,97$  u všech vzorků, což značí jejich vysokou čistotu (poměr absorbancí se u nekontaminovaných vzorků pohybuje mezi hodnotami 1,8 a 2,0). Integrita RNA byla určena pomocí parametru RNA Integrity Number (RIN), který hodnotí degradaci RNA na škále od 1 (nejvíce degradovaná RNA) do 10 (intaktní RNA). RIN se u všech vzorků pohyboval v rozmezí 6,5–9,5, což značí dobrou kvalitu RNA vhodnou pro analýzu. Nejhorší kvalitu mezi vzorky prokázala RNA získaná z čerstvě izolovaných LO (RIN  $6,5 \pm 0,26$ ). Po 24 h kultivace se kvalita RNA zjevně zvýšila (RIN  $7,4 \pm 0,12$ ) a po dalších 24 h (od 48 h kultivace dále) již RNA vykazovala stabilně vysokou kvalitu s RIN 9,4–9,5 až do konce kultivačního období (120 h). Elektroforeogramy separace RNA s příslušnou hodnotou RIN jsou zobrazeny na **Obrázku V1 A** (str. 39). Dalším parametrem integrity RNA je poměr zastoupení 28S a 18S rRNA, který v ideálním případě nabývá teoretické hodnoty 2,0 (= intaktní RNA). Tento poměr stoupl z hodnoty 1,0, která značí velmi fragmentovanou RNA, v čase 0 h, až na hodnotu 1,9 a 1,8, které značí jen velmi málo fragmentovanou RNA, v čase 96 h resp. 120 h. Nejvyšší výtěžek RNA na jeden ostrůvek byl zjištěn v čase 0 h, poté prudce klesl během následujících 24 hodin a poté opět stoupl až do 72 hodin po izolaci (**Obrázek V1 B**, str. 39).

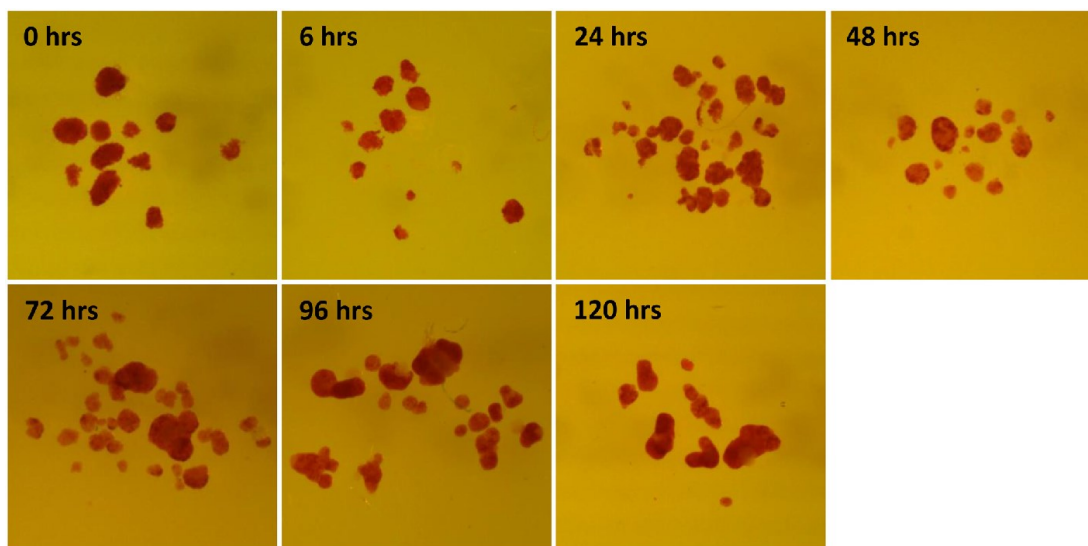
#### 3.1.3.2. Metabolická charakterizace LO

Viabilita izolovaných potkaních LO byla v průběhu všech experimentů 90 % a více. Barvení dithizonem potvrdilo neporušenou produkci inzulínu v průběhu celé doby kultivace LO (**Obrázek V2**, str. 40). Schopnost stimulované sekrece inzulínu

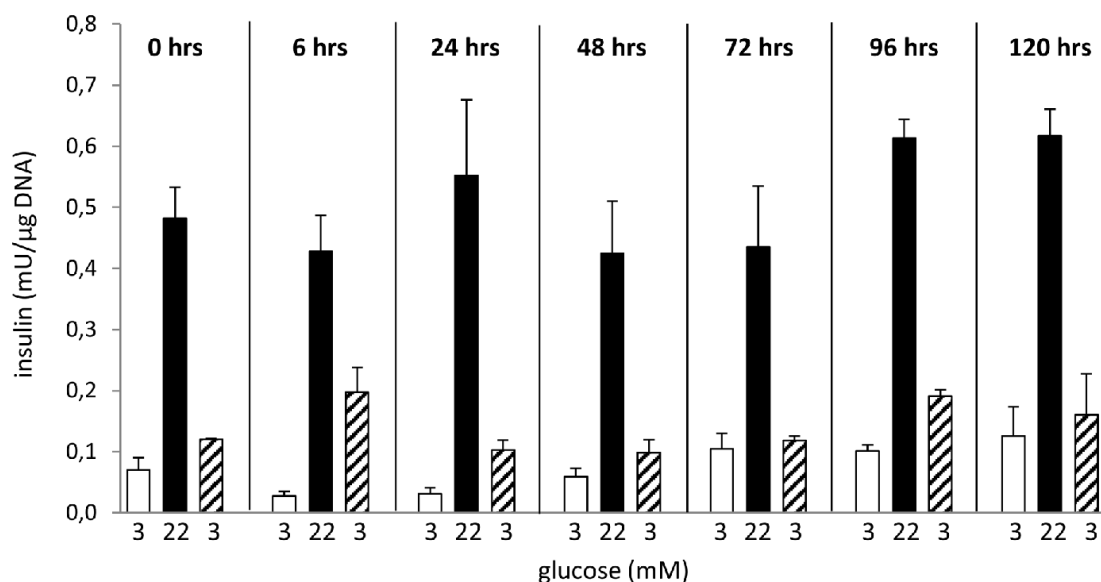
stanovená pomocí testu GSIS se v průběhu kultivace výrazně neměnila (**Obrázek V3**, str. 40). Stimulační index neboli poměr bazální a stimulované sekrece inzulínu byl nejvyšší v čase 6 h ( $16 \pm 2,5$ ) a 24 h ( $19 \pm 5,3$ ) po izolaci. Z absolutních hodnot je však patrné, že tyto hodnoty odrážejí spíše nízkou bazální hladinu inzulínu nežli zvýšenou glukózou stimulovanou sekreci. Od 48 h do 120 h dále byl stimulační index poměrně stabilní a dosahoval hodnoty  $6,1 \pm 2,0$ .



**Obrázek V1:** Množství a kvalita RNA. **A:** Elektroforeogramy separace RNA izolované z LO v různých časech kultivace. RIN = RNA integrity number. **B:** Množství RNA na jeden LO a poměr 28S:18S rRNA v týchž vzorcích.



**Obrázek V2:** Přítomnost inzulinu v buňkách Langerhansových ostrůvků v různých časech kultivace stanovený pomocí barvení dithizonem.



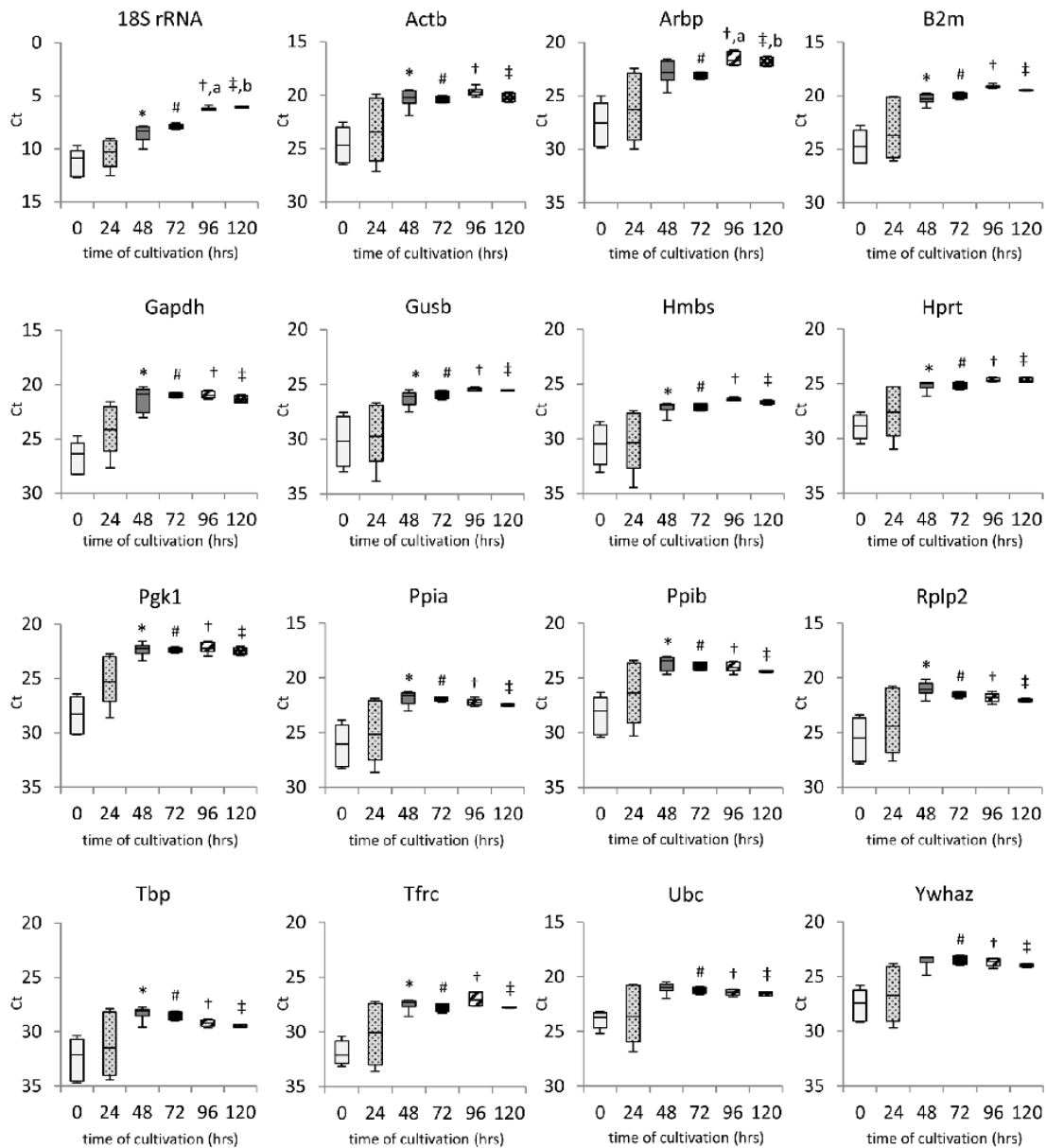
**Obrázek V3:** Vliv délky kultivace na glukózou stimulovanou inzulinovou sekreci (GSIS) u Langerhansových ostrůvků *in vitro*. GSIS byla testována při inkubaci v nízké, vysoké a opět nízké koncentraci glukózy (3 mM, 22 mM a 3 mM). Data jsou uvedena jako průměr ( $n=6$ )  $\pm$  SD.

### 3.1.3.3. Stanovení exprese kandidátních referenčních genů

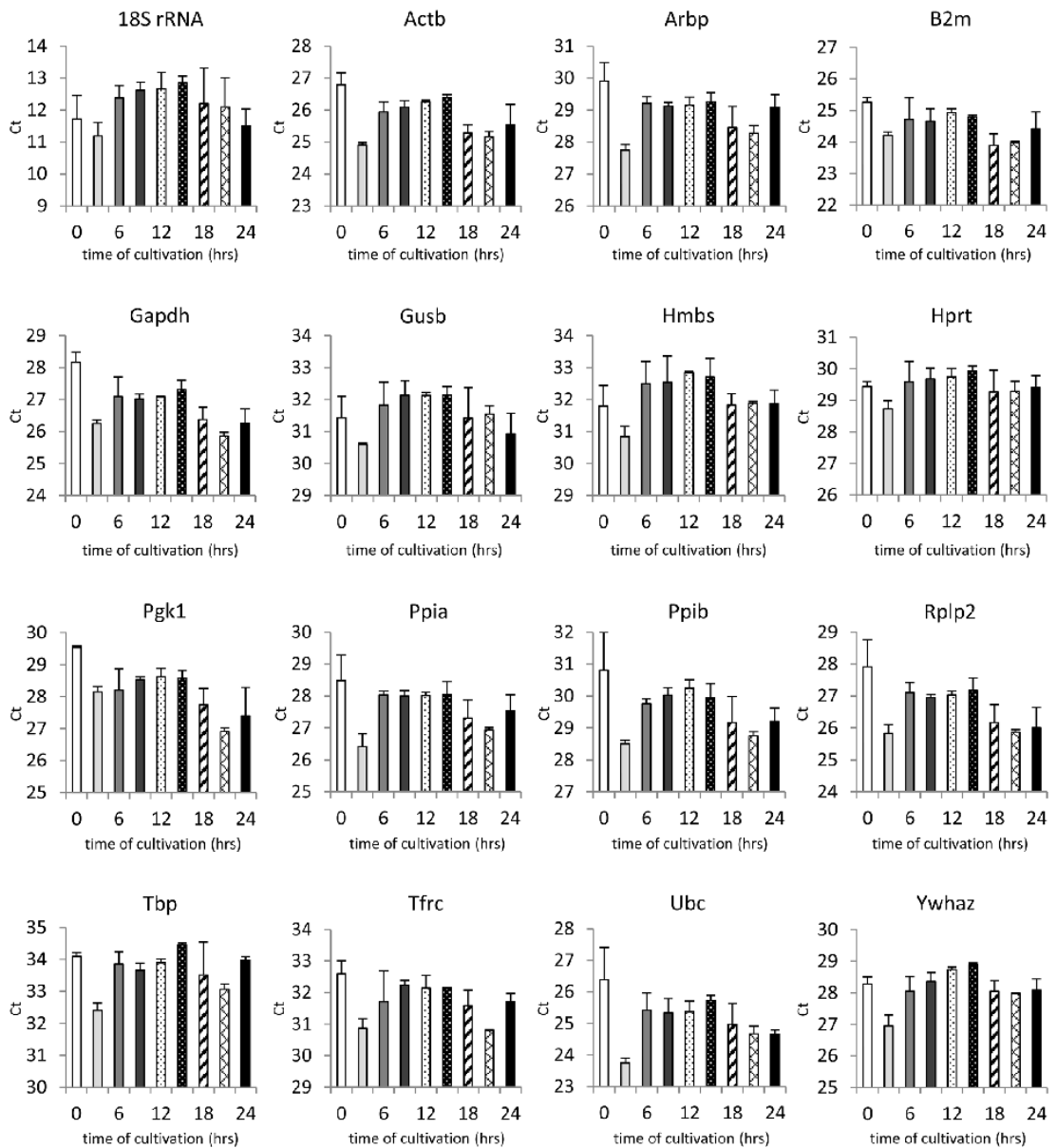
Základním požadavkem referenčního genu je jeho stabilní exprese v buňce v průběhu celého experimentu. Abychom zjistili, jaký vliv má na expresi běžně používaných referenčních genů proces izolace a následné kultivace Langerhansových ostrůvků, byla stanovena exprese 16 kandidátních referenčních genů v časech 0, 24,

48, 72, 96 a 120 h po izolaci. Z **Obrázku V4** (str. 42) je patrné, že žádný z testovaných genů nesplnil kritéria stabilní exprese v průběhu měřeného období. Množství specifické mRNA je vyjádřeno jako Ct (z angl. *threshold cycle*, prahový cyklus), tedy cyklus PCR, při kterém signál překročí prahovou hodnotu. Čím nižší je hodnota Ct, tím větší množství mRNA je přítomno v testovaném vzorku. U všech genů bylo množství specifické mRNA po izolaci velice nízké a během prvních 48 hodin kultivace se prudce zvýšilo. Během 72 hodin kultivace došlo průměrně k 15x nárůstu množství specifické mRNA (od 5,8x u 18S rRNA až po 43,1x u Pgk1), přičemž asi 90 % nárůstu proběhlo právě během prvních 48 hodin. V době od 72 do 120 hodin kultivace pak naopak došlo k výrazné stabilizaci hladiny mRNA u všech testovaných genů s relativní změnou exprese průměrně 1,5x. Významné změny v hladině mRNA v období 48–120 hodin byly pozorovány pouze u genů 18S rRNA a Arbp. Variabilita (rozptyl hodnot) v množství specifické mRNA byla velice vysoká u vzorků v časech 0 a 24 h a výrazně se snížila po 48 hodinách kultivace.

Za účelem zmapování exprese kandidátních referenčních genů v časně době po izolaci LO byla stanovena jejich exprese na úrovni mRNA v nezávislém experimentu v čase 0–24 hodin po izolaci každé 3 h. Bylo zjištěno, že exprese všech testovaných genů vykazuje podobný průběh (**Obrázek V5**, str. 43). Množství specifické mRNA je nejnižší po izolaci, poté dochází v čase 3 h k nárůstu a následně opět k poklesu a relativní stabilizaci v čase od 6 h do 15 h. Doba mezi 18 a 24 h je charakterizována vysokou variabilitou a značnými výkyvy v expresi mRNA mezi jednotlivými geny i časy.



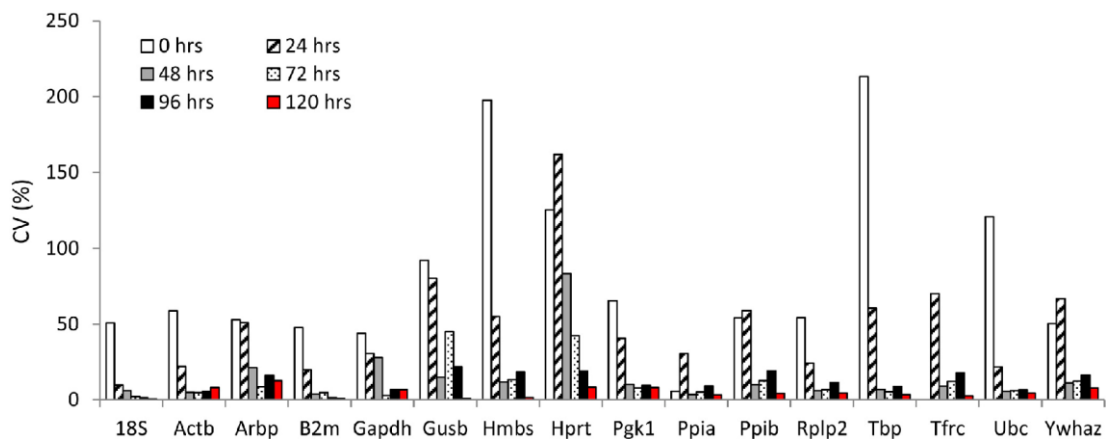
**Obrázek V4:** Expres 16 kandidátních referenčních genů v průběhu kultivace. Ct (z angl. *threshold cycle*, prahový cyklus) jednotlivých genů v různých časech kultivace jsou zobrazeny jako mediány (horizontální linie), 1.–3. kvantil (boxy) a variační rozpětí (vousy). Data jsou založena minimálně na 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 V5:** Expres kandidátních referenčních genů v průběhu prvních 24 hodin kultivace. Hodnoty Ct (z angl. threshold cycle, prahový cyklus) jednotlivých genů v různých časech jsou zobrazeny jako průměr ( $n = 6$ )  $\pm$  SD. Výsledky jsou založeny na dvou nezávislých experimentech.

Změna exprese genu v průběhu experimentu ještě nevyklučuje jeho použití jako referenčního genu pro relativní kvantifikaci genové exprese, a to v případě, že  $\Delta Ct_{(GOI-RG)}$  je v konkrétním bodě pro danou kombinaci studovaného genu (GOI) a referenčního genu (RG) konstantní. **Obrázek V6** (str. 44) zobrazuje variační koeficient CV (%) rozdílu exprese GOI (zde F3) a jednotlivých referenčních genů v různých časech

kultivace. V časech 0 a 24 h je  $\Delta Ct_{(GOI-RG)}$  velmi variabilní a variační koeficient kolísá o stovky % u všech testovaných genů. Naopak od 48 hodin kultivace dále se exprese výrazně stabilizuje a  $\Delta Ct_{(GOI-RG)}$  zůstává konstantní s variačním koeficientem nepřekračujícím jednotky %. Výsledky naznačují, že genová exprese v LO je významně narušená procesem izolace a k její celkové stabilizaci dochází po 48 hodinách kultivace.

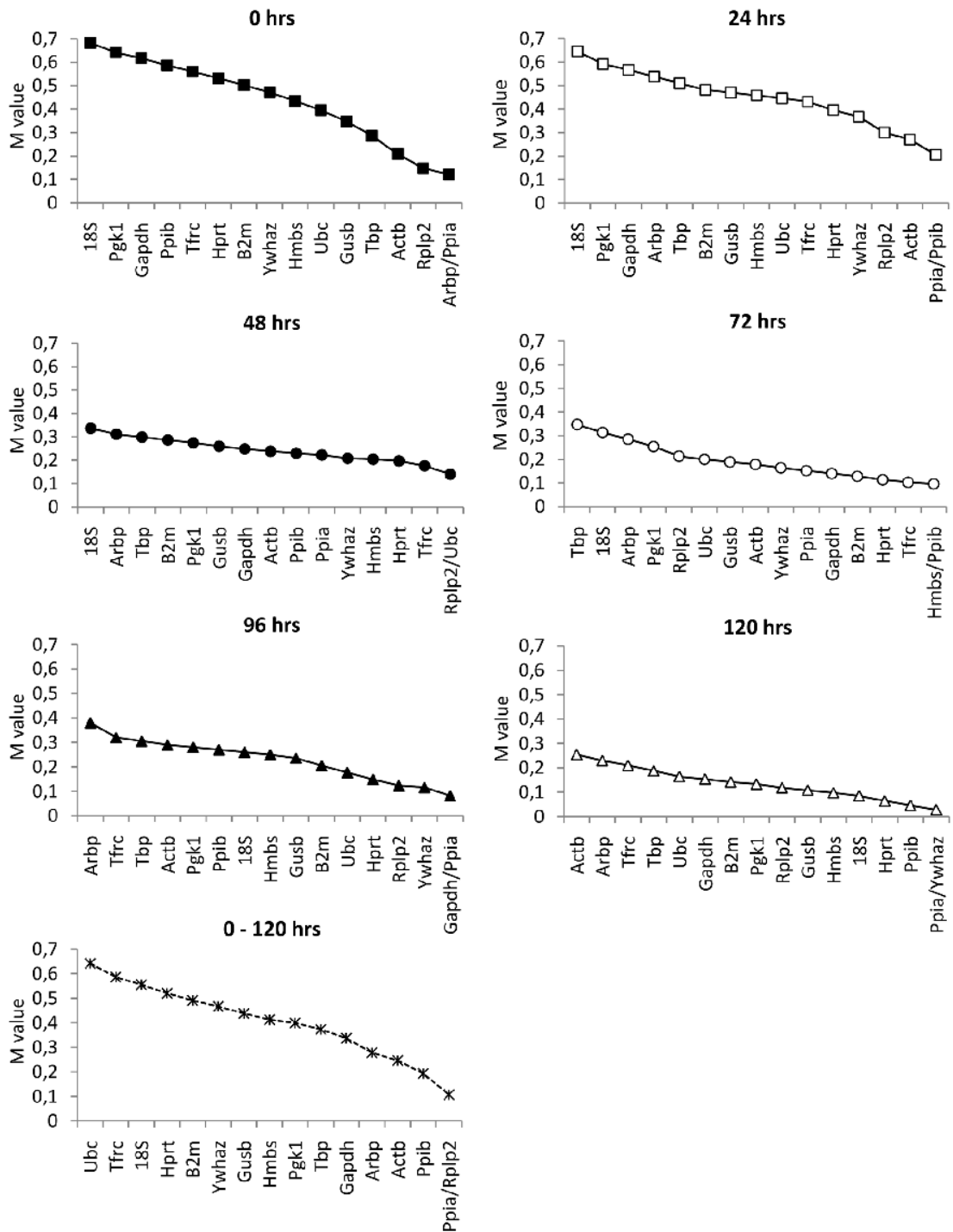


**Obrázek V6:** Variační koeficient CV (%) rozdílu exprese vybraného genu (gene of interest, GOI; zde F3) a jednotlivých referenčních genů (RG)  $\Delta Ct_{(GOI-RG)}$  v různých časech kultivace LO. Data jsou založena na 6 nezávislých experimentech.

### 3.1.3.4. Stabilita referenčních genů během kultivace LO

Existuje několik metod, které se používají k určení nejvíce stabilních genů a/nebo jejich kombinací v průběhu experimentu. Algoritmus využívaný softwarem GeNorm umožňuje vypočítat míru stability genů  $M$  jako průměrnou párovou variaci  $V$  mezi jedním určitým genem a všemi ostatními kandidátními geny. Geny s nejnižší hodnotou  $M$  vykazují nejstabilnější expresi. **Obrázek V7** (str. 45) zobrazuje hodnoty  $M$  jednotlivých genů vypočtené pomocí softwaru GeNorm v časech 0, 24, 48, 72, 96 a 120 hodin kultivace a dále v průběhu celé doby kultivace (0–120 h). Spíše překvapivě leží všechny hodnoty  $M$  pod „hranicí nestability“ ( $M = 1,5$ ). Na druhou stranu se však

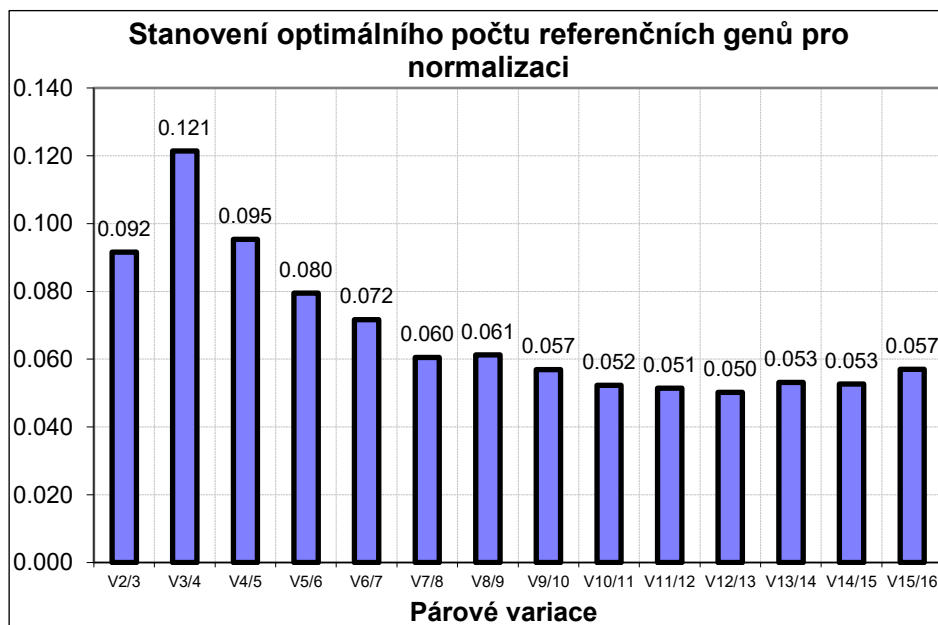
nepodařilo najít žádnou dvojici genů, která by vykazovala stejnou stabilitu exprese ve všech časech kultivace.



**Obrázek V7:** Stabilita exprese kandidátních referenčních genů během kultivace určená pomocí softwaru GeNorm. Hodnota  $M$  vyjadřuje průměrnou míru stability referenčního genu v každé možné kombinaci s ostatními geny v multiplexu vždy po vyloučení nejméně stabilního genu. Čím nižší je hodnota  $M$ , tím stabilnější je exprese daného genu vůči ostatním genům v multiplexu.



Analýza párových variací (**Obrázek V8**) nepotvrdila význam zahrnutí více než dvou referenčních genů, neboť hodnota  $V$  po zahrnutí třetího i dalších genů leží pod doporučenou mezní hodnotou 0,15.



**Obrázek V8:** Stanovení optimálního počtu referenčních genů pro normalizaci pomocí párové variace. Každý sloupec označuje párovou variaci  $V(x/y)$  při zahrnutí  $y$ -tého genu k původnímu počtu  $x$  genů. Doporučená mezní hodnota  $V$  pro zahrnutí třetího a dalších genů je 0,15, v daném experimentálním uspořádání se tedy nepotvrdil praktický význam zahrnutí více než dvou referenčních genů.

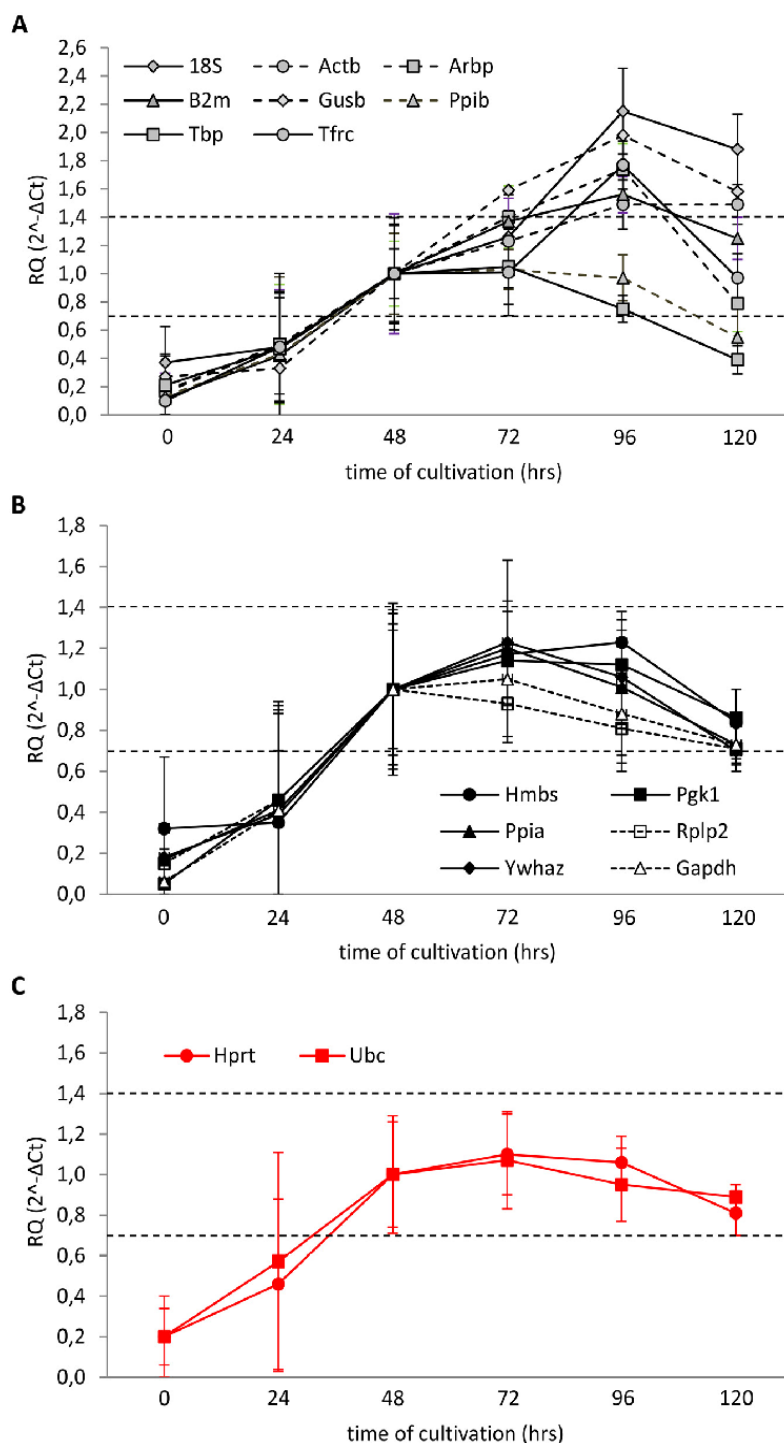
Další přístup ke stanovení vhodné endogenní kontroly říká, že exprese referenčního genu by se neměla v průběhu celého experimentu lišit u kontroly a experimentálních vzorků o více než 0,5 cyklu ( $\Delta Ct \leq 0,5$ ). Abychom mohli vyhodnotit kandidátní referenční geny podle tohoto kritéria, převedli jsme data z  $\Delta Ct$  na „násobné změny exprese“ pomocí metody  $2^{-\Delta Ct}$ . V takovém případě  $\Delta Ct$  o velikosti  $-0,5 Ct$  odpovídá 0,7násobku a  $+0,5 Ct$  a 1,4násobku exprese daného genu. Jelikož se genová exprese všech testovaných genů v našem experimentálním uspořádání stabilizovala po 48 hodinách kultivace, určili jsme expresi v čase 48 h jako kalibrátor. Za daných podmínek žádný z testovaných genů nesplnil podmínku  $\pm \Delta Ct$  v průběhu celé doby

kultivace, resp. v časech 0 a 24 h (**Obrázek V9**, str. 48). Pokud vezmeme v úvahu pouze kultivační dobu od 48 hodin dále, průměrná exprese osmi z testovaných genů (18S, Actb, Arbp, B2m, Gusb, Ppib, Tbp, Tfrc) ležela mimo oblast  $\pm 0,5 \Delta Ct$  alespoň v jednom bodě (**Obrázek V9 A**, str. 48). U šesti genů (Gapdh, Hmbs, Pgk1, Ppia, Rplp2, Ywhaz) průměrná exprese v období 48–120 hodin kultivace splňovala kritérium  $\pm 0,5 \Delta Ct$ , ale z důvodu variability mezi jednotlivými vzorky ve skupině spadají některé hodnoty mimo interval (**Obrázek V9 B**, str. 48). Pouze dva geny (Hprt a Ubc) splňovaly podmínku  $\pm 0,5 \Delta Ct$  včetně rozptylu hodnot jednotlivých vzorků v rámci skupiny (**Obrázek V9 C**, str. 48).

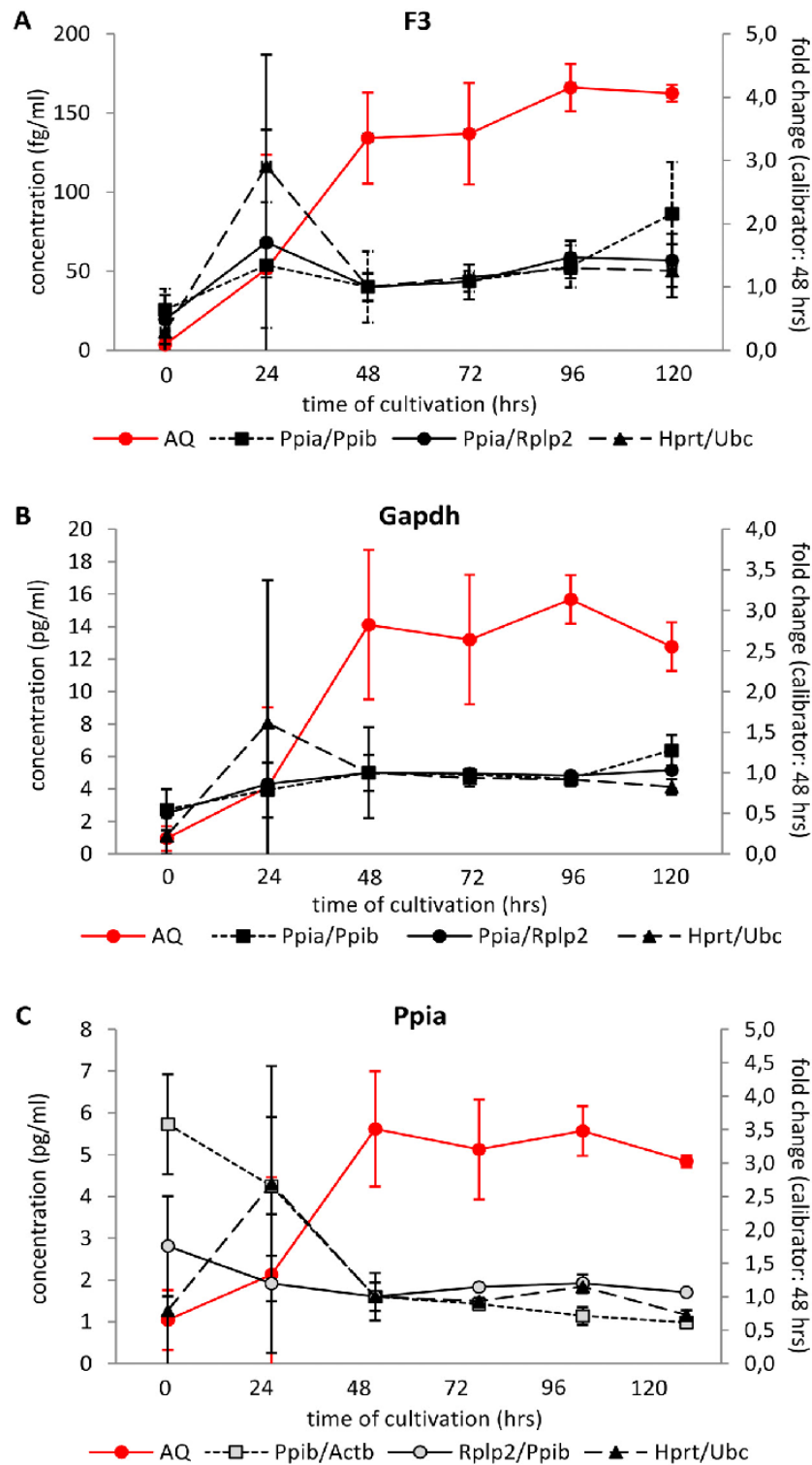
### 3.1.3.5. Srovnání metody relativní a absolutní kvantifikace genové exprese v izolovaných LO

Abychom ověřili spolehlivost relativní kvantifikace genové exprese v izolovaných LO v různých fázích kultivace, použili jsme metodu  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , kde jsme jako kalibrátor zvolili expresi v čase 48 h. Následně jsme vypočítali expresi tří vybraných genů (GOI) s použitím tří různých kombinací referenčních genů, a to: 1) nejstabilnější dvojice genů identifikované pomocí softwaru GeNorm v čase 24 h; 2) nejstabilnější dvojice genů identifikované pomocí softwaru GeNorm během celé doby kultivace, tedy v čase 0–120 h; 3) nejstabilnější dvojice referenčních genů identifikované pomocí pravidla  $\pm 0,5 \Delta Ct$ . Tyto výsledky jsme porovnali s údaji získanými pomocí absolutní kvantifikace, kde je množství specifické mRNA stanoveno z kalibrační křivky sestavené pro daný transkript (**Obrázek V10**, str. 49). Jako studované geny jsme vybrali Gapdh, jako jeden z nejčastěji používaných referenčních genů; Ppia, stanovený jako jeden z nejstabilnějších genů v našem

experimentálním uspořádání; a F3, gen pro tkáňový faktor, který je předmětem našeho výzkumu.



**Obrázek 9:** Stabilita exprese kandidátních referenčních genů v průběhu kultivace stanovena pomocí pravidla  $\pm 0,5 \Delta Ct$ . Data jsou zobrazena jako průměr  $\pm$  SD ( $n = 6$ ). Přerušované čáry indikují interval 0,7 až 1,4násobku změny genové exprese vzhledem k hodnotám v čase 48 h. **A)** Geny s průměrnou expresí v období 48–120 h mimo oblast  $\pm 0,5 \Delta Ct$ . **B)** Geny s průměrnou expresí v období 48–120 h v oblasti  $\pm 0,5 \Delta Ct$  s některými hodnotami (rozptyl ve skupině) mimo interval. **C)** Geny splňující podmínku  $\pm 0,5 \Delta Ct$  včetně rozptylu hodnot v rámci skupiny.



**Obrázek V10:** Relativní (černá) a absolutní (červená) kvantifikace exprese F3, Gapdh a Ppia v izolovaných LO během kultivace *in vitro*. Relativní kvantifikace byla vypočtena pomocí metody  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  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  $\pm 0,5 \Delta Ct$  (Hprt/Ubc). V případě použití Ppia jako GOI byl jako referenční gen použit další nejstabilnější gen (Ppib/Actb pro 24 h, Rplp2/Ppia pro 0–120 h).

Absolutní kvantifikace prokázala u všech tří sledovaných genů (GOI) stejný průběh exprese, která byla po izolaci LO velice nízká a poté stoupala až do času 48 h, kdy se stabilizovala a zůstala relativně stabilní až do konce kultivace (120 h). Tyto výsledky souhlasí s průběhem exprese kandidátních referenčních genů získaných v předchozích experimentech (**Obrázek V4**, str. 42). Metoda relativní kvantifikace naopak nedokázala prakticky vůbec reflektovat změny v genové expresi studovaných genů zjištěné během prvních 48 hodin kultivace pomocí absolutní kvantifikace a ukázala se tak být velmi nespolehlivá nehledě na kombinaci použitých referenčních genů. V intervalu 48–120 hodin již relativní kvantifikace fungovala a v podstatě kopírovala expresi genů stanovenou pomocí absolutní kvantifikace. Obě metody odhalily enormní variabilitu genové exprese v čase 24 h.

Výsledky potvrzují naši hypotézu, že vzhledem k velmi nestabilní a zároveň utlumené expresi na úrovni mRNA u všech testovaných genů v čase 0 a 24 h nepředstavuje relativní kvantifikace genové exprese v časné fázi po izolaci LO spolehlivou metodu pro genovou expresní analýzu. Relativní kvantifikace během prvních 48 hodin kultivace LO nereflektuje reálné změny v koncentraci mRNA a je možné ji použít až po uplynutí této doby.

Absolutní kvantifikace exprese genu pro tkáňový faktor odhalila, že stejně jako u ostatních testovaných genů dochází po izolaci LO k jeho výraznému utlumení a během následujících 48 hodin kultivace pak k obnově exprese a ustálení hladiny mRNA, která je více než 10x vyšší než po izolaci. Tohoto zjištění lze využít při transplantaci LO, kdy by v důsledku snížené hladiny tkáňového faktoru v buňkách LO mohlo být docíleno nižší intenzity nespecifické tromboticky-zánětlivé reakce IBMIR.

### **3.1.3.6. Výběr vhodné endogenní kontroly pro genovou expresní analýzu v izolovaných LO**

Jak vyplývá z našich výsledků, během prvních 48 hodin po izolaci LO je exprese běžně užívaných referenčních genů velmi nestálá, data získaná během této doby pomocí relativní kvantifikace tak nereflktují skutečné změny v expresi genů a výpočty s nimi spojené mohou vést k mylným zjištěním a nesprávné interpretaci výsledků. Z tohoto důvodu je vhodné provádět genové expresní studie až po uplynutí této doby, kdy se exprese genů výrazně stabilizuje a relativní kvantifikace poskytuje spolehlivé výsledky. Vzhledem k tomu, že exprese všech námi testovaných genů sledovala v průběhu celého experimentu stejný trend, dá se předpokládat, že k normalizaci genové exprese od 48 hodin kultivace dále postačí jediný referenční gen. Pro naše následné experimenty zaměřené na potlačení exprese tkáňového faktoru jsme zvolili jako nejvhodnější kontrolní gen Ppia, který byl vyhodnocen softwarem GeNorm jako jeden z nejstabilnějších během celé sledované periody. Zároveň jsme si ověřili průběh jeho exprese pomocí absolutní kvantifikace. Exprese Ppia se jevila ve srovnání s ostatními geny jako poměrně stabilní i během prvních 24 hodin po kultivaci a také variační koeficient CV (%) rozdílu exprese Ppia a studovaného genu pro tkáňový faktor (F3) byl ve všech časech (kromě času 24 h po izolaci) velmi nízký. Dalšími vhodnými kandidátskými geny mohou být např. Ppib, Rplp2 nebo Ubc, vždy však až po uplynutí 48 hodin od izolace LO.

### 3.1.4. DISKUZE

RT-qPCR je široce rozšířená metoda pro kvantitativní stanovení genové exprese v biologických vzorcích, která je však také velmi náchylná k mnohým nedokonalostem a technickým chybám. Tyto problémy mohou být vyřešeny pomocí normalizace, tj. zahrnutí neměnné endogenní kontroly, a to jak ke korekci variability účinnosti RT-qPCR mezi jednotlivými vzorky, tak i chyby v kvantifikaci vzorků. Základním požadavkem však zůstává stálá exprese vybrané endogenní kontroly (referenčního genu), která není ovlivněná experimentálními podmínkami použitými v dané studii (Dheda K. et al., 2004 a 2005, Thellin O. et al., 1999).

V našem experimentu jsme zjistili, že ihned po izolaci Langerhansových ostrůvků je exprese všech kandidátských referenčních genů velmi nízká v porovnání s hladinou exprese 48 hodin po izolaci (5x až 40x nižší, průměrně 13,5x). To je pravděpodobně způsobeno ischemickým, mechanickým, osmotickým a oxidativním stresem, kterému jsou ostrůvky vystaveny během izolace (Ihm S. H. et al., 2009). Jak již bylo popsáno dříve, během procesu izolace dochází v buňkách LO k závažným změnám struktury a funkce, které mají za následek apoptózu beta buněk, ať už jako důsledek hypoxie, narušení přirozeného mikroprostředí, nebo nedostatku růstových faktorů (Rosenberg L. et al., 1999, Ilieva A. et al., 1999, Wang R. N., Rosenberg L., 1999). Zároveň izolační procedura silně indukuje stresové signalizační dráhy, kultivace izolovaných ostrůvků po dobu 48 hodin však vede k návratu takto aktivovaných drah ke klidovým hodnotám (Abdelli S. et al., 2004).

Důkazy o stresu buněk LO během izolace podporují i naše data týkající se integrity (degradace) RNA, která může taktéž výrazně ovlivnit výsledky RT-qPCR analýzy. Z čísel RIN a příslušných elektroforeogramů (**Obrázek V1**, str. 39) je patrné,

že RNA izolovaná z ostrůvků ihned po izolaci a po 24 hodinách kultivace vykazuje značnou fragmentaci (RIN  $6.5 \pm 0.26$  a  $7.4 \pm 0.12$ ), zatímco RNA získaná z ostrůvků kultivovaných 48 hodin a více je téměř intaktní (RIN  $\geq 9,4$ ). Dalším parametrem odrážejícím degradaci RNA je poměr 28S:18S rRNA, který byl nízký v čerstvě izolovaných ostrůvcích (1,0) a následně během kultivace rostl a stabilizoval se na 1,8–1,9. Celkové množství RNA získané z jednoho ostrůvku bylo nejvyšší v čerstvě izolovaných ostrůvcích, následně prudce kleslo na minimální hodnotu 24 hodin po izolaci a dále pak znovu stoupalo. Všechna tato pozorování můžeme vysvětlit spuštěním degradačních procesů v důsledku stresu, kterému jsou ostrůvky vystaveny v průběhu izolace (Abdelli S. et al., 2004). Tyto mechanismy pravděpodobně vedou obecně ke zničení RNA v průběhu prvních 24 hodin po izolaci, což má za následek prudký pokles množství RNA. V buněčné kultuře, kde již stresové signalizační dráhy nejsou nadále stimulovány, dochází k pozvolnému obnovení obsahu RNA a stav ostrůvků se zlepšuje. Po 48 hodinách již nejsou patrné žádné známky degradace RNA (**Obrázek V1**, str. 39).

Z našich výsledků dále vyplývá, že během prvních 48 hodin kultivace dochází k významnému kolísání v expresi všech 16 testovaných kandidátských genů, zatímco od 48 hodin následuje její výrazná stabilizace. Především v čase 24 hodin po izolaci byla exprese všech testovaných genů extrémně variabilní, a to i mezi vzorky, u kterých se předpokládalo, že jsou homogenní. Na rozdíl od toho po 48 hodinách kultivace se Ct hodnoty u většiny genů stabilizovaly s minimální variabilitou mezi vzorky. Toto zjištění zpochybňuje biologickou relevanci genových expresních studií v průběhu prvních 48 hodin kultivace izolovaných Langerhansových ostrůvků *in vitro*.

Pro výběr vhodné endogenní kontroly existuje mnoho metod. „Empirický“ přístup je založen na výběru genů s robustní expresí, jako je např. Gapdh, B2m nebo



18S rRNA, které byly úspěšně využívány v semi- nebo nekvantitativních metodách, jako je Northern blot, pomocí nejž se zjišťují kvalitativní změny (Huggett J. et al., 2005). I přesto, že existuje mnoho důkazů o tom, že exprese těchto genů může být významně ovlivněna rozdílnými podmínkami (Dheda K. et al., 2004, Rodriguez-Mulero S., Montanya E. 2005, Bas A. et al., 2004, Arsenijevic T., 2012), stále jsou velmi často využívány v genových expresních studiích prováděných na izolovaných ostrůvcích (Bas A. et al., 2004, Schmittgen T. D., 2000). Také v našem experimentu se ukázalo, že některé z těchto genů (např. 18S rRNA) jsou poměrně nestabilní (**Obrázek V4**, str. 42, **V7**, str. 45, a **V9**, str. 48).

Jiný přístup je založen na vyhodnocení stability referenčních genů za určitých experimentálních podmínek. Podle Gorzelniaka a spol. (Gorzelniak K. et al., 2001) jsou rozdíly  $\Delta Ct < 0,5$  mezi experimentálním a kontrolním vzorkem způsobeny technickou variabilitou metody a budou se pravděpodobně odrážet v expresi referenčního i studovaného genu podobně. Naopak změny  $\Delta Ct > 1,0$  odrážejí změny v míře genové exprese a vypovídají o tom, že exprese referenčního genu je ovlivněna experimentálními podmínkami. V našem experimentu se hodnoty  $\Delta Ct$  v prvních 48 hodinách po izolaci ostrůvků pohybovaly v rozmezí 2,3–5,3, což znamená, že použití jakéhokoliv z 16 testovaných genů jako endogenní kontroly je nevhodné a vede k chybným výsledkům. Nicméně od 48 hodin kultivace dále se u osmi potenciálních referenčních genů (Gapdh, Hmbs, Hprt, Pfkfb3, Ppia, Rplp2, Ubc, Ywhaz) exprese stabilizovala v požadovaném intervalu  $\pm 0,5 \Delta Ct$ . Přestože se exprese genů v periodě 48–72 hodin mírně měnila, variabilita mezi vzorky v rámci jedné skupiny se výrazně snížila (**Obrázek V4**, str. 42, a **V6**, str. 44).

GeNorm je softwarový nástroj, který byl vyvinut pro stanovení stability genové exprese na základě nenormalizovaných dat (Vandesompele J. et al., 2002). Algoritmus

umožňuje vypočítat míru genové stability  $M$  jako průměrnou párovou variaci ( $V$ ) mezi konkrétním genem a všemi ostatními kandidátskými geny. V rozporu s našimi zjištěními všechny hodnoty  $M$  vypočtené GeNormem leží pod doporučenou mezní hodnotou 1.5 (přičemž nižší hodnota indikuje vyšší stabilitu), což znamená, že libovolná kombinace dvou testovaných genů by měla být dostatečně stabilní pro použití jako vnitřní kontrola (**Obrázek V8**, str. 46). Tento rozpor může být vysvětlen mechanismem výpočtu používaným algoritmem GeNorm, který vyhodnocuje stabilitu každé kombinace dvou genů v multiplexu vždy po vyřazení nejméně stabilního genu na základě hodnoty  $M$ , dokud nezbydou dva geny s nejstabilnějším poměrem exprese. Jelikož exprese všech testovaných genů sleduje v průběhu 48 hodin po izolaci stejný trend, poměr mezi každými dvěma srovnávanými geny se může jevit jako stabilní. To také vysvětluje, proč na základě výpočtu párové variace není třeba zahrnout více než 2 referenční geny (**Obrázek V8**, str. 46). Při použití daných genů jako vnitřní kontroly však dostaneme výsledky, které nemusí odpovídat realitě (**Obrázek V10**, str. 49).

Nevhodnost použití metody relativní kvantifikace genové exprese během prvních 48 hodin po izolaci LO byla na závěr demonstrována na srovnání výsledků absolutní a relativní kvantifikace exprese vybraných genů – F3, Gapdh a Ppia (**Obrázek V10**, str. 49). Gen F3 kóduje protein pro tkáňový faktor, u něhož byla opakovaně popsána zvyšující se exprese v tkáňové kultuře LO před transplantací, Gapdh byl zvolen jakožto jeden z nejčastěji používaných referenčních genů v genových expresních analýzách a nakonec gen Ppia byl vybrán, jelikož se zdá být jedním z nejstabilněji exprimovaných genů v našem experimentálním uspořádání (**Obrázek V7**, str. 45). Absolutní kvantifikace ukázala stejný trend pro všechny tři vybrané geny. Expese ihned po izolaci LO byla velmi nízká a během následujících 48

hodin kultivace stoupala, až se relativně ustálila v časovém intervalu 48–120 hodin. Relativní kvantifikace oproti tomu v intervalu 0–48 hodin v žádném případě nereflektuje změny v expresi daných genů, a to nezávisle na použitých referenčních genech. V intervalu 48–120 hodin byl pak průběh exprese genů vypočtený pomocí relativní kvantifikace v podstatě stejný jako u absolutní kvantifikace a obě techniky je tedy možné použít. Spolehlivějších výsledků bylo dosaženo při použití dvojice referenčních genů vybrané na základě jejich exprese během celé kultivační periody než při použití dvojice genů vybrané na základě jejich exprese v jednom konkrétním časovém bodě, zde 24 hodin.

Výsledky našich experimentů dokazují, že během prvních 48 hodin po izolaci LO je exprese běžně užívaných referenčních genů velmi nestálá, pravděpodobně v důsledku izolačního stresu, který vede k nespecifickému zničení RNA a aktivaci degradačních drah. Data získaná během této periody pomocí relativní kvantifikace genové exprese nereflektují skutečné změny v expresi genů a výpočty s nimi spojené mohou vést k mylným zjištěním a nesprávné interpretaci výsledků. Z tohoto důvodu doporučujeme ke stanovení genové exprese v izolovaných LO během prvních 48 hodin použití jiných metod než relativní kvantifikace, popř. doporučujeme provádět genovou expresní analýzu až po stabilizaci LO na kultuře po dobu 48 hodin. Naopak po uplynutí této doby poskytuje relativní kvantifikace v izolovaných LO spolehlivé výsledky a je možné vybírat z široké škály genů. Naše zjištění podtrhují důležitost validace referenčních genů pro každé konkrétní experimentální uspořádání.

### 3.1.5. ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na identifikaci a validaci vhodných referenčních genů pro normalizaci genové exprese během krátkodobé kultivace izolovaných potkaních Langerhansových ostrůvků. Bylo zjištěno, že žádný z 16 testovaných kandidátských genů nespĺňuje stabilitní kritéria ( $\Delta Ct \leq \pm 0,5$ ) během celé kultivační doby 120 hodin, průběh jejich exprese během této periody se však velmi podobá. Po izolaci LO dochází k výraznému poklesu hladiny 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 nespĺnil stabilitní kritéria ( $\Delta Ct \leq \pm 0,5$ ). 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 naznačují, 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. Exprese genu pro tkáňový faktor, který je předmětem našeho výzkumu v souvislosti s nespecifickou zánětlivou reakcí IBMIR, byla stejně jako u všech ostatních testovaných genů po izolaci LO velmi nízká a během následujících 48 hodin kultivace vzrostla na více než 10násobek původní hodnoty.

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

### 3.2.1. ÚVOD

Transplantace LO probíhá obvykle jako infuze tkáňové suspenze do portální žíly příjemce, odkud ostrůvky pokračují dále do jater. Zde se náhodně usadí v postranních větvích portálního kmene a mohou dále přežívat. Transplantované ostrůvky tvoří mechanickou obstrukci a výrazně snižují průtok krve v distálně ležící tkáni. Pouhá mechanická bariéra je dále zesilována nespecifickou zánětlivou reakcí IBMIR, která je charakterizována agregací trombocytů, aktivací koagulační kaskády a komplementu, infiltrací leukocytů do ostrůvků a vznikem trombu v důsledku přímého kontaktu buněk LO s krví příjemce. IBMIR začíná během několika minut po transplantaci a kulminuje asi 120 minut po ní (Moberg et al., 2005; Delaune et al., 2017). Nedostatečně prokrvené oblasti jater jsou patrné ihned po transplantaci jako fokální diskolorace a během následujících hodin se přemění na fokální nekrotické léze jaterní tkáně. Následný zánět a trombóza vedou k významné ztrátě transplantovaných ostrůvků během velmi krátkého času. Bylo prokázáno, že během tohoto procesu dochází ke zničení až 60 % ostrůvků, což znamená, že jen méně než polovina LO se může úspěšně přihojit (Moberg et al., 2005; Delaune et al., 2017; Eich et al., 2007a,b; Korsgren et al., 2008). IBMIR tak značně přispívá ke skutečnosti, že k dosažení nezávislosti na inzulínu je nutné v klinické praxi transplantovat LO z více než jednoho dárce (Delaune et al., 2017; Korsgren et al., 2008; Johansson et al., 2005; Moberg et al., 2002).

V posledních letech bylo vyzkoušeno mnoho metod zaměřených na zlepšení přijetí a funkce transplantovaných ostrůvků prostřednictvím inhibice koagulace a/nebo zánětu (Johansson et al., 2005; Moberg et al., 2002 and 2003; Ozmen et al., 2002; Nilsson et al., 2011; Cabric et al., 2007; Teramura and Iwata, 2008), stále však neexistuje technika, která by dokázala kvantifikovat rozsah ischemické tkáně jater po transplantaci LO. Zavedení takové techniky by přitom v experimentální praxi velmi pomohlo ve srovnání účinnosti a bezpečnosti různých terapeutických zákroků a přístupů k potlačení IBMIR. Doposud bylo monitorování a kvantifikace IBMIR po transplantaci LO založeno pouze na měření hladiny komplexu thrombin-antithrombin, popř. na měření velikosti trombu v *in vitro* systému s uzavřenou smyčkou naplněnou krví (Johansson et al., 2005; Moberg et al., 2002 and 2003; Ozmen et al., 2002; Cabric et al., 2007). Jediná publikovaná studie, zabývající se morfologickou kvantifikací nekrotické jaterní tkáně po transplantaci LO, byla vypracována na myším modelu s použitím vysokého počtu ostrůvků ( $\geq 30$  LO/g) a následným *ex vivo* vyšetřením jater příjemců magnetickou rezonancí pomocí 11.7 T skeneru v délce 80 minut (Sakata et al., 2009). Nekróza jater detekovaná u zvířat *ex vivo* je však charakteristická pro pozdní stádium jaterního poškození a neumožňuje tedy kvantifikaci neperfundované, ale stále vitální tkáně. Tato práce tak v principu dokazuje možnost použití magnetické rezonance (MRI) k vyšetření pozdního poškození jater po transplantaci LO, daná metodika však nemůže být použita k monitorování ischemie jater *in vivo* a srovnání technik zaměřených na modulaci IBMIR.

V následující části práce popisujeme nový experimentální model, který byl vytvořen za účelem vizualizace a kvantifikace ischemie jater po transplantaci LO pomocí MRI *in vivo*. Tento model může být s výhodou využit pro porovnání efektivity různých experimentálních přístupů zaměřených na potlačení IBMIR.

### **3.2.2. MATERIÁL A METODY**

#### **3.2.2.1. Design studie**

Izolované LO ve třech různých dávkách – 100 (skupina A), 500 (skupina B) a 1000 (skupina C) LO – byly transplantovány do portální žíly zdravých potkanů (n = 6 v každé skupině) s podvázanými jaterními tepnami. Ve skupině D (n = 6) byl proveden pouze podvaz jaterních tepen. Dvě hodiny po transplantaci LO byly zobrazeny ischemické oblasti jater potkanů pomocí MRI (skupina A, B a C) nebo pomocí intravitálního kontrastního barviva (zvířata nezahrnuta do experimentálních skupin). Na základě MRI byl pak vypočten objem neprokrvené jaterní tkáně. Za účelem potvrzení bezpečnosti podvazu jaterních tepen bylo vyšetřeno sérum získané z krve potkanů odebrané 7 dní před chirurgickým zákrokem, v den zákroku 4 hodiny po něm a poté 2, 7 a 28 dní po zákroku (skupiny A, B, C a D).

#### **3.2.2.2. Laboratorní zvířata**

Použití laboratorních zvířat bylo popsáno v kapitole 3.1.2.1.

#### **3.2.2.3. Izolace a kultivace potkaních LO**

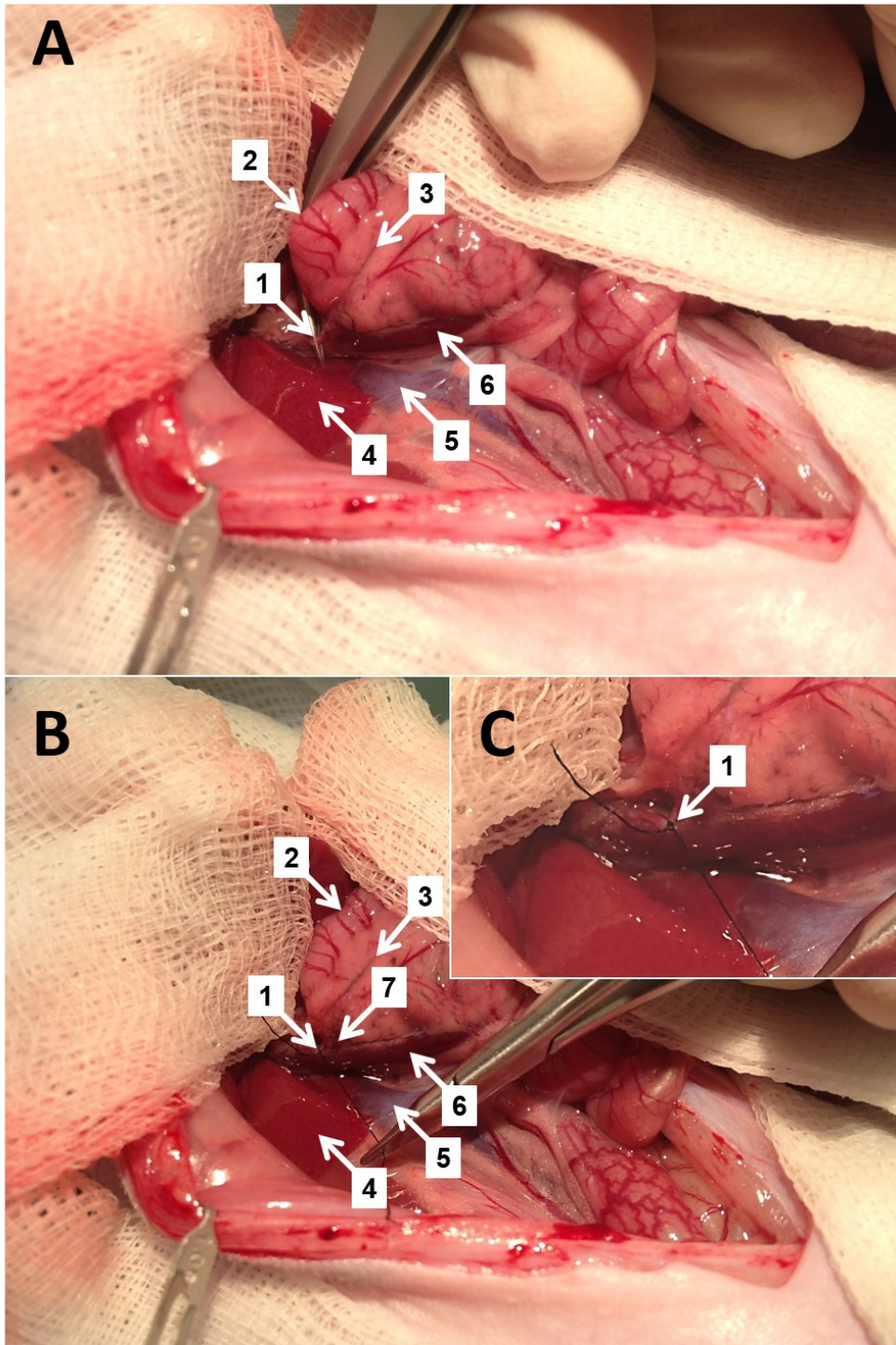
Izolace a kultivace potkaních LO probíhala podle postupu popsaného v kapitole 3.1.2.2.

#### **3.2.2.4. Příprava modelu pro zobrazení ischemie jater *in vivo***

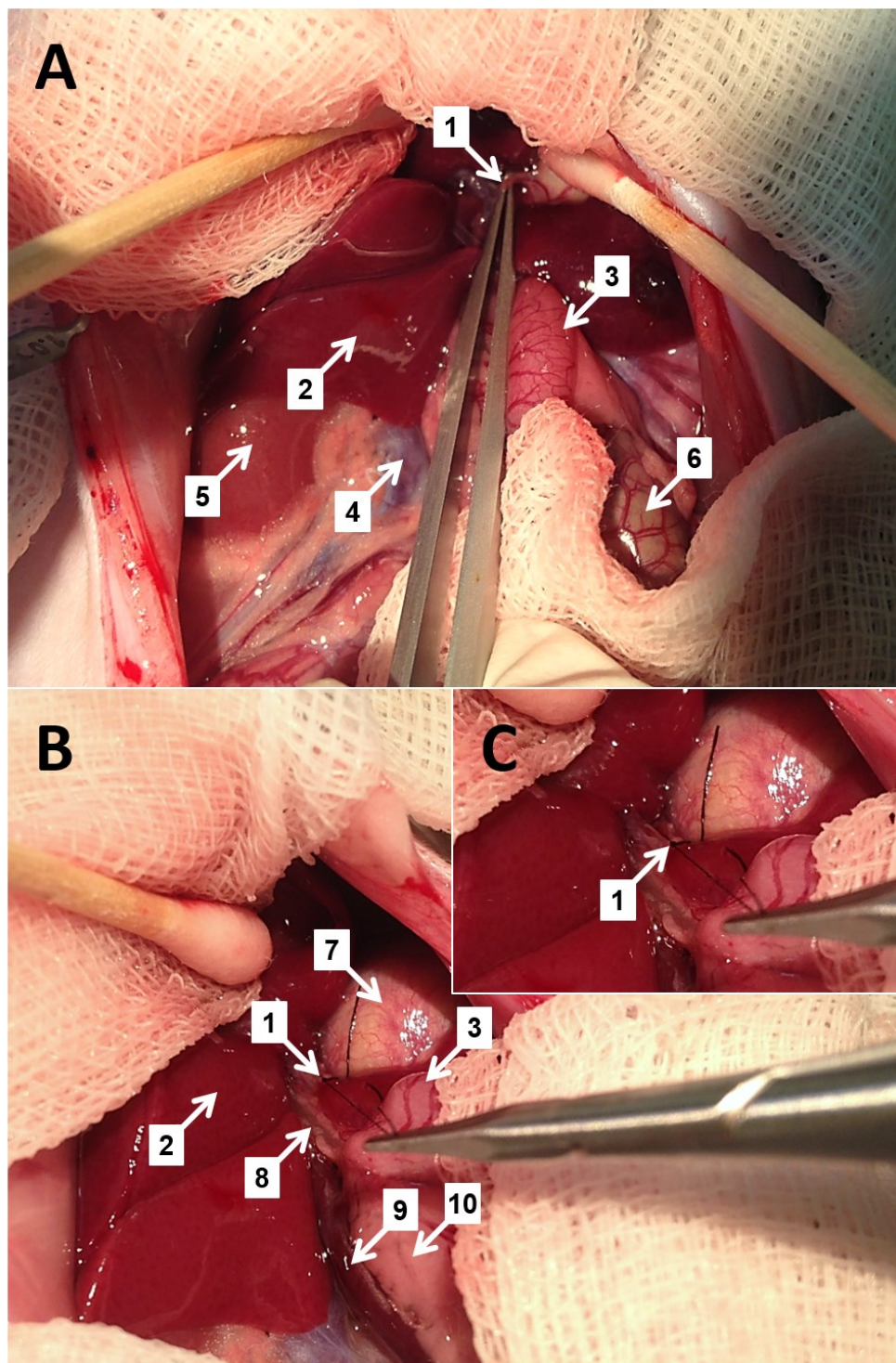
Játra mají dvojí krevní zásobení, a to funkční (portální žíla) a nutriční (tepenné). Pokud přerušíme průtok některou z větví portální žíly, objeví se v příslušné distálně ležící tkáni diskolorace, která však není zobrazovacími metodami spolehlivě charakterizovatelná, a to ani s použitím kontrastních látek. Jisté zpomalení průniku kontrastní látky do těchto oblastí je sice patrné, ale po několika minutách se probarvení

sjednotí. Proto jsme se rozhodli přerušit arteriální krevní zásobení jater příjemců, což umožňuje zobrazení neprokrvených oblastí jater pomocí MRI. Jaterní tepny *arteria hepatica propria* a *arteria hepatoesophagica* potkanů byly podvázány (**Obrázek V11**, str. 62, a **V12**, str. 63) pomocí nevstřebatelného materiálu Mersilk 7-0 (Ethicon, USA) těsně před transplantací (skupiny A, B a C; skupina D – pouze podvaz). V klinické praxi by byl tento zákrok fatální, u potkanů však byla publikována řada prací popisujících transplantaci jater bez rekonstrukce tepenného řečiště s dlouhodobě dobrým přežíváním potkanů i štěpu (Lee S. et al., 1975, Hori T. et al., 2012).





**Obrázek V11:** Preparace jaterní tepny *arteria hepatica propria* (A) a její podvaz (B) v detailu (C). 1 - arteria hepatica propria, 2 - duodenum, 3 - žlučovod, 4 - játra, 5 - dolní dutá žíla, 6 - portální žíla, 7 - vena pylorica.



**Obrázek V12:** Preparační jaterní tepny *arteria hepatoesophagica* (A) a její podvaz (B) s detailem (C). 1 - arteria hepatoesophagica, 2 - játra, 3 - duodenum, 4 - dolní dutá žíla, 5 - pravá ledvina, 6 - caecum, 7 - žaludek, 8 - žlučovod, 9 - portální žíla, 10 - slinivka břišní.

### **3.2.2.5. Transplantace LO**

Izolované LO (100, 500 a 1000 LO) byly po kultivaci přes noc transplantovány do portální žíly příjemců za použití standardní techniky (Kříž et al., 2012). Po střední laparotomii hluboce uspaných zvířat bylo vyjmuto tlusté střevo z dutiny břišní, rozprostřeno na vlhkou gázu a zpřístupněna ileocekální žíla. Izolované LO ve fyziologickém roztoku byly nasáty do motýlové kanyly velikosti 27G a injikovány do ileocekální žíly v celkovém objemu 300  $\mu$ l. Krvácení bylo zastaveno pomocí mikrofibrilárního kolagenového hemostatika Avitene® (Bard Inc., USA) a mechanického tlaku na místo vpichu. Dutina břišní byla následně zašita ve dvou vrstvách pomocí vstřebatelného materiálu Vicryl 5-0 (Ethicon, USA).

### **3.2.2.6. Makroskopické vyšetření intraportální trombózy**

Izolované LO v počtu 1000 byly transplantovány do portální žíly zdravého zvířete bez podvazu jaterních tepen. Dvě hodiny po transplantaci byla játra vyjmuta, omyta fyziologickým roztokem a portální žíla byla rozstřížena a makroskopicky vyšetřena. U dalších zvířat byla játra vyšetřena 2, 7 a 28 dní po transplantaci.

### **3.2.2.7. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO intravitálním barvením patentní modří V**

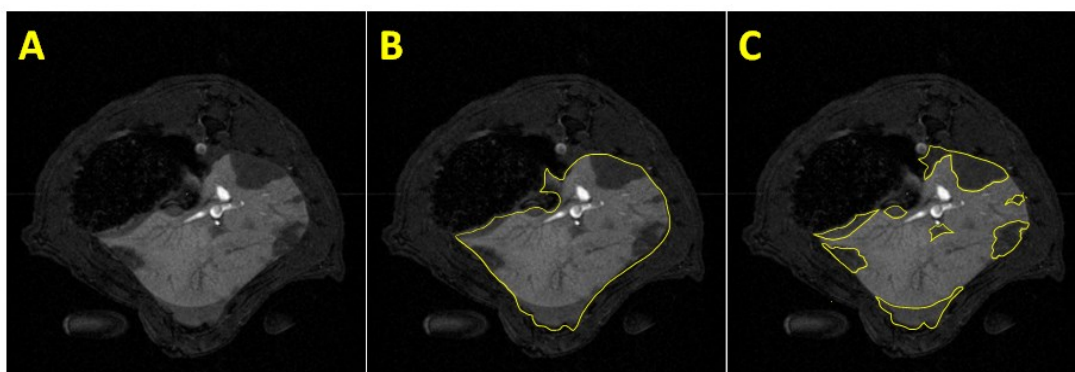
Pro makroskopické vyhodnocení rozsahu ischemie jater po transplantaci LO byla využita patentní modř V. Intravitální kontrastní barvivo Bleu Patenté V (Sodique Guerbet 2,5 %, Francie) o objemu 100  $\mu$ l bylo naředěno 1:1 fyziologickým roztokem a aplikováno do portální žíly potkana 2 hodiny po transplantaci 100, 500 nebo 1000 izolovaných LO s podvazem nebo bez podvazu jaterních tepen. Následně byl pořízen makroskopický snímek jater.

### 3.2.2.8. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO pomocí MRI

Zobrazování pomocí magnetické rezonance bylo provedeno na 4,7 T MRI skeneru (Bruker, Německo) s rezonátorovou cívkou o průměru 7 cm (Bruker, Německo). Pro anatomickou lokalizaci jaterní tkáně byly získány  $T_2^*$ -vážené snímky pomocí sekvence gradientního echa o následujících parametrech: doba opakování (repetition time, TR) = 111 ms, doba odezvy (echo time, TE) = 3,7 ms, prostorové rozlišení  $0,254 \times 0,254 \times 1 \text{ mm}^3$ , doba skenování = 4 minuty. Pro zobrazení ischemických oblastí jater byla použita kontrastní látka MultiHance® (gadobenát dimeglumin, Bracco, Itálie; 0,1 mmol/kg), aplikovaná do ocasní žíly potkanů před začátkem měření.  $T_1$ -vážené snímky jater byly získány pomocí sekvence gradientního echa o následujících parametrech: TR = 94,5 ms, TE = 3,7 ms, prostorové rozlišení  $0,23 \times 0,23 \times 1 \text{ mm}^3$ , počet akvizic (number of acquisition, NA) = 16, doba skenování = 6 minut. Játra byla většinou pokryta dvěma sadami sestávajícími z 11 řezů.

### 3.2.2.9. Kvantifikace objemu ischemické jaterní tkáně

Objem neprokrvené jaterní tkáně 2 hodiny po transplantaci LO byl kvantifikován na základě snímků z magnetické rezonance pomocí digitálního softwaru ImageJ (volně dostupný na <https://imagej.net/>). Demonstrace postupu je zobrazena na **Obrázku V13** (str. 66). Tři trénovaní experti vyhodnotili snímky nezávisle na sobě, výsledek byl pak vytvořen jako průměr jednotlivých vyhodnocení.



**Obrázek V13:** Snímek dutiny břišní potkana z magnetické resonance (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.

### 3.2.2.10. Vyšetření séra

Abychom prokázali, že podvaz jaterních tepen nemá škodlivý účinek na zdraví zvířat, byl potkanům odebrán 1 ml krve z ocasní žíly 7 dní před chirurgickým zákrokem, v den zákroku 4 hodiny po něm a poté 2, 7 a 28 dní po zákroku. Sérum izolované z krve bylo následně vyšetřeno na tyto parametry popisující případné jaterní poškození: alkalická fosfatáza (ALP),  $\gamma$ -glutamyltransferáza (GGT), aspartát transamináza (AST), alanin transamináza (ALT), celkový bilirubin (TBIL) a celkový protein (TP). Sérum bylo vyšetřeno na automatickém klinickém analyzátoru pro suchou chemii DRI-CHEM NX500i (Fujifilm, Japonsko).

## 3.2.3. VÝSLEDKY

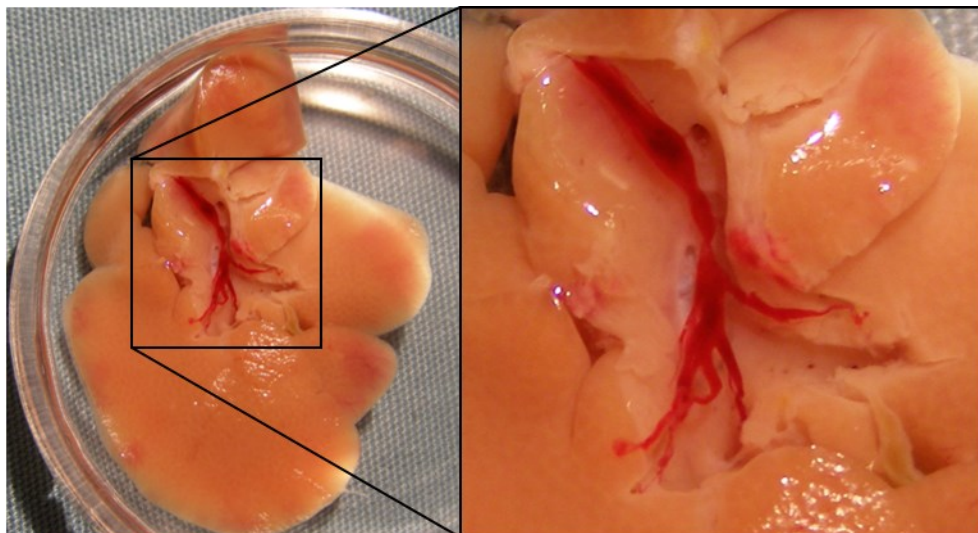
### 3.2.3.1. Makroskopické vyšetření intraportální trombózy

Ohned po aplikaci 1000 LO do portální žíly potkana lze na játrech pozorovat ischemické oblasti neprokrvené tkáně viditelné makroskopicky (**Obrázek V14**, str. 67). Po rozříznutí portálního kmene 2 hodiny po transplantaci LO byl uvnitř jater nalezen rozsáhlý trombus vyplňující větve portální žíly (**Obrázek V15**, str. 67). Dva

dny po transplantaci se ischemické oblasti zpravidla vyvinou v nekrotické léze, které jsou však většinou již 7 dní a nejpozději pak 28 dní po transplantaci plně zhojeny.



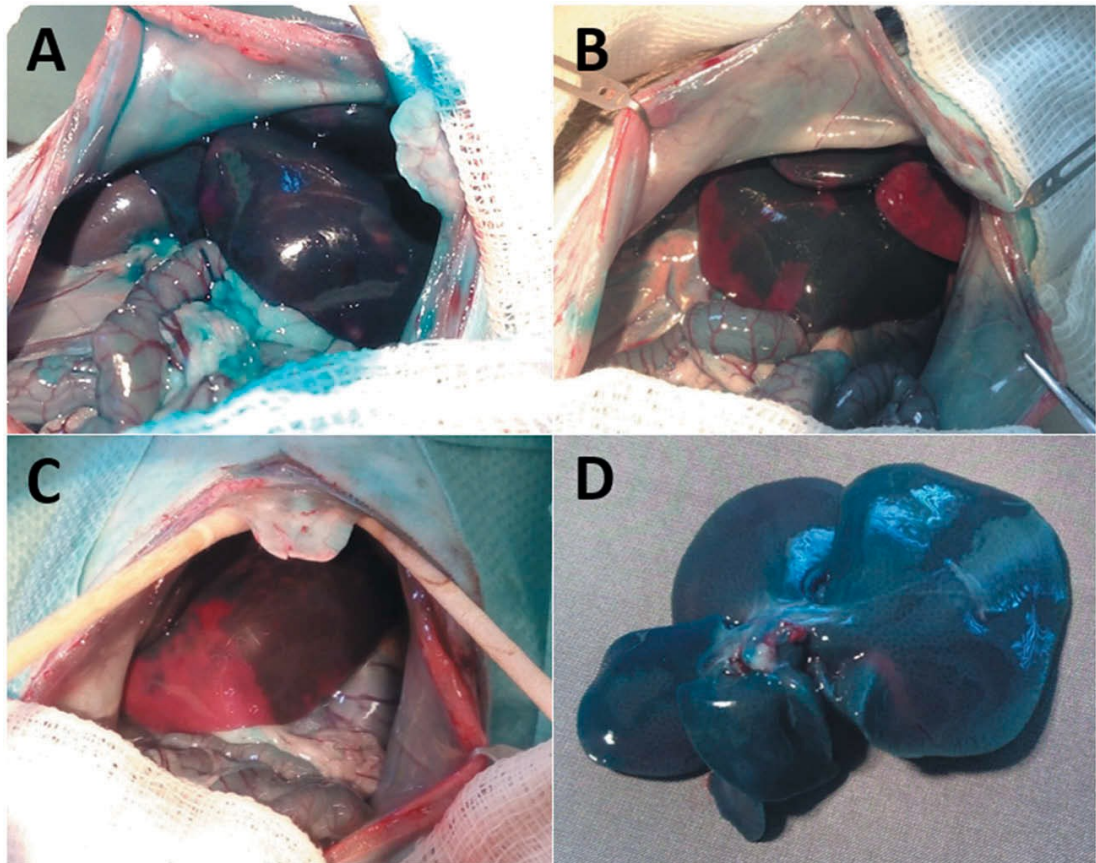
**Obrázek V14:** Ischemické oblasti v játrech potkana 2 hodiny po transplantaci 1000 syngenních LO. Tmavé oblasti reprezentují neprokrvenou jaterní tkáň.



**Obrázek V15:** Trombus vyplňující větve portální žíly potkaních jater 2 hodiny po transplantaci 1000 syngenních LO.

### **3.2.3.2. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO intravitálním barvením patentní modří V**

Dvě hodiny po transplantaci 100, 500 a 1000 LO potkanům s podvazem jaterních tepen byly neperfundované oblasti jaterní tkáně demonstrativně zobrazeny pomocí kontrastní intravitální barvy, patentní modří V (**Obrázek V16 A-C**, str. 69). Zatímco porucha prokrvení jater po transplantaci 100 LO byla téměř neznatelná (**A**), transplantace 500 a 1000 LO vedla ke vzniku výrazných ischemických oblastí (**B a C**). Transplantace ostrůvků bez podvazu jaterních tepen způsobila obstrukci několika větví portální žíly, která však byla detekovatelná pouze jako opožděná distribuce modrého barviva do těchto oblastí. Během 2 minut se krev dostala do ischemických oblastí přes jaterní arteriální krevní oběh a vnesla kontrastní barvivo do celých jater (**Obrázek V16 D**, str. 69).

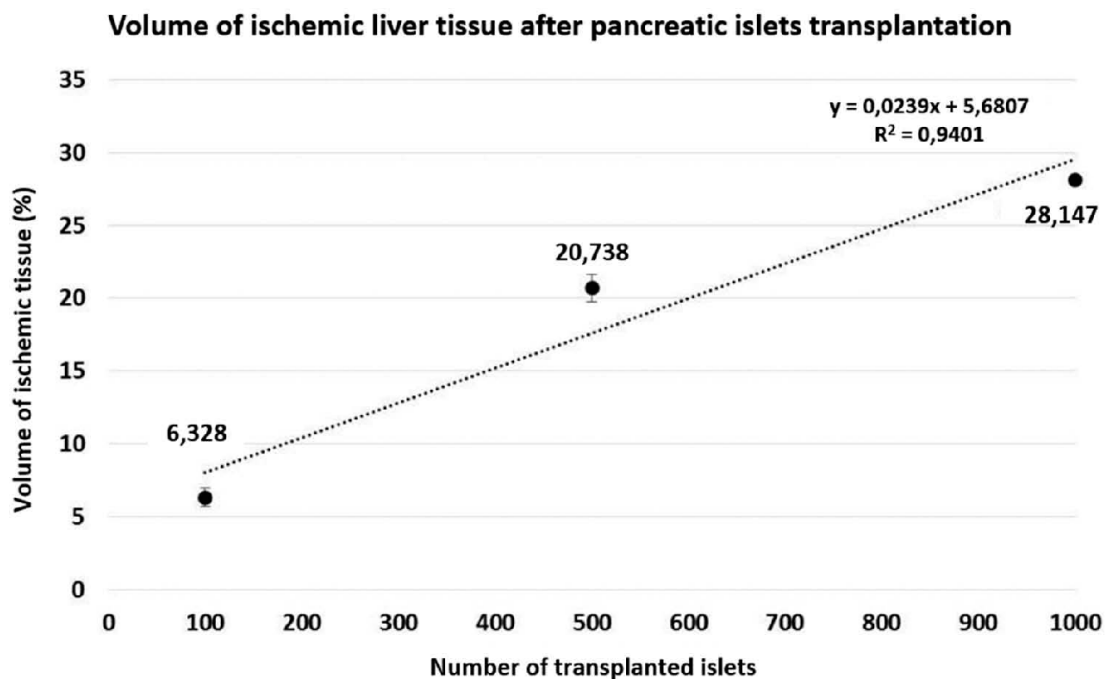


**Obrázek V16:** Neprokrvené oblasti jater 2 hodiny po transplantaci 100 (A), 500 (B) a 1000 (C) syngenních LO s podvazem tepen a játra po transplantaci 1000 syngenních LO bez podvazu tepen (D) 2 minuty po aplikaci intravitálního kontrastního barviva (patentní modř V). Bez podvazu tepen barvivo rychle penetruje do oblastí s výpadkem portální perfuze přes arteriální jaterní krevní oběh.

### 3.2.3.3. MRI a kvantifikace objemu ischemické tkáně

Průměrný celkový objem jater potkanů – příjemců vypočtený pomocí MRI se specifickou kontrastní látkou byl  $9,50 \pm 1,04$  ml. Objem ischemické jaterní tkáně po transplantaci LO se pohyboval od  $0,55 \pm 0,01$  ml ve skupině A, přes  $2,09 \pm 0,11$  ml ve skupině B až po  $2,88 \pm 0,01$  ml ve skupině C, což představuje 6,3 %, 20,7 % a 28,1 % z celkového objemu jaterní tkáně (**Obrázek V17**, str. 70).

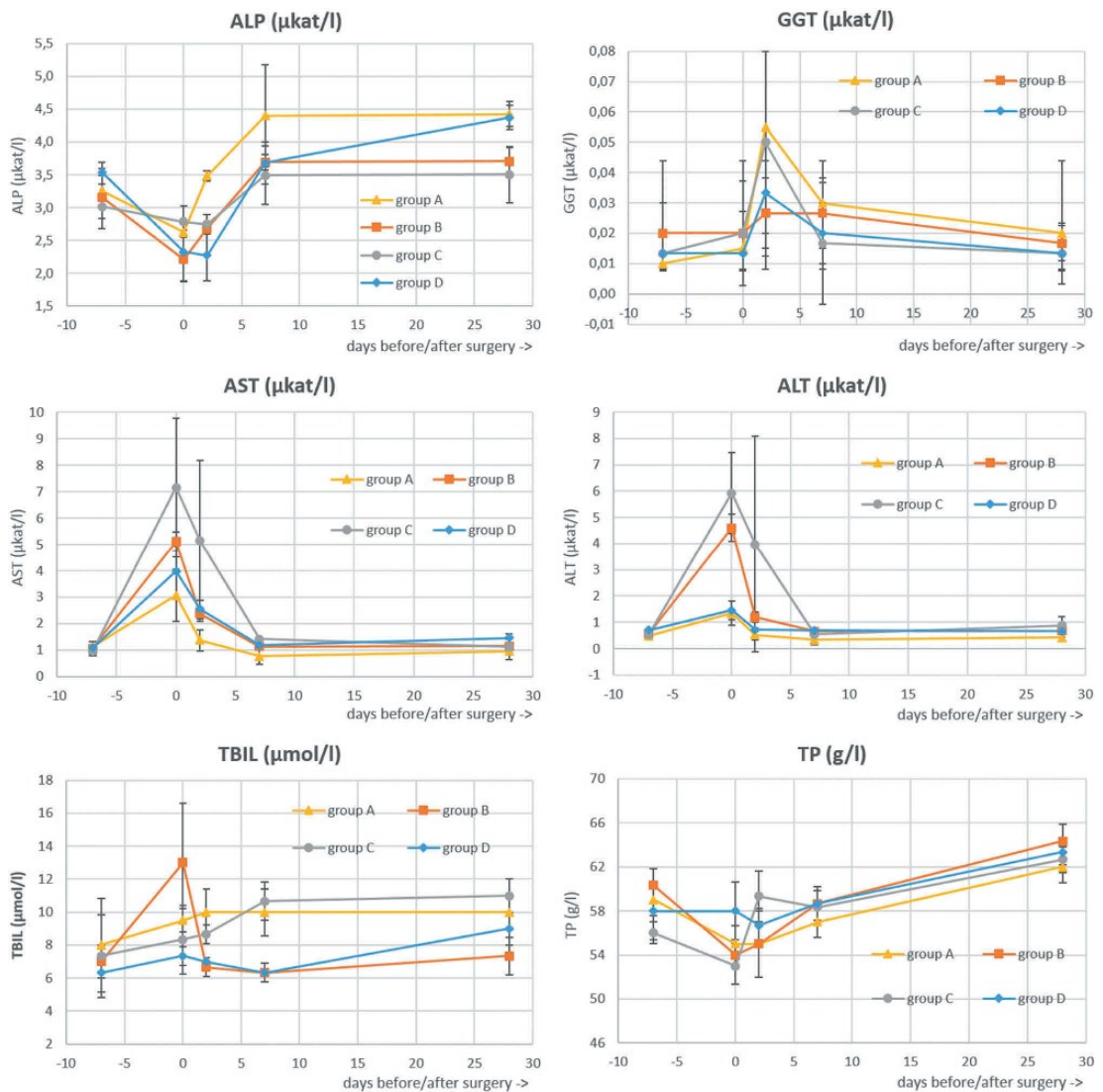




**Obrázek V17:** Kalibrační křivka ukazující přímou závislost mezi počtem transplantovaných ostrůvků a objemem ischemické jaterní tkáně 2 hodiny po transplantaci 100 (skupina A), 500 (skupina B) a 1000 (skupina C) syngenních LO do portální žíly zdravých potkanů (n = 6) s podvázanými jaterními tepnami. Graf ukazuje průměrné hodnoty ± směrodatnou odchylku.

#### 3.2.3.4. Vyšetření séra

**Obrázek V18** (str. 71) ukazuje, že podvaz jaterních tepen nemá škodlivý vliv na jaterní buňky potkanů. Dva dny po transplantaci bylo detekováno dočasné zvýšení hladiny jaterních enzymů v krvi indikující poškození jaterních buněk, hodnoty se však normalizovaly do 7 dní po chirurgickém zákroku. Sledované biochemické parametry pak zůstaly ve fyziologickém rozmezí až do ukončení experimentu.



**Obrázek V18:** Změny ve standardních biochemických parametrech potkanů během experimentu. Sérum bylo odebíráno z ocasní žíly 7 dní před transplantací, 4 h po transplantaci a následně 2, 7, a 28 dní po zákroku. Skupiny A, B a C – transplantace 100, 500, respektive 1000 syngenních LO s podvazem jaterních tepen. Skupina D – pouze podvaz jaterních tepen. Pro všechny skupiny n = 6; graf ukazuje průměrné hodnoty ± směrodatnou odchylku. ALP – alkalická fosfatáza, GGT –  $\gamma$ -glutamyltransferáza, AST – aspartáttransamináza, ALT – alanintransamináza, TBIL – celkový bilirubin, TP – celkový protein.

### 3.2.4. DISKUZE

Během posledních dvou desetiletí probíhá intenzivní výzkum zaměřený na zlepšení přihojení ostrůvkového štěpu s cílem zvýšení účinnosti transplantace LO jakožto léčebné metody. Bylo publikováno velké množství studií na téma inhibice IBMIR, doposud však nebyla dostupná žádná metoda umožňující přímé srovnání účinnosti jednotlivých intervencí *in vivo*. Byly popsány nepřímé laboratorní parametry, které indikují, avšak ne kvantifikují, poškození jater po transplantaci LO, jako např. dočasně zvýšené hladiny jaterních enzymů nebo přítomnost koagulačních markerů v krvi (Johansson H. et al., 2005, Moberg L. et al., 2002 a 2003, Ozmen L. et al., 2002, Cabric S. et al., 2007). Některé práce popisují také pokles počtu ostrůvků v časném posttransplantačním období naměřený pomocí MRI (Jirák D. et al., 2009, Saudek F. et al., 2010,) nebo pozitronové emisní tomografie (Eich T. et al., 2007ab), ale možnost přímého měření jaterního poškození doposud chyběla. Jediná studie popisující rozsah posttransplantační ischemické nekrózy jater je zaměřená na pozdní, plně vyvinuté, následky mikrotrombózy portální žíly, ne však na akutní posttransplantační poruchy průtoku krve (Sakata N. et al., 2009). Tyto stavy nejsou zaměnitelné, neboť konečný rozsah ischemické nekrózy je kromě přerušení krevního zásobení ovlivněn také jinými faktory, jako je načasování vyšetření, aktivita systému plasminogen-plasmin, individuální rezistence vůči ischemii atp. Přímá kvantifikace porušení krevního oběhu může přesně odrazet rozsah a závažnost mikrotrombózy portální žíly, a tedy i rozsah IBMIR krátce po transplantaci.

V naší studii jsme zkombinovali aplikaci kontrastní látky pro MRI do ocasní žíly potkana s ligací jaterních tepen před transplantací, abychom předešli dvojitému prokrvení jaterní tkáně z portální žíly a jaterních artérií. Nejprve jsme otestovali vizualizaci poruchy jaterního prokrvení pomocí intravitální kontrastní barvy (patentní

modř V) nebo za použití MRI s kontrastní látkou. Díky dvojitému krevnímu zásobení jater portální žilou a jaterními tepnami se kontrastní látka dostane v krátkém čase i do ischemických oblastí jater (**Obrázek V16 D**, str. 69). Makroskopicky bylo v hypoperfundovaných oblastech jater patrné zpoždění, se kterým se patentní modř do tkáně dostávala (do 2 minut), nebylo však detekovatelné pomocí MRI vzhledem k časové prodlevě, která je potřebná k technické přípravě zvířete a samotného měření. Proto jsme přistoupili k podvazu jaterních tepen, čímž se portální žíla stala jediným zdrojem krve pro játra (**Obrázek V11 a V12**, str. 62 a 63). Naše výsledky dokazují, že potkani s podvázanými jaterními tepnami přežívají s dobrou funkcí jater a bez vedlejších účinků minimálně 30 dní. Hodnoty biochemických parametrů se navrátily do fyziologického rozpětí během jednoho týdne po chirurgickém výkonu (**Obrázek V18**, str. 71). Všechna zvířata se zhojila jako obvykle a přibírala na váze stejně jako zdravá zvířata. To souhlasí s dříve publikovanými daty popisujícími dobrou dlouhodobou funkci jater u potkanů i v případě transplantace bez arteriální anastomózy (Lee S. et al., 1975, Hori T. et al., 2012). Přerušením arteriálního jaterního krevního oběhu jsme zamezili intravenózně podané kontrastní látce penetraci tkáně za ostrůvky usazenými v periferních větvích portální žíly, což nám umožnilo „zakonzervovat“ ischemické oblasti jater pro následné zobrazování pomocí MRI.

Ihned po podvazu jaterních tepen byly do jater potkanů transplantovány LO a následně 2 hodiny poté aplikována intravitální kontrastní barva (patentní modř V) (**Obrázek V16 A-C**, str. 69). Ostrůvky se usazují náhodně v koncových větvích portální žíly v různých jaterních lalocích a modrá barva jasně indikuje neperfundované regiony, nicméně kvantifikace ischemické tkáně *in vivo* pomocí této metody není možná, neboť její objem se výrazně liší uvnitř jater. Zobrazování pomocí magnetické resonance je bezpečné neinvazivní vyšetření, které minimálně zatěžuje pacienta a

může být prováděno opakovaně. Při použití vhodné cívky a měřicí sekvence v kombinaci gadoliniovou kontrastní látkou může MRI rozlišit malé léze a umožnit dokonce vizualizaci jednotlivých ostrůvků transplantovaných do jater myši nebo potkanů a jejich lokalizaci ve 3D rekonstrukci celého zvířete (Evgenov N. V. et al., 2006ab, Jiráček D. et al., 2004 a 2009, Kříž J. et al. 2005 a 2008, Saudek F. et al., 2010). Látky s obsahem gadolinia patří mezi pozitivní kontrastní látky, což znamená, že zvyšují intenzitu signálu tkání a tím citlivost skeneru k rozlišení mezi tkáněmi perfundovanými, neperfundovanými a tkáněmi, které absorbují negativní kontrastní látky (např. na bázi malých částic železa) a na snímku se tak jeví jako černé (Herynek et al., 2011). MRI je tedy pro naše experimenty dostatečně citlivou metodou.

Abychom měli v čase měření plně vyvinutý trombus, MRI bylo zahájeno 2 hodiny po transplantaci (kulminace IBMIR). S použitím sekvencí popsaných výše byla naskenována břišní dutina zvířete a zobrazeny jednotlivé orgány. Ihned po podání kontrastní látky jsou oblasti se zvýšeným signálem jasně rozlišitelné od těch, kde signál zůstal na základní úrovni. Pomocí vhodného softwaru je možné jednotlivé oblasti ohraničit a po vynásobení tloušťkou vrstev kvantifikovat celkový objem jater stejně tak jako objem neprokrvené tkáně. Dva dny po transplantaci je možné pozorovat ischemické léze na játrech potkanů ve stejných místech, kde byly předtím pomocí MRI detekovány oblasti s poruchou prokrvení. Použitím výše popsaného experimentálního protokolu je tedy možné detekovat poruchu prokrvení jater ihned po transplantaci LO do portální žíly potkanů *in vivo*.

Další sada experimentů byla zaměřena na posouzení citlivosti této techniky. Naším konečným cílem je vyhodnocení terapeutického účinku inhibice IBMIR různými metodami. Abychom určili rozsah ischemie jater spojený s různou intenzitou IBMIR, rozhodli jsme se jednoduše transplantovat různé množství ostrůvků.

S použitím stejného experimentálního protokolu byly připraveny skupiny zvířat s transplantací 100, 500 a 1000 LO do jater s podvázanými tepnami. Větší rozsah ischemie byl očekáván a také potvrzen u skupiny s větším počtem transplantovaných LO. Po vyhodnocení MRI jsme vypočetli objem neperfundované tkáně a mohli tak stanovit jeho poměr k celkovému objemu jater. Mezi rozsahem ischemie v jednotlivých skupinách byl významný rozdíl a objem neperfundované tkáně přesně koreloval s počtem transplantovaných LO s velmi malou odchylkou mezi jednotlivými zvířaty ve skupině (**Obrázek V17**, str. 70).

Tato studie má několik limitací, první z nich je nepřenositelnost do klinické praxe. Z důvodu podvazu jaterních tepen není možné použít tento model u člověka. Nicméně hlavním cílem této studie není využití v klinické praxi jako takové, ale zavedení nového experimentálního modelu, který umožňuje srovnání účinnosti různých experimentálních přístupů zaměřených na potlačení IBMIR. Podíl IBMIR na zničení ostrůvků po transplantaci je nesporný a odehrává se jak u člověka v klinické praxi, tak ve zvířecích modelech. Přerušení jaterních tepen přitom brání použití metody i ve velkých zvířatech. I přesto však výsledky získané na potkaním modelu mohou výraznou měrou přispět ke zlepšení protokolů zaměřených na ošetření ostrůvků před transplantací a jejich zavedení do klinické praxe bez nutnosti klinických studií založených na této technice. Taktéž mikroprostředí v játrech po transplantaci LO je u člověka a potkana velice rozdílné, rozsah ischemie v tomto případě však slouží pouze jako nástroj k demonstraci/vizualizaci intenzity nespecifické zánětlivé reakce IBMIR a jejího případného zmírnění pomocí experimentálních zásahů. Ačkoli tedy tento model není možné přenést do klinické praxe, jedná se o jediný model umožňující vyhodnocení a porovnání efektu různých terapeutických intervencí zaměřených na potlačení IBMIR na prokrvení jater *in vivo* a ihned po transplantaci 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.

### **3.2.5. ZÁVĚR**

V této studii jsme vytvořili nový experimentální model pro zobrazování a kvantifikaci ischemie jater po transplantaci LO u potkana *in vivo*. Dříve publikovaný model umožňující pouze zobrazení nekrotické jaterní tkáně *ex vivo* jsme modifikovali a připravili více citlivou variantu, která 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 neperfundované oblasti jater jasně koreluje s počtem transplantovaných LO.

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

#### **3.3.1. ÚVOD**

Jak již bylo popsáno výše, za poslední desetiletí bylo otestována řada látek a metod zaměřených na snížení intenzity IBMIR a zlepšení přežívání LO po transplantaci. Velká část z nich je založená na kultivaci ostrůvků s různými protizánětlivými a protikoagulačními působky, další část je zaměřena na obalení ostrůvků ve speciálních materiálech a vytvoření bariéry, která odděluje buňky LO od krve příjemce (Inverardi L. a Ricordi C., 2006, Nilsson B. et al., 2011). Zřejmým cílem zásahu je tkáňový faktor, exprimovaný buňkami LO, který přímo aktivuje koagulační kaskádu tzv. vnější cestou a jehož výskyt negativně koreluje s výsledky klinických transplantací (Johansson H. et al., 2005). Poměrně novým přístupem inhibice exprese tkáňového faktoru je RNA interference, která zatím byla u ostrůvků použita za účelem snížení IBMIR pouze v modelu xenotransplantace (Ji M. et al., 2011, Ma X. et al., 2012). Tento evolučně starý mechanismus představuje jedinečnou možnost efektivně „vypnout“ expresi vybraného genu v organismu pomocí malých uměle připravených molekul siRNA bez zásahu do genetické informace uložené v DNA. Na základě komplementarity siRNA k danému transkriptu dochází k tzv. posttranskripčnímu silencingu – gen se sice přepisuje, ale jeho mRNA je následně degradována, takže kýžený bílkovinný produkt nevzniká (Agrawal N. et al., 2003). Tento efekt je časově omezený a je ovlivněn stabilitou siRNA, jejího využitím v buňce, délkou transfekce a jejím případným opakováním. Podle typu siRNA i druhu buňky tak lze v některých případech efekt pozorovat již několik hodin po transfekci a trvat může typicky 5-7 dní (Dorsett Y., Tuschl T., 2004). V případě transplantace LO lze s výhodou využít



krátkodobý účinek siRNA, neboť v pozdějším stádiu po transplantaci je tkáňový faktor žádoucím stimulatorem angiogeneze, který podporuje regeneraci kapilární tkáně a její napojení na cévní systém příjemce (Carlsson P. O. et al., 2001). Krátkodobé potlačení exprese tkáňového faktoru na povrchu LO pomocí RNA interference by tak mohlo vést k jejich ochraně v raném posttransplantačním období a zároveň by později nebránilo napojení kapilár, které je důležité z hlediska správné funkce a dlouhodobého přežívání LO.

Důležitým aspektem při využití techniky RNA interference je metoda transfekce siRNA, tedy způsob, jakým se molekuly siRNA do cílových buněk dopraví, a její efektivita. V případě LO transfekce dlouhodobě představuje experimentální výzvu, neboť se nejedná o volné buňky, ale o kompaktní mikroorgány složené z několika set až tisíců buněk, což znesnadňuje přístup siRNA k buňkám uloženým ve vnitřních vrstvách (Li F., Mahato R. I., 2011). Základní transfekční techniky se rozdělují na metody biologické, chemické a fyzikální (Kim T. K., Eberwine J. H., 2010). Všechny metody mají své výhody a nevýhody a jejich použití záleží především na účelu experimentu, použitých buňkách, časové limitaci, náročnosti technického provedení nebo bezpečnosti. Biologické metody jsou založeny na přenosu genetické informace pomocí geneticky upravených virových částic, které mají zachovanou schopnost infikovat cílové buňky (většinou adenovirů a retrovirů). Tyto techniky jsou vysoce efektivní a vedou k dlouhodobé, tzv. stabilní transfekci genetické informace do buněk díky modifikaci jaderné DNA. Zdaleka nejrozšířenější chemickou metodou je lipofekce, která si svou popularitu získala díky vysoké účinnosti, jednoduchosti a možnosti transfekovat široké spektrum buněk všemi typy nukleových kyselin (Kumar P. et al., 2019). Fyzikální metody patří mezi nejnovější transfekční metody a k doručení nukleových kyselin do buněk využívají rozličných fyzikálních nástrojů

(Kim T. K., Eberwine J. H., 2010). Řadíme sem především elektroporaci a mikroporaci, která představuje její vývojově novější variantu, dále např. mikroinjekci, biolistiku (dodání exogenní DNA do buněk ostřelováním tzv. genovou zbraní) nebo transfekci pomocí magnetu. V případě transfekce siRNA do buněk LO se v literatuře nejčastěji setkáme s metodou lipofekce a mikroporace (Bradley S. P. et al., 2005, Hagerkvist R. et al., 2005, Ji M. et al., 2011, Lefebvre B. et al., 2010, Ma X. et al., 2012). Mikroporace je založena na aplikaci jednoho nebo více krátkých elektrických pulzů, což vede k tvorbě přechodných pórů v plazmatické membráně a vstupu nukleových kyselin do buněk (Kim J. A. et al., 2008). Tato technika vyžaduje optimalizaci délky, síly a počtu pulzů, a to zvláště pro každý buněčný typ. Volná siRNA, kterou lze v případě mikroporace použít, je rychle odbourávána buňkou, na druhou stranu není potřeba ji nijak upravovat a lze použít vyšší koncentraci než při lipofekci. Při té nejprve vzniká kladně nabitý konjugát siRNA s lipofekčním činidlem, tzv. liposom, který je endocytózou transportován do buňky, kde následně dojde k uvolnění jeho obsahu (Felgner P. L. et al., 1987). Kromě spontánního transportu do buňky je další výhodou lipofekce především její technická nenáročnost, snadná proveditelnost a vysoká reprodukovatelnost. V naší laboratoři je dobře zavedená jak metoda mikroporace (Herynek V. et al., 2017), tak lipofekce (Koblas T. et al., 2016, Leontovyč L. et al., 2017). Obě techniky přitom vykazují velmi dobrou transfekční účinnost a nemají zásadní vliv na viabilitu LO. V této práci jsme se proto rozhodli použít obě tyto metody k transfekci siRNA zacílené proti tkáňovému faktoru do buněk LO a porovnat jejich účinnost v potlačení nespecifické zánětlivé reakce IBMIR. V rámci konceptu 3R (replacement, reduction, refinement) byly při optimalizaci transfekčních podmínek, resp. výběru nejvhodnějšího lipofekčního činidla, použity taktéž mesenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně potkanů.

### **3.3.2. MATERIÁL A METODY**

#### **3.3.2.1. Laboratorní zvířata**

Použití laboratorních zvířat bylo popsáno v kapitole 3.1.2.1. Pro izolaci a transplantaci LO byli použiti potkani kmene Brown Norway (Charles River, Německo). Indukce diabetu v případě použití diabetických potkanů jako příjemců při transplantaci LO byla provedena intraperitoneálním podáním roztoku streptozotocinu (Sigma-Aldrich, Německo) v 3,9 % citronanu sodném o pH 4,5 v koncentraci 30 mg/ml a dávce 50 mg/kg váhy potkana. Diabetes byl potvrzen hodnotou glykémie  $\geq$  20 mmol/l ve třech po sobě následujících dnech. Pro izolaci mesenchymálních kmenových buněk byli použiti geneticky upravení potkani kmene Lewis s ubikvitiní expresí genu pro enzym luciferázu (Lew-Tg(Gt(ROSA)26Sor-luc)11Jmsk, National BioResource Project – Rat, Kyoto, Japan).

#### **3.3.2.2. Izolace a kultivace LO**

Izolace a kultivace potkaních LO probíhala podle postupu popsaného v kapitole 3.1.2.2. Viabilita a funkce LO byly v průběhu experimentů opakovaně testovány barvením propidium jodidem a akridinovou oranží (viz kap. 3.1.2.3.), respektive testem glukózou stimulované inzulinové sekrece (viz kap. 3.1.2.4.).

#### **3.3.2.3. Izolace a kultivace mesenchymálních kmenových buněk**

Mesenchymální buňky byly izolovány z podkožního a viscerálního tuku potkanů. Odebraný tuk byl promyt chladným PBS s 1 % antibiotickým a antimykotickým roztokem (Antibiotic Antimycotic Solution, AAS, Sigma-Aldrich, Německo) a následně inkubován s roztokem kolagenázy (Sigma-Aldrich, Německo) o koncentraci 1 mg/ml v poměru 1:1 (v/v) po dobu 45 minut ve vodní lázni při teplotě 37 °C a rychlém třepání 180×/min. Digeste kolagenázou byla ukončena přidáním

roztoku 10 % FBS v PBS v poměru 1:1 (v/v), buněčná suspenze byla přefiltrována přes 500 $\mu$ m sítko a centrifugována 10 minut na 1000 $\times$ g. Peleta byla opět promyta chladným roztokem PBS s 1 % AAS a následně resuspendována v malém objemu stejného roztoku. Buněčná suspenze byla navrstvena na gradient Ficoll-Paque (GE Healthcare, USA) o hustotě 1,077 g/ml a centrifugována 20 minut při 1000 $\times$ g. Oddělené mesenchymální buňky byly z rozhraní vrstev vysbírány Pasteurovou pipetou, promyty roztokem PBS s 1 % AAS a uloženy na kulturu. Pro kultivaci bylo použito DMEM médium s nízkým obsahem glukózy obohaceném o 10 % FBS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamax, 100 U/ml penicilinu a 100  $\mu$ g/ml streptomycinu (vše od Sigma-Aldrich, Německo) v inkubátoru s 5 % CO<sub>2</sub> atmosférou při 37°C. Buňky byly pasážovány při 70–80 % konfluenci a použity vždy maximálně do 5. pasáže. Jejich charakter byl v průběhu experimentů ověřován značením specifických povrchových markerů CD44, CD90 a CD105 a jejich detekcí průtokovou cytometrií. Schopnost diferenciaci buněk na adipocyty, chondrocyty a osteocyty byla testována pomocí diferenciačního kitu Rat Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (RD Systems, USA).

#### **3.3.2.4. Transfekce siRNA do buněk LO**

Transfekce siRNA do buněk LO byla prováděna pomocí metod mikroporace a lipofekce. K optimalizaci transfekce byla použita siRNA značená fluorescenční značkou Cy3 a siRNA proti luciferáze (vše Thermo Fisher Scientific, USA). Na základě překryvu se sekvencí genu pro tkáňový faktor byly vybrány tři různé siRNA zacílené na tři různé kódující úseky genu: Silencer® Select siRNA s130189, s130190 a s130191 (Thermo Fisher Scientific, USA), které byly následně použity k transfekci za optimálních podmínek a z nichž byla vybrána nejúčinnější. Na **Obrázku V19** (str.

82) je zobrazena genomická mapa potkaního genového transkriptu pro tkáňový faktor se znázorněním zacílení jednotlivých siRNA.

### 3.3.2.4.1. Mikroporace

Mikroporace byla prováděna pomocí mikroporátoru Neon™ Transfection System (Thermo Fisher Scientific, USA) a souvisejícího příslušenství v mikroporačních špičkách o objemu 100 µl v transfekčním pufru R dodávaném výrobcem dle dostupného návodu (Neon™ Transfection System 100 µL Kit, Thermo Fisher Scientific, USA). Parametry mikroporace (velikost napětí, počet a délka pulzů) byly nejprve optimalizovány podle doporučení výrobce (1–3 pulzy o délce 10–40 ms, napětí v rozsahu 650–1700 V). Následně byly dle účinnosti a s ohledem na viabilitu LO vybrány nejlepší z nich, které byly použity pro transfekci siRNA proti tkáňovému faktoru v koncentraci 10–600 nM.



**Obrázek V19:** Genomická mapa transkriptu genu pro tkáňový faktor s vyznačenými kódujícími úseky (modré obdélníky) a místy zacílení siRNA (zelené šipky) S130189, S130190 a S130191 (Thermo Fisher Scientific, USA). Dostupné online na: <https://www.thermofisher.com/order/genome-database/>.

#### **3.3.2.4.2. Lipofekce**

Lipofekce byla prováděna za použití transfekčních činidel Lipofectamine 3000, Lipofectamine RNAiMAX, siPORT NeoFX (vše od Thermo Fisher Scientific, USA), RiboCellin (BioCellChallenge, France) a X-tremeGENE (Sigma-Aldrich, Německo). Různé koncentrace siRNA (1–100 nM) a lipofekčních činidel dle doporučení výrobců byly testovány na primárních liniích potkaních mesenchymálních kmenových buněk a izolovaných LO. Nejlepší parametry byly vyhodnoceny na základě účinnosti transfekce s ohledem na viabilitu buněk.

#### **3.3.2.4.3. Optimalizace transfekce pomocí bioluminiscence**

Jednotlivá lipofekční činidla byla testována na potkaních mesenchymálních kmenových buňkách exprimujících gen pro enzym luciferázu pomocí siRNA proti tomuto enzymu (Ambion® Silencer® Firefly Luciferase (GL2 + GL3) Positive Control siRNA, ThermoFisher Scientific, USA). Luciferáza je oxidoreduktáza katalyzující oxidaci pigmentu luciferinu, při které dochází k uvolnění viditelného světla, které můžeme detekovat. Při úspěšné transfekci siRNA proti luciferáze do buněk dochází k umlčení genu pro luciferázu a ke snížení míry bioluminiscence po přidání substrátu. Izolované mesenchymální kmenové buňky byly transfekovány siRNA proti luciferáze o koncentraci 5–100 nM a umístěny do 12jamkové kultivační desky ( $1 \times 10^5$ /jamka). Poté bylo 24, 48 a 72 hodin po transfekci do každé jamky přidáno 10  $\mu$ l D-luciferinu (30 mg/ml, Sigma-Aldrich, Německo) a bioluminiscence byla detekována na přístroji IVIS Lumina XR imager (PerkinElmer, USA) s dobou expozice 1 min.

#### **3.3.2.4.4. Optimalizace transfekce LO pomocí Cy3-siRNA**

Různé podmínky transfekce lipofekčním činidlem Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific, USA) byly testovány pomocí siRNA značené fluorescenční

značkou Cy3 (Silencer™ Cy3-labeled Negative Control No. 1 siRNA, Thermo Fisher Scientific, USA), která umožňuje sledovat absorpci siRNA do buněk jednoduše za pomoci fluorescenčního mikroskopu. Účinnost transfekce Cy3-siRNA o různé koncentraci (10–50 nM) za přítomnosti různého množství transfekčního agens (1–3 µl) a v různém transfekčním médiu o rozdílném pH (PBS o pH 8.0 vs OptiMEM médium o pH 7.2) byla detekována 24–240 hodin po transfekci Cy3-siRNA pomocí zobrazovacího systému EVOS (EVOS® FL Auto Imaging System, Thermo Fisher Scientific, USA) a porovnána s mikroporací Cy3-siRNA o koncentraci 10–200 nM.

### **3.3.2.5. Stanovení exprese tkáňového faktoru na úrovni mRNA**

#### ***3.3.2.5.1. Izolace RNA a reverzní transkripce***

RNA z purifikovaných potkaních LO byla izolována pomocí kitu RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Německo), jak bylo popsáno v kapitole 3.1.2.5. Koncentrace RNA byla stanovena pomocí kitu Qubit RNA HS Assay Kit (Life Technologies, USA). RNA byla přepsána reverzní transkripcí do cDNA pomocí kitu High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Life Technologies, USA) a uskladněna při –20 °C až do provedení genové expresní analýzy.

#### ***3.3.2.5.2. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)***

Kvantifikace exprese genu pro tkáňový faktor na úrovni mRNA v izolovaných nativních LO a LO transfekovaných specifickou siRNA proti tkáňovému faktoru byla prováděna na Real-Time PCR Systému ViiA™ 7 (Applied Biosystems, USA) s použitím chemikálií TaqMan Gene Expression Master Mix a TaqMan Gene Expression Assay (Rn00564925\_m1, Thermo Fisher Scientific, USA) v objemu 20 µl/reakce. Relativní kvantifikace exprese tkáňového faktoru byla stanovována v čase 48 h po izolaci (resp. 24 h po transfekci mikroporací či lipofekcí) a dále a normalizována na expresi genu Ppia.

### **3.3.2.6. Stanovení exprese tkáňového faktoru na úrovni proteinu**

#### **3.3.2.6.1. SDS-PAGE a Western Blot**

Vzorky izolovaných LO po transfekci siRNA proti tkáňovému faktoru a kontrolní LO po kultivaci v médiu byly zlyzovány v RIPA pufru s inhibítorem proteáz a následně rozděleny pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Pro elektroforézu byl použit Laemmli nanášecí pufr obsahující 8 % SDS, 40 % glycerol, 0,02 % bromofenolovou modř, 250 mM Tris a 20 % 2-merkaptoetanol (všechny chemikálie od Sigma-Aldrich, Německo) o pH 6,8. Po zahřátí na 95°C po dobu 3 minut byly vzorky v pufru nanесeny na 15 % polyakrylamidový gel a přebíotovány na PVDF membrány (Merck Millipore, USA) s použitím elektroblotteru Pierce G2 (Thermo Fisher Scientific, USA). Membrány byly blokovány 3 % bovinním sérovým albuminem (Sigma-Aldrich, Německo). Primární polyklonální králičí protilátka proti tkáňovému faktoru ab151748 (Abcam, UK) byla použita v ředění 1:1000. Sekundární kozí anti-králičí protilátka IgG konjugovaná s avidín-peroxidázou (Merck Millipore, USA) byla ředěna 1:10000. Pro detekci chemiluminiscenčního signálu byl použit substrát SuperSignal West Pico Plus (Thermo Fisher Scientific, USA). Signál byl zaznamenán pomocí chemiluminiscenčního a fluorescenčního zobrazovacího systému G:BOX Chemi XR5 (Syngene, UK).

#### **3.3.2.6.2. ELISA**

Ke stanovení exprese tkáňového faktoru na úrovni proteinu metodou ELISA byl použit kit od firmy MyBioSource, Inc. (USA). Byl testován jednak obsah tkáňového faktoru v izolovaných LO a jednak obsah tkáňového faktoru v médiu během kultivace LO (nativních a transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru).



Množství proteinu tkáňového faktoru bylo vztaženo na množství celkového proteinu, které bylo stanoveno bicinchoninovou metodou.

### **3.3.2.7. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO intravitálním barvením patentní modří V**

Pro makroskopické vyhodnocení rozsahu poruchy prokrvení jater příjemce způsobené transplantací LO do portální žíly byla využita patentní modř V (Bleu Patenté V, Sodique Guerbet 2,5 %, Francie) tak, jak bylo popsáno v kapitole 3.2.2.7. 100 ul barvy bylo naředěno 1:1 fyziologickým roztokem a aplikováno do portální žíly potkana 2 hodiny po transplantaci 1000 LO nativních nebo transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru. Následně byl pořízen makroskopický snímek jater.

### **3.3.2.8. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO pomocí MRI**

Zobrazování ischemie jater po transplantaci LO pomocí magnetické rezonance probíhalo na 4,7 T MRI skeneru s rezonátorovou cívkou o průměru 7 cm (Bruker, Německo) dle protokolu popsaného v kapitole 3.2.2.8. Potkanům v celkové anestezii byly podvázány jaterní tepny tak, jak bylo popsáno v kapitole 3.2.2.4. Následně jim bylo transplantováno 1000 LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací či lipofekcí (kap. 3.3.2.4.1. a 3.3.2.4.2.) a 2 hodiny poté bylo zahájeno měření magnetickou rezonancí. Objem neprokrvené jaterní tkáně byl poté kvantifikován dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2.9. na základě snímků z magnetické rezonance v programu ImageJ (volně dostupný na <https://imagej.net/>).

### **3.3.2.9. Transplantace LO diabetickým potkanům**

Na základě výsledků optimalizace transfekčních metod mikroporace a lipofekce byly vybrány nejvhodnější podmínky, které byly následně použity pro transfekci siRNA proti tkáňovému faktoru do buněk LO. Takto ošetřené LO byly 24

hodin po transfekci transplantovány do jater dvěma skupinám diabetických potkanů v počtu 2 LO/gram váhy příjemce (skupina D – LO transfekované siRNA mikroporací a E – LO transfekované siRNA lipofekcí). Další skupině diabetických zvířat (skupina C) byly transplantovány nativní LO ošetřené pouze mikroporací bez přítomnosti siRNA. Dále byly připraveny dvě kontrolní skupiny zvířat – skupina A – transplantace LO dle standardního postupu po kultivaci LO přes noc (viz kapitola 3.2.2.5.) – a skupina B – transplantace LO ihned po izolaci, obě taktéž v počtu 2 LO/gram váhy příjemce (n = 6 v každé skupině). Po transplantaci byla sledována hladina glykémie příjemců každý druhý den až do ustanovení normoglykémie a dále 2x týdně po dobu 30 dnů. Po celou dobu byla sledována také hmotnost potkanů. 30 dní po transplantaci byl příjemcům proveden intravenózní glukózový toleranční test (IVGTT).

#### **3.3.2.10. Intravenózní glukózový toleranční test (IVGTT)**

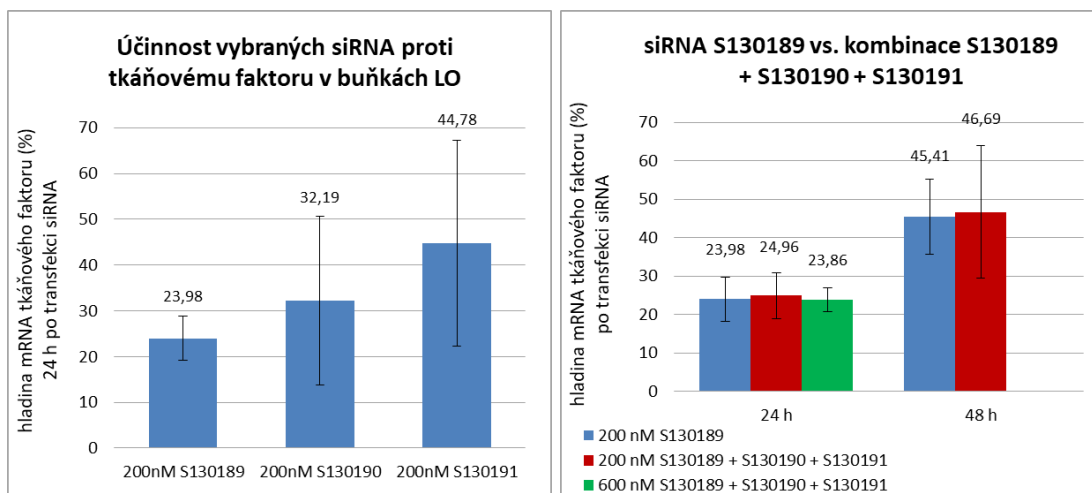
Potkanům po lačnění přes noc byl v inhalační anestezii isofluranem aplikován roztok 20 % glukózy do ocasní žíly (0,25 ml/100g váhy příjemce) a následně byla měřena glykémie v čase 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 a 120 minut. Koeficient asimilace glukózy  $K_G$  byl spočten jako směrnice lineární regrese průběhu glykémie ( $K_G > 1.2$  %/min = normální,  $0.8 < K_G < 1.2$  %/min = porušená a  $K_G < 0.8$  %/min = diabetická odpověď).

### 3.3.3. VÝSLEDKY

#### 3.3.3.1. Optimalizace transfekce siRNA do buněk LO a stanovení inhibice exprese tkáňového faktoru na úrovni mRNA

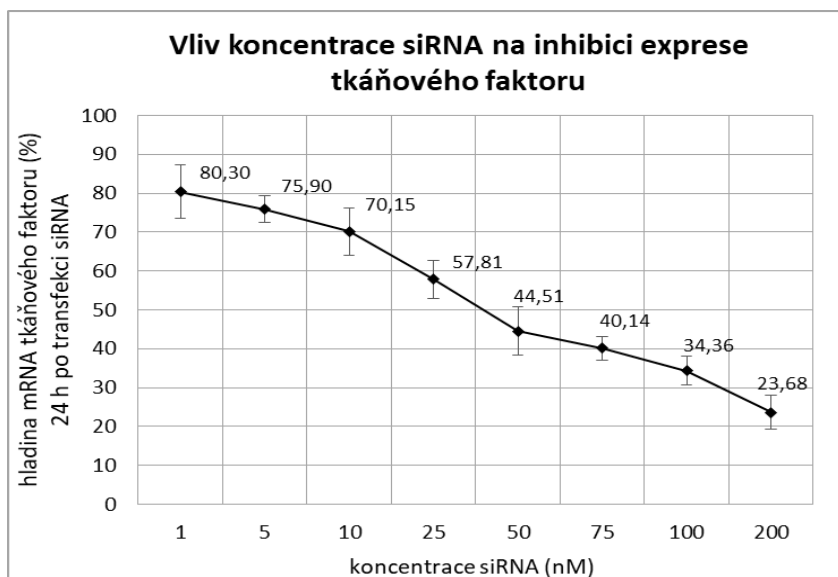
##### 3.3.3.1.1. Mikroporace

Na základě optimalizačních experimentů s fluorescenčně značenou Cy3-siRNA byly dle účinnosti a s ohledem na viabilitu LO vybrány nejvhodnější parametry pro mikroporaci, a to 2 pulsy o délce 30 ms a napětí 950 V. Tyto parametry byly použity pro všechny následující experimenty. Pomocí tří testovaných siRNA proti tkáňovému faktoru (S130189, S130190 a S130191) v nejvyšší doporučené koncentraci 200 nM se podařilo snížit expresi tkáňového faktoru na úrovni mRNA 24 hodin po transfekci na  $23,98 \pm 5,81$  %,  $32,19 \pm 18,48$  % a  $44,78 \pm 22,42$  % (**Obrázek V20**, str. 89, **vlevo**). Pro další experimenty byla vybrána siRNA S130189. Kombinace všech tří siRNA (o celkové koncentraci 200nM) vedla ke snížení hladiny mRNA tkáňového faktoru na  $24,96 \pm 5,98$  % 24 hodin po transfekci a  $46,69 \pm 17,31$  % 48 hodin po transfekci, transfekce samotnou siRNA S130189 přitom vedla ke snížení exprese na  $23,98 \pm 5,81$  % 24 hodin po transfekci a  $45,41 \pm 9,80$  % 48 hodin po transfekci (**Obrázek V20**, str. 89, **vpravo**). Kombinace všech tří siRNA tedy v tomto případě nepřispěla ke zvýšení účinnosti inhibice exprese tkáňového faktoru, a to ani při zvýšení koncentrace siRNA na 600 nM, kdy došlo ke snížení exprese tkáňového faktoru na  $23,86 \pm 3,14$  %. Uvedená data jsou průměrem minimálně 3 nezávislých experimentů.



**Obrázek V20:** Inhibice exprese tkáňového faktoru v buňkách LO mikroporací vybraných siRNA. **Vlevo:** Porovnání účinnosti inhibice exprese tkáňového faktoru tří různých siRNA (S130189, S130190 a S130191) v buňkách LO 24 hodin po transfekci 200 nM siRNA mikroporací. **Vpravo:** Porovnání účinnosti inhibice exprese tkáňového faktoru nejúčinnější siRNA (S130189) a kombinací všech tří siRNA 24 a 48 hodin po transfekci mikroporací. Data jsou zobrazena jako průměr tří nezávislých experimentů.

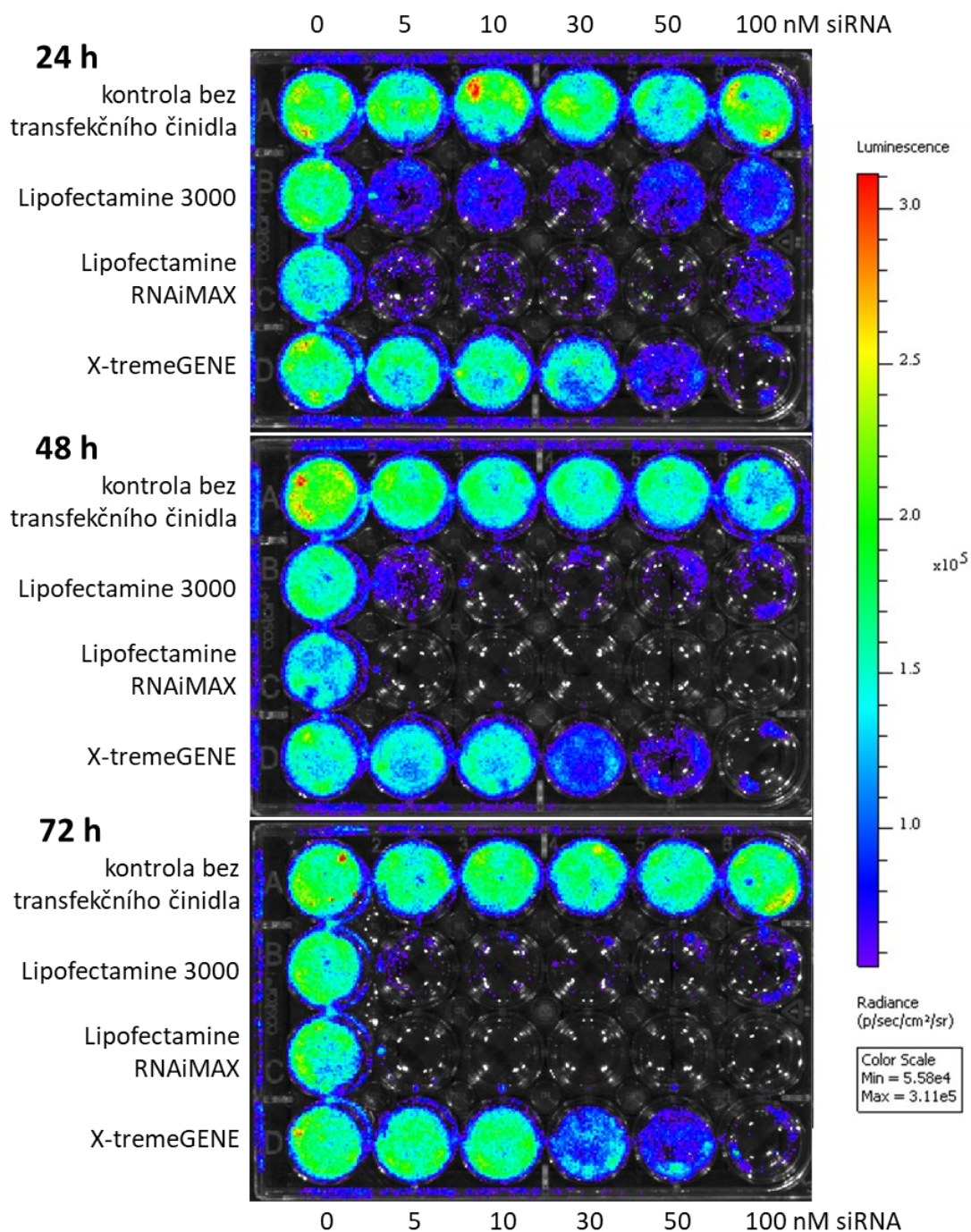
Na **Obrázku V21** je zobrazena závislost inhibice exprese tkáňového faktoru na koncentraci použité siRNA (S130189) v rozmezí koncentrací 1–200 nM. Data jsou průměrem ze dvou nezávislých experimentů.



**Obrázek V21:** Vliv koncentrace siRNA S130189 na inhibici exprese tkáňového faktoru v buňkách LO 24 hodin po transfekci mikroporací. Data ukazují procentuální obsah mRNA pro tkáňový faktor ve vzorku vzhledem ke kontrole a jsou průměrem dvou nezávislých experimentů.

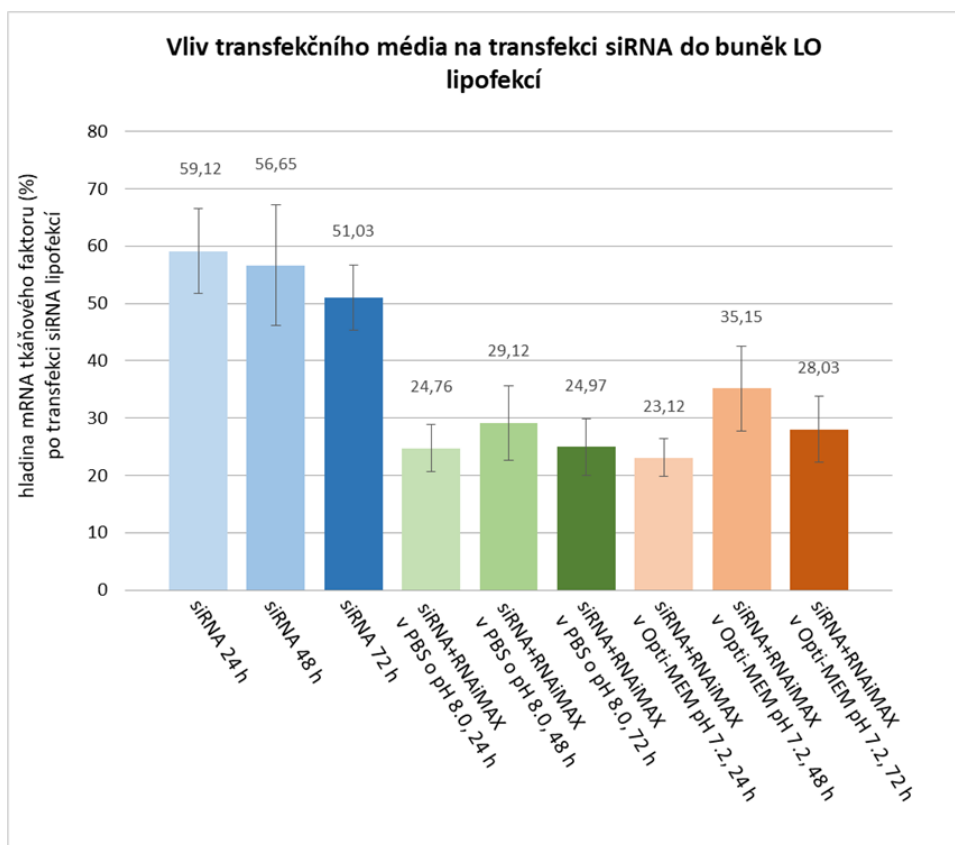
### 3.3.3.1.2. *Lipofekce*

Na základě optimalizačních experimentů s fluorescenčně značenou Cy3-siRNA a experimentů na potkaních mesenchymálních kmenových buňkách exprimujících gen pro enzym luciferázu bylo vybráno transfekční činidlo Lipofectamine RNAiMAX, které vykazovalo nejvyšší účinnost transfekce již po 24 hodinách. Nejúčinnější koncentrace v našem experimentu byla 50 nM. Na **Obrázku V22** (str. 91) jsou zobrazeny snímky bioluminiscence mesenchymálních kmenových buněk exprimujících luciferázu po přidání substrátu luciferinu 24, 48 a 72 hodin po transfekci siRNA proti luciferáze. Z obrázků je patrné, že 50 nM koncentrace siRNA je zcela dostatečná pro inhibici genové exprese v mesenchymálních kmenových buňkách a její efekt trvá minimálně tři dny. Zároveň se jedná o maximální doporučenou koncentraci siRNA při použití lipofekčního činidla Lipofectamine RNAiMAX.



**Obrázek V22:** Porovnání účinnosti lipofekčních činidel Lipofectamine 3000, Lipofectamine RNAiMAX a X-tremeGENE v transfekci potkaních mesenchymálních kmenových buněk exprimujících gen pro luciferázu. Účinnost transfekce za přítomnosti různé koncentrace siRNA proti luciferáze (0–100 nM) byla detekována pomocí bioluminiscence 24, 48 a 72 hodin po transfekci.

Během optimalizačních experimentů byl také testován vliv transfekčního média a jeho pH, tedy prostředí, v jakém transfekce probíhá, na její účinnost. Na **Obrázku V23** (str. 92) je znázorněno srovnání účinnosti inhibice exprese tkáňového faktoru na úrovni mRNA po transfekci lipofekčním činidlem Lipofectamine RNAiMAX siRNA o koncentraci 50 nM v PBS o pH 8,0, dále v Opti-MEM médiu o pH 7,2 a nakonec transfekce samotnou siRNA bez transfekčního agens v kultivačním médiu o pH 7,4 v čase 24, 48 a 72 hodin po transfekci. Z výsledku je patrné, že v našem experimentální uspořádání nehraje transfekční médium ani pH v tomto rozmezí z hlediska účinnosti transfekce zásadní roli.



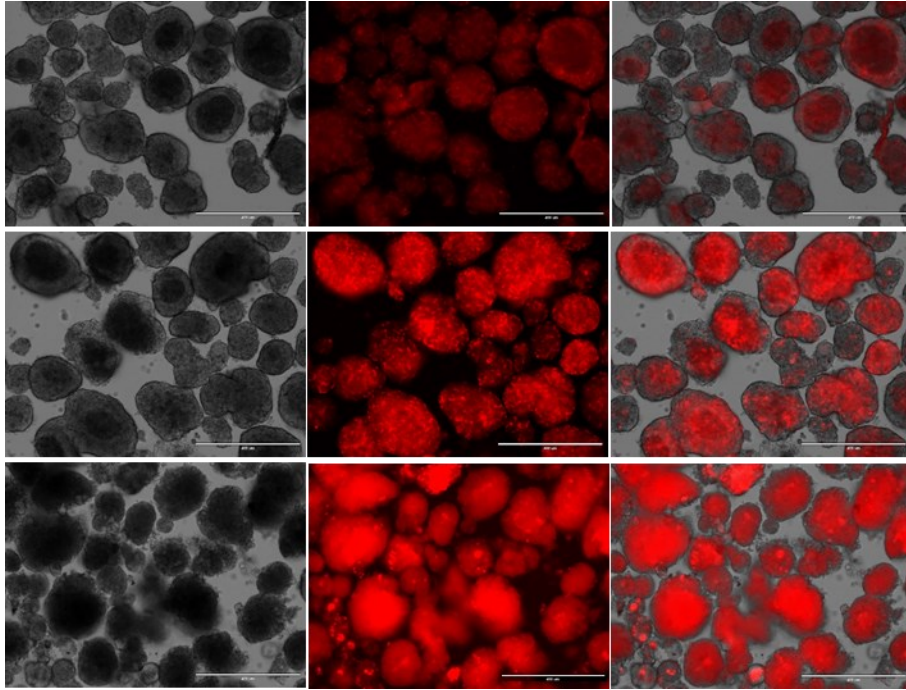
**Obrázek V23:** Porovnání účinnosti transfekce 50 nM siRNA proti tkáňovému faktoru do buněk LO lipofekcí v různém transfekčním prostředí 24, 48 a 72 hodin po transfekci. Hodnoty v % vůči netransfekované kontrole ukazují průměr ze dvou nezávislých experimentů.

Nejlepších výsledků inhibice exprese tkáňového faktoru lipofekčním činidlem Lipofectamine RNAiMAX na úrovni mRNA bylo dosaženo lipofekcí 50 nM siRNA v Opti-MEM médiu o pH 7,2 24 hodin po transfekci, kdy bylo dosaženo snížení hladiny mRNA na  $23,12 \pm 3,27$  % (**Obrázek V23**, str. 91). 48 hodin po transfekci pak hladina mRNA pro tkáňový faktor dosahovala  $35,15 \pm 7,35$  % a 72 hodin po transfekci  $28,03 \pm 5,72$  %. Tyto výsledky jsou zcela srovnatelné s lipofekcí siRNA v PBS o pH 8,0, kdy bylo 24, 48 a 72 hodin po transfekci dosaženo snížení hladiny mRNA pro tkáňový faktor na  $24,76 \pm 4,10$  %,  $29,12 \pm 6,53$  % a  $24,97 \pm 4,91$  % oproti kontrole. Inkubací LO se samotnou siRNA bez transfekčního činidla bylo dosaženo poklesu hladiny mRNA pro tkáňový faktor na  $59,12 \pm 7,35$  % 24 hodin,  $56,65 \pm 10,49$  % 48 hodin a  $51,03 \pm 5,71$  % 72 hodin po transfekci.

#### **3.3.3.1.3. Optimalizace transfekce LO pomocí Cy3-siRNA**

Pomocí fluorescenčně značené Cy3-siRNA byla ověřena a porovnána účinnost různých transfekčních podmínek lipofekce a mikroporace. Na **Obrázku V24** (str. 94) je zobrazena fluorescence LO transfekovaných Cy3-siRNA za vybraných podmínek lipofekcí a mikroporací v čase 24 hodin po transfekci ve srovnání s kontrolou bez transfekčního činidla/mikroporace. Pro lipofekci byla zvolena koncentrace Cy3-siRNA 50 nM v kombinaci s lipofekčním činidlem Lipofectamine RNAiMAX v množství 2  $\mu$ l/100  $\mu$ l reakční směsi v Opti-MEM médiu o pH 7,2. Pro mikroporaci přístrojem Neon (Thermo Fisher Scientific) byla použita koncentrace Cy3-siRNA 200 nM v pufru R dodávaném výrobcem za použití 2 pulzů o délce 30 ms a napětí 950 V. Na obrázku je vidět silná fluorescence ostrůvků transfekovaných Cy3-siRNA lipofekcí a mikroporací ve srovnání s kontrolou. Nejvyšší fluorescence dosahovaly ostrůvky po mikroporaci siRNA v maximální koncentraci 200 nM, což odpovídá 4x vyšší koncentraci siRNA použité při transfekci touto metodou než při lipofekci.

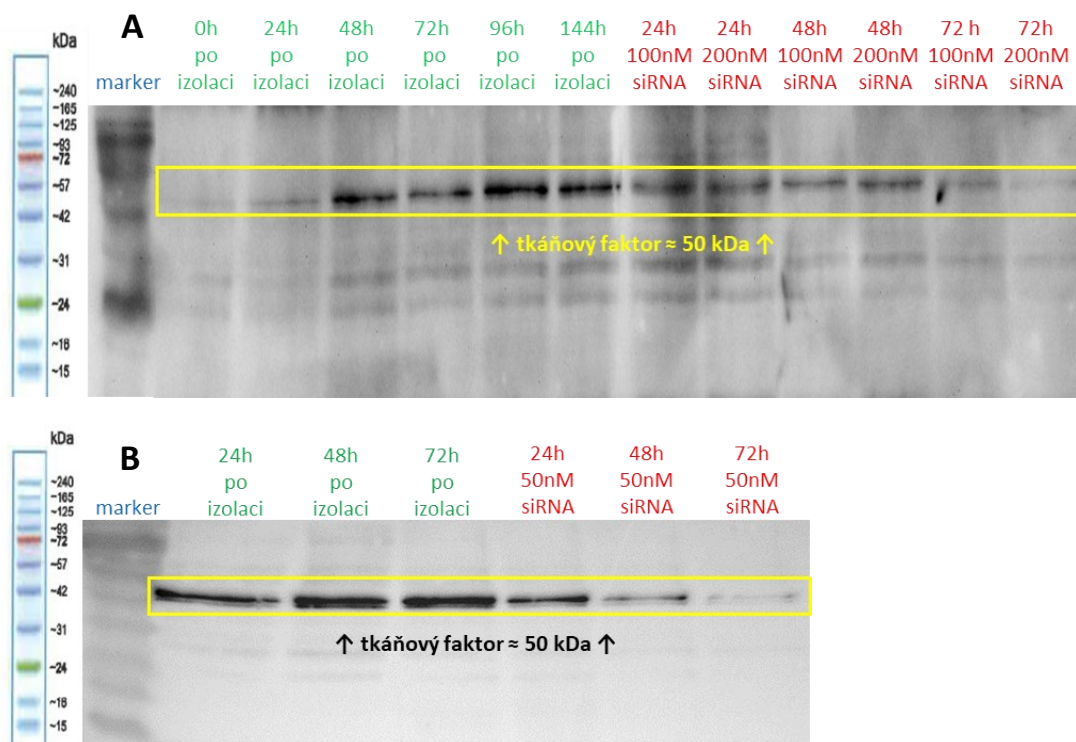




**Obrázek V24:** Fluorescence izolovaných potkaních LO po transfekci Cy3-siRNA bez transfekčního činidla (nahore, koncentrace 100 nM), lipofekcí činidlem Lipofectamine RNAiMAX (uprostřed, koncentrace 50 nM) a mikroporací (dole, koncentrace 200 nM). Fotky LO ve fázovém rozhraní – vlevo, fluorescence – uprostřed a kombinovaný snímek – vpravo. Měřítko = 400  $\mu\text{m}$ .

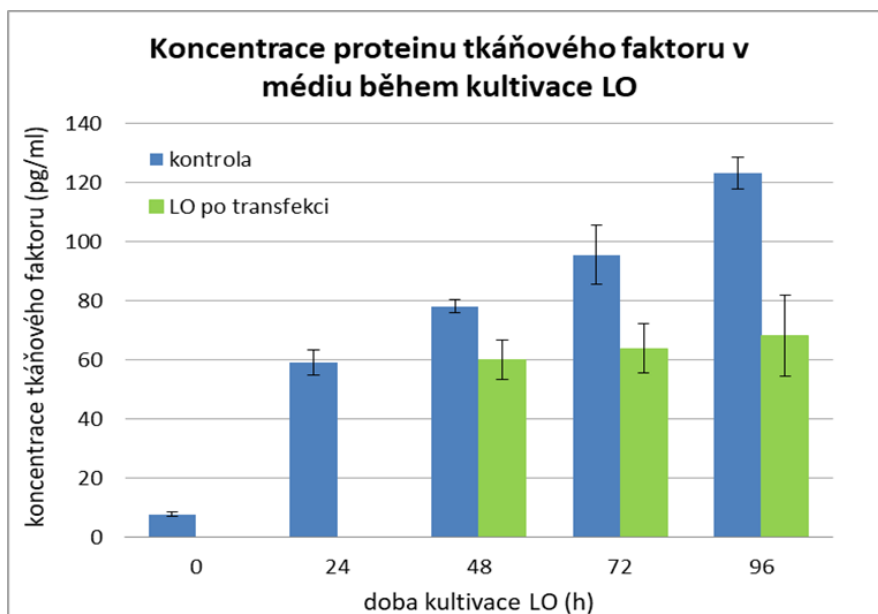
### 3.3.3.2. Stanovení exprese tkáňového faktoru na úrovni proteinu

Kvalitativně byl obsah proteinu tkáňového faktoru v buňkách LO během kultivace a po transfekci siRNA stanoven metodou Western Blot (**Obrázek V25**, str. 95). Z obrázků je patrné, že po izolaci LO je obsah tkáňového faktoru v buňkách LO minimální a postupně dochází ke zvyšování jeho množství. Po transfekci naopak dochází k postupnému snižování množství proteinu tkáňového faktoru v buňkách LO, což je nejvíce znatelné 72 hodin po transfekci. Kvůli obecně nízkému množství tkáňového faktoru v buňkách LO je nicméně Western Blot nevhodný pro kvantitativní vyhodnocení změn v jeho expresi.

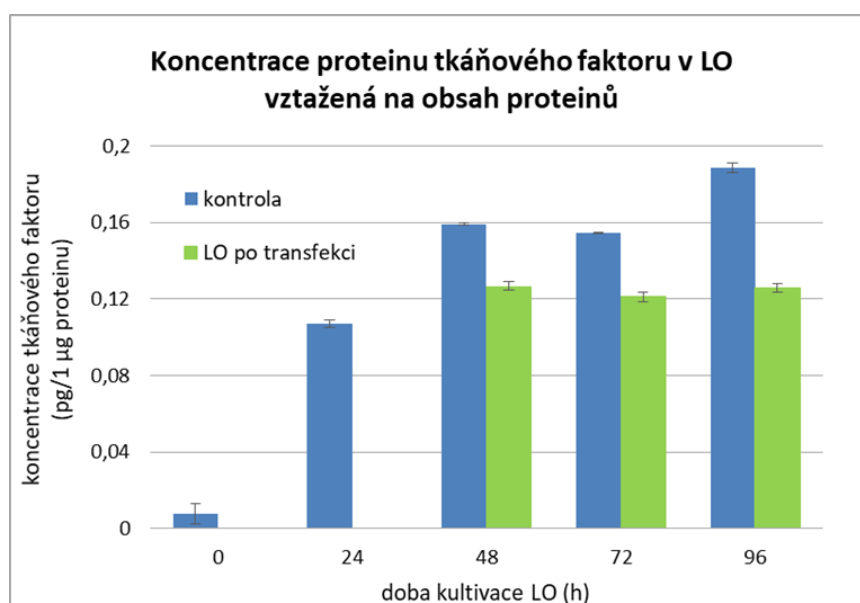


**Obrázek V25: Stanovení exprese tkáňového faktoru na úrovni proteinu v izolovaných LO metodou Western blot. A –** Exprese tkáňového faktoru v izolovaných LO 24, 48 a 72 hodin po transfekci 100 a 200 nM siRNA mikroporací ve srovnání s nativními LO kultivovanými po dobu 0–144 hodin. **B –** Exprese tkáňového faktoru v izolovaných LO 24, 48 a 72 hodin po transfekci 50 nM siRNA lipofekcí ve srovnání s nativními LO kultivovanými po dobu 24–72 hodin.

Metodou ELISA byl stanoven obsah proteinu tkáňového faktoru v nativních LO a LO transfekovaných 200 nM siRNA mikroporací (**Obrázek V26**, str. 96), stejně jako obsah proteinu tkáňového faktoru v kultivačním médiu, ve kterém byly nativní či transfekované LO kultivovány (**Obrázek V27**, str. 96). 24, 48 a 72 hodin po transfekci LO 200 nM siRNA mikroporací, což odpovídá době kultivace 48, 72 a 96 hodin, byl naměřen obsah proteinu tkáňového faktoru v LO  $0,127 \pm 0,00187$  pg,  $0,121 \pm 0,00281$  pg a  $0,126 \pm 0,00231$  pg na 1  $\mu$ g proteinu. V nativních LO kultivovaných po dobu 48, 72 a 96 hodin bylo naměřeno  $0,159 \pm 0,00053$  pg,  $0,154 \pm 0,00042$  pg a  $0,189 \pm 0,00237$  pg na 1  $\mu$ g proteinu.



**Obrázek V26:** Množství proteinu tkáňového faktoru v nativních LO a LO transfekovaných 200 nM siRNA mikroporací stanovené metodou ELISA a vztažené na množství celkového proteinu. Data jsou průměrem ze dvou nezávislých experimentů.



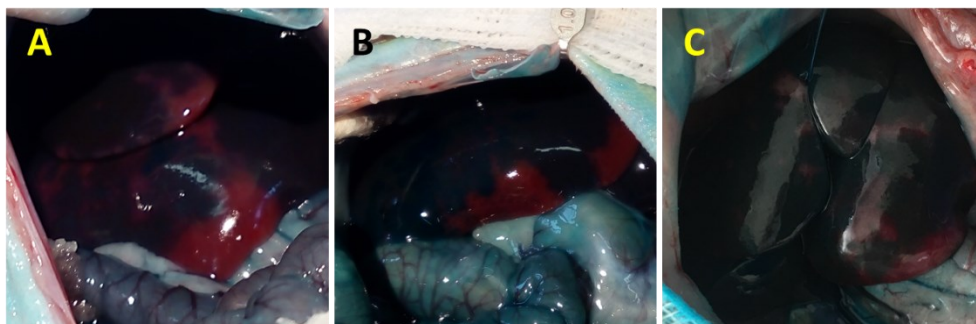
**Obrázek V27:** Koncentrace proteinu tkáňového faktoru v kultivačním médiu během kultivace nativních LO a LO transfekovaných 200 nM siRNA mikroporací stanovená metodou ELISA. Data jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů.

V kultivačním médiu s transfekovanými LO byla detekována koncentrace tkáňového faktoru  $60,04 \pm 6,72$  pg/ml 24 hodin,  $63,73 \pm 8,35$  pg/ml 48 hodin a  $68,09 \pm 13,82$  pg/ml 72 hodin po transfekci 200 nM siRNA mikroporací. V odpovídajících

kontrolách, tedy v médiu s nativními LO kultivovanými po dobu 48, 72 a 96 hodin, byla naměřena koncentrace proteinu tkáňového faktoru  $78,09 \pm 2,34$  pg/ml,  $95,48 \pm 10,05$  pg/ml a  $123,10 \pm 5,43$  pg/ml.

### 3.3.3.3. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO intravitálním barvením patentní modří V

Aplikací patentní modří V, intravitálního kontrastního barviva, do portálního řečiště potkanů 2 hodiny po transplantaci 1000 LO byl makroskopicky zobrazen rozsah ischemie jater způsobený mechanickou obstrukcí v kombinaci s nespecifickou zánětlivou reakcí IBMIR. Z výsledků je zřejmé, že transplantace LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru vede ke vzniku výrazně menšího rozsahu neperfundovaných oblastí ve srovnání s transplantací nativních LO (**Obrázek V28**).

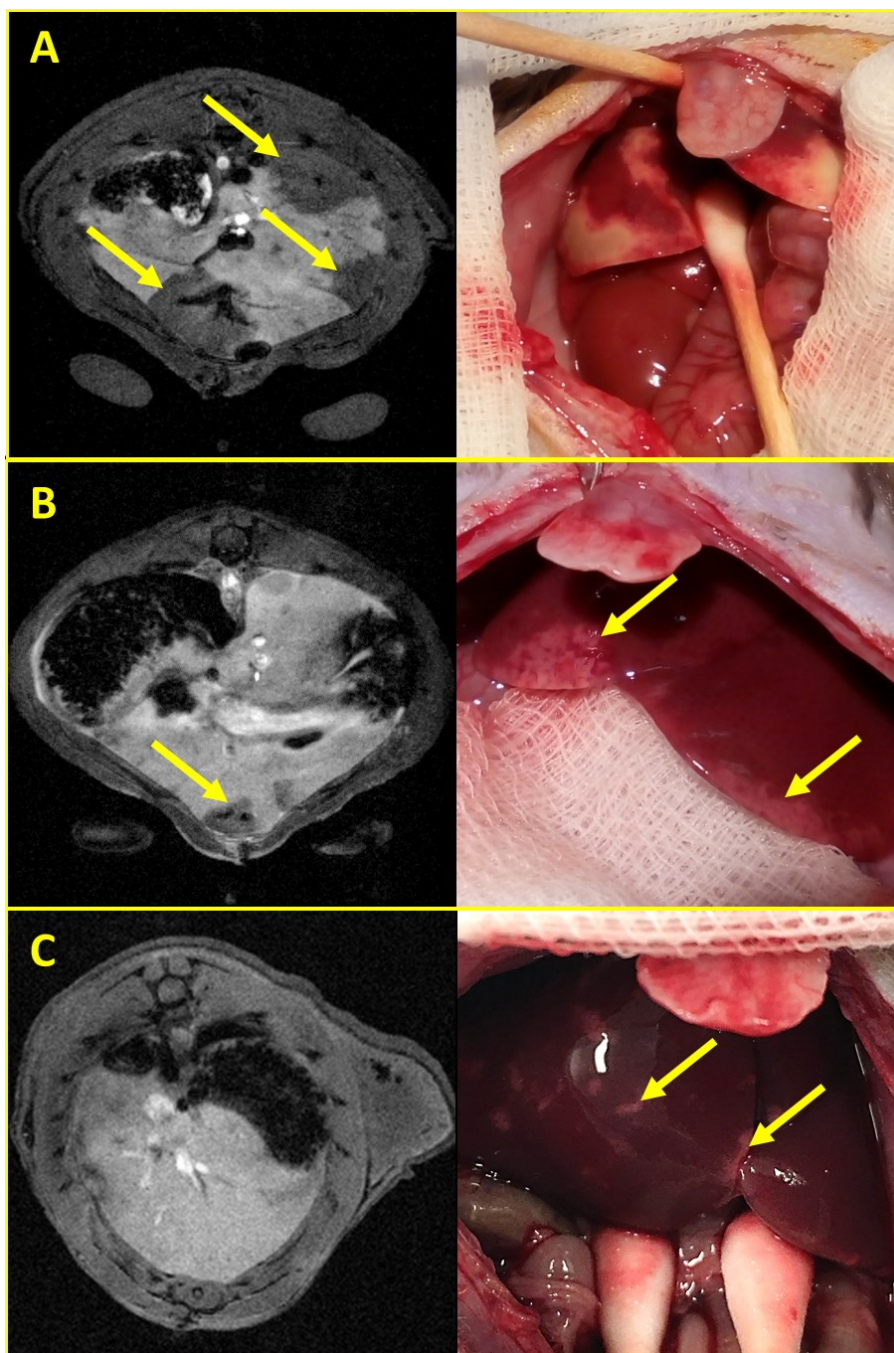


**Obrázek V28:** Zobrazení ischemických oblastí jater potkanů intravitální kontrastní barvou (patentní modř V) 2 hodiny po transplantaci nativních LO (A) a LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací (B) a lipofekcí (C).

### 3.3.3.4. Zobrazení ischemie jater po transplantaci LO pomocí MRI

Kvantifikace rozsahu ischemie jater 2 hodiny po transplantaci 1000 LO s podvazem jaterních tepen pomocí MRI s kontrastní látkou prokázala výrazné snížení objemu neperfundované tkáně po transplantaci LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru. Neprokrvené oblasti zobrazené pomocí MRI přitom dobře korelovaly s nekrotickými lézemi, které bylo možné pozorovat ve stejných místech o

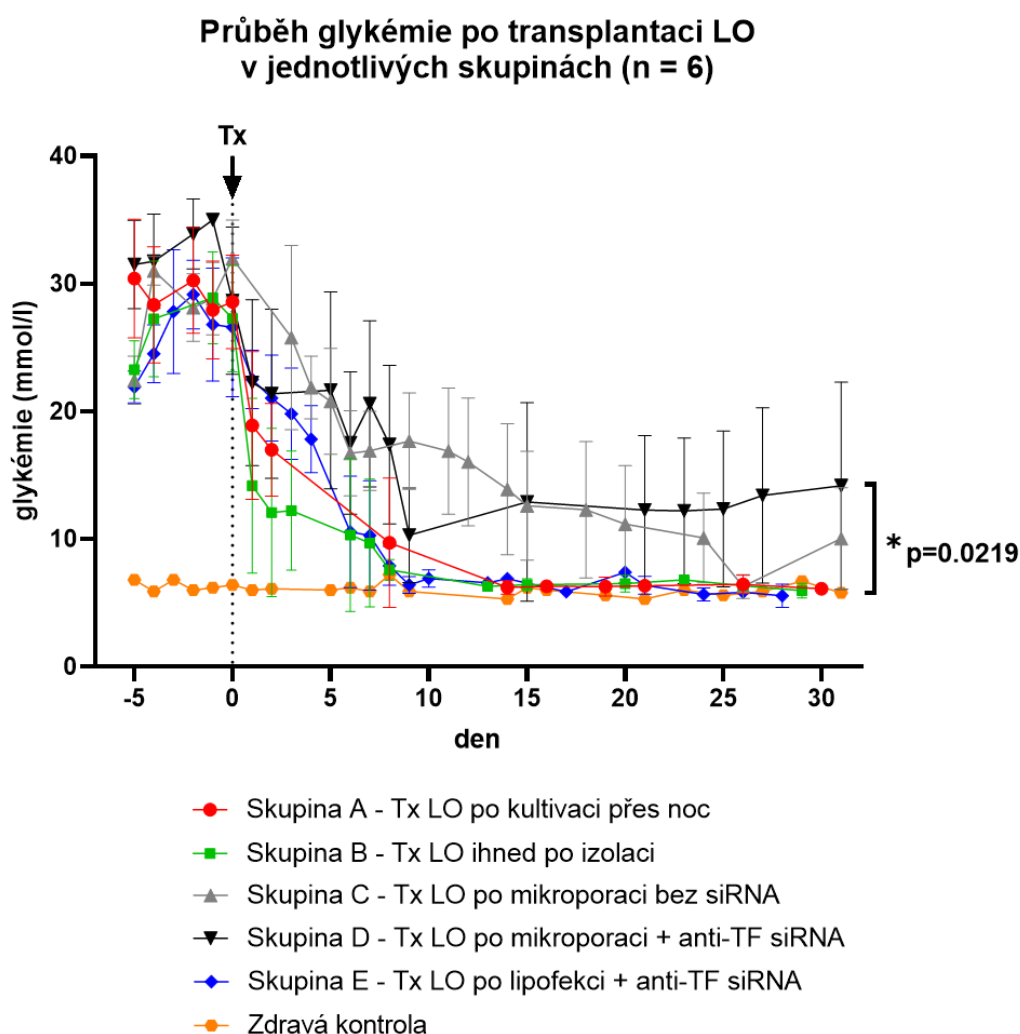
dva dny později. Zatímco po transplantaci nativních LO ischemické oblasti v játrech zaujímaly přibližně 28,1 %, po transplantaci LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací to bylo jen 11,3 %. To by přitom odpovídalo rozsahu ischemie po transplantaci jen cca 250 nativních LO (**Obrázek V17**, str. 70). Po transfekci LO siRNA lipofekcí byly dokonce ischemické léze v játrech tak malé a rozptýlené, že nebylo možné je pomocí MRI spolehlivě kvantifikovat. Inhibice exprese tkáňového faktoru tedy pravděpodobně zabraňuje rozsáhlé koagulaci v portálním řečišti po aplikaci LO a má tak významný vliv na vznik ischemických oblastí v játrech. Porovnání snímků z magnetické rezonance 2 hodiny po transplantaci nativních LO a LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací a lipofekcí a nekrotických oblastí 2 dny poté je znázorněno na **Obrázku V29** (str. 99).



**Obrázek V29:** Snímky z magnetické rezonance 2 hodiny po transplantaci (vlevo) a makroskopické snímky jater potkanů 2 dny po transplantaci LO nativních (A), transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací (B) a lipofekcí (C).

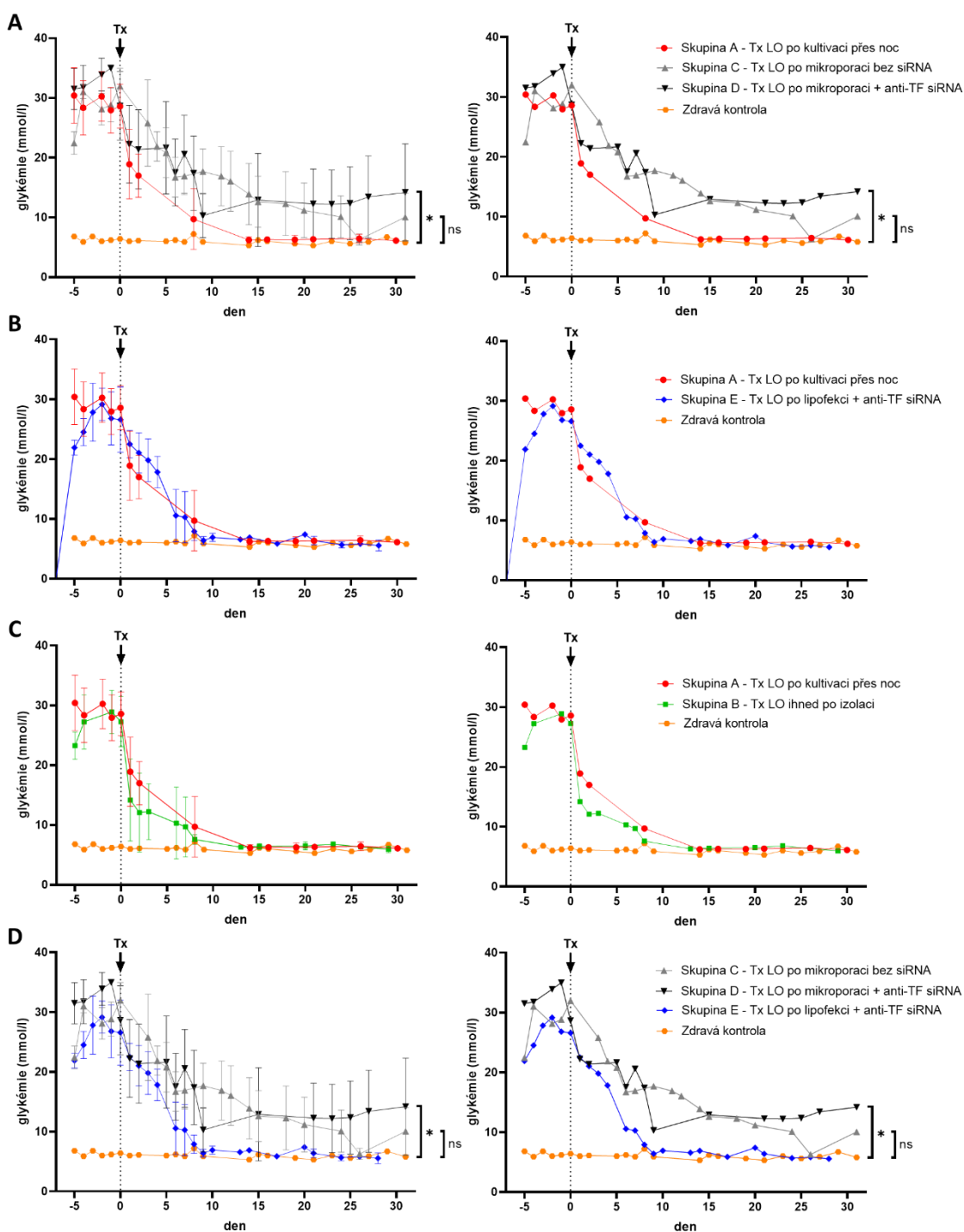
### 3.3.3.5. Transplantace LO diabetickým potkanům a IVGTT

Izolované nativní LO, LO po transfekci siRNA proti tkáňovému faktoru mikroporací a lipofekcí a LO ošetřené pouze mikroporací bez přítomnosti siRNA byly transplantovány pěti skupinám diabetických potkanů. Souhrnný **Obrázek V30** zobrazuje průběh glykémie potkanů během experimentu ve všech skupinách, **Obrázek V31** (str. 101) pak ukazuje logické porovnání jednotlivých experimentálních skupin.



**Obrázek V30:** 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.

## Průběh glykémie po transplantaci LO v jednotlivých skupinách



**Obrázek V31:** Průběh glykémie potkanů po transplantaci LO v jednotlivých skupinách. Data jsou znázorněna jako průměr z hodnot ve skupině  $\pm$  směrodatná odchylka (vlevo) nebo pouze průměr (vpravo). Tx LO – transplantace LO, anti-TF siRNA – siRNA proti tkáňovému faktoru. **A** – Srovnání Tx LO po mikroporaci  $\pm$  anti-TF siRNA vs. Tx nativních LO. **B** – Srovnání Tx LO po lipofekci + anti-TF siRNA vs. Tx nativních LO. **C** – Srovnání Tx nativních LO ihned po izolaci a pokultivaci přes noc. **D** – Srovnání Tx LO po mikroporaci  $\pm$  anti-TF siRNA vs. Tx LO po lipofekci + anti-TF siRNA. 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.



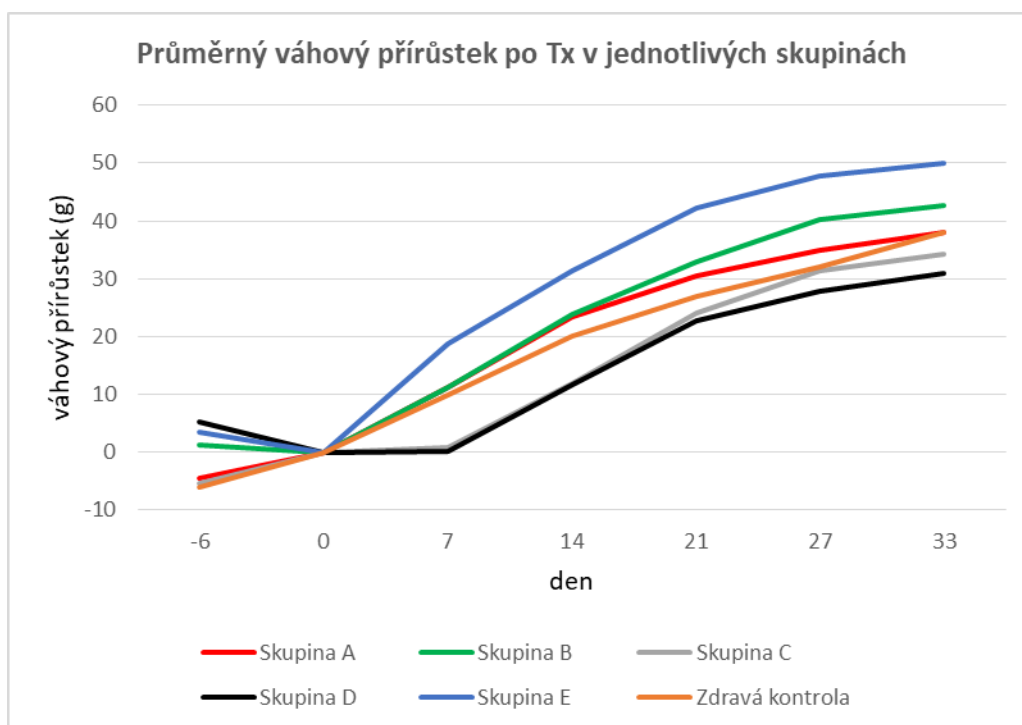
Z průběhu glykémie je patrné, že transplantace 2 LO na 1 g váhy příjemce standardní metodou, tzn. po kultivaci přes noc (Skupina A), vedla k vyléčení diabetu a navození stabilní normoglykémie, která nastala u některých zvířat 8. den po transplantaci, u všech zvířat ve skupině pak do 14 dnů. Skupina B, která představuje teoreticky transplantaci LO bez přítomnosti tkáňového faktoru, měla za následek velmi rychlý pokles glykémie a nástup normoglykémie u všech zvířat ve skupině nastal do 8 dnů po transplantaci. Při tomto postupu není výjimečné, když individuální zvíře dosáhne normoglykémie již druhý den po transplantaci, v našem případě to bylo jedno zvíře a další dvě měla glykémii pod 10 mmol/l. Transplantace LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru lipofekcí (Skupina E) dosáhla taktéž velmi dobrých výsledků a nástup normoglykémie u všech zvířat ve skupině nastal, stejně jako ve Skupině B, již 8. den po transplantaci. Naopak použití mikroporace, ať už v přítomnosti siRNA (Skupina D) nebo bez ní (Skupina C), nevedlo k vyléčení diabetu a nastolení normoglykémie u všech zvířat ani po 30 dnech. Ve skupině C dosáhla zvířata přechodně normoglykémie 27. den po transplantaci, avšak po glukózové zátěži během IVGTT 30. den po transplantaci LO došlo znovu k jejímu zvýšení. Z výsledků IVGTT (**Tabulka 2**, str. 103) navíc vyplývá, že použití siRNA ještě zhoršilo negativní efekt samotné mikroporace. Zatímco transplantace LO transfekovaných siRNA lipofekcí vyléčila všechna zvířata ve skupině stejně dobře jako transplantace nativních LO a koeficient asimilace glukózy  $K_G$  dosahoval v této skupině dokonce nejvyšších hodnot ze všech, transplantace LO ošetřených mikroporací bez přítomnosti siRNA vedla k stabilním, avšak diabetickým hodnotám glykémie a porušené asimilaci glukózy u 4 ze 6 zvířat, a transplantace LO po mikroporaci v přítomnosti siRNA proti tkáňovému faktoru dokonce vedla k porušené asimilaci glukózy u jedné poloviny a diabetické odpovědi u druhé poloviny zvířat, žádné zvíře tedy nebylo vyléčeno.

**Tabulka 2:** Výsledky IVGTT v jednotlivých skupinách 30 dní po transplantaci LO.

Výsledky IVGTT v jednotlivých skupinách					
skupina	<b>A</b> Tx LO po kultivaci přes noc	<b>B</b> Tx LO ihned po izolaci	<b>C</b> Tx LO mikroporace bez siRNA	<b>D</b> Tx LO mikroporace + siRNA	<b>E</b> Tx LO lipofekce + siRNA
zvíře					
1	1,2	1,86	1,15	0,63	1,45
2	1,51	1,67	1,13	0,7	2,06
3	1,86	1,84	1,75	0,9	1,32
4	1,27	1,66	1,02	0,66	1,25
5	1,3	1,72	1,08	0,86	2,06
6	1,47	1,5	1,56	0,84	1,93
diabetes < 0,8 porušená asimilace glukózy 0,8 - 1,2 normální glukózový metabolismus > 1,2					

A vs. D \*\*p=0.0038, B vs. D \*\*\*\*p<0.0001, D vs. E \*\*p=0.0099 dle Brown-Forsythova a Welchova ANOVA testu. Ostatní ns.

Relativní váhový přírůstek potkanů v jednotlivých skupinách v průběhu experimentu je zobrazen na **Obrázku V32** (str. 104) a dobře koreluje s průběhem glykemií a výsledky IVGTT. Zatímco potkani po transplantaci LO ošetřených mikroporací dosáhli nejnižšího váhového přírůstku (Skupina C a D) a skupina po mikroporaci v přítomnosti siRNA dopadla nejhůře ze všech, potkani po transplantaci LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru lipofekcí (Skupina E) dosáhli dokonce vyššího váhového přírůstku než potkani po transplantaci nativních LO (Skupina A a B) či zdravá kontrola. To svědčí o velmi dobrém přežívání a funkci takto ošetřených LO a možném benefitu krátkodobého potlačení exprese tkáňového faktoru v přihojení a funkci LO ve srovnání s transplantací dle běžného postupu. Naopak technika mikroporace ostrůvky poškozuje a zhoršuje funkci a přežívání štěpu. Transfekce siRNA proti tkáňovému faktoru do buněk LO touto metodou nevede k navození normoglykémie a vyléčení zvířat po transplantaci, naopak vede k jejich horšímu prospívání.



**Obrázek V32:** Relativní váhový přírůstek potkanů v jednotlivých skupinách v průběhu experimentu. Skupina A – Tx LO po kultivaci přes noc, Skupina B – Tx LO ihned po izolaci, Skupina C – Tx LO po mikroporaci bez siRNA, Skupina D – Tx LO po transfekci siRNA mikroporací, Skupina E – Tx LO po transfekci siRNA lipofekcí.

### 3.3.4. DISKUZE

Inhibice exprese tkáňového faktoru pomocí RNA interference představuje nový způsob ovlivnění nespecifické zánětlivé reakce IBMIR, která způsobuje významnou ztrátu ostrůvků v krátkém čase po transplantaci a výraznou měrou tak přispívá k nedostatečné účinnosti transplantace LO jakožto léčebné metody. Krátké uměle připravené molekuly siRNA jsou transfekovány do buněk LO, kde se specificky vážou na mRNA daného genu a způsobují tak jeho umlčení. V našich experimentech se potvrdilo, že právě transfekce může hrát v dosažení cíle zásadní roli. Pro transfekci jsme zvolili metodu mikroporace a lipofekce, neboť obě tyto metody jsou v naší laboratoři dobře zavedené a obě byly opakovaně popsány v literatuře v souvislosti s experimenty zahrnujícími LO.

Na základě optimalizačních experimentů s mesenchymálními kmenovými buňkami exprimujícími luciferázu s využitím siRNA proti luciferázovému genu a experimentů s izolovanými LO transfekovanými fluorescenčně značenou Cy3-siRNA byly vybrány nejvhodnější podmínky, při kterých byla transfekce dostatečně účinná a zároveň nebyla zásadně snížena viabilita buněk. Tyto podmínky byly následně použity pro transfekci LO třemi různými molekulami siRNA (S130189, S130190 a S130191) zacílenými proti různým částem molekuly tkáňového faktoru. Všechny tyto molekuly dokázaly významně snížit hladinu mRNA genu pro tkáňový faktor 24 i 48 hodin po transfekci, a to v případě obou použitých transfekčních metod. Jako nejúčinnější byla vybrána molekula siRNA S130189, pomocí níž bylo dosaženo snížení mRNA genu pro tkáňový faktor na 23 % původního množství a která byla dále použita pro všechny následující experimenty. Zvýšení účinnosti transfekce nebylo dosaženo ani při použití kombinace všech tří molekul siRNA při současném zvýšení koncentrace, což dokazuje existenci určitého maxima koncentrace siRNA, při jehož dosažení již nelze zvýšit

účinnost transfekce dalším zvyšováním koncentrace siRNA. Toto maximum je přitom různé pro každou transfekční metodu. Ze všech testovaných lipofekčních činidel bylo jako nejúčinnější vybráno transfekční činidlo Lipofectamine RNAiMAX při koncentraci siRNA 50nM, v případě mikroporace byly vybrány transfekční parametry se dvěma elektrickými pulzy o délce 20 ms a napětí 950 V při koncentraci siRNA 200 nM. Transfekce v obou případech vedla k vysoce účinnému dopravení molekul siRNA do buněk (mesenchymálních buněk i buněk LO) při současném minimálním snížení jejich viability. V případě mikroporace bylo možné pozorovat 24 h po transfekci poškození některých LO (především těch větších) pravděpodobně v důsledku narušení integrity LO elektrickými impulzy, které vedlo k rozpadu těchto LO na menší fragmenty a jejich postupnému zániku. Přeživší ostrůvky nicméně vykazovaly viabilitu srovnatelnou s kontrolními ostrůvky a testy GSIS 48 h po transfekci prokázaly zachovanou funkci inzulínové sekrece. Ostrůvky ošetřené lipofekcí naopak dokonce vykazovaly lepší viabilitu než kontrolní LO.

Za použití obou transfekčních metod bylo dosaženo vysoké a v obou případech obdobné míry inhibice exprese tkáňového faktoru, která byla na úrovni mRNA nejvyšší 24 h po transfekci (77 % v případě lipofekce a 76 % v případě mikroporace) a na úrovni proteinu 72 h po transfekci. Pomocí metody ELISA bylo prokázáno i snížení obsahu tkáňového faktoru v médiu během kultivace ostrůvků transfekovaných siRNA, což dokazuje snížení exprese solubilní formy tkáňového faktoru, která je do okolí vyplavována exocytózou společně s granuly inzulínu a glukagonu.

LO transfekované siRNA proti tkáňovému faktoru byly transplantovány potkanům a následně byl stanoven rozsah ischemie jater. Po aplikaci patentní modři V bylo patrné výrazné snížení velikosti neperfundovaných oblastí jater po transplantaci LO ve srovnání s nativními ostrůvky, které bylo ještě významnější u LO

transfekovaných siRNA lipofekcí. Stejně zjištění potvrdila i kvantifikace rozsahu ischemie jater pomocí MRI, kde z původních 28 % ischemické tkáně po transplantaci nativních LO byla u skupiny LO transfekovaných siRNA mikroporací ischemie snížena na méně než 11 % objemu jater a u LO transfekovaných siRNA lipofekcí nebyly dokonce zaznamenány žádné ohraničené ischemické oblasti, které by bylo možné kvantifikovat, ale pouze malé difúzní oblasti se sníženou intenzitou kontrastu. To potvrzuje naši hypotézu, že snížení množství tkáňového faktoru v LO vede ke snížení intenzity IMBIR a tím pádem ke vzniku menších ischemických oblastí v játrech po transplantaci LO.

Pro potvrzení účinnosti této metody *in vivo* byly LO v posledním kroce transplantovány diabetickým potkanům, u nichž byl následně sledován průběh glykémie a váha. Na konci experimentu (cca 30 dní po transplantaci LO) byl u všech potkanů proveden IVGTT. Skupina potkanů po transplantaci LO transfekovaných siRNA mikroporací nebo lipofekcí byla porovnána se skupinou po transplantaci nativních LO po kultivaci přes noc. Tato skupina představuje běžnou laboratorní praxi jak u potkanů, tak i v případě transplantace LO u lidí, kdy se z časových a logistických důvodů izolované ostrůvky v převážné většině případů ukládají na kulturu a transplantují druhý den po izolaci. Další kontrolní skupinou byli potkani po transplantaci LO ošetřených mikroporací bez přítomnosti siRNA a poslední kontrolní skupinou pak potkani po transplantaci LO ihned po izolaci. Tato skupina je důležitá, neboť představuje ideální stav transplantace v čase minimální exprese tkáňového faktoru. To vyplývá z našich výsledků kvantifikace genové exprese i z výsledků kvantifikace proteinu tkáňového faktoru v LO ihned po izolaci (**Obrázek V10**, str. 49 a **Obrázek V25**, str. 95). Tohoto stavu lze však v běžné praxi z důvodu časové

náročnosti transportu a přípravy příjemce k transplantaci dosáhnout jen ve výjimečných případech.

Z výsledků transplantace LO diabetickým potkanům je patrné, že mikroporace negativně ovlivňuje přežívání a funkci LO *in vivo* a jedná se tedy o nevhodnou metodu pro použití v izolovaných potkaních LO určených k transplantaci. Zatímco hodnoty glykémie po transplantaci LO ve skupinách po mikroporaci s i bez siRNA značí částečnou kompenzaci diabetu, dle hodnot IVGTT je jasné, že siRNA proti tkáňovému faktoru ještě dále významně zhoršuje negativní vliv samotné mikroporace, kdy ve skupině LO po mikroporaci siRNA nebylo vyléčeno žádné zvíře, 3 potkani ze 6 byli diabetičtí a 3 vykazovali porušenou asimilaci glukózy, zatímco ve skupině LO po mikroporaci bez siRNA byli dva potkani vyléčeni a zbytek měl porušenou asimilaci glukózy. Ve všech ostatních skupinách byla vyléčena všechna zvířata, což dokládá významný rozdíl mezi účinností mikroporace a lipofekce, kde výsledky IVGTT dosahovaly dokonce vyšších hodnot než v obou kontrolních skupinách s nativními ostrůvky. Tomu odpovídá i relativní váhový přírůstek zvířat v jednotlivých skupinách v průběhu experimentu, kdy potkani v obou skupinách po mikroporaci prospívali nejhůře, zatímco potkani s LO transfekovanými siRNA lipofekcí a s LO transplantovanými ihned po izolaci dosáhli vyššího váhového přírůstku než zdravá kontrola, přičemž skupina po lipofekci dopadla zdaleka nejlépe.

Závěrem lze říci, že se nám podařilo pomocí metody lipofekce docílit významného snížení exprese tkáňového faktoru při současném zachování dobré viability a funkce ostrůvků *in vitro* a *in vivo* a jejich transplantace diabetickým potkanům vedla k rychlému a kompletnímu vyléčení všech zvířat ve skupině. K dosažení normoglykémie přitom došlo dříve než v kontrolní skupině transplantace nativních ostrůvků po kultivaci přes noc, která odráží podmínky při transplantaci LO

v běžné laboratorní praxi. Výsledky ve skupině po transplantaci LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru lipofekcí byly srovnatelné se skupinou po transplantaci LO ihned po izolaci, tedy ve skupině, kde předpokládáme praktickou absenci proteinu tkáňového faktoru v buňkách LO. Naopak metoda mikroporace se ukázala v našem experimentálním uspořádání jako naprosto nevhodná s významným negativním účinkem na přežívání a funkci LO po transplantaci. Přítomnost siRNA proti tkáňovému faktoru přitom tento negativní vliv ještě dále výrazně zhoršila, což vedlo k celkovému selhání léčby diabetických potkanů.

### 3.3.5. ZÁVĚR

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.



#### 4. SOUHRNNÁ DISKUZE K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI PRÁCE

Léčba diabetu mellitu 1. typu je v současné době založena na frekventní injekční aplikaci inzulínu v kombinaci s měřením glykemie v krvi či kontinuálním měřením koncentrace glukózy v podkoží. Ve srovnání s minulostí neznamena dnes již diagnóza diabetu mellitu 1. typu přímé ohrožení života a současná standardní léčba nabízí většině pacientů poměrně dobré vyhlídky na kvalitní život do pokročilého věku, pozdním orgánovým komplikacím, jako je diabetická retinopatie, nefropatie, neuropatie a makroangiopatie, však nezabrání. Stále se jedná o léčbu symptomatickou a ne kauzální. Tu představuje v dnešní době pouze transplantace inzulín produkující tkáň, která jako jediná léčebná metoda obnovuje endogenní sekreci inzulínu a díky souběžné imunosupresivní léčbě inhibuje autoimunitní inzultidu. Prakticky tak umožňuje pacientům s diabetem 1. typu dosáhnout dlouhodobé nezávislosti na aplikaci inzulínu.

Transplantace LO jakožto alternativa k celoorgánové transplantaci pankreatu byla u člověka poprvé provedena v roce 1980 Davidem E. Sutherlandem (D. E. Sutherland et al., 1980) a do klinické praxe se významně rozšířila po zavedení Edmontonského protokolu v roce 2000 (Shapiro A. M. et al., 2000). I přes mnohaletý výzkum zaměřený na vylepšení této metody se transplantace LO stále potýká s některými nedostatky, které brání jejímu dalšímu rozšíření. Hlavním limitem na straně nabídky je omezený počet orgánů od kadaverózních dárců, na který navazuje ztráta podstatné části štěpu při izolaci ostrůvků a nízká efektivita přihojení štěpu v portálním řečišti příjemce v důsledku nespecifického zánětu a lokalizované hyperkoagulace (IBMIR). V porovnání s orgánovou transplantací pankreatu se tak typicky přihojí cca jedna čtvrtina ostrůvků.

Tato práce se věnuje možnosti zlepšení účinnosti metody transplantace LO v posledním ze jmenovaných úskalí, a to ztráty ostrůvků v časném posttransplantačním období v důsledku nespecifické zánětlivé reakce IBMIR, ke které dochází ihned 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 % transplantovaných ostrůvků v krátkém čase po transplantaci. Jedním z ústředních spouštěčů IBMIR je molekula tkáňového faktoru a jedním z hlavních projevů IBMIR 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 ostrůvků (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 (nepublikované výsledky) s polymerními kuličkami ( $\text{Ø}150 \mu\text{m}$ , potažené versus nepotažené heparinem) implantovanými do portálního řečiště 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 od systémového podání antikoagulancií, léků proti aktivaci komplementu až po kultivaci ostrůvků s inhibitory tkáňového faktoru nebo obalení ostrůvků např. v heparinu, ale žádný z nich nebyl krátkodobý, dostatečně účinný a bez významného rizika krvácení. V principu lze rozlišit dva přístupy – systémovou léčbu příjemce a manipulaci štěpu. Systémová léčba, aby byla úspěšná lokálně, vyžaduje

vysoké dávky léků, které jsou zatíženy rizikem krvácení. Pro manipulaci štěpu se nabízí možnosti kultivace v médiu s vysokým obsahem nikotinamidu, s protilátkami inhibujícími tkáňový faktor, v bezsérovém médiu nebo co nejrychlejší transplantace záhy po izolaci, jejímž následkem je generalizovaný krátkodobý útlum proteosyntézy a tvorba tkáňového faktoru se nestačí plně rozvinout. 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 komplementární úseky mRNA a iniciují jejich degradaci. Tato vysoce specifická vazba tak umožňuje selektivní zničení 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 techniku, která umožní šetrný a rovnoměrný průnik molekul několika vrstvami buněk ostrůvků. Porovnali jsme efektivitu a bezpečnost metody mikroporace a transfekce s využitím různých lipofekčních činidel. Samotný průnik siRNA do buněk jsme monitorovali pomocí fluorescenčně značených negativních kontrol (molekuly siRNA bez cílové sekvence s navázanou značkou Cy-3). Pomocí obou metod, lipofekce i mikroporace, bylo dosaženo vysoce účinné transfekce siRNA do buněk LO při současném zachování dobré viability ostrůvků i jejich schopnosti sekrece inzulínu po stimulaci glukózou, nicméně při použití mikroporace jsme

zaznamenali různý stupeň narušení struktury některých ostrůvků a jejich následný rozpad.

Objektivní posouzení efektu RNA interference je možné na několika úrovních, přičemž první z nich je mRNA, kdy se pomocí metody qRT-PCR stanovuje relativní množství sledované mRNA (pro tkáňový faktor) vzhledem k neošetřeným kontrolám. Pro určení relativního množství mRNA pomocí qRT-PCR je nezbytné použít stabilní endogenní kontrolu (tzv. referenční gen). V našem případě jsme v literatuře nenašli vhodný gen, a proto jsme provedli testování stability exprese 16 základních konstitutivně exprimovaných genů po izolaci LO a během následujících 120 hodin kultivace. Ukázalo se, že není dostupný žádný gen, který by sám o sobě byl dostatečně spolehlivou endogenní kontrolou po celou sledovanou dobu, nicméně od 48 hodin po izolaci ostrůvků dále se genová exprese ustaluje natolik, že je možné použít jako referenční jediný gen, kterým jsme zvolili gen Ppia. Pomocí metod mikroporace a lipofekce bylo dosaženo snížení hladiny mRNA pro tkáňový faktor až o 75 % 24 hodin po transfekci a 50 % 48 hodin po transfekci. Samotný efekt na mRNA však nedostatečně reflektuje skutečný dopad ošetření na funkci buněk, proto je vhodné sledovat i změny množství cílového proteinu. Pomocí metod ELISA a Western Blot bylo prokázáno, že během 24–48 hodin došlo k úbytku proteinu tkáňového faktoru v porovnání s kontrolami jak v buňkách LO, tak i v kultivačním médiu. Tento výsledek naznačuje, že je možné dosáhnout cíleného efektu transplantací ostrůvků 24–48 po ošetření siRNA. V pozdějším období účinek siRNA klesá a exprese genu se obnovuje na úroveň srovnatelnou s neošetřenými kontrolami. Byl tedy prokázán jasný efekt RNA interference na syntézu proteinu i jeho výskyt v buňkách ostrůvků po dobu nejméně 48 hodin po transfekci specifickými siRNA při zachování viability 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. Vycházeli jsme z literárně dostupných údajů, že ostrůvky se po vložení do portálního řečiště příjemce zachytí v terminálních větveních uvnitř jater a zároveň stimulací koagulační kaskády rozšíří obstrukci řečiště prostřednictvím vzniklého trombu. Byly popsány fokální ischemické nekrózy jaterní tkáň související prostorově s transplantovanými ostrůvky, ale techniku zobrazení výpadku perfúze bylo nutné vyvinout. Předpokládali jsme, že samotné podání intravitální barvy umožní pozorovat zpomalené probarvování tkáň jater distálně od usazených štěpů, což se potvrdilo. Pro objektivní kvantifikaci rozsahu ischemie jater ale bylo třeba využít zobrazovací metodu poskytující stabilní snímky. Pro tento experiment 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 zabarvení hypoperfundovaných oblastí, kam se kontrastní látka dostala cestou jaterních tepen. Metoda tak ve výsledku nemohla spolehlivě poruchy perfúze zobrazit. Proto jsme na základě literárních dat využili skutečnosti, že potkanovi lze přerušit tepenné zásobení jater bez fatálních následků, a připravili model s přerušením jaterních tepen *arteria hepatica propria* a *arteria hepatooesophagica*. V tomto modelu je možné spolehlivě zobrazit neperfundované oblasti jater, jejichž signál se po podání kontrastní látky nezmění. Celkový objem ischemické tkáň přitom dobře koreluje s počtem transplantovaných ostrůvků (100 LO  $\approx$  výpadek perfúze 6,3 % objemu jater, 500 LO  $\approx$  výpadek perfúze 20,7 % objemu jater, 1000 LO  $\approx$  výpadek perfúze 28,1 % objemu jater). Při vyšetřování 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 klesl objem neperfundované tkáně na 11,3 % oproti původním 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 LO (qRT-PCR, WB, ELISA) má prokazatelný ekvivalent i na biologické úrovni. Po inhibici exprese tkáňového faktoru pomocí RNA interference tak ve srovnání s nativními ostrůvky došlo k významnému snížení rozsahu poškození perfúze jater. Podvaz jaterních arterií bohužel brání přenosu tohoto modelu do klinické praxe, pro posouzení biologického efektu siRNA je však zcela vyhovující.

Potvrdili jsme tedy proveditelnost metody RNA interference a jejího efektu na expresi genu tkáňového faktoru v Langerhansových ostrůvcích. Potvrdili jsme i fakt, že samotná transfekce buněk siRNA nemá negativní efekt na viabilitu buněk LO a jejich schopnost uvolňovat inzulin v závislosti na okolní koncentraci glukózy. Z výsledků je však patrné, že metoda mikroporace vede v určitém směru k narušení funkce ostrůvků, a přestože se jejich viabilita i produkce inzulinu po transfekci zdála být v pořádku, funkce LO se později po transplantaci ukázala být nedostatečná. To je způsobeno pravděpodobně 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 však možné, že tento proces má na ostrůvky neblahý vliv a může

v některých případech vést k rozpadu ostrůvků a jejich postupnému zániku. Při kultivaci *in vitro* byl patrný vyšší rozpad LO transfekovaných mikroporací, než LO transfekovaných lipofekcí či nativních ostrůvků. Stejně tak při zhotovování histologických řezů LO transfekovaných mikroporací jsme se opakovaně setkali s rozpadem krájené tkáně, a tedy nemožností přípravy tenkých ucelených řezů. Metoda mikroporace se tedy ukázala být nevhodná pro použití v LO a naopak metoda lipofekce se zdá být velmi dobrou alternativou bez škodlivých účinků na funkci či přežití LO.

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 v kontrolní skupině byla provedena druhý den po izolaci ostrůvků, což je nyní běžná laboratorní praxe (izolace LO a jejich kultivace 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 však dokazují, že významně špatný vliv na funkci LO má především samotná transfekční technika, když zvířata v této 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 mírnou výhodu takto ošetřených ostrůvků oproti standardní transplantaci LO.

Závěrem lze říci, že námi testované 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. Samotná transfekce siRNA do buněk LO nepoškozuje jejich funkci a takto ovlivněné LO normalizují glykémii diabetického příjemce se stejnou účinností jako nativní LO. Velmi však záleží na transfekční technice, neboť se ukázalo, že mikroporace poškozuje funkci LO a není tedy vhodná pro použití v LO. Naopak lipofekce představuje vhodnou metodu pro transfekci siRNA do buněk LO, která nemá špatný vliv na jejich přežívání a funkci.



Transplantace LO transfekovaných siRNA proti tkáňovému faktoru lipofekcí vedla ke 100 % kompenzaci diabetu u všech zvířat ve skupině, k dřívějšímu nástupu normoglykémie a vyššímu váhovému přírůstku než u zvířat v ostatních skupinách včetně kontrolní. Další optimalizace transfekčních podmínek by mohla vést k dalšímu zvýšení efektivity připojení ostrůvků, a tedy k normalizaci glykemií příjemce menším štěpem.

## 5. ZÁVĚRY DISERTAČNÍ PRÁCE

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

- Byla stanovena exprese a vyhodnocena stabilita 16 základních konstitutivně exprimovaných genů běžně užívaných v laboratorní praxi jako referenční geny v izolovaných potkaních LO po izolaci a během 120 hodin následné kultivace. Bylo zjištěno, že po izolaci LO dochází k signifikantnímu snížení hladiny mRNA všech testovaných genů a žádný nich nespĺňuje stabilitní kritéria ( $\Delta Ct \leq \pm 0,5$ ) během celé testované doby (120 h).
- Celková RNA vykazuje po izolaci LO značné známky degradace. Během následujících 48 hodin kultivace dochází k regeneraci RNA a ustálení genové exprese. Od 48 hodin dále je pak integrita RNA prakticky neporušená a genová exprese všech testovaných genů je stabilní s nízkou variabilitou mezi vzorky ve skupině.
- Byly porovnány metody relativní a absolutní kvantifikace genové exprese a jejich spolehlivost při použití v izolovaných LO. Normalizace genové exprese v LO během prvních 48 hodin po izolaci je velmi problematická a nespolehlivá, a tedy použití metody relativní kvantifikace genové exprese v LO za těchto podmínek je nevhodné. Pro genové expresní analýzy po 48 hodinách kultivace dále byl jako vhodná endogenní kontrola pro následné studie zaměřené na inhibici exprese tkáňového faktoru vybrán gen Ppia.
- Expresce genu pro tkáňový faktor po izolaci LO je, stejně jako exprese ostatních genů, výrazně utlumená, hladina mRNA pro tkáňový faktor během následných 48 hodin kultivace vzrůstá více než 10x.

## **ČÁST 2.: Experimentální model pro zobrazení ischemie jater po transplantaci**

### **LO u potkana *in vivo***

- Byl vytvořen nový experimentální model pro detekci ischemie jater po transplantaci LO u potkana *in vivo* založený na přerušení arteriálního krevního zásobení a zobrazení pomocí magnetické rezonance s kontrastní látkou. Podvaz jaterních artérií nemá dlouhodobý vliv na zdraví a přežívání potkanů a počet transplantovaných LO dobře koreluje s rozsahem vzniklé ischemie jater.
- Nově vytvořený experimentální model byl úspěšně použit ke stanovení biologického účinku inhibice exprese tkáňového faktoru v izolovaných LO na rozsah intenzity IBMIR po transplantaci.

## **ČÁST 3.: Inhibice exprese tkáňového faktoru v buňkách izolovaných potkaních**

### **LO pomocí RNA interference**

- Pomocí metod lipofekce a mikroporace byla do izolovaných LO transfekována specifická siRNA proti tkáňovému faktoru, čímž bylo docíleno efektivního potlačení exprese tohoto genu na úrovni mRNA a proteinu (až o 75 %).
- Transfekované LO byly transplantovány potkanům a byl stanoven rozsah ischemie jater *in vivo*. Snížení exprese tkáňového faktoru v buňkách LO pomocí RNA interference prokazatelně vede ke zmenšení rozsahu ischemie jater po transplantaci LO pravděpodobně cestou snížení intenzity IBMIR.
- Funkce transfekovaných LO *in vivo* byla ověřena transplantací do jater diabetických potkanů. Zatímco transplantace LO transfekovaných siRNA lipofekcí vedla k rychlému vyléčení diabetických zvířat, LO transfekované siRNA metodou mikroporace nedokázaly u poloviny zvířat navodit normoglykémii ani po 30 dnech jejich sledování. Statisticky významný rozdíl

v účinnosti léčby potkanů metodami lipofekce a mikroporce poukazuje na nevhodnost mikroporce jako transfekční metody pro použití v izolovaných LO. Lipofekce se naopak jeví jako vhodná alternativa, která nepoškozuje funkci LO. Transplantace LO se sníženou expresí tkáňového faktoru touto metodou vedla nejen k významnému zmenšení rozsahu neperfundované oblasti jater po transplantaci, ale také ke kompletnímu vyléčení všech zvířat ve skupině, a to dokonce s mírně časnějším nástupem normoglykémie a lepším prospíváním ve srovnání s ostatními skupinami včetně kontrolní.

## 6. SEZNAM ZKRATEK

ALP – alkalická fosfatáza

ALT – alanintransamináza

AST – aspartáttransamináza

ANOVA – analýza rozptylu (z angl. *analysis of variance*), statistická metoda

cDNA – komplementární DNA (z angl. *complementary DNA*)

CMRL – Connaught Medical Research Laboratories, výrobce kultivačního média

Ct – prahový cyklus (z angl. *threshold cyklus*)

DMEM – základní kultivační médium (z angl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (z angl. *deoxyribonucleic acid*)

dsDNA – dvouvláknová DNA (z angl. *double-stranded DNA*)

dsRNA – dvouvláknová RNA (z angl. *double-stranded RNA*)

EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina (z angl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

FBS – fetální bovinní sérum

GFR – odhad glomerulární filtrace (z angl. *glomerular filtration rate*)

GGT –  $\gamma$ -glutamyltransferáza

GOI – studovaný gen (z angl. *gene of interest*)

GSIS – glukózou stimulovaná inzulínová sekrece

HBSS – Hank's balanced salt solution, solný roztok udržující fyziologické pH a osmotický tlak buněk

HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina

hpRNA – vlásenková RNA (z angl. *hairpin RNA*)

IBMIR – okamžitá krev zprostředkována zánětlivá reakce (z angl. *instant blood-mediated inflammatory reaction*)

IEQ – ostrůvkový ekvivalent (z angl. *islet equivalent*)

IKEM – Institut klinické a experimentální medicíny

IL-8 – interleukin 8, chemoatraktant polymorfonukleárních buněk

LO – Langerhansův ostrůvek/Langerhansovy ostrůvky

MCP-1 – chemoatraktant aktivující monocyty (z angl. *monocyte chemoattractant protein 1*)

MIF – faktor inhibující migraci makrofágů (z angl. *macrophage migration inhibitory factor*)

MSC – mesenchymální kmenové buňky (z angl. *mesenchymal stem cells*)

NICCs – neonatální ostrůvkové buněčné klustery (z angl. *neonatal islet cell clusters*)

miRNA – microRNA

mRNA – mediátorová (messengerová) RNA

MRI – zobrazování magnetickou rezonancí (z angl. *magnetic resonance imaging*)

PBS – fyziologický fosfátový pufr (fosfátový pufr s 0,15 M NaCl; z angl. *phosphate buffer saline*)

PCR – polymerázová řetězová reakce (z angl. *polymerase chain reaction*)

PMN – polymorfonukleární leukocyty (také neutrofilní granulocyty či neutrofilny)

PVDF – polyvinylidenfluorid

RG – referenční gen

RIN – RNA integrity number, parametr vyjadřující kvalitu RNA

RIPA – radioimmunoprecipitační analýza (z angl. *radioimmunoprecipitation assay*)

RISC – ribonukleoproteinový komplex vázající resp. štěpící cílovou mRNA při RNA interferenci (z angl. *RNA-induced silencing complex*)

RNA – ribonukleová kyselina (z angl. *ribonucleic acid*)

RNAi – RNA interference

RT-qPCR – kvantitativní PCR v reálném čase, nebo také PCR s reverzní transkripcí (z angl. *real-time quantitative PCR*, resp. *reverse transcription PCR*)

SD – směrodatná odchylka (z angl. *standard deviation*)

SDS – dodecylsírany sodný (z angl. *sodium dodecyl sulphate*)

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl síranu sodného (z angl. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamid gel electrophoresis*)

siRNA – malá interferující RNA (z angl. *small interfering RNA* nebo také *silencing RNA*)

shRNA – krátká vlásenková RNA (z angl. *short hairpin RNA*)

TBIL – celkový bilirubin (z angl. *total bilirubin*)

TP – celkový protein (z angl. *total protein*)

Tris – *tris*(hydroxymethyl)aminomethan

VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor (z angl. *vascular endothelial growth factor*)

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abdelli S., Ansite J., Roduit R., Borsello T., Matsumoto I., Sawada T., Allaman-Pillet N., Henry H., Beckmann J. S., Hering B. J., Bonny C. (2004). „Intracellular stress signaling pathways activated during human islet preparation and following acute cytokine exposure“. *Diabetes* **53**(11): 2815–23.

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.

Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2013). „Essential Cell Biology 4th Edition“. *Garland Science*. New York and London, s. 258-259.

Arsenijevic T., Gregoire F., Delforge V., Delporte C., Perret J. (2012). „Murine 3T3-L1 adipocyte cell differentiation model: validated reference genes for qPCR gene expression analysis“. *PLoS One* **7**(5): e37517.

Bas A., Forsberg G., Hammarström S., Hammarström M. L. (2004). „Utility of the Housekeeping Genes 18S rRNA,  $\beta$ -Actin and Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase for Normalization in Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Human T Lymphocytes“. *Scand J Immunol* **59**(6): 566–573.

Berkova Z., Jirak D., Zacharovova K., Kriz J., Lodererova A., Girman P., Koblas T., Dovolilova E., Vancova M., Hajek M., Saudek F. (2008). „Labeling of pancreatic islets with iron oxide nanoparticles for in vivo detection with magnetic resonance“. *Transplantation* **85**(1): 155-9.

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.

Berman D. M., Cabrera O., Kenyon N. M., Miller J., Tam S. H., Khandekar V. S., Picha K. M., Soderman A. R., Jordan R. E., Bugelski P. J., Horninger D., Lark M., Davis J. E., Alejandro R., Berggren P. O., Zimmerman M., O'Neil J. J., Ricordi C., Kenyon N. S. (2007). „Interference With Tissue Factor Prolongs Intrahepatic Islet Allograft Survival in a Nonhuman Primate Marginal Mass Model“. *Transplantation* **84**(3): 308-15.

Beuneu C., Vosters O., Ling Z., Pipeleers D., Pradier O., Goldman M., Verhasselt V. (2007). „N-Acetylcysteine Derivative Inhibits Procoagulant Activity of Human Islet Cells“. *Diabetologia* **50**(2): 343-7.



- Bogdanov V. Y., Balasubramanian V., Hathcock J., Vele O., Lieb M., Nemerson Y. (2003). „Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein.“ *Nat Med* **9**(4): 458–462.
- Bradley S. P., Rastellini C., da Costa M. A., Kowalik T. F., Bloomenthal A. B., Brown M., Cicalese L., Basadonna G. P., Uknis M. E. (2005). „Gene silencing in the endocrine pancreas mediated by short-interfering RNA“. *Pancreas* **31**(4):373-9.
- Butenas S. (2012). „Tissue Factor Structure and Function“. *Scientifica* **2012**: 964862.
- Butenas S., Mann K. G. (2002). „Blood coagulation“. *Biochemistry* **67**(1): 3–12.
- Cabric S., Sanchez J., Lundgren T., Foss A., Felldin M., Källén R., Salmela K., Tibell A., Tufveson G., Larsson R., Korsgren O., Nilsson B. (2007). „Islet surface heparinization prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction in islet transplantation“. *Diabetes* **56**(8): 2008-15.
- 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.
- Cui W., Angsana J., Wen J., Chaikof E. L. (2010). „Liposomal formulations of thrombomodulin increase engraftment after intraportal islet transplantation“. *Cell Transplant* **19**(11): 1359–1367.
- Cui W., Wilson J. T., Wen J., Angsana J., Qu Z., Haller C. A., Chaikof E. L. (2009). „Thrombomodulin improves early outcomes after intraportal islet transplantation“. *Am J Transplant* **9**(6): 1308–1316.
- Čihák R. Anatomie 2 (2002). *Grada*. Praha, s. 115-122.
- Delaune V., Berney T., Lacotte S., Toso C. (2017). „Intraportal islet transplantation: the impact of the liver microenvironment“. *Transpl Int* **30**(3): 227-238.
- Dheda K., Huggett J. F., Bustin S. A., Johnson M. A., Rook G., Zumla A. (2004). „Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR“. *BioTechniques* **37**(1): 112–119.
- Dheda K., Huggett J. F., Chang J. S., Kima L. U., Bustin S. A., Johnson M. A., Rook G. A., Zumla A. (2005). „The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization“. *Anal Biochem* **344**(1): 141–143.
- Dokládál M., Páč L. (2003). Anatomie člověka II.: Splanchnologie a cévní systém. *Masarykova univerzita*. Brno, s. 36-37.
- Dorsett Y., Tuschl T. (2004) „siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics“. *Nat Rev Drug Discov*, **3**(4): 318-29.
- Drake T. A., Morissey J. H., Edgington T. S. (1989). „Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis“. *Am J Pathol*, **134**(5): 1087–1097.

- Dupont C., Armant D. R., Brenner C. A. (2009). „Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective“. *Semin Reprod Med* **27**(5): 351–57.
- Eddleston M., de la Torre J. C., Oldstone M. B. A., Loskutoff D. J., Edgington T. S., Mackman N. (1993). „Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central nervous system. A role for astrocytes in cerebral hemostasis“. *J Clin Invest.* **92**(1): 349–358.
- 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.
- Ellis C., Ramzy A., Kieffer T. J. (2017). „Regenerative medicine and cell-based approaches to restore pancreatic function“. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **14**(10): 612-628.
- Emamaullee J. A., Shapiro A. M. (2007). „Factors influencing the loss of beta-cell mass in islet transplantation.“ *Cell Transplant* **16**(1): 1–8.
- Evgenov N. V., Medarova Z., Dai G., Bonner-Weir S., Moore A. (2006a). „In vivo imaging of islet transplantation“. *Nat Med* **12**(1): 144-8.
- Evgenov N. V., Medarova Z., Pratt J., Pantazopoulos P., Leyting S., Bonner-Weir S., Moore A. (2006b). „In vivo imaging of immune rejection in transplanted pancreatic islets“. *Diabetes* **55**(9): 2419-28.
- Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northrop J. P., Ringold G. M., Danielsen M. (1987). „Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(21): 7413-7.
- Ferguson B. S., Nam H., Hopkins R. G., Morrison R. F. (2010). „Impact of reference gene selection for target gene normalization on experimental outcome using real-time qRT-PCR in adipocytes“. *PLoS One* **5**(12): e15208.
- 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.
- Fleck R. A., Rao L. V. M., Rapaport S. I., Varki N. (1990). „Localization of human tissue factor antigen by immunostaining with monospecific, polyclonal anti-human tissue factor antibody“. *Thromb Res* **59**(2): 421–437.
- Flossel C., Luther T., Muller M., Albrecht S., Kasper M. (1994). „Immunohistochemical detection of tissue factor (TF) on paraffin sections of routinely fixed human tissue“. *Histochem* **101**(6): 449–453.
- Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B., Bartel D. P. (2009). „Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.“ *Genome Research* **19**(1): 92–105.
- Girman P., Kriz J., Balaz P. (2015). „Rat Experimental Transplantation Surgery: A Practical Guide“. Springer, Basel.

- Gmyr V., Bonner C., Moerman E., Tournoy A., Delalleau N., Quenon A., Thevenet J., Chetboun M., Kerr-Conte J., Pattou F., Hubert T., Jourdain M. (2017). „Human Recombinant Antithrombin (ATryn®) Administration Improves Survival and Prevents Intravascular Coagulation After Intraportal Islet Transplantation in a Piglet Model“. *Cell Transplant* **26**(2): 309-317.
- Gorzelnik K., Janke J., Engeli S., Sharma A. M. (2001). „Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes“. *Horm Metab Res* **33**(10): 625–7.
- Goto M., Johansson H., Maeda A., Elgue G., Korsgren O., Nilsson B. (2004). „Low Molecular Weight Dextran Sulfate Prevents the Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction Induced by Adult Porcine Islets“. *Transplantation* **77**(5): 741-7.
- 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.
- Hagerkvist R., Mokhtari D., Myers J. W., Tengholm A., Welsh N. (2005). „siRNA produced by recombinant dicer mediates efficient gene silencing in islet cells“. *Ann N Y Acad Sci* **1040**: 114-122.
- Herynek V., Berkova Z., Dovolilova E., Jirak D., Kriz J., Girman P., Saudek F., Hajek M. (2011). „Improved detection of pancreatic islets in vivo using double contrast“. *Contrast Media Mol Imaging* **6**(4): 308-13.
- Herynek V., Gáliková A., Srinivas M., van Dinther E. A. W., Kosinová L., Ruzicka J., Jiráková M., Kriz J., Jiráček D. (2017). „Pre-Microporation Improves Outcome of Pancreatic Islet Labelling for Optical and 19F MR Imaging“. *Biol Proced Online* **19**: 6.
- Holen T., Amarzguioui M., Wiiger M. T., Babaie E., Prydz H. (2002). „Positional effect of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor“. *Nucleic Acid Res* **30**(8): 1757-1766.
- Holen T., Amarzguioui M., Babaie E., Prydz, H. (2003). „Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway“. *Nucleic Acid Res* **31**(9): 2401-2407.
- Hori T., Gardner L. B., Chen F., Baine A. M., Hata T., Uemoto S., Nguyen J. H. (2012). „Impact of hepatic arterial reconstruction on orthotopic liver transplantation in the rat“. *J Invest Surg* **25**(4): 242-52.
- Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. (2005). „Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations“. *Genes Immun* **6**(4): 279–84.
- Ihm S. H., Matsumoto I., Zhang H. J., Ansite J. D., Hering B. J. (2009). „Effect of short-term culture on functional and stress-related parameters in isolated human islets“. *Transpl Int* **22**(2): 207–16.

- Ilieva A., Yuan S., Wang R. N., Agapitos D., Hill D. J., Rosenberg L. (1999). „Pancreatic islet cell survival following islet isolation: the role of cellular interactions in the pancreas“. *J Endocrinol* **161**(3): 357–64.
- 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., Herynek V., Andersson B., Girman P., Burian M., Saudek F., Hajek M. (2004). „MRI of transplanted pancreatic islets“. *Magn Reson Med* **52**(6): 1228-33.
- 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., Goto M., Dufrane D., Siegbahn A., Elgue G., Gianello P., Korsgren O., Nilsson B. (2006). „Low molecular weight dextran sulfate abrogates the allogeneic instant blood-mediated inflammatory reaction (IBMIR); A strong candidate drug to improve clinical islet transplantation“. *Am J Transplant* **5**(2): 305-12.
- Johansson H., Lukinius A., Moberg L., Lundgren T., Berne C., Foss A., Felldin M., Källen 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.
- Karge W. H., Schaefer E. J., Ordovas J. M. (1998). „Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method“. *Methods Mol Biol* **110**: 43-61.
- Kim J. A., Cho K., Shin M. S., Lee W. G., Jung N., Chung C., Chang J. K. (2008). „A novel electroporation method using a capillary and wire-type electrode“. *Biosens Bioelectron* **23**(9): 1353-60.
- Kim T. K., Eberwine J. H. (2010). „Mammalian cell transfection: the present and the future“. *Anal Bioanal Chem* **397**(8): 3173-8.
- Koblas T., Leontovyc I., Loukotova S., Kosinova L., Saudek F. (2016). „Reprogramming of Pancreatic Exocrine Cells AR42J Into Insulin-producing Cells Using mRNAs for Pdx1, Ngn3, and MafA Transcription Factors“. *Molecular therapy. Nucleic acids* **5**(5), e320.
- Korsgren O., Lundgren T., Felldin M., Foss A., Isaksson B., Permert J., Persson N. H., Rafael E., Rydén M., Salmela K., Tibell A., Tufveson G., Nilsson B. (2008). „Optimising islet engraftment is critical for successful clinical islet transplantation“. *Diabetologia* **51**(2): 227-32.
- Kriz J., Jirak D., Girman P., Berkova Z., Zacharovova K., Honsova E., Lodererova A., Hajek M., Saudek F. (2005). „Magnetic resonance imaging of pancreatic islets in tolerance and rejection“. *Transplantation* **80**(11): 1596-603.
- Kriz J., Jirak D., White D., Foster P. (2008). „Magnetic resonance imaging of pancreatic islets transplanted into the right liver lobes of diabetic mice“. *Transplant Proc* **40**(2): 444-8.

- Kriz J., Jirak D., Berkova Z., Herynek V., Lodererova A., Girman P., Habart D., Hajek M., Saudek F. (2012). „Detection of pancreatic islet allograft impairment in advance of functional failure using magnetic resonance imaging“. *Transpl Int* **25**(2): 250-60.
- Kumar P., Nagarajan A., Uchil P. D. (2019). „Lipofection“. *Cold Spring Harb Protoc* **2019**(3).
- Lee S., Charters A. C., Orloff M. J. (1975). „Simplified technic for orthotopic liver transplantation in the rat“. *Am J Surg* **130**(1): 38-40.
- Lefebvre B., Vandewalle B., Longue J., Moerman E., Lukowiak B., Gmyr V., Maedler K., Kerr-conte J., Pattou F. (2010). „Efficient gene delivery and silencing of mouse and human pancreatic islets“. *BMC Biotechnol* **10**: 28.
- Lehmann R., Weber M., Berthold P., Züllig R., Pfammatter T., Moritz W., Mädler K., Donath M., Ambühl P., Demartines N., Clavien And P. A., Andreia Spinass G. (2004). „Successful simultaneous islet-kidney transplantation using a steroid-free immunosuppression: two-year follow-up“. *Am J Transplant* **4**(7): 1117-23.
- Leontovyc I., Habart D., Loukotova S., Kosinova L., Kriz J., Saudek F., Koblas T. (2017). „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* **12**(8).
- Li F., Mahato R. I. (2011). „RNA interference for improving the outcome of islet transplantation“. *Adv Drug Deliv Rev* **63**(1-2): 47-68.
- López-Pedrerá C., Barbarroja N., Dorado G., Siendones E., Velasco F. (2006). „Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies“. *Leukemia* **20**(8): 1331-40.
- 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.
- Majumdar R., Rajasekaran K., Cary J. W. (2017) „RNA Interference (RNAi) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants: Concepts and Considerations“. *Front Plant Sci* **8**: 200.
- Mann K. G., Orfeo T., Butenas S., Undas A., Brummel-Ziedins K. (2009). „Blood coagulation dynamics in haemostasis“. *Hamostaseologie* **29**(1): 7–16.
- Marselli L., Thorne J., Ahn Y., Omer A., Sgroi D. C., Libermann T., Otu H. H., Sharma A., Bonner-Weir S., Weir G. C. (2008). „Gene Expression of Purified  $\beta$ -Cell Tissue Obtained from Human Pancreas with Laser Capture Microdissection“. *J Clin Endocrinol Metab* **93**(3): 1046–1053.
- 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.
- Melis E., Moons L., De Mol M., Herbert J. M., Mackman N., Collen D., Carmeliet P., Dewerchin M. (2001). „Targeted deletion of the cytosolic domain of tissue factor in mice does not affect development“. *Biochem Biophys Res Commun* **286**(3): 580-586.
- Mello C. C., Conte D. Jr. (2004). „Revealing the world of RNA interference“. *Nature* **431**(7006):338-42.
- Merani S., Shapiro A. M. (2006). „Current status of pancreatic islet transplantation“. *Clin Sci* **110**(6): 611-25.
- 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.
- Moberg L., Olsson A., Berne C., Felldin M., Foss A., Källén R., Salmela K., Tibell A., Tufveson G., Nilsson B., Korsgren O. (2003). „Nicotinamide inhibits tissue factor expression in isolated human pancreatic islets: implications for clinical islet transplantation“. *Transplantation* **76**(9): 1285-8.
- Moberg L., Korsgren O., Nilsson B. (2005). „Neutrophilic granulocytes are the predominant cell type infiltrating pancreatic islets in contact with ABO-compatible blood“. *Clin Exp Immunol* **142**(1): 125-31.
- Müller T. D., Nogueiras R., Andermann M. L., Andrews Z. B., Anker S. D., Argente J., Batterham R. L., Benoit S. C., Bowers C. Y., Broglio F., Casanueva F. F., D'Alessio D., Depoortere I., Geliebter A., Ghigo E., Cole P. A., Cowley M., Cummings D. E., Dagher A., Diano S., Dickson S. L., Diéguez C., Granata R., Grill H. J., Grove K., Habegger K. M., Heppner K., Heiman M. L., Holsen L., Holst B., Inui A., Jansson J. O., Kirchner H., Korbonits M., Laferrère B., LeRoux C. W., Lopez M., Morin S., Nakazato M., Nass R., Perez-Tilve D., Pfluger P. T., Schwartz T. W., Seeley R. J., Sleeman M., Sun Y., Sussel L., Tong J., Thorner M. O., van der Lely A. J., van der Ploeg L. H., Zigman J. M., Kojima M., Kangawa K., Smith R. G., Horvath T., Tschöp M. H. (2015). „Ghrelin“. *Mol Metab* **4**(6): 437-60.
- Negi S., Jetha A., Aikin R., Hasilo C., Sladek R., Paraskevas S. „Analysis of Beta-Cell Gene Expression Reveals Inflammatory Signaling and Evidence of Dedifferentiation following Human Islet Isolation and Culture“. (2012) *PLoS One*. **7**(1): e30415.
- Nilsson B., Berne C., Korsgren O. (2005) „The recent finding that tissue factor is produced by the pancreatic islets constitutes a possible link between insulin resistance and cardiovascular disease.“ *Am J Ther* **12**(6):551-4.
- 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.
- Ozmen L., Ekdahl K. N., Elgue G., Larsson R., Korsgren O., Nilsson B. (2002). „Inhibition of thrombin abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction triggered by isolated human islets: possible application of the thrombin inhibitor melagatran in clinical islet transplantation“. *Diabetes* **51**(6): 1779-84.

- Peng W., Yu Y., Li T., Zhu Y., Chen H. (2013). „The effects of small interfering RNA-targeting tissue factor on an in vitro model of neovascularization“. *Mol Vis* **19**: 1296-303
- Pileggi A., Ricordi C., Alessiani M., Inverardi L. (2001). „Factors influencing Islet of Langerhans graft function and monitoring. *Clin Chim Acta* **310**(1): 3–16.
- Planas R., Carrillo J., Sanchez A., Ruiz de Villa M. C., Nuñez F., Verdaguer J., James R. F., Pujol-Borrell R., Vives-Pi M. (2010) „Gene expression profiles for the human pancreas and purified islets in Type 1 diabetes: new findings at clinical onset and in long-standing diabetes“. *Clin Exp Immunol* **159**(1): 23–44.
- Qi M., Barbaro B., Wang S., Wang Y., Hansen M., Oberholzer J. (2009). „Human Pancreatic Islet Isolation: Part I: Digestion and Collection of Pancreatic Tissue“. *J Vis Exp* **27**: 1125.
- Qi M., Barbaro B., Wang S., Wang Y., Hansen M., Oberholzer J. (2009). „Human Pancreatic Islet Isolation: Part II: Purification and Culture of Human Islets“. *J Vis Exp* **27**: 1343.
- Quan W., Hur K. Y., Lim Y., Oh S. H., Lee J. C., Kim K. H., Kim G. H., Kim S. W., Kim H. L., Lee M. K., Kim K. W., Kim J., Komatsu M., Lee M. S. (2012). „Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice“. *Diabetologia* **55**(2): 392–403.
- Quesenberry K. E., Carpenter J. W. (2012). „Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery“. Elsevier, St. Louis.
- Rak J., Milsom C., Yu J. (2008). „Tissue factor in cancer“. *Curr Opin Hematol* **15**(5): 522-8.
- Ricordi C., Lacy P. E., Finke E. H., Olack B. J., Scharp D.W. (1988). „Automated Method for Isolation of Human Pancreatic Islets“. *Diabetes* **37**(4): 413-420.
- Rodriguez-Mulero S., Montanya E. (2005). „Selection of a Suitable Internal Control Gene for Expression Studies in Pancreatic Islet Grafts“. *Transplantation* **80**(5): 650–652.
- Rosenberg L., Wang R., Paraskevas S., Maysinger D. (1999) „Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death“. *Surgery* **126**(2): 393–8.
- 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.
- Safley S. A., Kenyon N. S., Berman D. M., Barber G. F., Willman M., Duncanson S., Iwakoshi N., Holdcraft R., Gazda L., Thompson P., Badell I. R., Sambanis A., Ricordi C., Weber C. J. (2018). „Microencapsulated adult porcine islets transplanted intraperitoneally in streptozotocin-diabetic non-human primates“. *Xenotransplantation* **25**(6): e12450.
- Sakata N., Hayes P., Tan A., Chan N. K., Mace J., Peverini R., Sowers L., Pearce W. J., Chinnock R., Obenaus A., Hathout E. (2009) „MRI assessment of ischemic liver after intraportal islet transplantation“. *Transplantation* **87**(6): 825-830.
- 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.

Schmittgen T. D., Zakrajsek B. A. (2000). „Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR“. *J Biochem Biophys Methods* **46**(1-2): 69–81.

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.

Shapiro A. M., Ricordi C., Hering B. J., Auchincloss H., Lindblad R., Robertson R. P., Secchi A., Brendel M. D., Berney T., Brennan D. C., Cagliero E., Alejandro R., Ryan E. A., DiMercurio B., Morel P., Polonsky K. S., Reems J. A., Bretzel R. G., Bertuzzi F., Froud T., Kandaswamy R., Sutherland D. E., Eisenbarth G., Segal M., Preiksaitis J., Korbitt G. S., Barton F. B., Viviano L., Seyfert-Margolis V., Bluestone J., Lakey J. R. (2006). „International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation“. *N Engl J Med* **355**(13): 1318-30.

Suckdale J., Solimena M. (2008). Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci* **13**: 7156-71.

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.

Tang C., Koulajian K., Schuiki I., Zhang L., Desai T., Ivovic A., Wang P., Robson-Doucette C., Wheeler M. B., Minassian B., Volchuk A., Giacca A. (2012). „Glucose-induced beta cell dysfunction in vivo in rats: link between oxidative stress and endoplasmic reticulum stress“. *Diabetologia* **55**(5): 1366–79.

Thellin O., Zorzi W., Lakaye B., De Borman B., Coumans B., Hennen G., Grisar T., Igout A., Heinen E. (1999) „Housekeeping genes as internal standards: use and limits“. *J Biotechnol* **75**(2–3): 291–5.

Teramura Y., Iwata H. (2008). „Islets surface modification prevents blood-mediated inflammatory responses“. *Bioconjug Chem* **19**(7): 1389-95.

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.

Tremoli E., Camera M., Toschi V., Colli S. (1999). „Tissue factor in atherosclerosis“. *Atherosclerosis* **144**(2): 273-83.

Tricarico C., Pinzani P., Bianchi S., Paglierani M., Distante V., Pazzagli M., Bustin S. A., Orlando C. (2002). „Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies“. *Anal Biochem* **309**(2): 293–300.

Turabelidze A., Guo S., DiPietro L. A. (2010). „Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model“. *Wound Repair Regen* **18**(5): 460-6.



- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002). „Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes“. *Genome Biol* **3**(7): RESEARCH0034.
- Vasir B., Aiello L. P., Yoon K. H., Quickel R. R., Bonner-Weir S., Weir G. C. (1998). „Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene and protein expression in cultured rat islet cells“. *Diabetes* **47**(12): 1894-903.
- Versteeg H. H., Peppelenbosch M. P., Spek C. A. (2003). „Tissue factor signal transduction in angiogenesis“. *Carcinogenesis* **24**(6):1009-13.
- 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.
- Wang J., Sun Z., Gou W., Adams D. B., Cui W., Morgan K. A., Strange C., Wang H. (2017). „ $\alpha$ -1 Antitrypsin Enhances Islet Engraftment by Suppression of Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction“. *Diabetes* **66**(4): 970-980.
- Wang R. N., Rosenberg L. (1999). „Maintenance of beta-cell function and survival following islet isolation requires re-establishment of the islet-matrix relationship“. *J Endocrinol* **163**(2): 181–90.
- Wilcox J. N., Smith K. M., Schwartz S. M., Gordon, D. (1989). „Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque“. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2839-2843.
- Yang J., Jiang S., Guan Y., Deng J., Lou S., Feng D., Kong D., Li Ch. (2019). „Pancreatic islet surface engineering with a starPEG-chondroitin sulfate nanocoating“. *Biomater Sci* **7**: 2308-2316.
- Zhan C., Zhang Y., Ma J., Wang L., Jiang W., Shi Y., Wang Q. (2014). „Identification of reference genes for qRT-PCR in human lung squamous-cell carcinoma by RNA-Seq“. *Acta Biochim Biophys Sin* **46**(4): 330–7.

## 8. PŘÍLOHY

### PŘÍLOHA 1 – SEZNAM PUBLIKACÍ V ODBORNÝCH ČASOPISECH

1. 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.
2. 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.
3. Kosinová L., Patiková A., Jiráček D., Galisová A., Vojtisková 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.
4. Berková Z., Girman P., Zacharovová K., Kříž J., Fábryová E., Leontovyč I., Koblas T., Kosinová L., Neškudla T., Vávrová E., Loukotová Š., Habart D., Zahradnická M., Lipár K., Voska L., Skibová 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.
5. 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  $\beta$ -cells correlate with their  $Zn^{2+}$  levels. *Open Biology*. 2020 Oct 21;10(10):200137. doi:10.1098/rsob.200137.
6. Gálisová A., Fábryová E., Sticová E., Kosinová L., Jiráček 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.
7. Gálisová A., Herynek V., Swider E., Sticová E., Pátíková A., Kosinová L., Kříž J., Hájek M., Srinivas M., Jiráček D.: A Trimodal Imaging Platform for Tracking Viable Transplanted Pancreatic Islets In Vivo: F19 MR, Fluorescence, and Bioluminescence Imaging. Aug 2018. *Mol Imaging Biol*. doi: 10.1007/s11307-018-1270-3.

8. 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.
9. Herynek V., Gálišová A., Srinivas M., van Dinther EAW., Kosinová L., Ruzicka J., Jirátoová M., Kriz J., and Jiráček 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.
10. 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.
11. 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.
12. Koblas T., Leontovyč I., Loukotová Š., Kosinová 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.
13. 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.
14. Pátíková A., Vojtíšková A., Fabryová E., Kosinová L., Heribanová A., Sticová E., Berková Z., Hladíková Z., Kříž J.: The optimal maturation of subcutaneous pouch can improve pancreatic islets engraftment in rat model. Accepted for publication in *Transplantation*. Manuscript reference number TPA-2020-2361.
15. Patsula V., Kosinova L., Lovric M., Ferhatovic L., Rabyk M., Konefal R., Paruzel A., Šlouf M., Herynek V., Gajovic S. and Horák D.: Superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 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.

16. Voglová B., Zahradnická M., Girman P., Kříž J., Berková Z., Koblas T., Vávrová E., Némětová L., Kosinová L., Habart D., Fábryová E., Dovolilová E., Leontovych 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.

17. 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.

PŘÍLOHA 2 – PLNÉ ZNĚNÍ PRVOAUTORSKÝCH PUBLIKACÍ