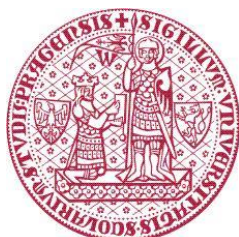


KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



HABILITAČNÍ PRÁCE

Název práce: Nové postupy při transplantaci a zobrazení Langerhansových ostrůvků

Uchazeč: MUDr. Jan Kříž, Ph.D.

Pracoviště: Klinika diabetologie, CD IKEM v Praze
III. interní klinika 1. LF UK a VFN v Praze

Oponenti: Doc. MUDr. Běla Bendlová, CSc. - Endokrinologický ústav v Praze

Prof. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D. – 2. LF UK v Praze

Prof. MUDr. Kateřina Kaňková, Ph.D. – LF MU v Brně

v Praze, 28. ledna 2020

Poděkování

Rád bych poděkoval všem, kteří svou spoluprací, podporou a pomocí přispěli ke vzniku předkládané habilitační práce. V první řadě děkuji panu **Prof. MUDr. Františku Saudkovi, DrSc.**, přednostovi Kliniky diabetologie a vedoucímu Laboratoře Langerhansových ostrůvků IKEM. Pod jeho vedením a s jeho podporou jsem mohl pracovat v klinickém programu péče o diabetiky s rozvinutými komplikacemi včetně transplantační léčby. Dostal jsem příležitost učit se od vynikajících odborníků, spolupracovat s nadanými kolegy a podílet se na zavedení metody izolace a transplantace Langerhansových ostrůvků do klinické praxe. Dále pak na vývoji a následné klinické aplikaci metody zobrazení Langerhansových ostrůvků po transplantaci do portálního řečiště jater. V této souvislosti musím zmínit pana **Doc. Ing. Daniela Jiráka, Ph.D.**, se kterým jsme řadu let optimalizovali zobrazování ostrůvků v experimentu a následně přispěli k jeho zavedení do klinické praxe. Doc. Jirák mi byl oporou a inspirací i při společné PostDoc stáži v Kanadském Londýně (Robarts Research Institute, University of Western Ontario), kde jsme se posléze zapojili do programu vývoje alternativní techniky transplantace ostrůvků do podkožní kapsy. Tento program jsme pak společně rozvíjeli i po návratu do IKEM. Poděkování patří i všem spolupracovníkům z Laboratoře Langerhansových ostrůvků, kteří se podíleli na řešení těchto i dalších experimentů a jejich publikaci.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat přednostovi III. Interní kliniky VFN a 1. LF UK, panu **Prof. MUDr. Štěpánovi Svačinovi, DrSc.**, který mi umožnil podílet se na výuce mediků a nutričních terapeutů 1. lékařské fakulty a vytvořil mi svou podporou vhodné podmínky.

Zejména by rád poděkoval své rodině, která mi mnoho let vytvářela zázemí, bez něhož bych se práci nemohl věnovat.

Tuto práci jsem připravil samostatně, řádně jsem citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla použita k získání jiného titulu. Souhlasím s uložením elektronické verze této práce v Digitálním repozitáři Karlovy Univerzity.

MUDr. Jan Kříž, Ph.D.

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	2
OBSAH	3
ÚVOD	4
Transplantační léčba diabetes mellitus	4
Orgánová transplantace pankreatu.....	5
Indikace.....	5
Kontraindikace	5
Technika provedení.....	6
Péče o příjemce.....	7
Výsledky.....	8
Komplikace.....	11
Limity	11
Transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků	12
Indikace.....	12
Kontraindikace	13
Technika provedení.....	13
Péče o příjemce.....	22
Výsledky.....	23
Komplikace.....	26
Limity	26
Experimentální model izolace a transplantace Langerhansových ostrůvků u potkana.....	27
Izolace Langerhansových ostrůvků potkana.....	27
Transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků u potkana.....	32
AKTUÁLNĚ ŘEŠENÉ PROBLÉMY PROVÁZEJÍCÍ IZOLACI A TRANSPLANTACI LANGERHANSOVÝCH OSTRŮVKŮ.	35
VLASTNÍ VÝSLEDKY	38
Zobrazení transplantovaných Langerhansových ostrůvků pomocí MRI	38
In vitro značení Langerhansových ostrůvků potkana.....	39
In vivo experimentální zobrazení	43
Zobrazení ostrůvků pomocí MRI v klinické praxi	47
Vývoj alternativního místa pro transplantaci Langerhansových ostrůvků	48
Optimalizace načasování a podpora MSCs	52
Řízené prorůstání mikroporézním skeletem	54
ZÁVĚR.....	56
LITERATURA:.....	57
PŘÍLOHY	63

Úvod

V úvodní části habilitační práce jsou shrnuty aktuální možnosti využití transplantace inzulín produkující tkáně v léčbě pacientů trpících diabetes mellitus 1. typu. Ambicí úvodu není detailní a kompletní zpracování problematiky transplantační léčby diabetu, ale představení základních principů této metody, shrnutí našich výsledků. Poté následuje vlastní problematika habilitační práce zaměřená na oblasti transplantace Langerhansových ostrůvků, které studujeme s cílem zvýšení efektivity, aby tato léčebná modalita mohla být nabízena většímu počtu pacientů. Nakonec jsou formou příloh předloženy vlastní publikace shrnující výzkum zobrazování Langerhansových ostrůvků a vývoj efektivnějšího způsobu transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků.

Transplantační léčba diabetes mellitus

Diabetes mellitus je chronické metabolické onemocnění, které díky moderním metodám léčby přestalo být smrtelné, ale díky nedokonalosti substituční léčby inzulínem se stalo příčinou celé řady pozdních orgánových komplikací. Diabetická retinopatie, nefropatie, polyneuropatie a akcelerovaná ateroskleróza způsobují mnoho utrpení pacientům a jejich léčba stojí enormní náklady zdravotní systémy celého světa. Jen v České republice je registrováno cca 1 milion diabetiků a z toho cca 70 tisíc diabetiků prvního typu. Možnosti léčby diabetu obou typů se rozvíjejí rychlým tempem. Moderní technologie umožňují prakticky nepřetržité monitorování glykémie pacienta v domácím prostředí. Aplikace inzulínu je možná v režimu téměř automatickém a blízkém fyziologické regulaci. Nicméně, inzulín se aplikuje a glykémie senzorem měří stále do/v podkoží, což je znemožňuje promptní a vysoce účinnou reakci systému na výkyvy glykémie. Téměř dokonalé regulace glykémie u pacientů bez vlastní sekrece inzulínu se tak zatím daří dosáhnout jedině úspěšnou transplantací inzulín produkující tkáně s drenáží krve štěpu do portální žíly jater.

Orgánová transplantace pankreatu v kombinaci s ledvinou se stala prakticky rutinním výkonem pro diabetiky 1. typu s pokročilou formou diabetické nefropatie (CKD 4-5)¹. Limitovaný počet kadaverosních orgánů (v ČR 30-40 ročně), náročnost operačního výkonu a nutnost trvalého užívání imunosupresivních léků brání většímu rozšíření této metody v léčbě ostatních pacientů trpících diabetem 1. typu. Transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků je doplňkovou, z hlediska

využití orgánů výhodnou, mnohem méně invazivní a zatím z dlouhodobého hlediska méně účinnou metodou². V současné fázi vývoje je tato technika vhodná pro pacienty s poruchou rozpoznávání hypoglykemií. Prakticky na našem pracovišti představuje záchrannou léčbu pro cca 3-10 pacientů z celé České republiky ročně³. V zájmu širšího uplatnění této metody v klinické praxi je třeba zlepšit efektivitu přihojení štěpu a jeho dlouhodobé přežívání. Samostatnou skupinu představují tzv. autotransplantace Langerhansových ostrůvků u pacientů, kteří podstupují totální pankreatektomii z nemaligní příčiny. V takovém případě není potřebná dlouhodobá imunosupresivní léčba a je možné transplantovat s efektem i významně menší štěp⁴.

Orgánová transplantace pankreatu

Orgánové transplantace pankreatu se v IKEM provádí od roku 1983. Technika transplantace a imunosupresivní léčba se průběžně mění a vyvíjí. Důsledkem je soustavné zlepšování výsledků, které umožňuje poskytovat tento způsob léčby více pacientům s méně rozvinutými komplikacemi. V současnosti není výjimečné, že se díky kombinované transplantaci ledviny a pankreatu vrátí dříve těžce nemocný člověk do plnohodnotného života (včetně pracovního). Nicméně hlavním a zřejmě v dohledné době neřešitelným limitem zůstává počet vhodných kadaverosních orgánů.

Indikace

Kombinovaná transplantace ledviny a pankreatu je metodou volby pro pacienty trpící diabetes mellitus 1. typu s pokročilou diabetickou nefropatií. V současnosti by měla být nabídnuta každému pacientovi s touto diagnózou v pre-dialyzačním období (CKD 4-5). Transplantace samotného pankreatu je vhodná i pro pacienty s rychle progredující diabetickou retinopatií, jako léčba zachraňující zrak, nebo pro pacienty s poruchou rozpoznávání hypoglykemií. Tato indikace je hraniční a překrývá se s indikací k transplantaci izolovaných Langerhansových ostrůvků. Další logickou indikací je retransplantace pankreatu příjemci, kterému selhal štěp nebo jako ochrana ledviny získané od žijícího dárce⁵.

Kontraindikace

Kontraindikace transplantace pankreatu jsou relativní a absolutní. Představují překážku k úspěchu a efektu transplantace, který by převážil nad riziky velkého

chirurgického výkonu a trvalého užívání imunosuprese. Absolutní kontraindikace jsou shodné s obecnými překážkami transplantační léčby a zahrnují maligní onemocnění, agresivní infekční onemocnění, sepsi, multiorgánové selhání, srdeční selhání a anatomické poměry příjemce znemožňující vložení orgánu. Specifické, relativní kontraindikace představují: výrazná inzulinová rezistence (diabetes mellitus 2. typu), neochota nebo neschopnost pacienta spolupracovat, nedostatečné sociální zázemí, které zejména u velmi mladých pacientů a seniorů může znemožnit transplantační léčbu.

Technika provedení

Orgány se odebírají z těla kadaverosních dárců mladších 45 let v rámci multiorgánových odběrů po promytí konzervačním roztokem (HTK, UW). Po ošetření možných zdrojů krvácení se orgán vkládá do těla příjemce. Technika transplantace pankreatu se ve své 40-leté historii výrazně vyvinula. Hlavním úskalím v prvních letech bylo vyřešení drenáže pankreatické šťávy, v pozdějších letech se přidaly otázky hojení operační rány a přirozené drenáže žilní krve štěpu do portální žíly příjemce.

První transplantace řešily drenáž exokrinní sekrece pankreatické šťávy obliterací vývodů polymerní látkou. Retence pankreatické šťávy vyvolala zánět a postupnou atrofii acinární tkáně pankreatu. Štěp se ukládal do břišní dutiny a žilní krev bylo možné drénovat do systémového i portálního řečiště. Tato technika byla doprovázena častými závažnými komplikacemi.

V roce 1995 byla technika vylepšena ve smyslu drenáže pankreatické šťávy štěpu do močového měchýře příjemce⁶. Štěp se odebíral s cca 20 cm úsekem duodena, které bylo na obou okrajích uzavřeno. Na straně protilehlé k Vaterské papile byla vytvořena duodeno-cysto anastomóza. Výhodou tohoto přístupu bylo výrazně delší fungování štěpu, slabinou naopak ztráty 10-20 g bikarbonátu denně a styk pankreatické šťávy obsahující trávicí enzymy se sliznicí močového měchýře. Při event. oligo- či anurii způsobené renálním selháním štěpu či vlastních ledvin pak pankreatická šťáva vytvářela ulcerace sliznice močového měchýře. Uložení štěpu do podkoží pravé kyčelní jámy významně prodloužilo hojení operační rány, ale usnadnilo biopsii štěpu v případě poruchy funkce.

Další významnou modifikací techniky transplantace pankreatu, kterou umožnila moderní imunosupresiva, byla drenáž pankreatické šťávy do tenkého střeva příjemce díky duodeno-jejuno anastomóze (duodenum štěpu napojené na jejunum

příjemce). Výhodou bylo přirozené zpětné vstřebávání bikarbonátu, které umožnilo dlouhodobé fungování štěpu pankreatu bez nutnosti substituce bikarbonátu. Stejně tak nedocházelo k poškozování sliznice střeva pankreatickou šťávou. Přetrvávala ale nevýhoda dlouhého hojení podkožně uloženého štěpu související s vylučováním pankreatických enzymů do okolí štěpu v časném pooperačním období. Nejnověji používaná technika spočívá v retro-mezokolickém uložení štěpu s napojením tepny na arteria mezenterika příjemce, drenáží žíly štěpu do vena portae příjemce a drenáží pankreatických vývodů přes duodenum štěpu do jejunu příjemce. Výhodou metody je přirozená drenáž inzulínu do portální žíly, pankreatické šťávy štěpu do střeva příjemce a rychlé hojení operační rány. Nevýhodou oproti předchozím technikám je obtížná biopsie štěpu pankreatu, která je jedinou možností pro spolehlivé zjištění rejekce štěpu. Nicméně celkové výsledky přežívání štěpů a jejich dlouhodobé funkce se stále zlepšují.

Péče o příjemce

Nechirurgická péče o příjemce začíná už před samotnou transplantací. Příjemce dostává tzv. indukční imunosupresi, kterou zajišťují v naší praxi depleční polyklonální protilátky cílené k odstranění cirkulujících T-lymfocytů (ATG Fresenius, Grafalon, Thymoglobuline). Současně se podávají první dávky dlouhodobé udržovací imunosupresivní medikace, které jsou podávány v zájmu maximalizace efektu při minimálních nežádoucích účincích v kombinaci. Používané kombinace jsou: tacrolimus + sirolimus + prednison nebo tacrolimus + mykofenolát mofetil + prednison. Při standardním průběhu se kortikoidy vysazují během 6 týdnů po transplantaci. Dávkování tacrolimu a sirolimu se upravuje podle dosažených údočních hladin (tacrolimus, sirolimus a everolimus 8-15 ng/ml první 3 měsíce a 5-10 ng/ml dlouhodobě; hladina mykofenolátu se nemonitoruje).

Jako prevence trombózy štěpu je prvních několik dní užíván nízkomolekulární heparin, který se posléze nahrazuje kyselinou acetylosalicylovou nebo ticlopidinem. Prvních několik dní chrání pacienta profylakticky indikovaná antibiotika (v našem případě Tazocin = tazobactam + piperacilin). Virostatika (valgancyclovir) se podávají 3 měsíce (při pozitivitě příjemce anti-CMV IgG) nebo 6 měsíců (při negativitě anti-CMV IgG u příjemce). Jako ochranu proti specifickým pneumoniím užívají příjemci 6 měsíců po transplantaci Biseptol 960mg 2x týdně. Po 6 měsících a při dobré funkci štěpů pak pacient dojíždí do ambulance pro „transplantované pacienty“ každé 2 měsíce,

monitorují se funkce obou štěpů, hladiny imunosupresiv, krevní obraz, SONO břicha jednou za rok.

Zjištění rejekce pankreatu je poměrně komplikované. Nepřímé ukazatele iritace exokrinní tkáně štěpu (aktivitu pankreatické lipázy a amylázy) můžeme měřit v séru pacienta. Nástup hyperglykemie je až pozdním ukazatelem poškození štěpu, které bývá často již ireverzibilní. Prakticky se při kombinované transplantaci obou orgánů od jednoho dárce můžeme řídit podle nárůstu hladiny kreatininu, protože rejekce obou orgánů probíhá většinou současně a poškození štěpu ledviny bývá zjištěno časně. Nicméně podezření na rejekci jako indikace k anti-rejekční léčbě musí být verifikované biopsií štěpu.

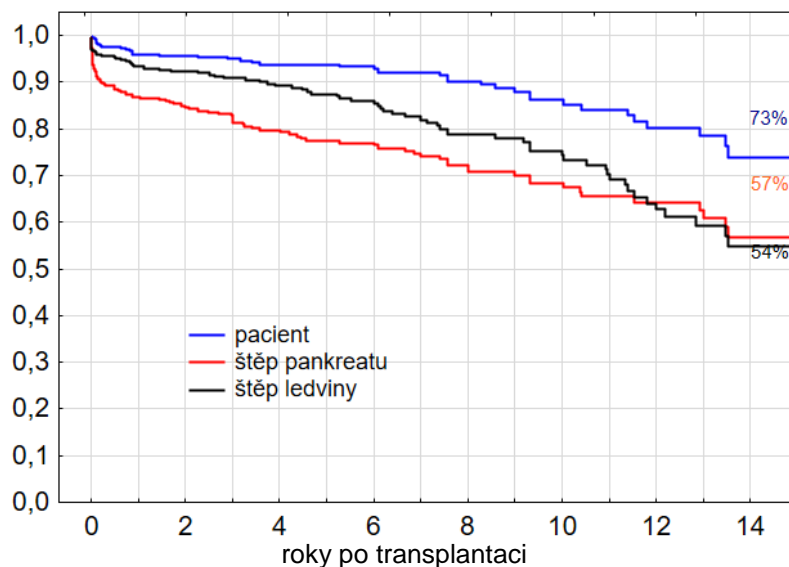
Výsledky

Na Klinice diabetologie IKEM bylo v posledních 6 letech provedeno více než 200 orgánových transplantací pankreatu v různých kategoriích (SPK – simultaneous pancreas and kidney; PTA – pancreas transplantation alone; PAK – pancreas after kidney)s velmi dobrými výsledky, které shrnují následující tabulka (**Tab. 1**) a grafy (**Obr. 1–4**). Kumulovaným přežíváním pacientů se rozumí přežívání pacientů bez ohledu na funkci štěpů a příčinu smrti. Kumulovaným přežíváním štěpů se rozumí plná funkce pankreatu (tj. nezávislost na injekcích inzulinu) a alespoň částečná funkce štěpu ledviny bez nutnosti dialyzační léčby.

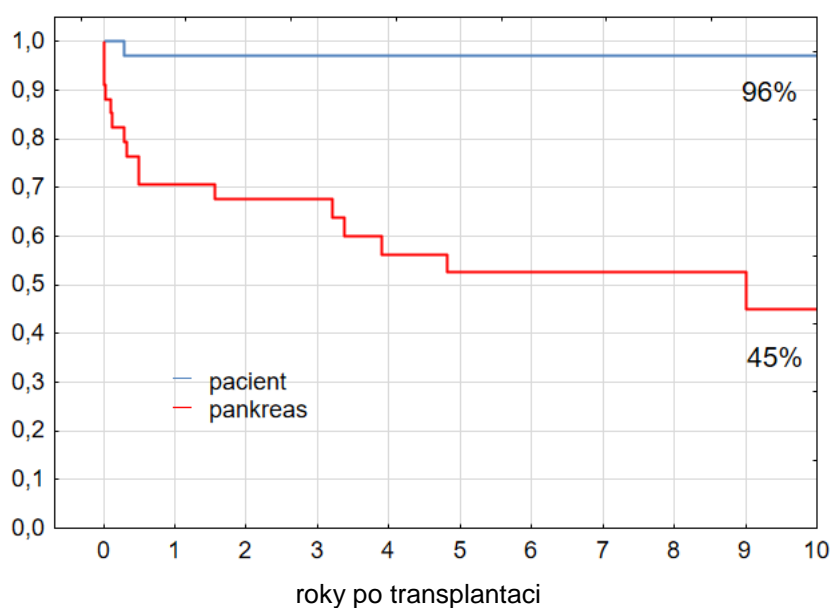
Tabulka 1: Počet orgánových transplantací v posledních 6 letech podle druhu.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015
SPK	16	28	23	30	35	31
PTA	1	1	3	3	4	0
PAK	3	3	0	2	0	5
Celkem	20	32	26	35	38	36

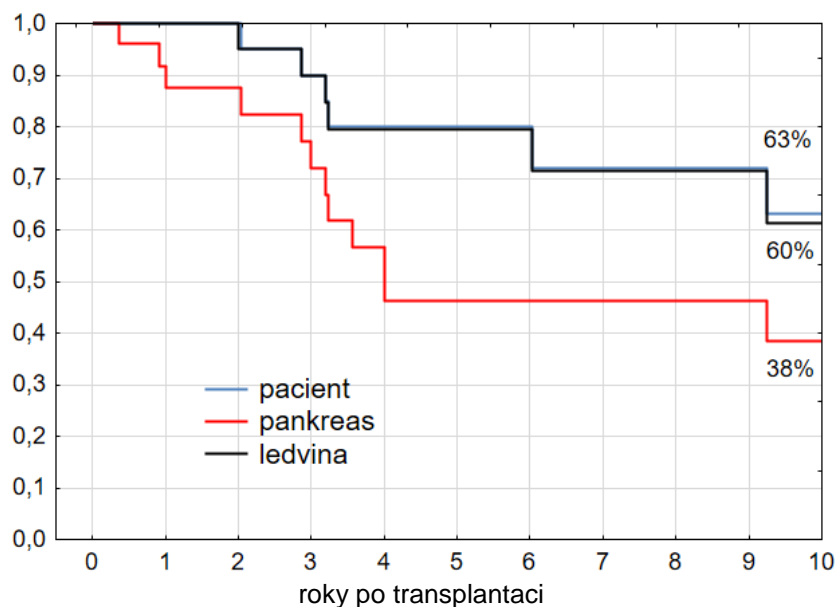
Obraz 1: Kumulované přežívání příjemců a štěpů v kategorii SPK z období let 2000 až 2015 (n=375). Samotný výkon přežijí téměř všichni pacienti. První rok po transplantaci 98% pacientů, 95% štěpů ledviny a 89% štěpů pankreatu. Přežívání příjemců v čase postupně klesá v souladu s celkovou mortalitou populace.



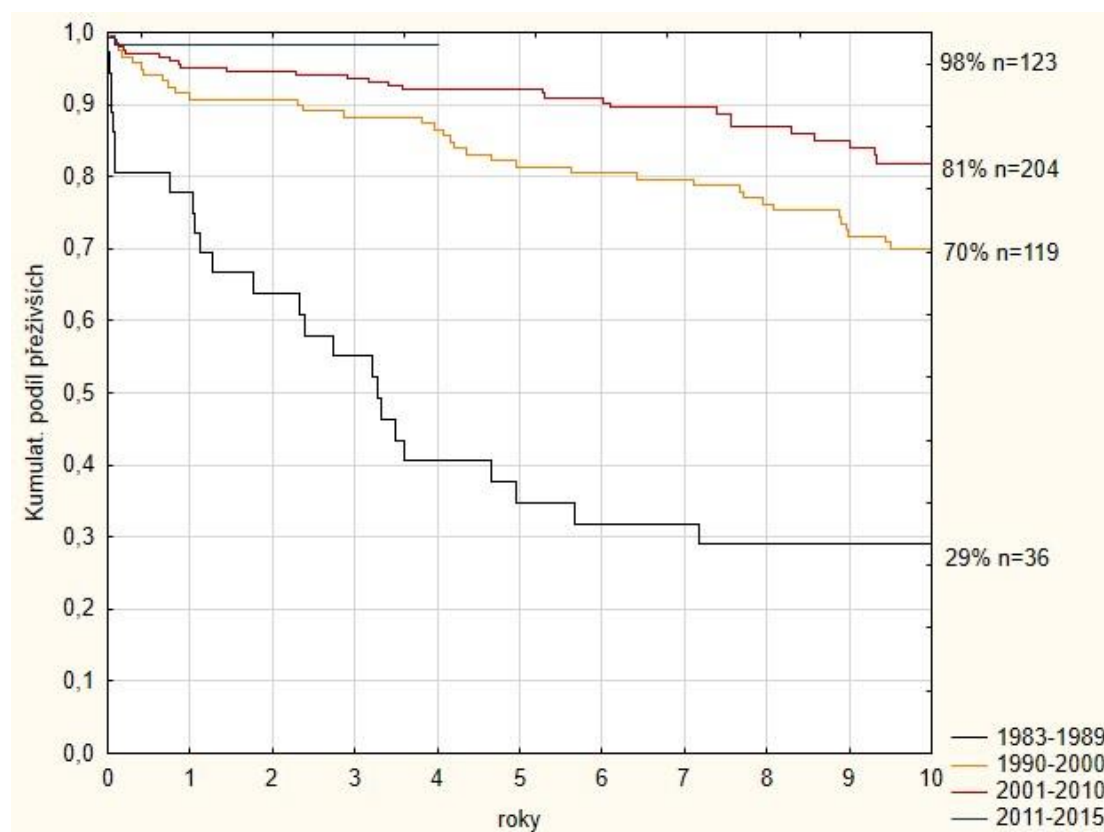
Obraz 2: Kumulované přežívání příjemců a štěpů v kategorii PTA z období let 2000 až 2015 (n=36). Odlišná indikace tohoto výkonu vysvětluje lepší celkové přežívání příjemců, obtížnější diagnostika postižení štěpu pankreatu bez přítomnosti štěpu ledviny vysvětluje horší dlouhodobé fungování pankreatu.



Obraz 3: Kumulované přežívání příjemců a štěpů v kategorii PAK z období let 2000 až 2015 (n=27). Většinu těchto výkonů podstupují příjemci se selhání štěpu pankreatu v předchozím období. Jsou imunizovaní a mají vyšší riziko opětovného selhání štěpu i mortality.



Obraz 4: Kumulované přežívání příjemců celkem z období let 1984 až 2015 (n=483). Jednotlivé křivky dokládají postupné zlepšování celkových výsledků při zavádění lepší chirurgické techniky a účinnější a specifitější imunosupresivní medikace.



Z křivek kumulativního přežívání je patrný jasný trend narůstající doby přežívání příjemců i délky fungování štěpů. To je důsledkem mimo jiné vyšší účinnosti i selektivity imunosupresiv, narůstající zkušenosti chirurgických týmů, výběru pacientů s menším vstupním postižením (zařazování zdravějších kandidátů), účinnější konzervace orgánů. Z kombinované transplantace ledviny a pankreatu se stala rutinní metoda s vynikajícími výsledky, která by měla být zvážena a eventuálně nabídnuta každému diabetikovi 1. typu se pokročilou renální insuficiencí.

Komplikace

Chirurgické komplikace transplantace pankreatu jsou relativně časté, ale málokdy vedou ke ztrátě štěpu či pacienta. Hrozí především ischemicko-reperfúzní pankreatitida štěpu, únik pankreatické šťávy do břišní dutiny píštělí, nebo trombóza štěpu, které se předchází zpočátku antikoagulační nízkomolekulárním heparinem a později trvalou antiagregací. Může dojít ke krvácení z místa duodeno-entero anastomózy nebo některého drobného zdroje na samotné slinivce.

Limity

Hlavním limitujícím faktorem je nedostatek orgánů vhodných k transplantaci, prakticky je v České republice k dispozici cca 40 orgánů ročně. Přitom diabetiků prvního typu potenciálně profitujících z tohoto způsobu léčby jsou tisíce. Dalšími méně závažnými, ale přesto významnými limity jsou:

1. Nutnost trvalé imunosupresivní léčby jako ochrany štěpů
2. Závažný chirurgický výkon trvající cca 5 hodin

Transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků

Transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků reflektuje logickou potřebu transplantovat pouze cílovou inzulin produkující tkáň, která představuje pouze 1-2 % celého orgánu. Langerhansovy ostrůvky jsou okrouhlé mikroorgány variabilní velikosti od několika buněk po 350-400 μm , které jsou rozptýlené v celém objemu pankreatu. Pozoruhodné je jejich enormní prokrvení (spotřebovávají 10-15 % veškeré krve protékající pankreatem)⁷ a speciální uspořádání cévního řečiště, které usnadňuje parakrinní ovlivňování buněk ostrůvku⁸. Poměrně složitá technika oddělení ostrůvků od okolní tkáně a ve srovnání s orgánovou transplantací horší výsledky dočasně odsunuly tento typ transplantace do pozadí. Nedostatek orgánů vhodných pro orgánovou transplantaci a trvale narůstající počet potenciálních příjemců znovu oživil zájem o hledání dalších zdrojů inzulin produkující tkáně, včetně možnosti izolace ostrůvků z orgánů nevhodných pro orgánovou transplantaci. Do této kategorie patří například orgány s nevhodným anatomickým uspořádáním cév, orgány s mírnou fibrózou, od alkoholiků, atd). Experimentálně se program transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků v IKEM připravoval už od 80. let, ale klinicky dostupným se stal v roce 2005.

Indikace

Hlavní indikací k allogenní transplantaci izolovaných Langerhansových ostrůvků je ověřený syndrom poruchy vnímání hypoglykemie. Podle nejnovějšího konsenzu vzešlého z Workshopu EPITA/IPITA (**E**uropean **P**ancreas **I**slet **T**ransplantation **A**ssociation / **I**nternational **P**ancreas **I**slet **T**ransplantation **A**ssociation) je vhodnou indikací k transplantaci izolovaných Langerhansových ostrůvků i inzulinopenická forma diabetes mellitus 2. typu a pankreatogenní formy diabetu (jako např. při cystické fibróze či po totální pankreatektomii)⁹. Limitované množství tkáně získané izolací z jednoho pankreatu a nižší efektivita přihojení ostrůvků po transplantaci do portální žíly jater jsou důvodem, proč většinou nestačí na osvobození pacienta od léčby inzulinem. Přesto umožňují ostrůvky obnovit schopnost příjemce zastavit sekreci významné části inzulinu při klesající glykemii. Tento základní mechanismus chrání zdravé jedince před hypoglykemií, ale v případě diabetiků 1. typu léčených podkožně aplikovaným inzulinem se nemůže uplatnit. Jednou aplikovaný inzulin nelze z těla odstranit a korekce hypoglykemie je pak možná jen doplněním

glukózy do krve (přímo, cestou GIT nebo mobilizací z jater). Cílem tohoto druhu transplantace je tedy alespoň částečné obnovení sekrece inzulínu, která v případě klesající glykemie může být zastavena a v důsledku toho pak snížení frekvence a závažnosti hypoglykemických epizod. Úplného zbavení injekcí inzulínu se jedinou transplantací Langerhansových ostrůvků většinou nedaří dosáhnout.

Menšinou indikací je autotransplantace vlastní tkáně u pacientů podstupujících totální pankreatektomii z nemaligní příčiny. Transplantace vlastních ostrůvků nevyžaduje chronickou imunosupresi a pacientovi zachová podstatnou část sekrece inzulínu i kontraregulačních hormonů.

Výjimečně se pak Langerhansovy ostrůvky transplantují v kombinaci s ledvinou u diabetiků 1. typu s diabetickou nefropatií ve stádiu selhání ledvin, kteří jsou z kardiovaskulárních příčin kontraindikováni k orgánové transplantaci pankreatu. Jinou vhodnou indikací může být transplantace jater diabetikovi 1. typu, který společně s játry dostane inzulín produkující tkáň od jednoho dárce a nezvyšuje se mu tak riziko imunizace/senzibilizace.

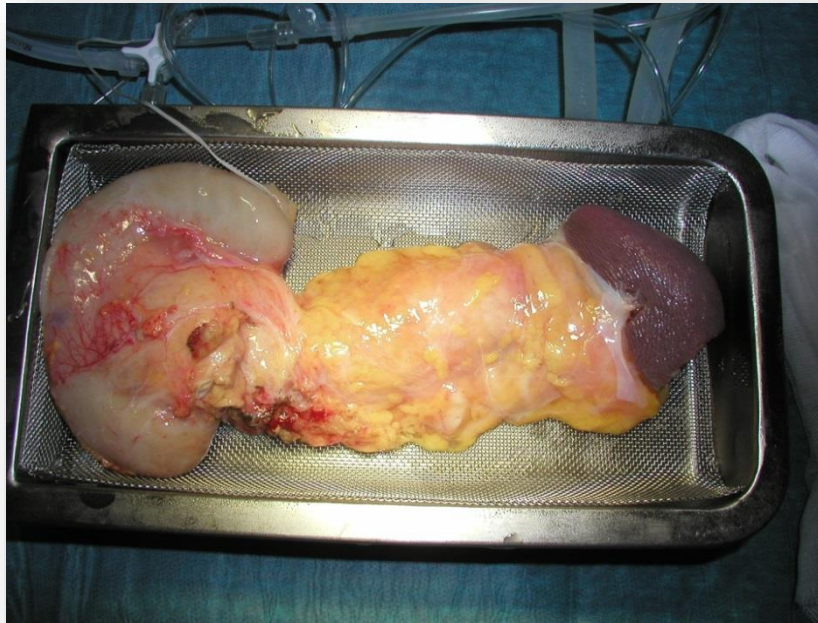
Kontraindikace

Kontraindikace transplantace Langerhansových ostrůvků jsou také relativní a absolutní. Absolutní kontraindikace jsou shodné s obecnými překážkami transplantační léčby a zahrnují maligní onemocnění, agresivní infekční onemocnění, sepsi, multiorgánové selhání, srdeční selhání, závažnější jaterní onemocnění a trombózu portální žíly. Specifické, relativní kontraindikace představují: výrazná inzulínová rezistence (diabetes mellitus 2. typu), neochota nebo neschopnost pacienta spolupracovat.

Technika provedení

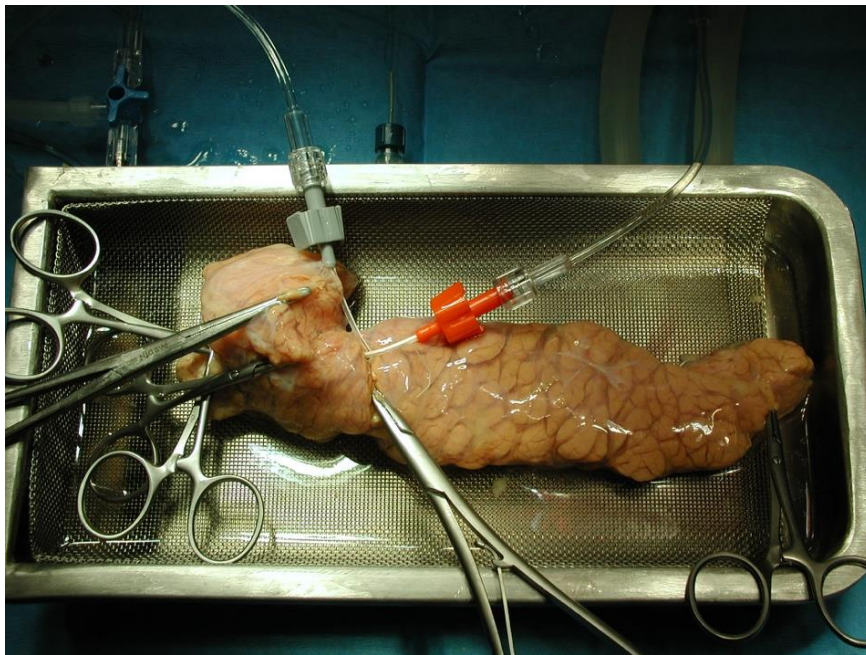
Langerhansovy ostrůvky se izolují ze standardně odebraných orgánů od kadaverosního dárce (**Obr. 5**) zavedenou technikou využívající specifické vazby enzymu kolagenázy (produkované *Clostridium histolyticum*) na kolagen IV a VI exokrinního pankreatu, které rozpouští.

Obraz 5: Pankreas odebraný chirurgickým týmem v rámci multiorgánového odběru od kadaverosního dárce. Společně s pankreatem se odebírá duodenum a slezina. Jemnou preparaci (backtable) provádí pracovníci Laboratoře Langerhansových ostrůvků před zavedením katetrů.



Po odstranění duodena, sleziny a většiny tuku se roztok enzymu aplikuje do hlavního pankreatického vývodu pod kontrolovaným tlakem, a tak pronikne do terminálních větví pankreatických duktů (**Obr. 6**).

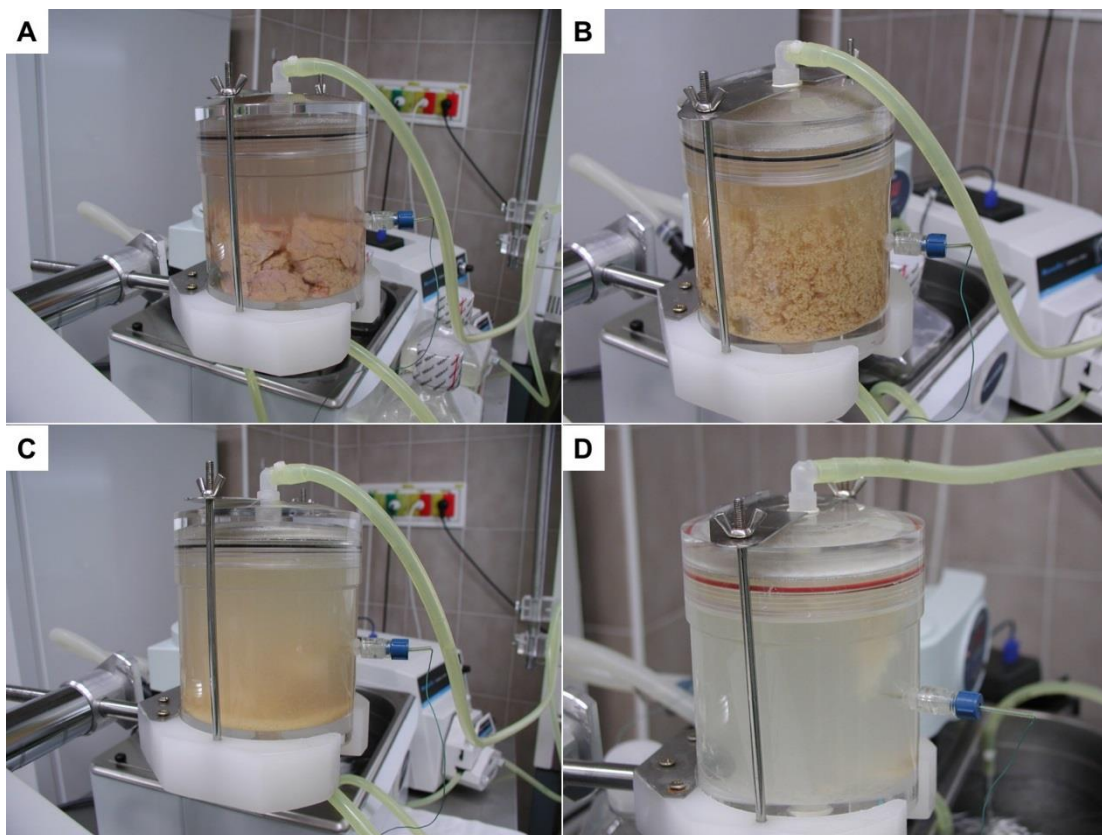
Obraz 6: Pankreas zbavený okolního tuku, sleziny a duodena, se zavedenými katetry pro plnění orgánu roztokem kolagenázy. Po správném naplnění je jasně patrné rozestoupení acinů v celém rozsahu orgánu.



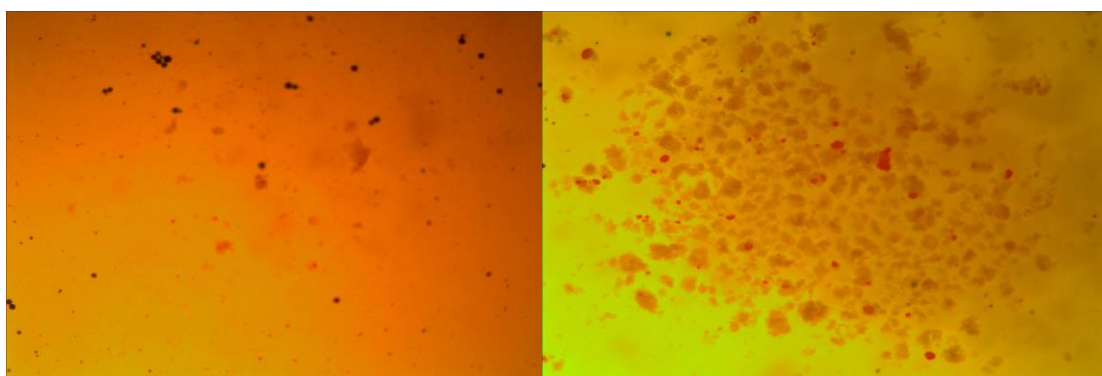
Celková doba plnění je variabilní podle zkušeností jednotlivých pracovišť. Někteří preferují jasně definovanou dobu cca 10-15 minut s postupně narůstající rychlostí plnění 10 – 100 ml/min. Jiné skupiny plní také 10-15 minut, ale rychlost instilace roztoku regulují podle tlaku, který se první polovinu doby udržuje na 50 a druhou polovinu na 100 mmHg. Jiné skupiny plní orgán pomalu (30-40 ml/min) po dobu nezbytnou k dostatečnému stupni naplnění, který kontrolují zrakem. Orgán je po celou dobu plnění chlazen na 5-7 °C. Pro rovnoměrné zahájení digesce je třeba rychle a v celém objemu koordinovaně zvýšit teplotu na optimální hodnotu, tj. 37°C. Proto se pankreas rozdělí na cca 0.5 až 1.0 cm silné plátky, které se následně vloží do digesční komory zapojené do promývacího okruhu (**Obr 7**). Po několik jednotek až desítek minut trvající inkubaci enzymem naplněného orgánu při 37 °C dojde k rozpadu fibrózní tkáně. Cirkulující roztok enzymu nese fragmenty tkáně, které mohou procházet příčně umístěným sítkem, pokud jsou menší než 500 µm (velikost otvoru zvolena podle velikosti největších ostrůvků do 400 µm – měl by projít ostrůvek minimálně obalený exokrinní tkání). Postup digesce lze sledovat makroskopicky, postupně se objeví zákal roztoku v komoře, a mikroskopickým vyšetřením vzorků odebraných z okruhu. Celkový objem cirkulační soustavy kolísá mezi 600 a 800 mililitry, odebírají se 2 ml vzorky každé tři minuty. První vzorek se odebírá 10 minut po dosažení teploty 36.5 °C v digesční komoře. Zpočátku se ve vzorku nacházejí jen drobné fragmenty exokrinní tkáně, které se barví slabě růžově, a kapénky tuku, které se barví zeleno černě. Výjimečně při přesycení roztoku můžeme v mikroskopu vidět černé krystaly ditizonu ve tvaru jehly. Typicky během 10-15 minut ve vzorcích přibývá exokrinní tkáně a objevují se první okrouhlé, jasně červené ostrůvky.

Nejdříve spojené s kousky exokrinní tkáně, později zcela uvolněné. Kritériem pro přerušení okruhu a zahájení sběru tkáně je přítomnost více než 10 ostrůvků v jednom vzorku a z toho 50% uvolněných, tj. bez připojené exokrinní tkáně (**Obr 8**). Suspenze odebírá do zkumavek, ve kterých sedimentuje při centrifugaci a následně se koncentruje do jedné zkumavky. Tekutina v systému se nahrazuje čistým ohřátým roztokem, který nezpomaluje digesci v komoře. Tkáňová suspenze odtékající z komory se v nerezové cívce chladí a digesce se zastavuje. Suspenze se opakovaně proplachuje a koncentruje. Výsledkem je 50-70 ml tkáňové suspenze obsahující směs všech typů buněk pankreatu a v komoře zbytky kapsuly, vývodů a cév (**Obr 9**).

Obraz 7: Distendovaný pankreas se nakrájí na ½ až 1 cm silné plátky a vloží do digesční komory (A). Postupující digesce se makroskopicky projeví objevením zákalu (B) a mizením kousků tkáně (C, D). Nakonec v komoře zbyde jen tkáň kapsuly, vývodů a části, které se nepovedlo dobře naplnit kolagenázou.



Obraz 8: Mikroskopické vyšetření vzorků odebíraných z digesčního okruhu a obarvených Ditizonem. Vlevo je obraz z počátku digesce, kdy se ve vzorku nachází malé kousky exokrinní tkáně (růžovo oranžové) kapénky tuku (zeleno černé) a někdy krystaly Ditizonu. Vpravo je typický obraz indikující rozpojení digesčního okruhu a zahájení kolekce tkáňové suspenze – jasně červené jsou Langerhansovy ostrůvky, v tomto případě většinou uvolněné z exokrinní tkáně.



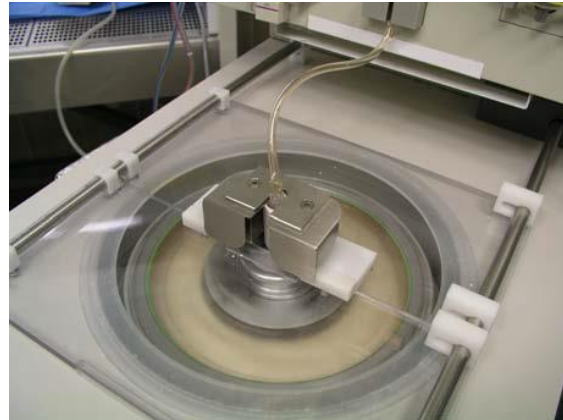
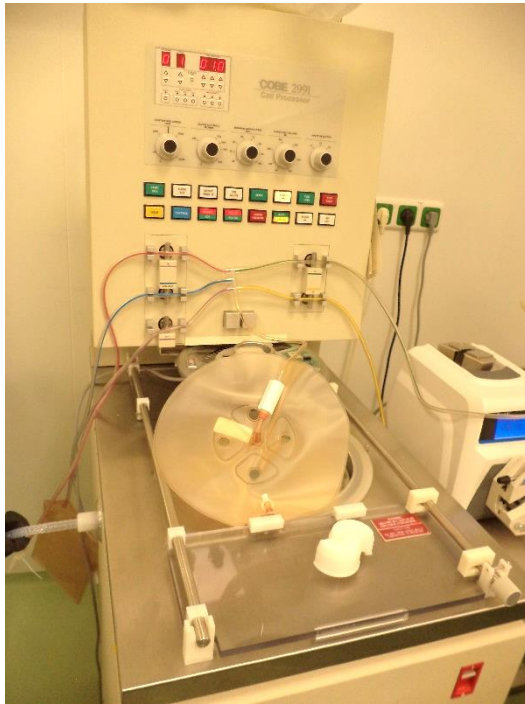
Obraz 9: Po opakovaném promývání a sedimentaci se celá suspenze tkáně pankreatu soustředí v jedné zkumavce a má objem cca 50-70 ml. V tomto případě je vidět suspenze rozptýlená v promývacím médiu před finální centrifugací. Pravý panel ukazuje zbytky tkáně v komoře po ukončení digesce a vypláchnutí rozpuštěné suspenze.



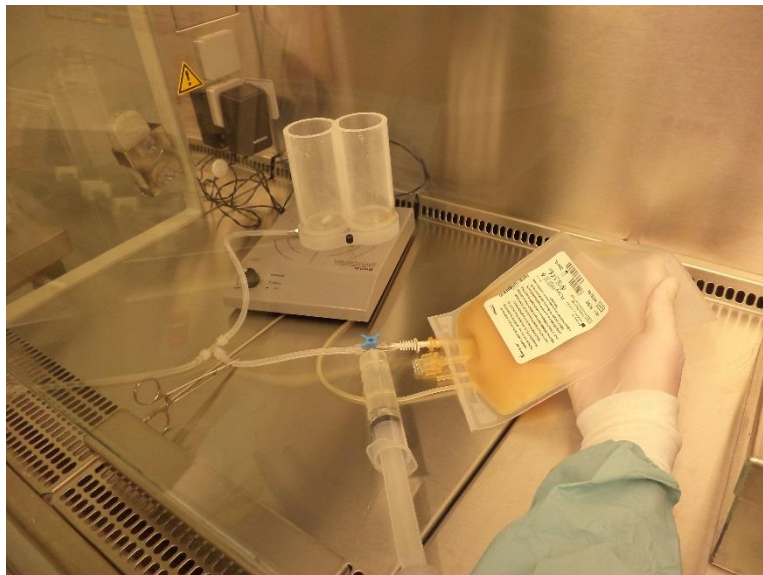
Pro oddělení jednotlivých frakcí se využívá rozdíl mezi densitou exokrinní tkáně a Langerhansových ostrůvků¹⁰. Smíšená tkáňová suspenze v objemu průměrně kolísajícím mezi 50 a 70 ml se centrifuguje v kontinuálním hustotním gradientu. Gradient se připravuje v buněčném separátoru COBE 2991 (**Obr. 10**) ze dvou roztoků téhož polysacharidu s vysokou viskozitou, který se velmi pomalu mísí. Krajiní denzity roztoků umístěných v mísících komorách (**Obr. 11**) jsou 1.100 g/ml a 1.037 g/ml a jejich postupným plněním do centrifugačního vaku se vytvoří masa tekutiny s postupně do periferie narůstající densitou. Nakonec přidaná tkáňová suspenze (**Obr. 11**) se během 8 minut pokračující centrifugace rozdělí a jednotlivé frakce tkáně se „usadí“ ve vrstvě s odpovídající densitou. Následuje odběr frakcí suspenze z vaku (po 25 ml, **Obr. 12**), které se po prohlédnutí 100 μ l vzorků v mikroskopu rozdělí podle obsahu a čistoty Langerhansových ostrůvků (**Obr. 13**).

Frakce s nejvyšším podílem vysoce pročištěných ostrůvků se spojí, po odstranění roztoku gradientu kvantifikují a uloží do tkáňové kultury až do doby transplantace. Tradičně se získaná tkáň ukládala do bez sérového média do kultivačních lahví (175 cm²), nově se v naší laboratoři používají kultivační vaky, které díky většímu difusnímu povrchu umožňují efektivnější výměnu plynů a zvyšují viabilitu kultivované tkáně (**Obr. 14**).

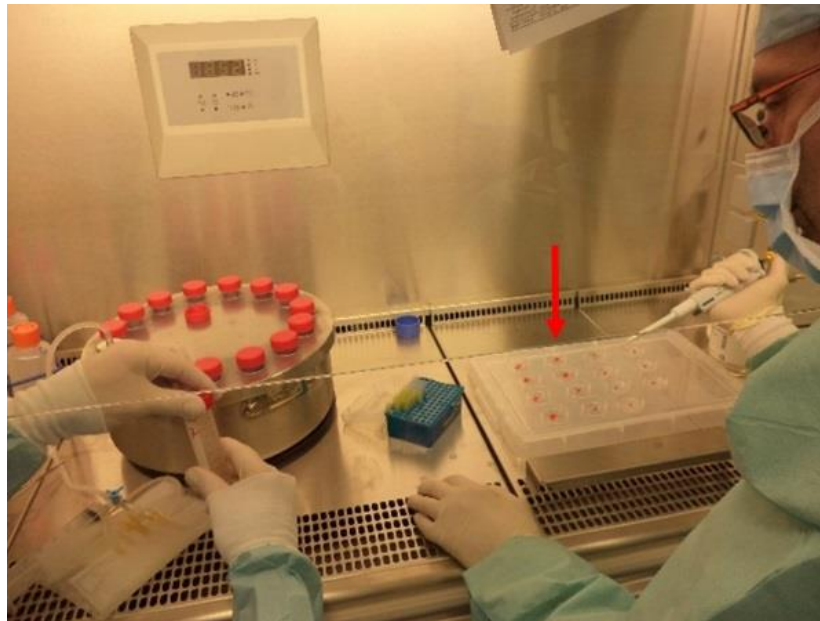
Obraz 10: Buněčný separátor COBE 2991. Na levém obrázku je otevřená komora centrifugy s vakem, ze kterého centrálně vystupuje plnicí a zároveň vypouštěcí hadice. Na pravém obrázku je komora centrifugy zavřená, vak roztočený a naplněný tekutinou tvořící hustotní gradient.



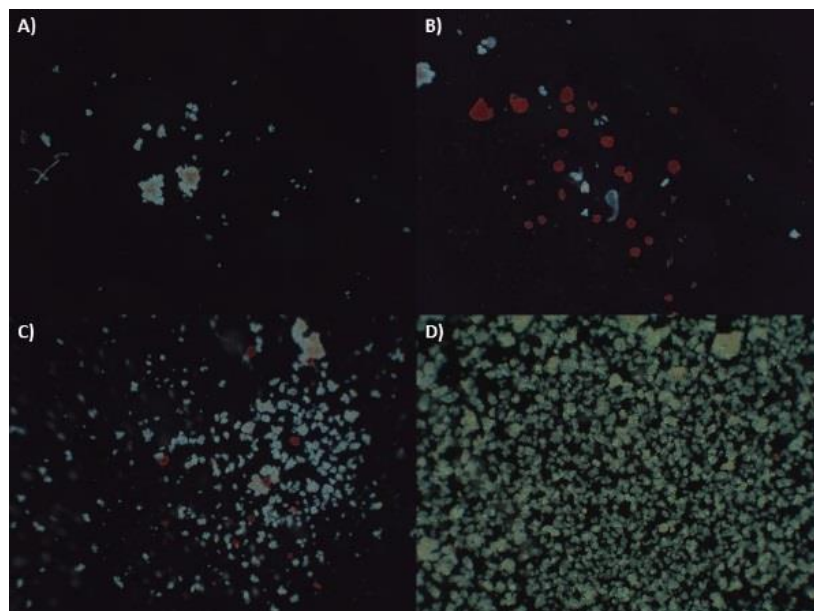
Obraz 11: Mísící komory (gradient maker) obsahují roztoky polysacharidu s krajními hustotami. Postupně se pomocí peristaltické pumpy vpraví do centrifugačního vaku (Obr. 10).



Obraz 12: Sběr vzorků z jednotlivých alikvot (v 50 ml zkumavkách) tkáňové suspenze v gradientním roztoku. Z každé zkumavky se odebírá 100 μ l vzorek a v Petriho misce \uparrow se obarví ditizonem.



Obraz 13: Vpravo jsou mikroskopické obrazy čtyř vzorků (**A** první zkumavka s jednotlivými kousky exokrinní tkáně, **B** třetí zkumavka s ostrůvky a minimální příměsí exokrinní tkáně, **C** sedmá zkumavka s několika ostrůvky a větším podílem neodstraněné exokrinní tkáně, **D** dvanáctá zkumavka obsahující převážně exokrinní tkáň).

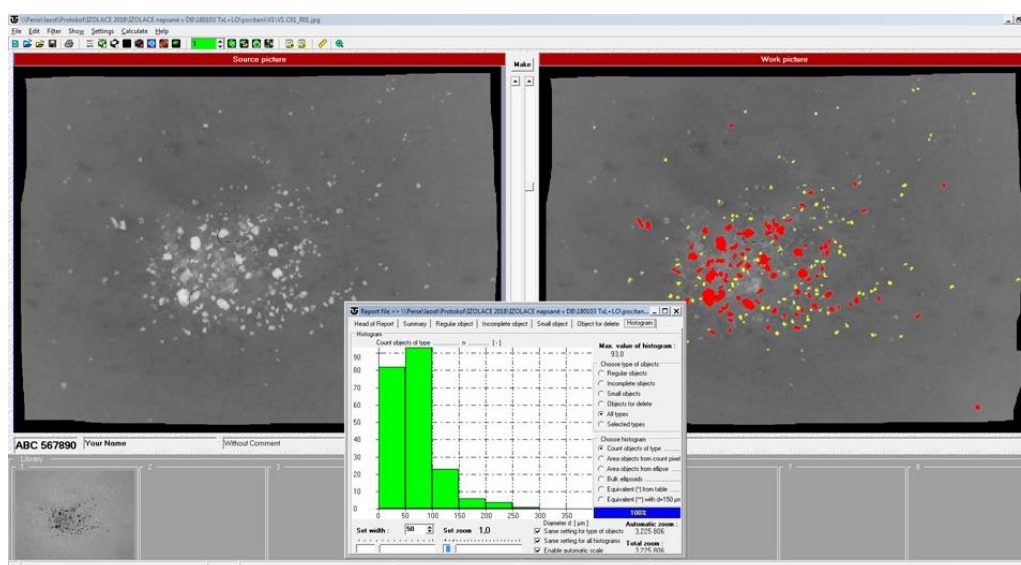


Obraz 14: Vlevo jsou ostrůvky uložené do kultivační lahve, vpravo jsou připravené kultivační vaky ve stojanech pro vložení suspenze ostrůvků.



Tkáňová suspenze se ukládá do kultury rozděleně podle stupně odstranění exokrinní tkáně jako vysoce purifikovaná (Langerhansovy ostrůvky tvoří více než 85% tkáně), středně purifikovaná (Langerhansovy ostrůvky tvoří 35-85% tkáně) a málo purifikovaná (Langerhansovy ostrůvky tvoří méně než 35% tkáně). Ze všech tří částí štěpu se odebírá 3-5 100 μ l vzorků pro kvantifikaci. Vzorky se obarví ditizonem a následně vyfotografují s definovaným zvětšením v mikroskopu. Získané fotografie se zpracují metodou digitální analýzy obrazu (**Obr. 15**).

Obraz 15: Ukázka SW používaného pro digitální analýzu obrazu – kvantifikaci Langerhansových ostrůvků ve štěpu. SW byl vyvinut ve spolupráci s Technickou univerzitou v Košicích v roce 2003 – viz publikace^{11,12}



Po zjištění průměrné velikosti vzorku v jednotlivých částech štěpu se počty Langerhansových ostrůvků a ostrůvkových ekvivalentů sečtou. Pokud se podaří získat

dostatečně velký štěp, tj. 300 tisíc ostrůvkových ekvivalentů (1 ostrůvkový ekvivalent = IEQ odpovídá jednomu ostrůvku o průměru 150 μ m), je považován za dostatečný pro transplantaci. Limitujícím faktorem je i celkový objem tkáňové suspenze (narůstá s vyšším podílem exokrinní tkáně), kdy objem větší než 20 ml považujeme za vysoce rizikový pro vyvolání klinicky významné trombózy portální žíly. Kvalita štěpu se dále ověřuje posouzením viability buněk pomocí testu integrity membrány fluorescenčními značkami (Propidium Iodide a Acridine Orange) a schopnosti produkovat inzulin po stimulaci glukózou. Z bezpečnostních důvodů se opakovaně odebírají vzorky pro kontrolu mikrobiologické čistoty štěpu.

Vlastní transplantaci zahajuje invazivní radiolog. V lokální znecitlivění transhepatálně zavede katetr do hlavního kmene portální žíly. Poloha katetru se ověřuje skiaskopicky po aplikaci minimálního množství rentgen kontrastní látky (**Obr. 16**). Pokud je katetr zaveden správně, změří se portální tlak krve a připojí se infusní set se suspenzí štěpu. Součástí transplantačního média je heparin v dávce 75 jednotek na kilogram váhy příjemce. Vak (vaky) se až do podání chladí pomocí ledové tříště. Podání suspenze trvá typicky 20-40 minut, tlak krve v portální žíle se opakovaně měří a v případě jeho vzestupu nad 20 mm vodního sloupce je považována mikrotrombotizace za významnou a infuze štěpu ostrůvků se přeruší, eventuálně ukončí. V zájmu podání co největšího množství inzulin produkujících buněk se většinou štěp rozdělí na dvě části, kdy první se podávají prakticky samotné ostrůvky a ve druhé ostrůvky s příměsí exokrinní tkáně.

Obraz 16: Pacient v lokální anestezii na radiologickém sále - vlevo. Perkutánně je zaveden katetr do portální žíly a skiaskopicky se pomocí rentgen kontrastní látky zobrazí kmen portální žíly a její větvení - vpravo.



Po podání celého štěpu se katetr vyjímá a následnému krvácení z punkčního kanálu brání tkáňové lepidlo (Avitene®) instilované cestou katetru při jeho vyjímání.

Péče o příjemce

Nechirurgická péče o příjemce začíná už před samotnou transplantací. Příjemce dostává tzv. indukční imunosupresi, kterou zajišťují v naší praxi depleční polyklonální protilátky cílené k odstranění cirkulujících T-lymfocytů (ATG Fresenius, Grafalon, Thymoglobuline). Současně se podávají první dávky dlouhodobé udržovací imunosupresivní medikace, které jsou podávány v zájmu maximalizace efektu při minimálních nežádoucích účincích v kombinaci. Používané kombinace jsou: tacrolimus + sirolimus + prednison nebo tacrolimus + mykofenolát mofetil + prednison. Při standardním průběhu se kortikoidy vysazují během 6 týdnů po transplantaci. Dávkování tacrolimu a sirolimu se upravuje podle dosažených údočních hladin (tacrolimus, sirolimus a everolimus 8-15 ng/ml první 3 měsíce a 5-10 ng/ml dlouhodobě; hladina mykofenolátu se nemonitoruje). Jako prevence trombózy portální žíly je první tři dny podáván nízkomolekulární heparin, který se posléze nahrazuje kyselinou acetylosalicylovou nebo ticlopidinem. Současně je v tomto období korigována glykemie intravenózně podávaným inzulínem při frekventní monitoraci glykemie s cílem téměř fyziologické regulace (glykemie 5-7 mmol/l). Prvních několik dní chrání pacienta tzv. profylakticky indikovaná antibiotika (v našem případě Tazocin = tazobactam + piperacilin). Virostatika se podávají 3 měsíce (při pozitivě příjemce anti-CMV IgG) nebo 6 měsíců (při negativě anti-CMV IgG u příjemce). Jako ochranu proti specifickým pneumoniím užívají příjemci 6 měsíců po transplantaci Biseptol 960mg 2x týdně. Po 6 měsících a při dobré funkci štěpu pak pacient dojíždí do ambulance pro „transplantované pacienty“ každé 2 měsíce, monitoruje se funkce štěpu, hladiny imunosupresiv, krevní obraz, SONO břicha jednou za rok. Při zcela nekomplikovaném průběhu je možné pacienta pozvat k druhé nebo třetí transplantaci s odstupem cca jednoho týdne. Zjištění rejekce štěpů Langerhansových ostrůvků je poměrně komplikované a některé zobrazovací techniky zachycující rejekci včas jsou testovány v experimentu. Nástup hyperglykemie je až pozdním ukazatelem poškození štěpu, které bývá často již ireverzibilní.

Výsledky

Na Klinice diabetologie IKEM bylo od zahájení klinického programu v roce 2005 provedeno celkem 385 izolací Langerhansových ostrůvků z lidských pankreatů a z toho bylo připraveno 105 štěpů vhodných k transplantaci. Celkově byly ostrůvky transplantovány 67 pacientům v různých kategoriích (ITA – islet transplantation alone, SIK – simultaneous islet kidney transplantation, IAL – islet after liver transplantation, IAT – islet auto-transplantation) s výsledky srovnatelnými s ostatními centry v Evropě a Severní Americe. Samotný výkon přežili všichni příjemci. Hodnocení funkce štěpu Langerhansových ostrůvků spočívá v dosažení tzv. složeného ukazatele (kombinovaného Endpointu), který zahrnuje:

1. snížení celkové denní dávky inzulínu o více než 30% původní dávky
2. zlepšení kompenzace diabetu se snížením HbA1c pod doporučenou hladinu 53 mmol/mol
3. obnovení přítomnosti C-peptidu v séru příjemce s hladinami nad 0,2 nmol/l
4. vymizení závažných hypoglykemií (lehká hypoglykemie je taková, kterou pacient zvládne vyřešit sám, závažná hypoglykemie je taková, při které pacient potřebuje pomoc další osoby).

Vzhledem k praxi opakovat transplantaci ostrůvků příjemcům s fungujícím štěpem, který ale nedosahuje funkce umožňující pacientovi ukončení monitorace glykemií a aplikace injekčního inzulínu, nelze funkci štěpu vyjádřit srovnatelným způsobem jako při orgánové transplantaci, tj. kumulativní přežívání pomocí Kaplan Meyerovy křivky. Hlavním limitujícím faktorem je opět nedostatek vhodných orgánů od kadaverosních dárců.

Tabulka 2: Počet izolací a transplantací Langerhansových ostrůvků v letech 2005 až 2017. Bylo provedeno 76 izolovaných transplantací Langerhansových ostrůvků 38 příjemcům z indikace syndromu poruchy rozpoznávání hypoglykemie. Jeden štěp obdrželo 13 příjemců, dvě transplantace podstoupilo také 13 příjemců, tři transplantace 11 příjemců a jedenkrát byla výjimečně provedena i čtvrtá transplantace Izolovaných Langerhansových ostrůvků. Dále bylo provedeno 14 autotransplantací, kdy byly Langerhansovy ostrůvky izolovány z vlastního pankreatu pacienta, který podstoupil totální pankreatektomii z nemaligní příčiny. Pět pacientům byly ostrůvky transplantované společně s játry a deseti společně s ledvinou.

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	Σ
IZOLACE	15	32	33	27	34	50	39	29	30	28	26	16	26	385
ITA	3	5	4	6	3	12	13	7	4	8	3	3	5	76
SIK	0	0	0	1	3	1	1	1	1	0	2	0	0	10
IAL	0	0	2	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	5
IAT	0	0	2	1	1	1	2	1	2	1	1	0	2	14
Celkem Tx	3	5	8	8	8	14	16	10	7	10	6	3	7	105

Úspěšnost izolací, tj. podíl izolací se získáním transplantabilního štěpu se postupně zvyšuje a z poměru 1:5 po zahájení programu byla zvýšena na 1:2 až 1:3 v posledním roce. Hlavními faktory klíčovými pro zvýšení efektivity izolací bylo zlepšování izolační techniky, získání kolagenázy se stabilní aktivitou (srovnatelná aktivita enzymu v jednotlivých dodávkách), náročnější kritéria pro výběr orgánů (např. edém znemožňuje distribuci enzymu, natremie dárce nad 160 mmol/l komplikuje separaci ostrůvků od exokrinní tkáně, atd.).

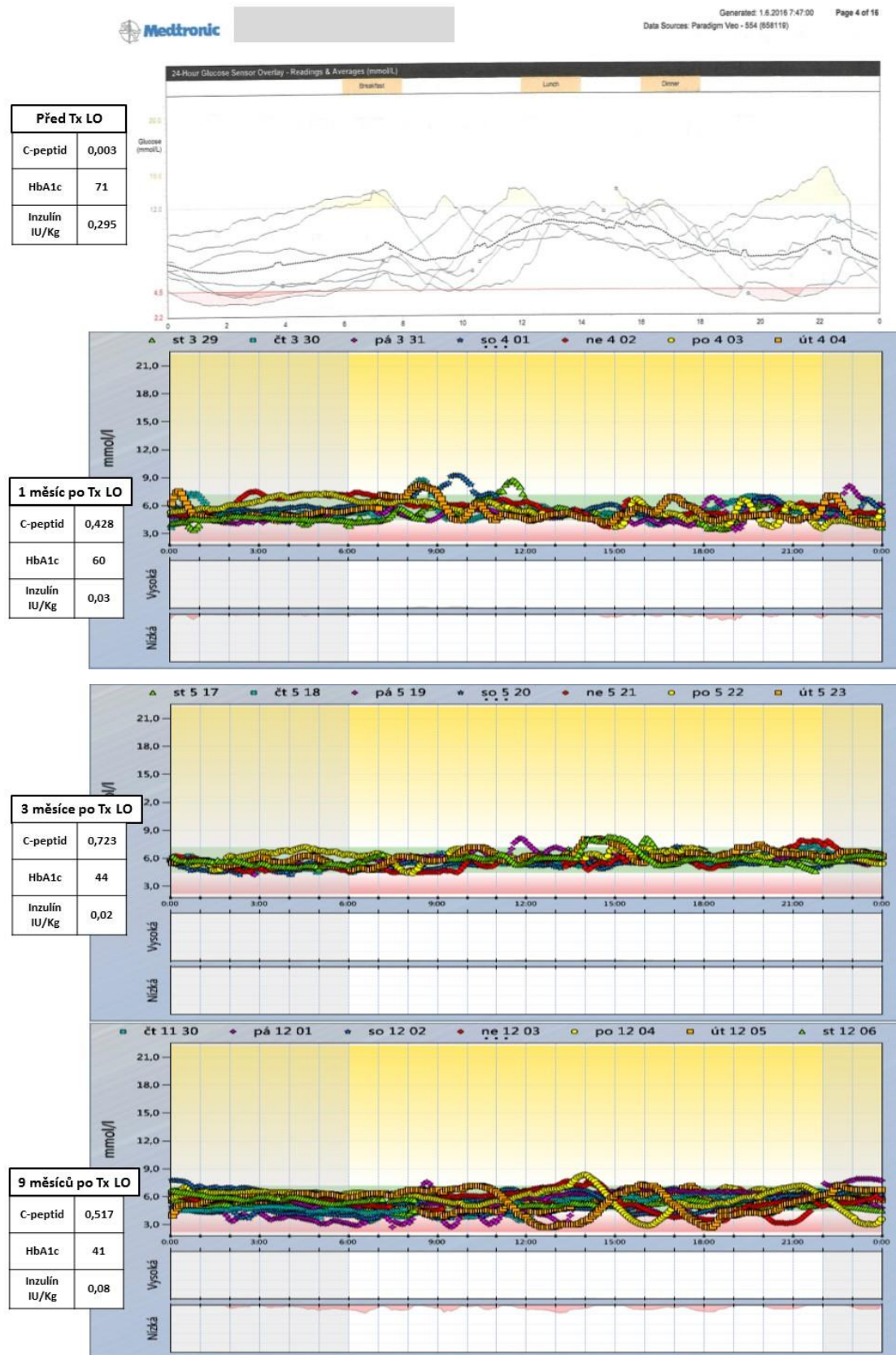
Kombinovaného „End-pointu“ jeden rok po transplantaci bylo dosaženo u 65 % příjemců. Nejdelší funkce štěpu Langerhansových ostrůvků trvala 11 let. Následující tabulka shrnuje, u kolika příjemců bylo dosaženo jednotlivých parametrů kombinovaného Endpointu a nezávislosti na injekcích inzulínu (která není hlavním cílem této metody léčby).

Tabulka 3: Shrnutí výsledků transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků jeden rok po transplantaci.

Parametr	Dosaženo u
Nezávislost na exogenním inzulínu	13%
C-peptid nad 0.2 nmol/ml 1 rok po poslední	69%
HbA1c 1 rok po poslední transplantaci nižší než 53 mmol/mol	39%
Redukce denní dávky inzulínu o >30%,	55%
Eliminace těžkých hypoglykemií	71%

Výsledky kontinuální monitorace glykemie u pacientky před a po úspěšné transplantaci izolovaných Langerhansových ostrůvků ukazuje (**obr. 17**).

Obraz 17: Záznamy z kontinuální monitorace glykemie u pacientky před a po transplantaci izolovaných Langerhansových ostrůvků cestou portální žíly. Jde o příklad dobré funkce štěpu. První monitoraci zajistila spádová diabetologická ambulance, a proto je kopírovaná z dokumentace a má jiný formát než následující tři monitorace provedené na našem pracovišti.



Hlavního cíle, eliminace těžkých hypoglykemií bylo dosaženo u téměř $\frac{3}{4}$ příjemců, stabilizace glykemií u více než poloviny. Metoda je tedy méně efektivní než orgánová transplantace, ale představuje smysluplnou a rychleji dostupnou alternativu pro pacienty s poruchou rozpoznávání hypoglykemií a neporušenou funkcí vlastních ledvin⁵.

Komplikace

Nejčastější komplikací bylo hlavně v prvních letech tohoto programu krvácení z punkčního kanálu do břišní dutiny (33 % pacientů, 18 % implantací), které bylo nutné v 8 případech (27 %) řešit urgentní chirurgickou revizí břišní dutiny. U jednoho pacienta se vyvinula signifikantní částečná trombóza portální žíly, kterou se podařilo zvládnout antikoagulační léčbou. Dvakrát se vyskytla iritace žlučových cest a u jednoho pacienta došlo ke krátkodobému poklesu tlaku, který bylo nutné řešit katecholaminovou podporou. Infekční komplikace související se samotnou transplantací se vyskytla jednou, a to díky transplantaci štěpu s hemolytickou E. Coli. Vyvinula se v závažnou sepsi, ale pacientka se vyléčila bez následků. Infekční komplikace související s imunosupresivní medikací se vyskytovaly také, a to jedenkrát cholecystitis, vícekrát uroinfekce a jedenkrát pneumonie. V souvislosti s imunosupresivní medikací a virostatickou profylaxí se čtyřikrát vyskytla trombocytopenie a desetkrát neutropenie.

Limity

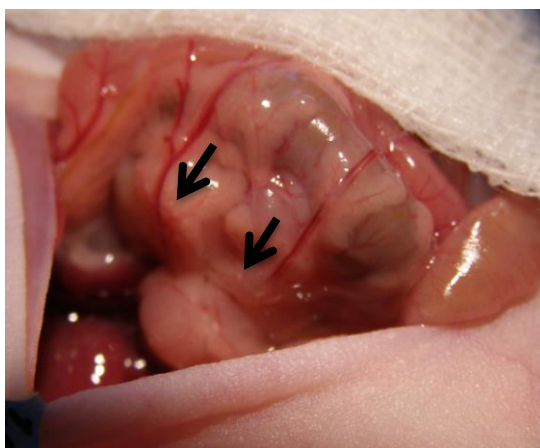
Hlavním limitujícím faktorem je stejně jako u orgánových transplantací omezený počet orgánů vhodných k izolaci Langerhansových ostrůvků. Částečnou aktuálně řešitelnou rezervou metody vhodnou ke zlepšení je málo účinné přihojení štěpu po vložení do krve portální žíly a dlouhodobá expozice štěpu hypoxii díky lokalizaci v játrech. Přihojení štěpu limituje nespecifický zánět a koagulace vyvolané mimo jiné molekulou tkáňového tromboplastinu, která se bohatě exprimuje v ostrůvku a spouští tzv. IBMIR (Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction). Dlouhodobá hypoxie limituje sekreci inzulínu a přežívání buněk.

Experimentální model izolace a transplantace Langerhansových ostrůvků u potkana

Izolace Langerhansových ostrůvků potkana

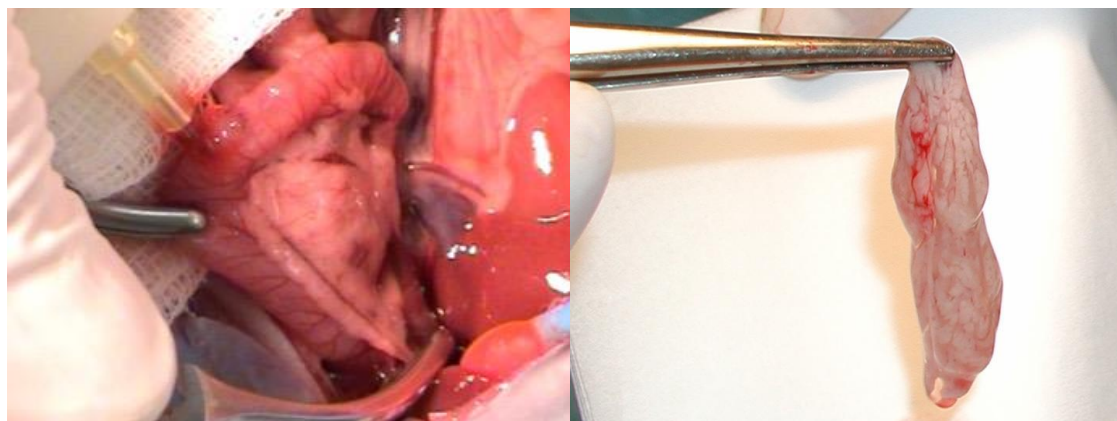
Potkani a myši jsou nejrozšířenějším modelem pro nácvik technik před přechodem ke klinické praxi a současně i hlavním modelem využívaným při testování nových postupů izolace i transplantace Langerhansových ostrůvků. Pankreas hlodavců je anatomicky odlišný (**obr. 18**), ale základní struktura i velikost ostrůvků obdobná jako u člověka.

Obraz 18: Pankreas potkana je plochý, vložený mezi listy mesoduodena, šipky ukazují na makroskopicky viditelné ostrůvky.



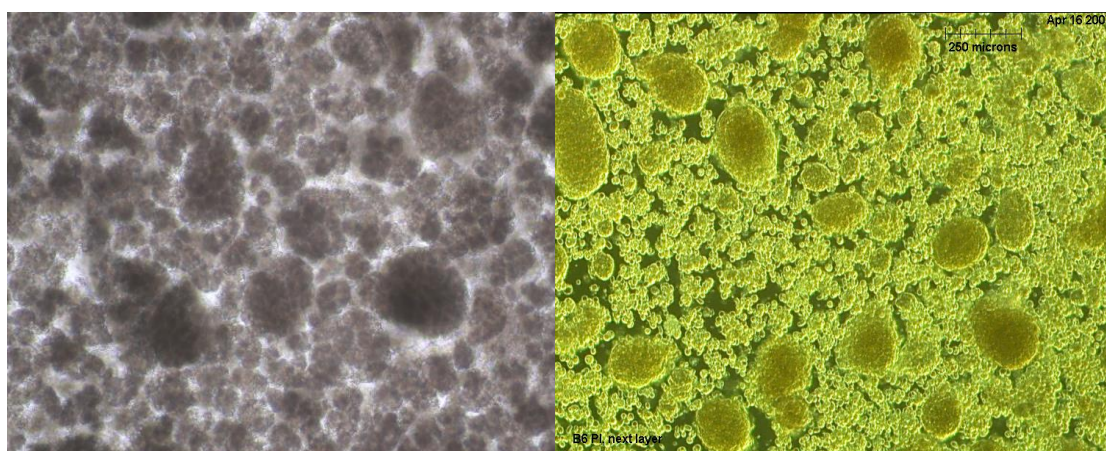
Metoda izolace přímé manuální extrakce ostrůvků pod disekčním mikroskopem je v tomto případě proveditelná, ale namáhavá a málo efektivní. Prakticky je pro izolaci ostrůvků využívána směs proteolytických enzymů s převažujícím obsahem enzymu kolagenázy (produkované *Clostridium histolyticum*), která se po naředění v pufru injikuje do pankreatických vývodů (potkan 15 ml, myš 3 ml, **obr 19**).

Obraz 19: Pankreas potkana. Vlevo je transduodenálně do ductus choledochus zaveden katetr; v jaterní brance je choledochus uzavřen cévní svorkou. Duodenum je na místě přidrženo také cévní svorkou. Vpravo je patrná distenze pankreatu s rozestupem acinů po oddělení od ostatních nitrobršních orgánů.



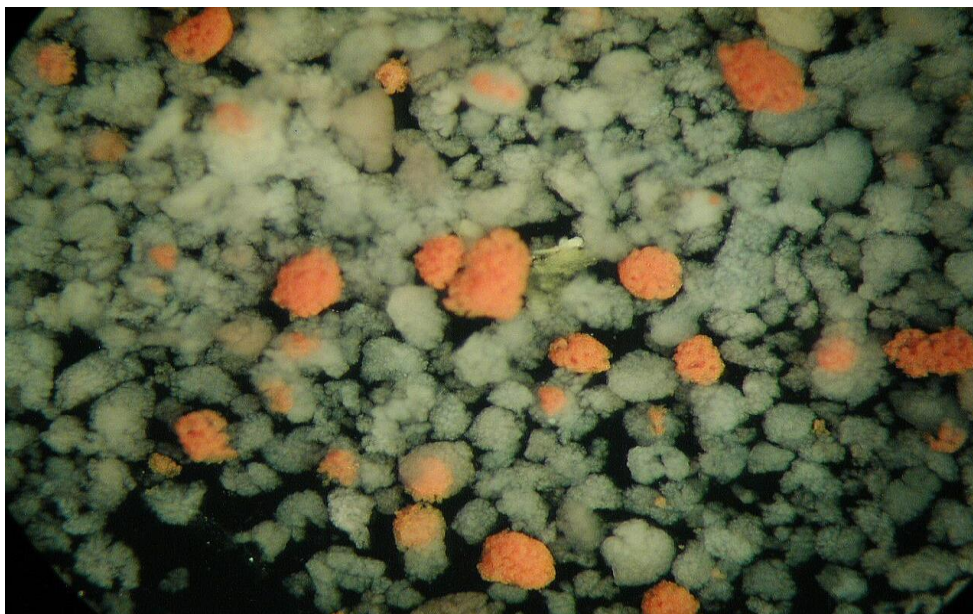
Pro správnou účinnost enzymu je třeba pankreas inkubovat při teplotě 37°C několik minut až desítek minut. Preferenčně se rozruší exokrinní tkáň. Výsledkem je pak tkáňová trávenina ve formě makroskopicky homogenní suspenze, která obsahuje směs exokrinní, endokrinní tkáně a fragmenty vývodů a cév (**Obr. 20**).

Obraz 20: Tkáňová směs získaná digescí pankreatu hlodavců. Vlevo je směs tkáně pozorovaná v Petriho misce disekčním mikroskopem, vpravo stejná směs tkáně pozorovaná inverzním mikroskopem.



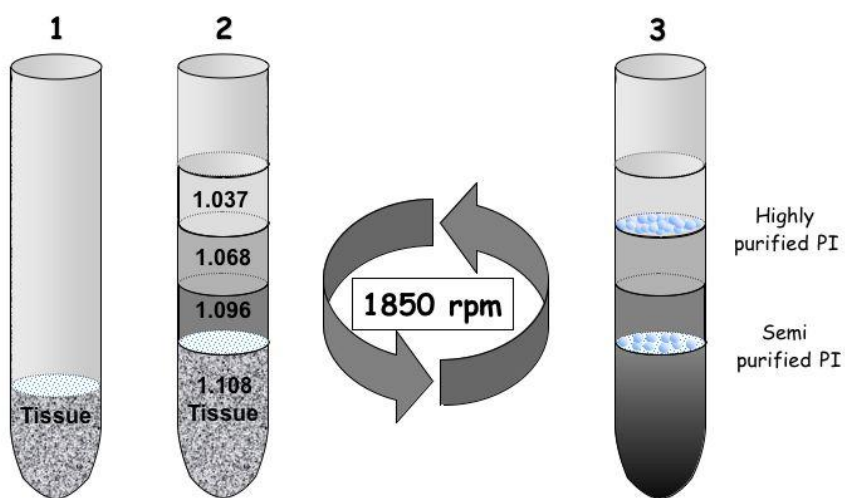
Rozpoznat exo- a endokrinní tkáň ve směsi dle morfologických znaků je možné díky zkušenosti, ale mnohem spolehlivějším způsobem je značení difenylcarbazonem (ditozionem), který ve vazbě na zinek tvoří červené komplexy. Značit je možné pouze reprezentativní vzorek, ve kterém se exokrinní tkáň zbarví buď lehce do růžova nebo vůbec, tkáň obsahující inzulin se zbarví jasně červeně. Ditozon je špatně rozpustný ve vodě, a proto se připravuje rozpuštěním v DMSO (dimethylsulfoxid) a ethanolu. Tento roztok se pak snadno rozpustí v médiu s tkáňovou směsí (**Obr. 21**).

Obraz 21: Tkáňová směs získaná digescí pankreatu hlodavců. Bílé až světle růžově je zbarvená exokrinní tkáň, Langerhansovy ostrůvky jsou cihlově červené. Konkrétní barva se může lišit podle koncentrace ditizonu v roztoku a nastavení mikroskopu.



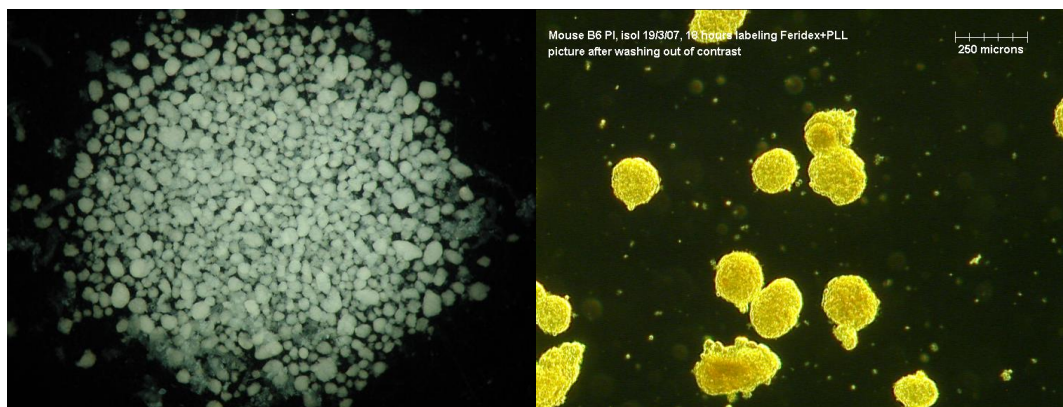
Oddělit Langerhansovy ostrůvky (tvoří až 2 % objemu) od zbývající tkáně je možné manuálně pomocí mikropipety, což je proveditelné jen při velmi malých počtech ostrůvků – u myši cca do 100 ostrůvků. Při větším množství tkáně je takový postup příliš časově náročný a pracný. Prakticky se proto využívá rozdíl specifické váhy obou typů tkání. Specifická váha ostrůvků je poměrně stabilní a uniformní, v literatuře bývá udávána hodnota 1.059 g/ml. Naopak specifická váha exokrinní tkáně je poměrně variabilní a kolísá typicky v rozmezí 1.059 – 1.074 g/ml¹³. Pokud vložíme tkáňovou směs obsahující složky s popsány rozdíly do hustotního gradientu, je možné je centrifugací oddělit. V naší laboratoři používáme polysacharidový gradient Ficoll připravený ve 4 různých koncentracích, a to 1.037, 1.069, 1.096 a 1.108 g/ml. Roztoky se navrství do 50 ml zkumavky v objemech po 8 ml. Při pokojové i centrifugační (7° C) teplotě se velmi pomalu mísí. Na dno zkumavky se umístí cca do 1ml tkáňové směsi a vše se centrifuguje 20 minut při 680x g. Výsledkem je oddělení zcela uvolněných ostrůvků, ostrůvků se zbytky exokrinní tkáně a exokrinní tkáně v příslušných vrstvách s odpovídající hustotou (**Obr. 22**). Pro konstrukci hustotního gradientu je možné použít i jiné biokompatibilní molekuly tvořící viskózní roztoky. Např. jiné polysacharidy nebo albumin.

Obraz 22: Rozdělení tkáňové směsi v hustotním gradientu. Prvním krokem je vložení tkáňové směsi na dno zkumavky, následuje převrstvení jednotlivými roztoky polysacharidu Ficoll, 20 minutová centrifugace a výsledkem je oddělení jednotlivých frakcí tkáně. Ostrůvky jsou převážně bílé, a proto nejlépe viditelné na tmavém pozadí.



Výsledkem je vysoce čistá frakce izolovaných Langerhansových ostrůvků (**Obraz 23**). Předpokládá se, že nejméně polovina ostrůvků je touto technikou ztracena. Prakticky tak je možné získat 50-200 ostrůvků od myši a 500-1500 ostrůvků od potkana.

Obrázek 23: Výsledkem purifikace je vysoce čistá frakce izolovaných Langerhansových ostrůvků. Vlevo je vidět cca 2000 ostrůvků v černé misce pozorované diskčním mikroskopem. Vpravo je několik myších ostrůvků pozorovaných inverzním mikroskopem v tkáňové kultuře.



Ostrůvky je třeba kvantifikovat, což se v případě experimentálních studií na hlodavcích provádí manuálně pomocí mikropipety a počítá se každý jednotlivý ostrůvek. Většinou se rozdíly ve velikosti jednotlivých ostrůvků neberou v úvahu. Tuto techniku počítání je možné aplikovat maximálně do celkového počtu 2 – 3 tisíc ostrůvků. Alternativou použitelnou při experimentální izolaci ostrůvků od většího počtu hlodavců, větších zvířat nebo z lidského pankreatu je kvantifikace ostrůvků v reprezentativních vzorcích. V takovém případě se typicky odebírá 1/1000 až 1/2000 objemu suspenze tkáně v médiu. Pro jednoznačné odlišení ostrůvků se použije ditizon a samotné počítání se pak provádí manuálně pomocí měřítka v mikroskopu, kalibrované mřížky nebo moderněji digitální analýzou fotografií vzorků z mikroskopu (**Obr. 15**). Tento způsob vyžaduje obsluhu, ale snižuje subjektivní vliv člověka na výsledek.

Novinkou jsou systémy pracující zcela autonomně, kdy samotná analýza je objektivní a opakovatelná. Jediným variabilním faktorem je pak odběr vzorků ze suspenze. Hlavním faktorem pro rozhodnutí o vhodnosti transplantovat bývá celkový obsah viabilních β -buněk ve štěpu. Vzhledem k velké variabilitě velikosti ostrůvků od několika desítek po několik tisíc buněk (30-450 μm) a pro zajištění srovnatelnosti štěpů se jednotlivé ostrůvky vzorku měří a přepočítávají na univerzální tzv. ostrůvkový ekvivalent, který odpovídá kouli o průměru 150 μm (1 IEQ).

Takto získané ostrůvky je možné ve vysoké kvalitě uchovat v tkáňové kultuře několik desítek hodin, po kterých dochází k destrukci struktury ostrůvků, nekróze, apoptóze a dediferenciaci buněk. Prakticky to znamená, že významně ubývá buněk schopných syntetizovat a uvolňovat inzulin v prostředí se suprafyziologickou

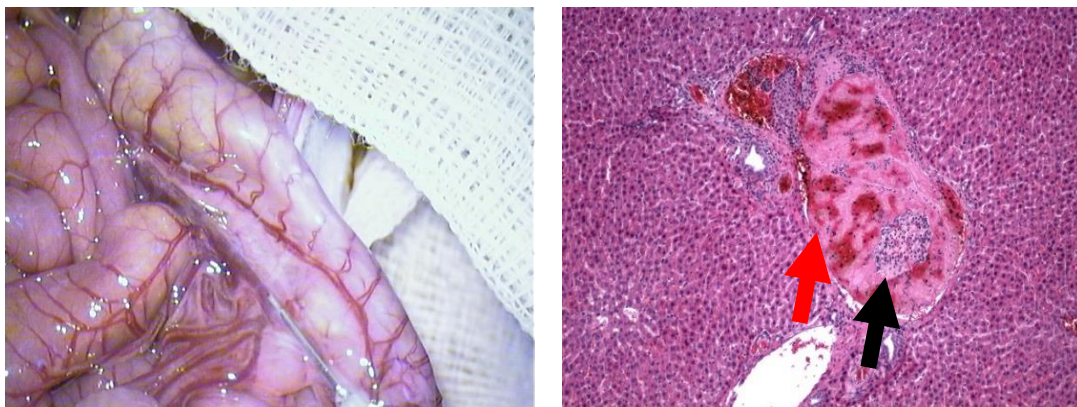
koncentrací glukózy. Standardně bývá používáno medium CMRL-1066 nebo RPMI obohacené o Fetal Bovine Serum 10%, Glutamin (Glutamax), se stabilizovaným pH pomocí HEPES a chráněné antibiotiky (Penicilin, Streptomycin). Typickým vzorkem je 1000-1200 ostrůvků v 5 ml obohaceného média v kultivační lahvi s plochou 25 cm² uzavřenou víčkem s HEPA filtrem. Kultivační lahev je pak uložena do tkáňového inkubátoru s atmosférou obsahující 5% CO₂, teplotou 37°C a vyšší než vzdušnou vlhkostí.

Transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků u potkana

Za optimální pro transplantaci bývá považován štěp obsahující cca 10 ostrůvků nebo ostrůvkových ekvivalentů na gram živé váhy příjemce. Způsob kvantifikace záleží na podmínkách konkrétního experimentu, používají se oba.

Izolované Langerhansovy ostrůvky se transplantují převážně do portální žíly jater, a to buď do hlavního kmene, nebo do některé z periferních větví, což umožňuje transplantovat ostrůvky do vybraných laloků jater (**Obr. 24A**). Vhodný je katetr nebo jehla kalibru nejméně 27G. Langerhansovy ostrůvky se resuspendují v transplantačním médiu u potkana maximálně v objemu 1 ml, u myši do 200 µl (PBS, HBSS). Po vložení do krve volně embolizují v terminálních větvích portální žíly uvnitř jaterního parenchymu (**Obr. 24B**). Krvácení po vyjmutí katetru či jehly se zastavuje pomocí hemostatické pěny (Curaspon, Gelaspon) nebo koagulačního prášku (Avitene).

Obrázek 24: A) vlevo je zachycena jehla motýlového katetru 27G zavedená do ileocékální žíly potkana. B) vpravo je snímek zachycující histologický řez jater potkana 2 hodiny po transplantaci ostrůvků. Uvnitř větve portální žíly je trombus obsahující řez ostrůvkem. Černá šipka ukazuje ostrůvek, červená trombus.



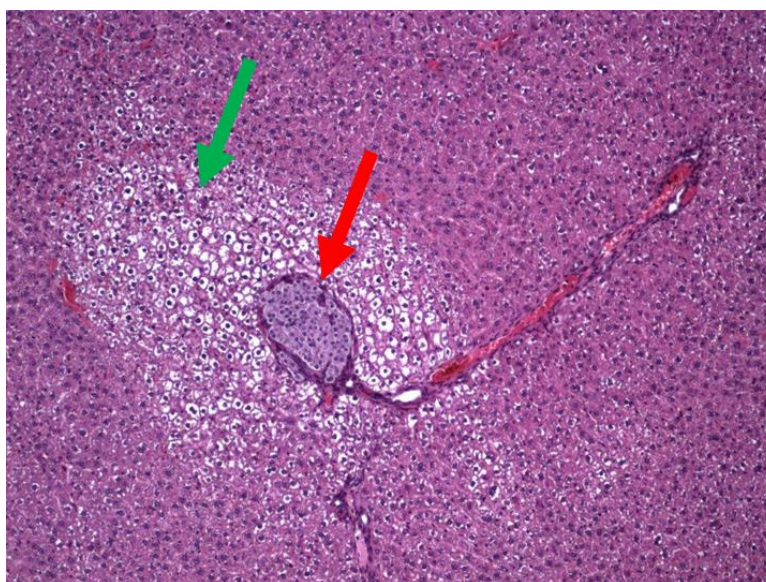
Kompletní normalizace hladin glykemie se daří touto technikou a při použití štěpu velikosti 10 ostrůvků na gram váhy příjemce dosahovat ve více než 90 % případů

(potkana, myši). Tato procedura je relativně bezpečná, ale má několik úskalí, která snižují efektivitu transplantace samotné i dlouhodobou funkčnost a přežívání ostrůvků.

Jsou to například:

- 1) Destrukce více než 50 % transplantovaných ostrůvků v řádu desítek minut po infuzi do krve portální žíly. Je tomu tak z velké části kvůli nespecifické zánětlivé reakci a lokální aktivaci koagulace^{14,15} (IBMIR = Instant Blood Mediated Inflammatory Reaction; **Obr. 24B**).
- 2) Trvalá expozice štěpu hypoxii
- 3) Vysoká hladina nutrientů, toxinů a léků v portální krvi
- 4) Nejasná dlouhodobá reakce jaterního parenchymu na vysokou koncentraci inzulinu v okolí štěpu (fokální steatóza **Obr. 25**, glykogenóza, možná excesivní proliferace)
- 5) Akutní mikrotrombóza portálního řečiště
- 6) Obtížné sledování distribuce a nemožnost biopsie štěpu – pro zobrazovací metody obdobné vlastnosti štěpu a okolní tkáň
- 7) A další.

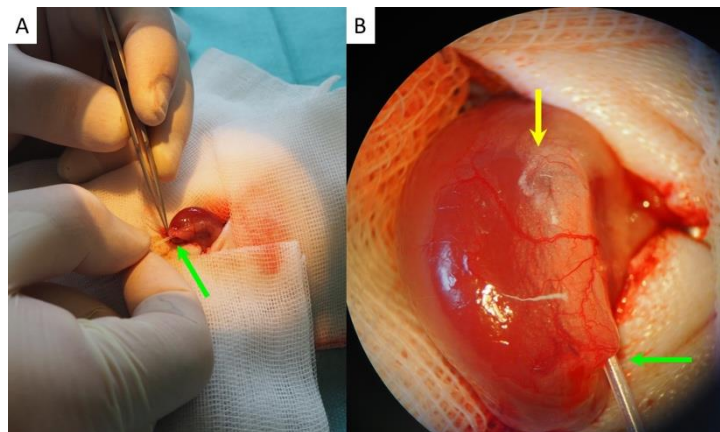
Obraz 25: Fokální steatóza obklopující ostrůvek transplantovaný do portálního řečiště jater potkana. Červená šipka ukazuje ostrůvek, zelená šipka ukazuje steatotickou jaterní tkáň.



Alternativou poměrně často používanou při experimentech zaměřených hlavně na rejekci a testování nových imunosupresivních protokolů, na studium revaskularizace štěpu a proliferaci/apoptózu buněk štěpu je transplantace ostrůvků pod renální kapsulu. Tato technika poskytuje výhodu těsného kontaktu štěpu s vysoce vaskularizovanou

tkání renálního kortexu bez přímého styku s krví. Druhou výhodou je možnost vizuální kontroly štěpu, jeho vyjmutí a ověření funkce, když po jednostranné nefrektomii ledviny nesoucí štěp dochází k rekurenci hyperglykemií. Zásadní pro úspěšné přihojení štěpu transplantovaného touto technikou je přiměřený poměr objemu štěpu a plochy kontaktu s kůrou ledviny. V první fázi, než dojde k revaskularizaci, jsou buňky štěpu odkázané pouze na difuzi kyslíku a nutrientů, proto musí být difusní vzdálenost minimální. V případě myši se ostrůvky mohou rozprostřít prakticky do jedné vrstvy, v případě potkana bývají ve 2 až 3 vrstvách (**Obr. 26**). U velkých zvířat a člověka nelze tuto techniku transplantace s úspěchem používat proto, že celkový objem štěpu je příliš velký a podstatná část ostrůvků díky ischemii v časném období nekrotizuje.

Obrázek 26: Transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků pod pouzdro levé ledviny. ↑ vstup hadičky PE 50 pod pouzdro ledviny, ↕ ložisko ostrůvků v kapce média pod pouzdem ledviny.



Stávající techniky izolace a transplantace ostrůvků nejsou optimální. Hledají se proto techniky pro účinnější izolaci, pro šetrné akutní i dlouhodobé monitorování viability a funkce štěpu a současně se vyvíjejí účinnější metody transplantace ostrůvků.

Aktuálně řešené problémy provázející izolaci a transplantaci Langerhansových ostrůvků.

Podle souhrnné zprávy¹⁶ vycházející z workshopu pořádaného IPITA (International Pancreas and Islet Transplant Association) ve spolupráci s TTS (The Transplant Society) v Oxfordu ve Velké Británii ve dnech 7. – 9. května 2014 se program transplantace inzulín produkující tkáně ve formě izolovaných Langerhansových ostrůvků etabloval jako široce akceptovaná léčebná modalita pro pacienty s diabetes mellitus 1. typu komplikovaným syndromem poruchy rozpoznávání hypoglykemie. Zpráva vycházela z rozsáhlé multicentrické prospektivní klinické studie fáze 3, která prokázala, že¹⁷:

- 1) Langerhansovy ostrůvky mohou být izolovány s obdobnou efektivitou při použití standardních postupů v různých centrech
- 2) Nezávislosti na léčbě injekčním inzulínem po jednom roce se daří dosáhnout u cca 50 % příjemců pomocí transplantace 1 nebo 2 štěpů
- 3) Kompenzace diabetu je vynikající, i pokud není dosaženo nezávislosti na inzulínu
- 4) Porucha rozpoznávání hypoglykemie se efektivně léčí, pacienti se zbaví hypoglykemických kómat.

Při výrazně menší invazivitě v porovnání s orgánovou transplantací přetrvává nižší efektivita transplantace izolovaných ostrůvků. Ve zprávě byly shrnuty hlavní oblasti, na které je třeba zaměřit aktuální výzkum¹⁶:

- 1) Vyhledávání kadaverosních dárců, odběr a konzervace orgánů, transport izolovaných ostrůvků.
 - a. Je třeba využít všech potenciálních dárců.
 - b. Je třeba odebírat pankreas pro izolaci ostrůvků se stejnou péčí a identickými metodami jako pro orgánovou transplantaci. Opakovaně se prokázalo, že kvalita a zkušenost chirurgického týmu odebírajícího orgán koreluje s výsledkem transplantace ostrůvků¹⁸.
 - c. Optimalizace konzervačního postupu by mohla zlepšit kondici i počet získaných ostrůvků¹⁹⁻²¹.
- 2) Optimalizace a inovace metody izolace ostrůvků.

- a. Přes veškerý pokrok je stále hodnocení pokročilosti digesce pankreatu empirické a závislé na zkušenosti týmu. Navíc se používá jedna směs enzymů pro variabilní orgány²².
 - b. Je třeba přesně definovat strukturu a složení pankreatické matrix, aby bylo možné připravit cíleně a standardně fungující enzym.
 - c. Možným řešením by mohly být neenzymatické postupy izolace ostrůvků²³⁻²⁵.
- 3) Optimalizace přípravy a uložení ostrůvků v tkáňové kultuře
- a. Krátkodobé uložení ostrůvků v tkáňové kultuře je výhodné pro zotavení ostrůvků po izolaci, pro kontrolu kvality i pro optimální přípravu příjemce a transplantačního týmu.
 - b. Současně umožňuje ovlivnit kvalitu štěpu, tzv. preconditioning (přidáním látek podporujících oxygenaci a revaskularizaci štěpu²⁶, redukujících IBMIR^{27,28}, umožňujících in vivo zobrazení²⁹⁻³¹, lokální imunosupresi^{32,33}, poskytující ochranu proti hypoxickému stresu³⁴).
 - c. Modelování 3D kultivace a podpory extracelulární matrix³⁵⁻³⁷.
- 4) Standardizace kontroly kvality a sjednocení definice kvalitního štěpu a jeho velikosti.
- a. Aktuálně není přijatá jednotná sada kritérií hodnocení štěpu, která by umožnila srovnání mezi centry. Rozhodnutí o transplantabilitě štěpu závisí na individuální zkušenosti každého týmu.
 - b. Jednotná kritéria kvality a velikosti štěpu umožní srovnatelnost výsledků jednotlivých center^{38,39}.
- 5) Identifikace příjemců s vysokým rizikem selhání štěpu ostrůvků.
- a. Aktivní vyhledávání příjemců s vysokým rizikem senzibilizace nebo extrémních metabolických nároků na štěp umožní individualizovanou léčbu po transplantaci⁴⁰.
- 6) Vývoj alternativních míst pro implantaci ostrůvků.
- a. Ačkoli se transplantace do jater rutinně provádí a játra mají řadu výhod, ostrůvky jsou zde vystaveny trvalé hypoxii, vysokým koncentracím léků, nutrientů a toxinů. Tento způsob transplantace není pro ostrůvky optimální.
 - b. Alternativní způsoby zohledňují bohaté prokrvení, zamezení přímému kontaktu s krví, vhodnou teplotu, přirozenou drenáž inzulínu do jater,

mechanickou ochranu štěpu, dostupnost k biopsii, minimálně invazivní implantaci štěpu, atd. ⁴¹⁻⁵⁰.

- 7) In vivo zobrazení ostrůvků s ohledem na monitoraci přežívání a rejekce
 - a. Zobrazení distribuce předem značených ostrůvků a jejich vymizení díky destrukci umožňuje monitorovat akutní a pozdní úbytek ostrůvků a optimálně predikovat rejekci^{31,44,51,52}.
 - b. Zobrazení hraničního štěpu umožňuje monitorovat přežívání štěpu, jehož funkční kapacita není dostatečná k normalizaci glykémie⁵³.
- 8) Strategie minimalizující systémovou imunosupresivní léčbu nebo dosažení specifické tolerance štěpu.
 - a. Příprava příjemce pomocí deplečních a non-deplečních protilátek.
 - b. Ko-transplantace ostrůvků a mezenchymových kmenových a dalších typů buněk⁵⁴⁻⁵⁹.
 - c. Pre-conditioning ostrůvků ^{32,33}.

Řešený problém	Příspěvek autora – vlastní publikace
Odběr orgánů	-
Izolace ostrůvků	60
Pre-conditioning	61
Kvalita a kvantifikace	12,38,62,63
Identifikace rizikových příjemců	64
Vývoj alternativních míst	65-71
In-vivo zobrazení	29-31,51,52,62,72-76
Redukce imunosuprese, tolerance	77-79

Kromě toho se setrvale zkoumají možnosti propagace inzulin produkujících buněk in vitro, využití kmenových buněk jako zdroje, použití xenogenních buněk.

Vlastní výsledky

Zobrazení transplantovaných Langerhansových ostrůvků pomocí MRI

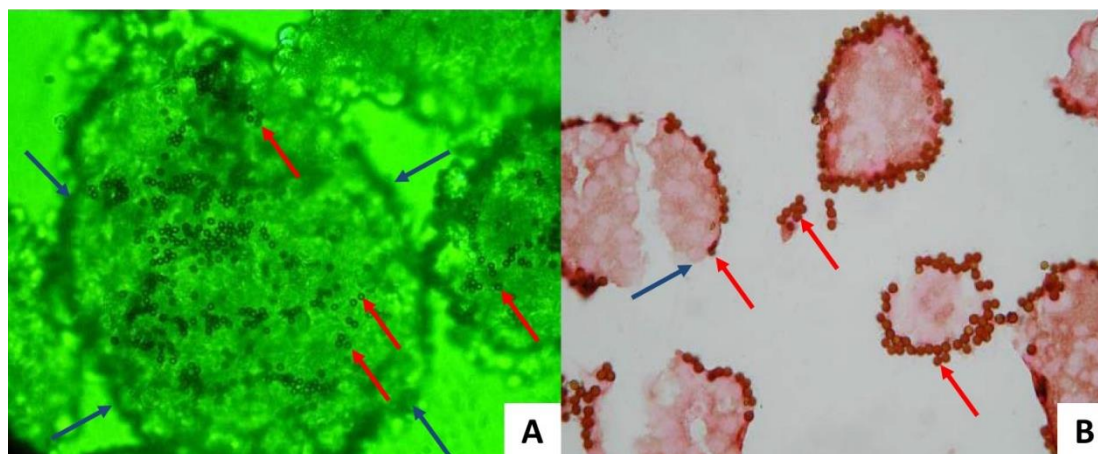
Langerhansovy ostrůvky mají pozoruhodnou mezidruhově stabilní velikost. U myši, potkana, vepře i člověka se jejich velikost pohybuje od několika buněk po 350-400 μm . Primární dysfunkce záhy po transplantaci štěpu hraniční velikosti (u hlodavců 4 LO na gram váhy příjemce) je poměrně častá a morfologické/funkční zobrazení by mohlo ozřejmit, jestli dochází ke destrukci štěpu nebo jen funkčnímu selhání Beta buněk. Celkově představují Langerhansovy ostrůvky cca 1% podíl na objemu pankreatu a tento rozdíl se ještě 10x zvýrazní po transplantaci do jater. Magnetické i radiologické vlastnosti Langerhansových ostrůvků jsou prakticky shodné s parenchymem jater, a proto nejsou pomocí samotné MRI identifikovatelné. Nicméně magnetická rezonance je velmi vhodná k dlouhodobému sledování štěpu pro svou bezpečnost, opakovatelnost a vysoké prostorové rozlišení. V roce 2003 publikoval Markmann klinickou studii, ve které vyšetřil 4 pacienty po transplantaci Langerhansových ostrůvků SONOgraficky a poté pomocí MRI. U dvou osob s velmi dobrou funkcí štěpu umožňující ukončení léčby injekcemi inzulínu se v okolí ostrůvků vytvořila jasně detekovatelná ložiska jaterní steatózy. U dvou příjemců, jejichž štěpy nebyly dostatečně výkonné a bylo potřeba pokračovat v injekční léčbě inzulínem, se lokální reakce nevyvinula. Tuto techniku nelze považovat za přímé zobrazení Langerhansových ostrůvků, ale spíše za detekci důsledku jejich metabolické aktivity⁸⁰. Naše studie vycházela z dříve popsaných modelů, kdy nanočástice oxidů železa obalené biokompatibilní polysacharidovou vrstvou byly akumulovány makrofágy příjemce v odhojované ledvině^{81,82}. Jinou alternativu popsala Anna Moore v roce 2002, a to metodu kdy obdobné nanočástice vstupovaly do nefagocytujících lymfoidních buněk pomocí transfekčních faktorů. Takto označené autoreaktivní lymfoidní buňky pak infiltrovaly Langerhansovy ostrůvky NOD myši a byly jasně detekovatelné v pankreatu pomocí MRI⁸³. Tyto metody nejsou pro zobrazení Langerhansových ostrůvků transplantovaných do jater vhodné, protože jsme hledali způsob zobrazení samotných ostrůvků, který by navíc umožnil detekovat jejich poškození rejekcí. Využili jsme proto enormního vlivu nanočástic oxidů železa (SPIO – superparamagnetic iron oxide) na magnetické pole. Jednotlivé nanočástice obsahují krystaly železnatých a železitých oxidů, které při dostatečné velikosti mohou vytvářet v klidu náhodně orientované domény. Jejich

výsledný magnetický moment je nulový, ale po vložení do dostatečně silného vnějšího magnetického pole se magnetické momenty jednotlivých domén zorientují ve směru vnějšího pole a celá nanočástice se začne chovat jako magnet schopný výrazně ovlivnit MR obraz s takovou účinností, že umožňuje detekovat jedinou buňku^{84,85}. Pro studium možností zobrazit ostrůvky a vývoj nové metody jsme vybrali model laboratorního potkana a použili MR scanner firmy Bruker Biotech, s polem 4.7 Tesla, kterým bylo vybaveno pracoviště MR spektroskopie IKEM.

In vitro značení Langerhansových ostrůvků potkana

Samotné ostrůvky po transplantaci do jater se nepodařilo zobrazit žádnou z použitých sekvencí a cívek. Příčinou byla podobnost tkáně ostrůvků a jater. Otestovali jsme dva druhy kontrastních látek využívajících superparamagnetické nanočástice oxidů železa. **První** z nich tvoří polystyrenové jádro se SPIO o průměru 2.8–5.0 μm , na jehož povrchu jsou kovalentně navázané sekundární protilátky specificky se vážící prostřednictvím primární protilátky na cílovou buňku (**Obr. 27**). V naší studii byly zvoleny **mikročástečky Dynabeads** firmy Dynal MPC (Oslo, Norsko). Viabilitu testovanou pomocí testu integrity membrány (Acridine Orange+ Propidium Iodide) značení ostrůvků touto kontrastní látkou neovlivnilo.

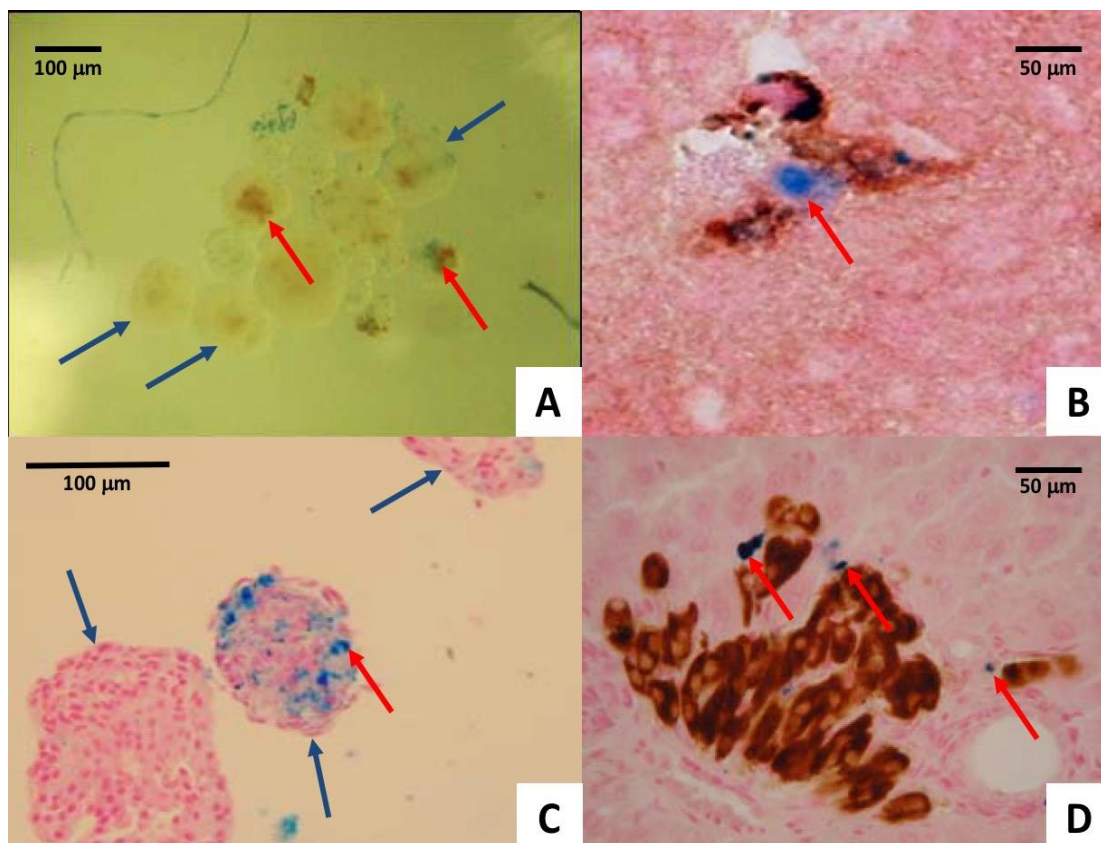
Obrázek 27: Izolované Langerhansovy ostrůvky s navázanými mikročásticemi Dynabeads[®]. Na obrázku A jsou ostrůvky v tkáňové kultuře, drobné okrouhlé útvary označené červenou šipkou jsou Dynabeads, modrá šipka označuje okraj ostrůvku. Na obrázku B je histologický řez ostrůvku značenými Dynabeads – imunohistochemicky, protilátka proti MHC-1 potkana. Barevné šipky označují stejné struktury jako v obrázku A.



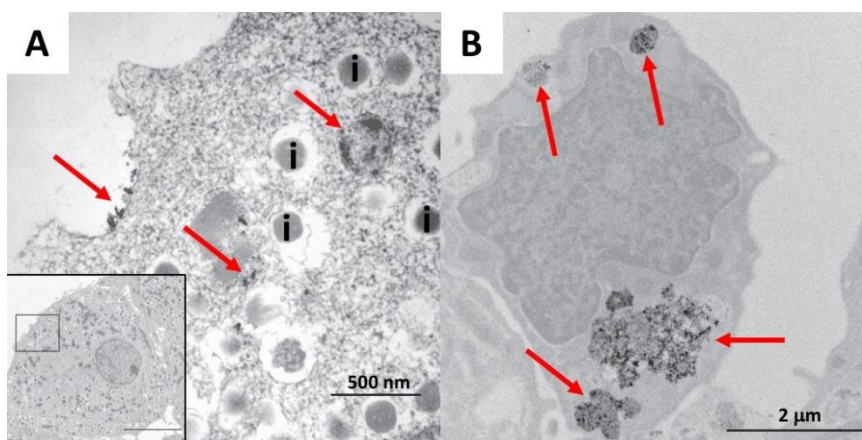
Druhým, principiálně odlišným typem kontrastní látky byly nanočástice v České republice klinicky schválené kontrastní látky ferucarbotranu (průměr 4,2 nm; Resovist[®]; Schering), které mají superparamagnetické jádro potažené carbodextranem,

příčemž celkový hydrodynamický průměr částic je 62 nm. Typicky jsou vychytávány monocytomakrofákovým systémem jater (80 %), kostní dřeň, sleziny (10 %) a lymfatických uzlin. V MR T2 váženém obraze se projeví jako lokální snížení intenzity signálu. Krystalické jádro oxidů železa je potažené netoxickým polysacharidem karbodextranem, díky čemuž jsou nanočástice rozpustné ve vodě a nemají tendenci agregovat⁸⁶. Stran toxicity železa je třeba zohlednit, že do buněk ostrůvků se inkorporuje jen část Resovistu[®] a většina se odplaví při proplachu. I kdybychom podali celou dávku, tak v jednom mililitru ferucarbotranu je obsaženo 0,5 μmol (28 mg) železa, tzn. že dávka, která se dostává do organismu při klinickém vyšetření (<60 kg 0,9 ml, ≥ 60 kg 1,4 ml) je ve srovnání s celkovými zásobami železa zanedbatelná (1%; odpovídá 2-3 dennímu příjmu potravy). Výhodou umožňující potenciálně rozpoznat destrukci označených buněk je biodegradace ferucarbotranu hydrolytickými enzymy makrofágů aktivovaných v našem případě zánětem po transplantaci nebo později v rámci rejekce. Vede ke ztrátě specifické struktury nanočástic a jejich vlivu na MR zobrazení značené tkáně. Během několika dnů (diagnostické okno je 1-4 dny) se obraz normalizuje a za 2 týdny je možné cca 20% podaného železa prokázat v hemoglobinu periferní krve⁸⁶. Langerhansovy ostrůvky jsou tvořeny řádově tisíci buněk uspořádaných do trámců, kromě endokrinních jsou zastoupeny také buňky stromální, endotelie a leukocyty. U potkana bývá v jednom ostrůvku průměrně 5-20⁸⁷, u myši 5-10⁸⁸ a u člověka 0-15⁸⁹ monocytů. Dalo se předpokládat, že tyto buňky budou inkorporovat nanočástice s polysacharidovým povrchem i bez transfekčních činidel (**Obr. 28**). Při ultrastrukturním vyšetření transmisí elektronovou mikroskopií (TEM) nebylo zachyceno jakékoli strukturní poškození endokrinních a depozita Resovistu[®] byla nalezena v různých typech buněk (**Obr. 29**).

Obrázek 28: Izolované ostrůvky po značení Resovistem® v tkáňové kultuře 48 hodin. Panel A – nativní pohled v invertovaném mikroskopu do kultivační lahve. Modré šípky označují okraj ostrůvků, červené šípky depozita Resovistu®. Panel B – detailní obrázek kombinovaného barvení imunohistochemie – hnědá je protilátka proti ED-1 molekule charakteristické pro makrofágy, modře je detekováno železo pomocí barvení Pearlovou reakcí. Panel C – histologické vyšetření ostrůvků, barvení Hematoxillinem Eosinem v kombinaci s Pearlovou reakcí. Panel D – detailní snímek ostrůvku barveného kombinovaně protilátkou proti inzulinu (hnědá) a Pearlovou reakcí. Kolokalizace obou barev prokazuje přítomnost železa i v beta buňkách.

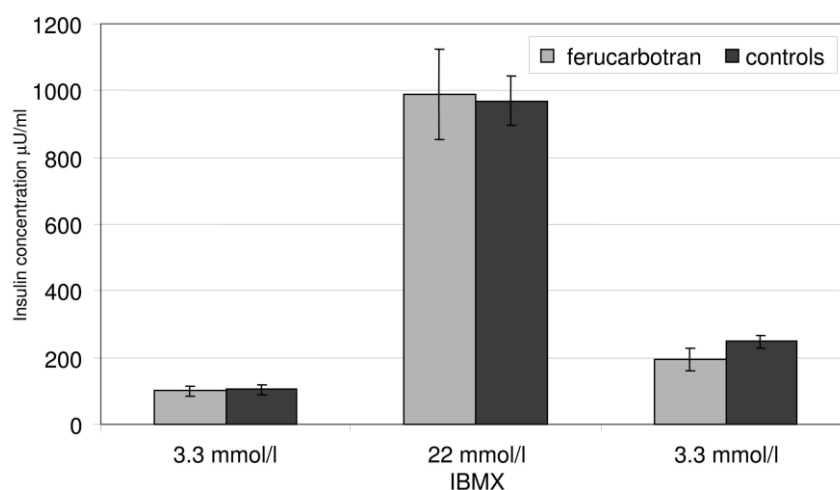


Obrázek 29: Vyšetření značených Langerhansových ostrůvků TEM prokazuje depozita Resovistu® v různých buňkách Langerhansových ostrůvků. i – granula inzulinu, ↑ depozita Resovistu®. Panel A – Beta buňka, Panel B – makrofág.



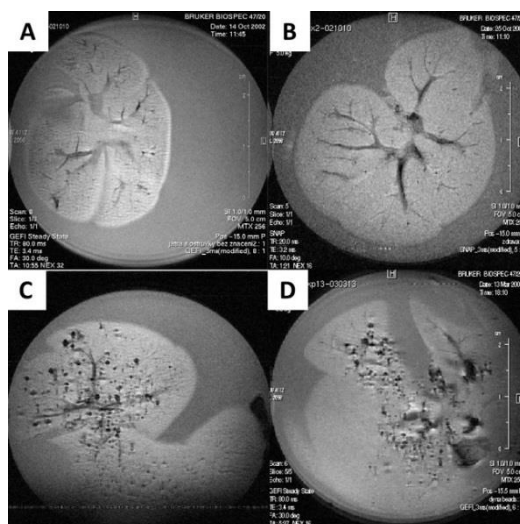
Funkční poškození beta buněk ostrůvků Resovistem[®] bylo vyloučeno testováním sekrece inzulínu in vitro, která je srovnatelná u nativních i značených ostrůvků (**Obr. 30**).

Obrázek 30: Statické inkubace izolovaných Langerhansových ostrůvků v médiu s proměnlivou koncentrací glukózy³⁰. V každé koncentraci byly ostrůvky inkubovány jednu hodinu. Sekrece inzulínu stoupá po zátěži glukózou srovnatelně v obou skupinách.



MR obraz nativních jater potkana a jater 10 minut po transplantaci 2000 izolovaných Langerhansových ostrůvků byl prakticky shodný. Po injekci roztoku samotné kontrastní látky došlo k difusnímu poklesu signálu v celém rozsahu jater. Po transplantaci ostrůvků značených Resovistem[®] i pomocí Dynabeads[®] byly jasně detekovatelné mnohočetné hypointensní signály v játrech příjemce⁷⁶ (**Obr. 31**).

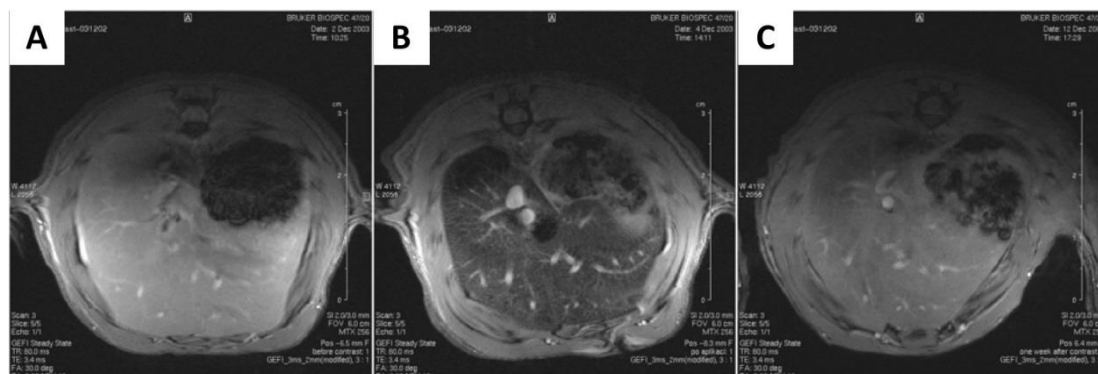
Obrázek 31: In vitro MRI vyšetření jater zdravého potkana (A), jater 10 minut po transplantaci 2000 neznačených izolovaných Langerhansových ostrůvků (B), jater 10 minut po transplantaci 2000 izolovaných Langerhansových ostrůvků značených Resovistem[®] (C), jater 10 minut po transplantaci 2000 izolovaných Langerhansových ostrůvků značených Dynabeads[®] (D).



In vivo experimentální zobrazení

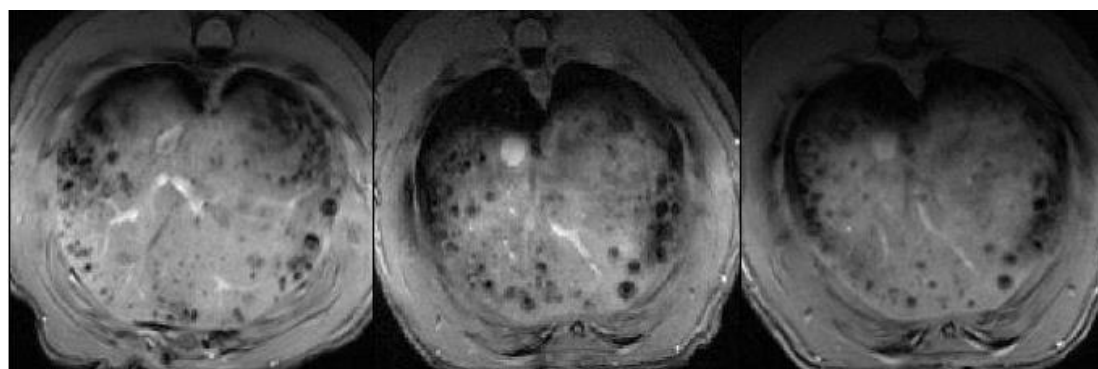
Po ověření možnosti zobrazit značené ostrůvky in-vitro bylo možné přikročit k experimentům s transplantací značených ostrůvků diabetickým zvířatům a využít zobrazení k monitoraci lokalizace a změny intenzity a počtu signálů souvisejících s ostrůvkem v čase. Zjistili jsme, že intravenózní podání samotného Resovistu[®] způsobuje difúzní a rovnoměrný pokles intenzity signálu tkáně jater, který po týdnu spolehlivě vymizí⁷⁶ (**Obr. 32**).

Obrázek 32: MRI vyšetření jater potkana (A) – nativní játra zdravého zvířete, (B) – játra 10 minut po intraportální injekci Resovistu[®] v koncentraci 5 ml/ml, (C) – játra jeden týden po injekci Resovistu[®]

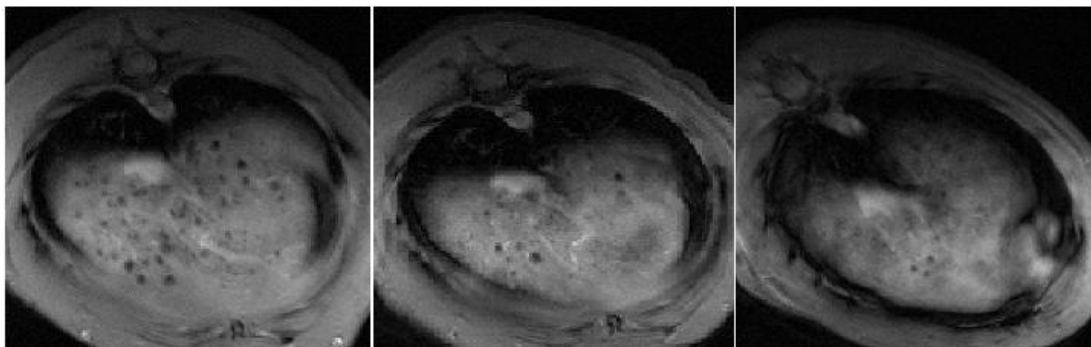


Funkci Resovistem[®] značených Langerhansových ostrůvků jsme ověřili transplantací 2000 syngenních (n=6) a allogenních (n=8, dárci kmene Wistar) ostrůvků diabetickým potkanům kmene Lewis³⁰. K normalizaci glykémie došlo u všech příjemců během 3 dnů. Syngenní štěp fungoval po celou dobu studie (6 týdnů), allogenní ostrůvky selhaly po dvou týdnech plné funkce. V játrech příjemců byly jasně detekovatelné hypointensní spoty odpovídající jednotlivým ostrůvkům nebo jejich skupinám. Ve skupině léčené syngenními ostrůvkem byl jejich počet stabilní, ve skupině léčené allogenními ostrůvkem počet spotů významně klesal až do konce experimentu (**Obr. 33 až 35**).

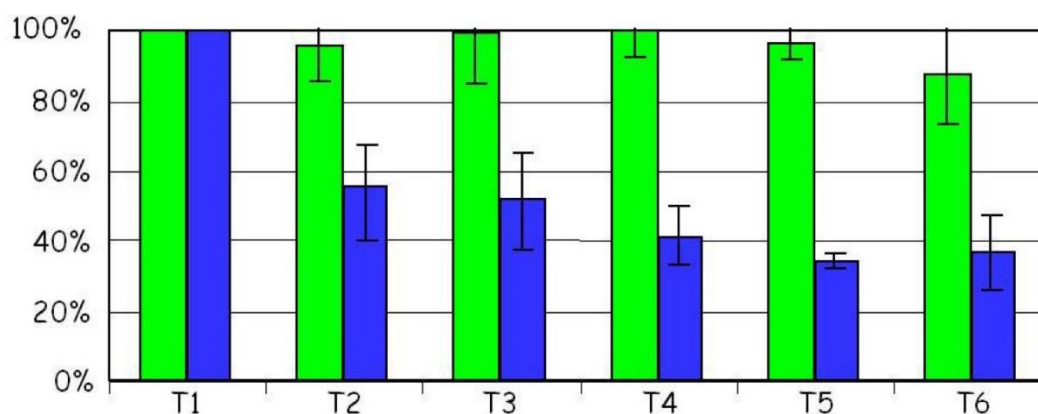
Obrázek 33: MR obraz jater potkana po transplantaci 2000 syngenních Langerhansových ostrůvků značených Resovistem[®]. V játrech jsou jasně patrné tmavé (= hypointensní) spoty, které přetrvávají v odpovídajících si vrstvách 1, 4 a 6 týdnů po transplantaci, kdy byl experiment plánovaně ukončen.



Obrázek 34: MR obraz jater potkana po transplantaci 2000 allogenních Langerhansových ostrůvků značených Resovistem[®]. V játrech jsou jasně patrné tmavé (= hypointensní) spoty, které ubývají v odpovídajících si vrstvách 1, 4 a 6 týdnů po transplantaci, kdy byl experiment plánovaně ukončen.



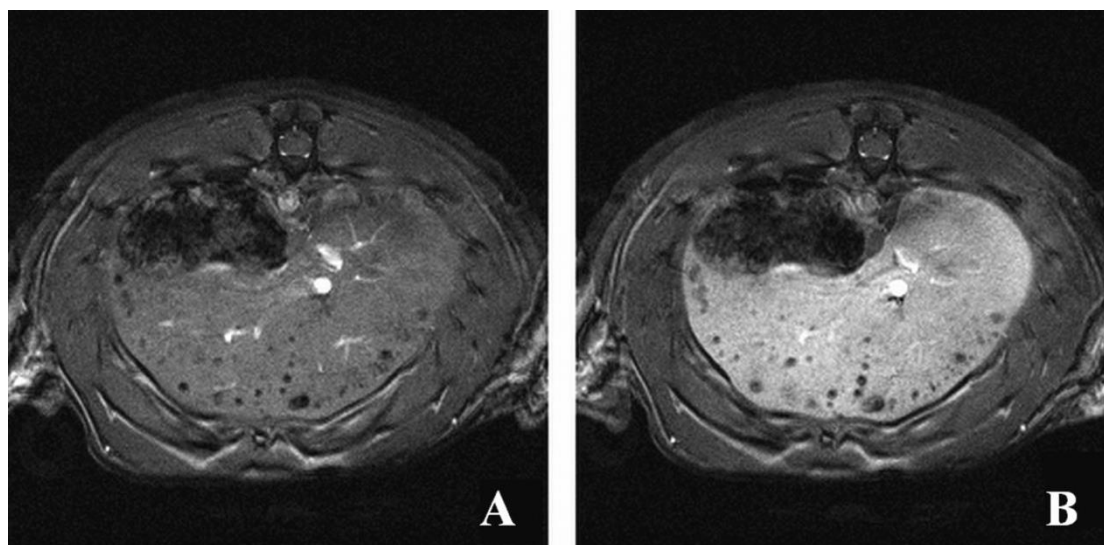
Obrázek 35: Relativní počet spotů detekovaných v celém rozsahu jater potkanů po transplantaci 2000 syngenních (zelené) a allogenních (modré) ostrůvků³⁰. Ve skupině allogenních došlo po dvou týdnech k selhání funkce a počet spotů postupně klesal.



Při použití kontrastních mikročástic Dynabeads byly ostrůvky zobrazeny stejně dobře, ale počet hypointensních spotů byl stabilní i po selhání funkce allogenního štěpu. Mikročástice nejsou metabolizovatelné a nemizí proto po destrukci ostrůvků při odhojení. Toto značení bylo opuštěno a další experimenty prováděny s Resovistem[®].

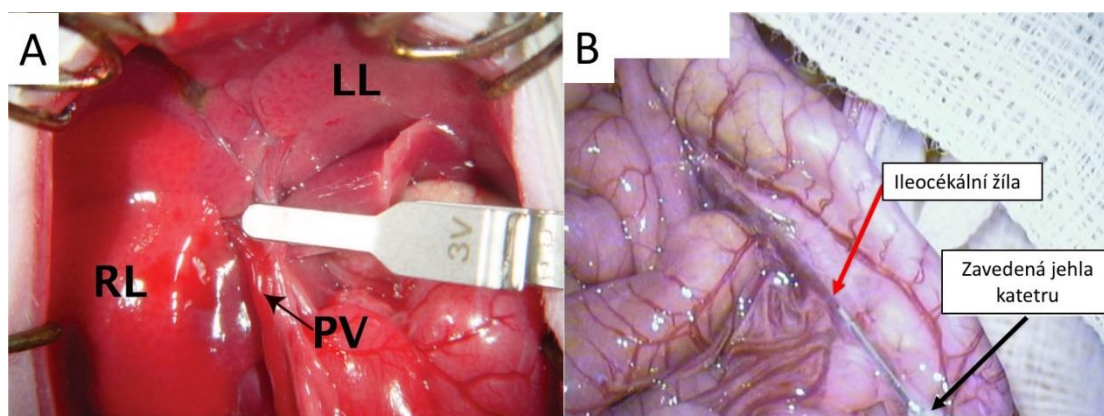
Hypointensní plochy při okrajích jater mohou splývat se signálem orgánů obsahujících vzduch (GIT). Pro zvýšení jednoznačnosti nálezu jsme podali v době vyšetření MRI intravenózně T₁ kontrastní látku na bázi gadolinia (20 µl, MultiHance[®]). Došlo k zřetelnějšímu ohraničení tkáně jater a vyloučení artefaktů z nálezu v cílové oblasti⁷² (**Obr. 36**).

Obrázek 36: Ve tkáni jater potkana jsou patrné mnohočetné hypointensní spoty, které v okrajových partiích mohou splývat s artefakty (A). Po intravenózní aplikaci druhého kontrastu s opačným efektem dojde ke zvýraznění jaterní tkáně a vyloučení artefaktů (B).

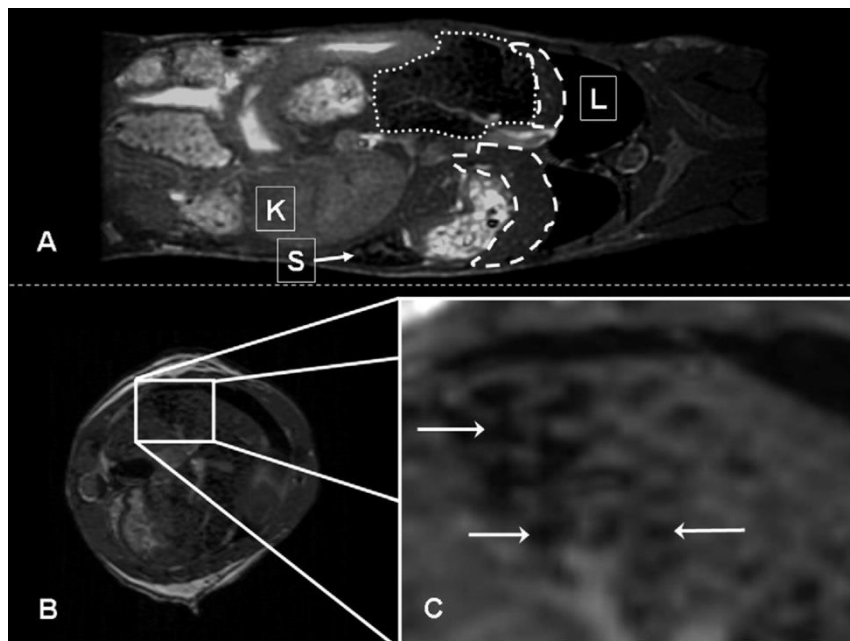


Když byla optimalizována technika odlišení artefaktů od signálů SPIO značených Langerhansových ostrůvků, bylo možné přistoupit k vývoji automatické segmentace a následně i kvantifikace ostrůvků v játrech příjemce. Abychom mohli použít část jater k analýze a část jako intra-individuální kontrolu, transplantovali jsme ostrůvky do pravých laloků jater myši⁹⁰. Principem bylo krátkodobé (do 5 minut) naložení cévní svorky na levé větve portální žíly v jaterní brance a injekce ostrůvků do periferní, tj. ileocékální větve (Obr. 37 – adaptováno z publikace⁹⁰). V první fázi jsme pro segmentaci využili grafický program ImageJ, který umožnil považovat vlastní kontrolní tkáň jater za pozadí a všechny pixely tmavší než pozadí detekovat jako SPIO značené ostrůvky (Obr. 38) či jejich fragmenty⁷⁵.

Obrázek 37: Technika transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků do limitované části jater (A) – prvním krokem je naložení cévní svorky na větev portální žíly pro pravé laloky⁹⁰. Druhým krokem (B) je injekce suspenze ostrůvků do periferní větve portální žíly, v našem případě ileocékální žíly.



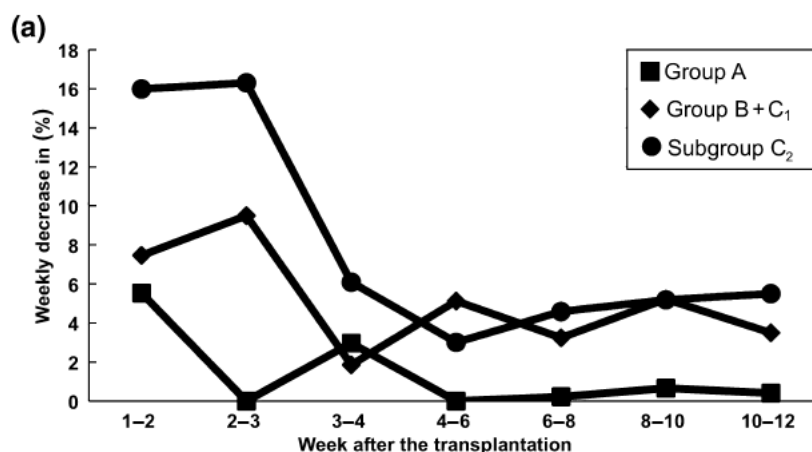
Obrázek 38: MRI břicha myši po transplantaci 200 izolovaných Langerhansových ostrůvků do pravých laloků jater výše popsanou technikou⁷⁵. (A) celotělový scan frontální řez, L – plíce, čárkované ohraničení – nativní játra, tečkované ohraničení – játra s ostrůvků značenými SPIO, K – ledvina, S – slezina. (B) příčný řez břišní dutinou v úrovni jater s detailem (C) – bílé šipky ukazují na hypointensní spoty odpovídající štěpu.



Touto technikou kvantifikované hypointensní spoty umožnily sledovat velikost štěpu dva týdny po transplantaci. Pokles rozsahu signálu odpovídajícího štěpu mezi prvním dnem a prvním týdnem po transplantaci byl obdobný u syngenních a allogenních ostrůvků. V průběhu druhého týdne po transplantaci se projevil vliv rejekce a detekovaný pokles byl významně rychlejší ve skupině léčené allogenními ostrůvků (syngenní 100% => 61.8% => 47.2%; allogenní 100% => 59.4% => 38.2%). Poměrně velkou pracnost a subjektivitu zpracování MRI obrázků může odstranit automatické zpracování, v našem případě rozdělené do dvou kroků. Nejprve zvýraznění cílových pixelů pomocí top-hat a bottom-hat funkcí, které umí identifikovat originální obrázek jako pozadí a nové body jako odpovídající sledované struktury a tu pak zvýraznit. Na tento krok navazuje vyhodnocení histogramu celého řezu, ve kterém se automaticky stanovuje prahová hodnota odlišující značené ostrůvky od ostatní tkáně jater⁵¹. Touto metodou byly monitorovány diabetické myši léčené transplantací 200 syngenních, allogenních a xenogenních (potkan) ostrůvků do portální žíly. Příjemci byli vyšetřeni 1, 3, 5, 7, 10 a 14 dní po transplantaci s nálezem poklesu srovnatelným s předchozím článkem (syngenní 100% => 81% => 63% => 50% => 47% => 42%; allogenní 100% => 85% => 72% => 62% => 46% => 36%; xenogenní 100% => 77% => 67% => 54%

=> 47% => 35%). Citlivost metody a možnost jejího využití pro predikci rejekce allogenních ostrůvků příjemci léčenými imunosupresivními léky jsme otestovali v rozsáhlejší studii v trvání 12 týdnů. Byla porovnána dynamika ubývání hypointensních spotů odpovídajících syngenním ostrůvkům, allogenním ostrůvkům při plné imunosupresivní léčbě (tacrolimus + kortikoidy) a allogenním s krátkou (2 týdny) léčbou redukovanou imunosupresí (tacrolimus). Výsledkem bylo selhání funkce části štěpů, které bylo možné pomocí MRI identifikovat 8 týdnů v předstihu⁵², tzn. v době umožňující účinnost antirejექční intervenci. Rozdílem byl rychlý pokles počtu spotů v prvních čtyřech týdnech po transplantaci (**Obr. 39**).

Obrázek 39: Pokles počtu spotů odpovídajících ostrůvkům v jednotlivých týdnech po transplantaci. Ve skupině A (syngenní ostrůvky) se po dvou týdnech pokles prakticky zastavil a zůstal stabilní po celou dobu studie. Spoty odpovídající allogenním ostrůvkům, které zůstaly funkční po celou dobu studie (skupina B a podskupina C₁), ubývaly až do 12. týdne, ale signifikantně pomaleji než u ostrůvků, které selhaly (C₂). V podskupině C₂ se počet spotů snižoval až do třetího týdne po transplantaci o 16% týdně, poté se rychlost poklesu snížila, ale zůstala patrná až do 12. týdne.

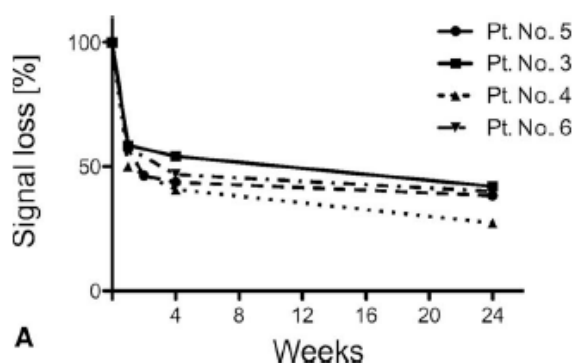


Zobrazení ostrůvků pomocí MRI v klinické praxi

Přirozeným pokračováním experimentálního vývoje zobrazování Langerhansových ostrůvků byla aplikace metody v klinické studii. Po ověření bezpečnosti a vyloučení negativního vlivu Resovistu[®] na viabilitu a funkci Langerhansových ostrůvků byla aplikována u 8 pacientů. Do stabilizačního média byla na dobu mezi izolací ostrůvků a samotnou transplantací přidána kontrastní látka Resovist[®] schválená Státním ústavem pro kontrolu léčiv ke klinickému použití. Příjemci ostrůvků byli vyšetřeni před transplantací, 1 den, 1 týden, 4 týdny a 24 týdnů po transplantaci pomocí 3T Trio TIM MR přístroje (Siemens Healthcare, Německo)

s využitím integrovaných cívek v kombinaci s cívkou uloženou na jaterní krajinu břicha. Pro kvantifikaci hypointensních spotů byl stejně jako v experimentu použit program ImageJ (freeware NIH, Bethesda, USA). Potvrdilo se, že během prvních desítek hodin po transplantaci dojde ke ztrátě cca 50% štěpu a následně byl počet spotů odpovídající ostrůvkům téměř stabilní (**Obr. 40**) stejně jako jejich funkce³¹.

Obrázek 40: Počet hypointensních spotů v játrech odpovídajících transplantovaným Langerhansovým ostrůvkům se snižoval po celou dobu studie. Výrazný pokles byl detekován v průběhu prvního týdne, později byl počet spotů stabilnější (převzato z článku³¹).



Pravidelnému a systematickému použití jako prediktoru rejekci u našich pacientů zabránilo ukončení výroby SPIO kontrastních látek schválených ke klinickému použití. Alternativní kontrastní látky se vyvíjejí, ale dosud není komerčně dostupná odpovídající náhrada. Proto jsme se zapojili do hledání nových přístupů při zobrazování Langerhansových ostrůvků s využitím kontrastních látek na bázi atomů fluoru⁷³ a magnetoliposomů²⁹.

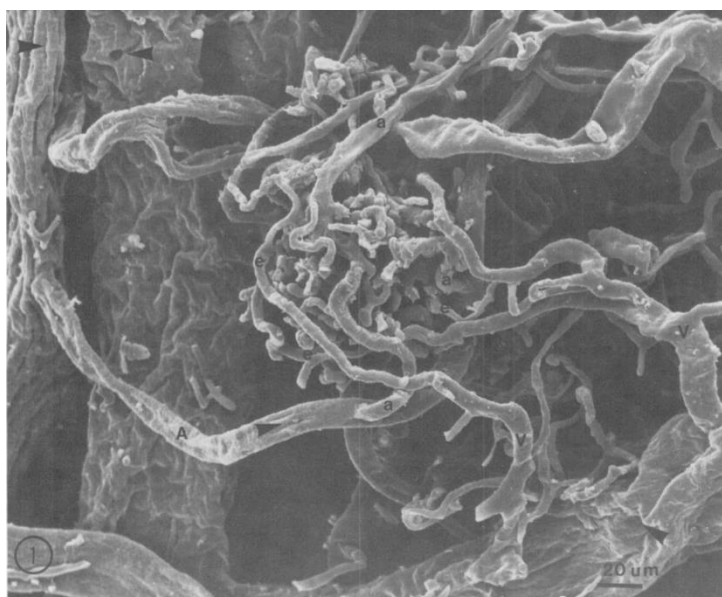
Vývoj alternativního místa pro transplantaci Langerhansových ostrůvků

Langerhansovy ostrůvky jsou jednou z nejvíce prokrvených tkání v organismu, představují cca 1% objemu pankreatu, ale protéká jimi cca 20% veškeré krve⁹¹ (**Obr. 41**). Přirozeně do ostrůvků přitéká v nadbytku arteriální krev s parciálním tlakem kyslíku 80-100 mmHg⁹², díky které dosahuje parciálního tlak kyslíku uvnitř ostrůvků cca 40 mmHg⁹³. Specifické uspořádání kapilární sítě umožňuje fungování beta buněk jako senzorů glykémie a producentů inzulínu stejně tak, jako rychlé odplavování inzulínu chrání okolní tkáň od přílišného efektu inzulínu jako růstového faktoru. Při izolaci ostrůvků pomocí digesce kolagenázou dochází k přerušení kapilární sítě a

ostrůvky jsou odkázané na difuzi kyslíku i nutrientů. Následuje stabilizace ve tkáňové kultuře, kdy dochází k uspokojivému prokysličení pouze v povrchových vrstvách cca 30 μm ostrůvků, přičemž buňky v hlubších vrstvách podléhají nekróze⁹⁴. Současně díky fetálnímu hovězímu séru (standardní složka kultivačních médií) obsaženém v kultivačním médiu dochází k zvýšení exprese molekul tkáňového tromboplastinu a MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) na povrchu buněk ostrůvků²⁸. Takto ovlivněné ostrůvky po vložení do krve portální žíly vyvolávají IBMIR (nespecifickou zánětlivou a koagulační reakci), jejímž důsledkem je ztráta více než poloviny buněk štěpu během několika hodin po transplantaci^{31,51,95}. Po přihojení dosahuje parciální tlak kyslíku ve štěpu dlouhodobě pouhých 5 mmHg⁷.

Zřejmá potřeba efektivnějšího způsobu transplantace a dlouhodobě vhodnějšího prostředí bohatšího na kyslík dostupný pro ostrůvky vedla většinu laboratoří k úsilí o vývoj alternativního způsobu transplantace^{41,42,45,47,96}. Některé skupiny včetně naší se zaměřily na vývoj dutiny s bohatě prokrveným vnitřním povrchem, která by minimalizovala difusní vzdálenost a současně ochránila štěp od přímého kontaktu s krví příjemce^{47,71,97}. Zpočátku byl za hlavní negativní faktor považován nespecifický zánět, a proto se velká pozornost věnovala dokončení procesu hojení rány vzniklé při implantaci skeletu do tkáně. Typicky se používaly skelety z nerezové oceli nebo biokompatibilních polymerů ve tvaru perforovaného válce s teflonovou vložkou, která zajistila vytvarování přiměřeně velké dutiny uvnitř skeletu. Tyto přípravky se nechávaly vhojit do tkáně 4 a více týdnů^{47,71}. V naší laboratoři jsme porovnávali dvě místa implantace upřednostňující minimální invazivitu (podkoží) nebo přirozenou drenáž inzulínu do jater (velké omentum) se standardně používanou transplantací do portální žíly jater. V první experimentální studii jsme použili inbrední model potkanů Lewis, kterým byl navozen streptozotocinový diabetes a chirurgicky implantovány skelety s teflonovou vložkou (**Obr. 42**). Po měsíci hojení byla vložka vyjmuta a transplantováno stejně jako u kontrol 10 syngenních LO/g (standardně používaná velikost štěpu). Ve skupině s transplantací LO do jater byla normalizována glykemie u všech příjemců, ve skupině s umělou dutinou ve velkém omentu v 70% a v podkoží v 40%⁷¹. Podle teoretických předpokladů mělo být prostředí umělých dutin pro ostrůvky výhodnější (bez zánětu, arteriální prokrvení), ale prakticky byly výsledky výrazně horší než při transplantaci do jater.

Obrázek 41: Erozní preparát pankreatu zobrazený skenovacím elektronovým mikroskopem ⁸ dokládá výrazně vyšší hustotu kapilární sítě v Langerhansově ostrůvku při porovnání s exokrinní tkání pankreatu.

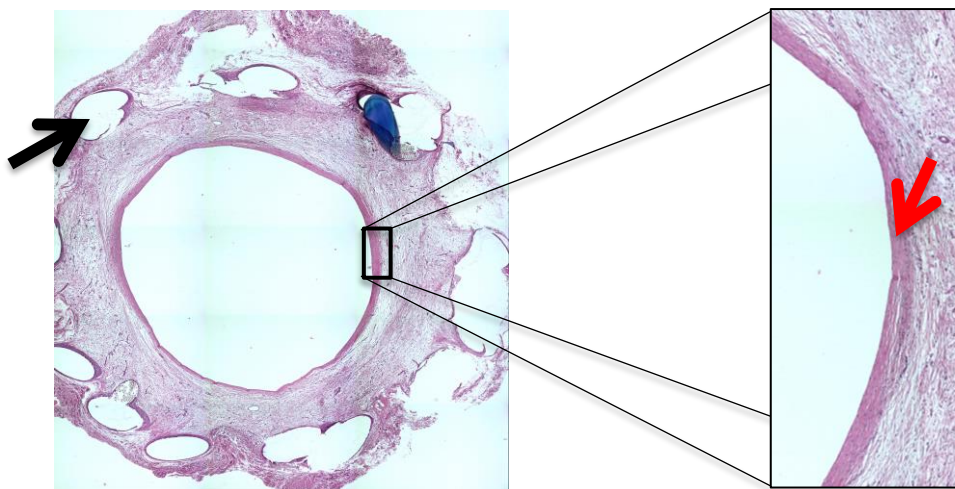


Obrázek 42: Makroporézní skelet ve tvaru válce upletený z biokompatibilního polymerního monofilamenta, do kterého je zasunuta teflonová vložka tvarující konečnou dutinu.



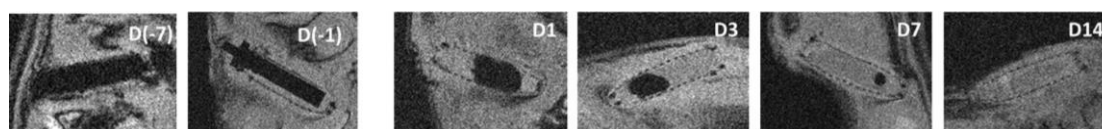
Pravděpodobným limitujícím faktorem bylo nedostatečné prokrvení plochy, na kterou ostrůvky přilnuly po transplantaci a dlouhá doba nutná pro revaskularizaci ostrůvků ze strany příjemce. Histologické řezy vzorků odebraných po měsíci hojení dokladovaly na vnitřním povrchu dutiny prakticky avaskulární fibrózní tkáň (**Obr. 43**). Cévní struktury byly detekovány více než 200 μm pod povrchem.

Obrázek 43: Histologický řez skeletem s teflonovou vložkou. Stav po 4 týdnech hojení. Vnitřní povrch dutiny je tvořen prakticky avaskulární fibrózní tkání. Černá šipka ukazuje na otvor po skeletu, červená šipka na fibrózní vrstvu na vnitřním povrchu dutiny.



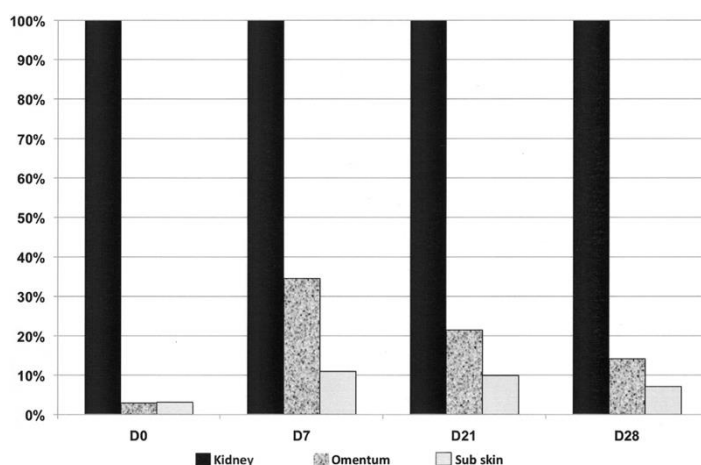
Pro posouzení dynamiky hojení a změn prokrvení byla adaptována technika DCE MRI (dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging), kterou bylo možné zachytit změny rychlosti pronikání kontrastní látky do tkáně v různých fázích hojení. Pomocí anatomického MR zobrazování bylo možné sledovat rychlost prorůstání tkáně do skeletu a tvarování dutiny kolem teflonové vložky (**Obr. 44**)⁷⁰.

Obrázek 44: MRI anatomické zobrazení dokládá postupné uzavírání dutiny uvnitř skeletu během 3 týdnů po implantaci. D-7 a -1 jsou dny před vyjmutím vložky.



Po měsíci hojení byla modelace dutiny spolehlivě dokončena, což dokládá i specifický zvuk „odšpuntování“ při vyjímání teflonové vložky. Prokrvení a kvalita kapilár odpovídající průniku kontrastní látky byla hodnocena relativně, v porovnání s kůrou ledvin⁶⁹. Výsledkem bylo zjištění, že zatímco v podkoží je prokrvení velmi nízké po celou dobu experimentu, ve velkém omentu je po prvním týdnu přibližně třetinové v porovnání s kůrou ledviny a po měsíci se snižuje prakticky na úroveň avaskulární fibrózní jizvy⁶⁹ (**Obr. 45**).

Obrázek 45: Relativní prokrvení tkáně v okolí skeletů implantovaných do podkoží a do velkého omenta. Přepočítáno na standard – tkáň kůry ledvin.

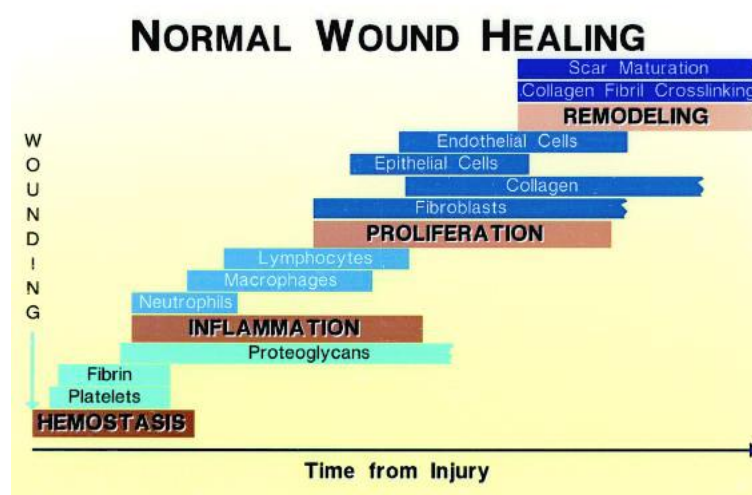


Bylo třeba podpořit vaskularizaci ve směru vnitřního povrchu dutiny, kam přilnou ostrůvky po transplantaci. Otestovali jsme dva principiálně přístupy, a to optimalizaci načasování implantace dříve použitého makroporézního skeletu s podporou mezenchymových stromálních buněk (MSCs) nebo řízené prorůstání tkáně mikroporézním skeletem nesoucím vaskulární růstové faktory.

Optimalizace načasování a podpora MSCs

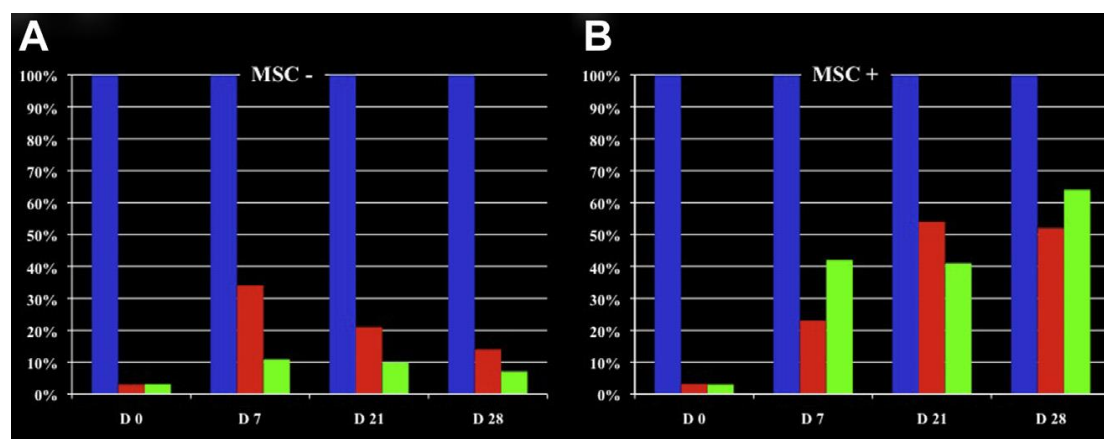
Jednodušší, ale i méně definovanou možností postupu bylo nalezení optimální fáze hojení rány a lokální podpora angiogeneze pomocí produkce růstových faktorů mezenchymovými stromálními buňkami. Hojení zdravé tkáně má typicky 4 hlavní fáze⁹⁸, a to Hemostázu, Zánět, Proliferaci a Remodelaci (**Obr. 46**).

Obrázek 46: Schéma ilustrující jednotlivé fáze hojení rány – přeneseno z přehledného článku⁹⁸



Dynamika hojení rány u potkana a důraz na vyloučení lokálního zánětu vedly k transplantaci ostrůvků ve 4 fázi, kdy byla přirozeně vymodelována fibrózní avaskulární dutina. Naším cílem byla identifikace Proliferační fáze hojení, kdy povrch dutiny tvoří na cévy bohatá granulační tkáň. Paralelně s tím jsme do místa implantace skeletů injikovali 15 milionů syngenních MSCs, které v hypoxickém prostředí produkují vaskulární růstové faktory. Pomocí DCE-MRI byl jasně prokázán stimulační efekt MSCs na prokrvení tkáně vrůstající do skeletu (**Obr. 47**). Maximální prokrvení na relativních 2/3 úrovně kůry ledviny bylo dosaženo po 4 týdnech. Bez podpory MSCs to bylo po týdnu⁶⁵.

Obrázek 47: Relativní prokrvení tkáně vrostlé do skeletů bez a s podporou mezenchymových kmenových buněk měřené pomocí průniku kontrastní látky metodou DCE-MRI. Modrá = ledvina, červená = velké omentum, zelená = podkoží.



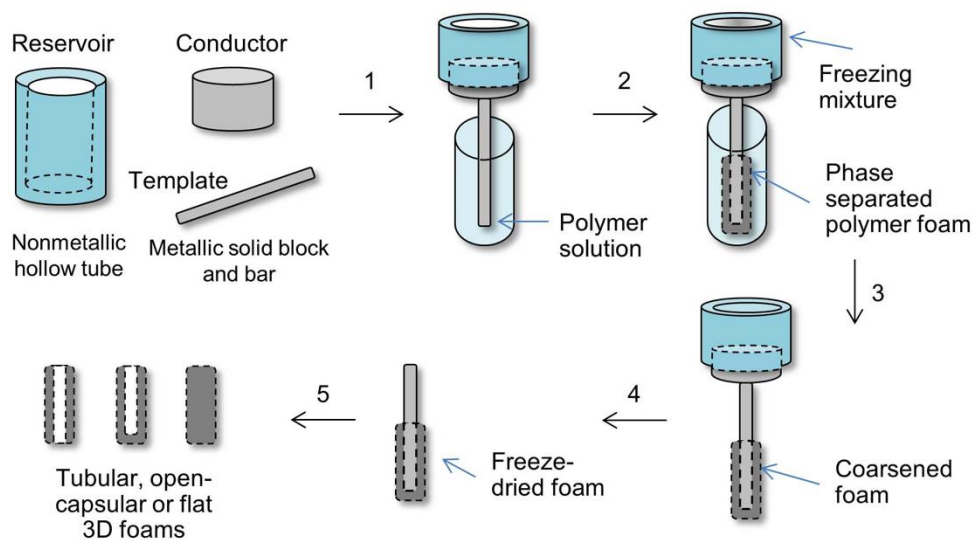
Podání MSCs do skeletu 1 týden po implantaci do podkoží (vyjmutí teflonové vložky a současná transplantace buněk) urychlilo hojení a zvýšilo prokrvení dutiny (penetraci kontrastní látky) s maximem 9 dní po vyjmutí teflonové tyčky. Maximální optický signál odpovídající počtu viabilních a perfundovaných buněk byl naměřen 4 dny po vyjmutí teflonové tyčky a transplantaci Luciferáza pozitivních MSCs⁶⁶. Na základě těchto dat byla připravena navazující studie, ve které byly diabetickým potkanům implantovány skelety s teflonovou vložkou, která byla po 7 dnech vyjmuta. Do vzniklé dutiny poloviny příjemců byly transplantovány syngenní (Luc negativní) MSCs a za další 4 nebo 7 dní do ještě přetrvávajících dutin transplantovány syngenní Langerhansovy ostrůvky s expresí genu pro Luciferázu (hraniční štěp 4 LO/g váhy). Vznikly tak 4 skupiny příjemců, které ukázaly, že optimální načasování transplantace

ostrůvků má klíčový vliv na přihojení štěpu. MSCs výsledek nezlepšily⁶⁷. Dlouhodobá funkce a vliv MSCs na přežívání allogenních štěpů jsou otázkou aktuálně probíhajících experimentů.

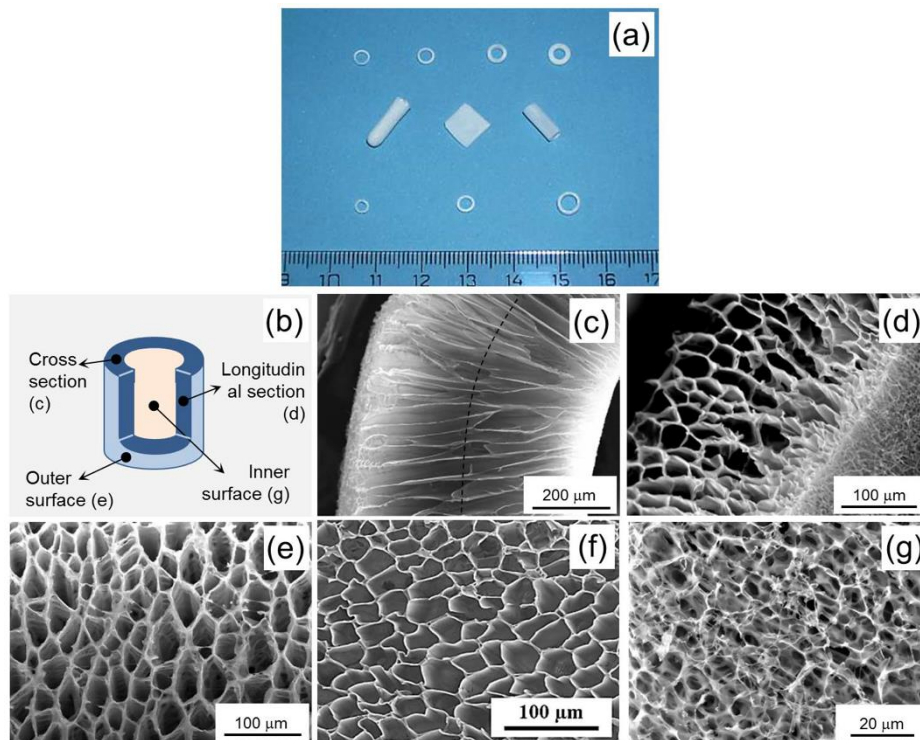
Řízené prorůstání mikroporézním skeletem

Více definovaným a technologicky významně náročnějším přístupem je vytvoření mikroporézního skeletu ve tvaru válce se stěnou silnou 500-600 μm a centripetálně orientovanými paralelně uspořádanými kanálky, které vznikají díky řízené krystalizaci tekutého polymeru na teplotním rozhraní. Optimalizací techniky Dip-TIPS (**Obr. 48**) bylo dosaženo velikosti kanálek odpovídající 8-15 μm na vnitřním a 50-60 μm na vnějším povrchu skeletu (**Obr. 49**). Jako základní materiál pro výrobu skeletu byl zvolen poly-L-lactide-co- ϵ -caprolacton, který je biokompatibilní a umožňuje vrůstání fibrózní tkáně a endotelu. Výhodou tohoto materiálu a uspořádání je možnost kontrolovaně navázat vaskulární růstové faktory. Ukázalo se, že vrůstání tkáně do samotného skeletu bez další podpory není rychlejší ani bohatší na endotelie (**Obr. 50**). V podkoží nestačily ani 4 týdny ke kompletnímu proniknutí fibrózní tkáně celou tloušťkou stěny skeletu. Proto byl jako kotva použit heparan sulfát, na který byly navázané molekuly VEGF a FGF. Současně byly další skelety implantovány do velkého omenta potkanů, kde k proniknutí vaziva celou tloušťkou stěny stačily 2-3 týdny. Tyto experimenty v době finalizace habilitační práce ještě probíhají a část dat byla jako rukopis odeslána k publikaci.

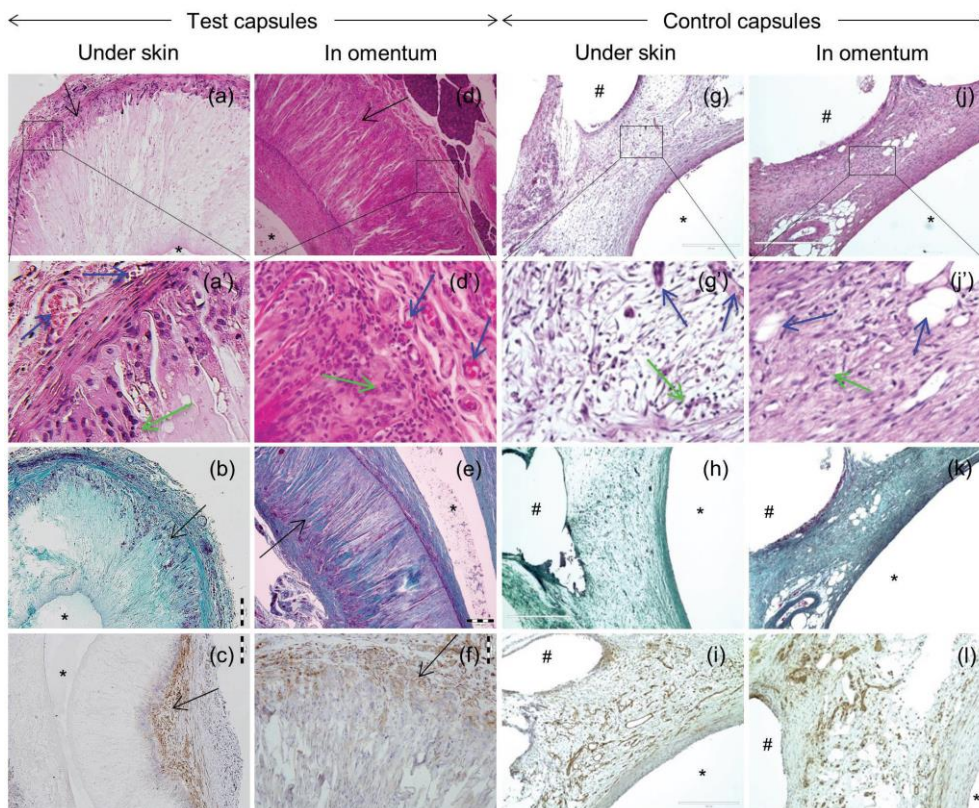
Obrázek 48: Schéma metody Dip – TIPS umožňující vytvoření polymerního skeletu s centripetálně orientovanými kanálky⁹⁹.



Obrázek 49: Struktura mikroporézního skeletu zachycená pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Na schématu jsou vyznačené řezy. Obrázek (f) zachycuje strukturu skeletu v příčném řezu uprostřed stěny – přerušovaná linie na obr. (c).



Obrázek 50: Histologický obrázek mikroporézních (Test capsules) a jednodušších makroporézních (Control capsules) skeletů v základním provedení, bez obohacení růstovými faktory. Po 4 týdnech od implantace do podkoží nebo velkého omenta.



Závěr

Zobrazování Langerhansových ostrůvků pomocí magnetické rezonance bylo v naší laboratoři prezentováno jako prioritní výsledek v experimentu a později i jako jedna z prvních publikací v klinické praxi. Samotné i v kombinaci s bioluminiscencí prokázalo, že transplantace Langerhansových ostrůvků do portálního řečiště jater je doprovázena významnou ztrátou štěpu a že i dlouhodobě dochází v tomto místě k jeho pomalé redukci. Vývoj metody přispěl k podrobnějšímu poznání o distribuci štěpu i o průběhu časných změn po transplantaci. Senzitivita metody v kombinaci s využitím kontrastních látek umožnila predikci selhání štěpu z důvodu rejekce a pravděpodobně by mohla být použita jako indikační kritérium pro zahájení antirejekční terapie. Tomu brání ukončení výroby kontrastních látek na bázi nanočástic oxidů železa, které byly schválené pro klinické použití.

Vývoj alternativního místa pro transplantaci ostrůvků do podkoží či velkého omenta pokročil do fáze, kdy je jasné, že je možné dosáhnout korekce glykemií transplantací méně než polovičního štěpu v porovnání s rutinní praxí. Aktuálně probíhají preklinické testy s využitím modelu vepře, kdy testujeme dynamiku hojení rány a hledáme optimální načasování implantace skeletu a následné transplantace ostrůvků. Předpokládáme, že tyto testy nám umožní úspěšně požádat o schválení klinické studie.

Literatura:

1. Saudek, F., *et al.* [Islet transplantation for treatment of type-1 diabetes mellitus]. *Cas Lek Cesk* **150**, 49-55 (2011).
2. Saudek, F., *et al.* [Pancreas transplantation: State of the art and future prospects]. *Vnitr Lek* **61**, 731-737 (2015).
3. Girman, P. & Saudek, F. The IKEM pancreas and islet transplant program as part of healthcare for type 1 diabetes patients: retrospective analysis of outcome from 1983 to 2010. *Rev Diabet Stud* **8**, 35-43 (2011).
4. Shindo, Y. & Kanak, M.A. Total pancreatectomy with islet autotransplantation: recent updates and outcomes. *Curr Opin Organ Transplant* **22**, 444-451 (2017).
5. Voglova, B., *et al.* 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**, 10-21 (2017).
6. Saudek, F. & Adamec, M. *Transplantace slinivky břišní*, (Karolinum, 2006).
7. Carlsson, P.O., Palm, F., Andersson, A. & Liss, P. Markedly decreased oxygen tension in transplanted rat pancreatic islets irrespective of the implantation site. *Diabetes* **50**, 489-495 (2001).
8. Bonner-Weir, S. & Orci, L. New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat. *Diabetes* **31**, 883-889 (1982).
9. Piemonti, L., *et al.* Defining outcomes for beta cell replacement therapy: a work in progress. *Diabetologia* **61**, 1273-1276 (2018).
10. Ichii, H., *et al.* Rescue purification maximizes the use of human islet preparations for transplantation. *Am J Transplant* **5**, 21-30 (2005).
11. Girman, P., Berkova, Z., Dobolilova, E. & Saudek, F. How to use image analysis for islet counting. *Rev Diabet Stud* **5**, 38-46 (2008).
12. Girman, P., Kriz, J., Friedmanský, J. & Saudek, F. Digital imaging as a possible approach in evaluation of islet yield. *Cell Transplant* **12**, 129-133 (2003).
13. Ricordi, C. *Pancreatic Islet Cell Transplantation 1892 - 1992: One Century of Transplantation for Diabetes*, (R. G. Landes Company, Austin, Texas, USA, 1992).
14. Johansson, H., *et al.* Tissue factor produced by the endocrine cells of the islets of Langerhans is associated with a negative outcome of clinical islet transplantation. *Diabetes* **54**, 1755-1762 (2005).
15. Moberg, L., *et al.* Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation. *Lancet* **360**, 2039-2045 (2002).
16. Bartlett, S.T., *et al.* Report from IPITA-TTS Opinion Leaders Meeting on the Future of beta-Cell Replacement. *Transplantation* **100 Suppl 2**, S1-44 (2016).
17. Hering, B.J., *et al.* Phase 3 Trial of Transplantation of Human Islets in Type 1 Diabetes Complicated by Severe Hypoglycemia. *Diabetes Care* **39**, 1230-1240 (2016).
18. Andres, A., *et al.* Impact of adverse pancreatic injury at surgical procurement upon islet isolation outcome. *Transpl Int* **27**, 1135-1142 (2014).
19. Matsumoto, S., *et al.* Effect of the two-layer (University of Wisconsin solution-perfluorochemical plus O₂) method of pancreas preservation on human islet isolation, as assessed by the Edmonton Isolation Protocol. *Transplantation* **74**, 1414-1419 (2002).

20. Oniscu, G.C., *et al.* In situ normothermic regional perfusion for controlled donation after circulatory death--the United Kingdom experience. *Am J Transplant* **14**, 2846-2854 (2014).
21. Suszynski, T.M., *et al.* Persufflation (or gaseous oxygen perfusion) as a method of organ preservation. *Cryobiology* **64**, 125-143 (2012).
22. Hughes, S.J., *et al.* Characterisation of collagen VI within the islet-exocrine interface of the human pancreas: implications for clinical islet isolation? *Transplantation* **81**, 423-426 (2006).
23. Brunicardi, F.C., *et al.* Laser destruction of human nonislet pancreatic tissue. *Transplant Proc* **26**, 3354-3355 (1994).
24. Brunicardi, F.C., *et al.* Selective photodynamic laser treatment of dispersed pancreatic tissue for islet isolation. *Transplant Proc* **24**, 2796-2797 (1992).
25. Taylor, M.J. & Baicu, S.C. Nonenzymatic cryogenic isolation of therapeutic cells: novel approach for enzyme-free isolation of pancreatic islets using in situ cryopreservation of islets and concurrent selective freeze destruction of acinar tissue. *Cell Transplant* **23**, 1365-1379 (2014).
26. Lazard, D., Vardi, P. & Bloch, K. Induction of beta-cell resistance to hypoxia and technologies for oxygen delivery to transplanted pancreatic islets. *Diabetes Metab Res Rev* **28**, 475-484 (2012).
27. Luan, N.M. & Iwata, H. Inhibition of instant blood-mediated inflammatory responses by co-immobilization of sCR1 and heparin on islets. *Biomaterials* **34**, 5019-5024 (2013).
28. Marzorati, S., *et al.* Culture medium modulates proinflammatory conditions of human pancreatic islets before transplantation. *Am J Transplant* **6**, 2791-2795 (2006).
29. Garcia Ribeiro, R.S., *et al.* Magnetoliposomes as Contrast Agents for Longitudinal in vivo Assessment of Transplanted Pancreatic Islets in a Diabetic Rat Model. *Sci Rep* **8**, 11487 (2018).
30. Kriz, J., *et al.* Magnetic resonance imaging of pancreatic islets in tolerance and rejection. *Transplantation* **80**, 1596-1603 (2005).
31. Saudek, F., *et al.* Magnetic resonance imaging of pancreatic islets transplanted into the liver in humans. *Transplantation* **90**, 1602-1606 (2010).
32. Jalili, R.B., *et al.* Local expression of indoleamine 2,3 dioxygenase in syngeneic fibroblasts significantly prolongs survival of an engineered three-dimensional islet allograft. *Diabetes* **59**, 2219-2227 (2010).
33. Marek, N., *et al.* Coating human pancreatic islets with CD4(+)CD25(high)CD127(-) regulatory T cells as a novel approach for the local immunoprotection. *Ann Surg* **254**, 512-518; discussion 518-519 (2011).
34. Nadithe, V., Mishra, D. & Bae, Y.H. Poly(ethylene glycol) cross-linked hemoglobin with antioxidant enzymes protects pancreatic islets from hypoxic and free radical stress and extends islet functionality. *Biotechnol Bioeng* **109**, 2392-2401 (2012).
35. Hlavaty, K.A., *et al.* Enhancing human islet transplantation by localized release of trophic factors from PLG scaffolds. *Am J Transplant* **14**, 1523-1532 (2014).
36. Rutzky, L.P., *et al.* Microgravity culture condition reduces immunogenicity and improves function of pancreatic islets1. *Transplantation* **74**, 13-21 (2002).
37. Saito, T., *et al.* Reversal of diabetes by the creation of neo-islet tissues into a subcutaneous site using islet cell sheets. *Transplantation* **92**, 1231-1236 (2011).
38. Habart, D., *et al.* Automated Analysis of Microscopic Images of Isolated Pancreatic Islets. *Cell Transplant* **25**, 2145-2156 (2016).

39. Papas, K.K., Suszynski, T.M. & Colton, C.K. Islet assessment for transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **14**, 674-682 (2009).
40. Campbell, P.M., *et al.* High risk of sensitization after failed islet transplantation. *Am J Transplant* **7**, 2311-2317 (2007).
41. Brady, A.C., *et al.* Proangiogenic hydrogels within macroporous scaffolds enhance islet engraftment in an extrahepatic site. *Tissue Eng Part A* **19**, 2544-2552 (2013).
42. Giraldo, J.A., Weaver, J.D. & Stabler, C.L. Enhancing clinical islet transplantation through tissue engineering strategies. *J Diabetes Sci Technol* **4**, 1238-1247 (2010).
43. Jiang, K., *et al.* Local release of dexamethasone from macroporous scaffolds accelerates islet transplant engraftment by promotion of anti-inflammatory M2 macrophages. *Biomaterials* **114**, 71-81 (2017).
44. Pattou, F., Kerr-Conte, J. & Wild, D. GLP-1-receptor scanning for imaging of human beta cells transplanted in muscle. *N Engl J Med* **363**, 1289-1290 (2010).
45. Pedraza, E., *et al.* Macroporous three-dimensional PDMS scaffolds for extrahepatic islet transplantation. *Cell Transplant* **22**, 1123-1135 (2013).
46. Pepper, A.R., *et al.* A prevascularized subcutaneous device-less site for islet and cellular transplantation. *Nat Biotechnol* **33**, 518-523 (2015).
47. Pileggi, A., *et al.* Reversal of diabetes by pancreatic islet transplantation into a subcutaneous, neovascularized device. *Transplantation* **81**, 1318-1324 (2006).
48. Rajab, A. Islet transplantation: alternative sites. *Curr Diab Rep* **10**, 332-337 (2010).
49. Weaver, J.D., *et al.* Design of a vascularized synthetic poly(ethylene glycol) macroencapsulation device for islet transplantation. *Biomaterials* **172**, 54-65 (2018).
50. Chen, X., *et al.* The epididymal fat pad as a transplant site for minimal islet mass. *Transplantation* **84**, 122-125 (2007).
51. Jirak, D., *et al.* Monitoring the survival of islet transplants by MRI using a novel technique for their automated detection and quantification. *MAGMA* **22**, 257-265 (2009).
52. Kriz, J., *et al.* Detection of pancreatic islet allograft impairment in advance of functional failure using magnetic resonance imaging. *Transpl Int* **25**, 250-260 (2012).
53. Chen, X., Zhang, X., Larson, C., Xia, G. & Kaufman, D.B. Prolonging islet allograft survival using in vivo bioluminescence imaging to guide timing of antilymphocyte serum treatment of rejection. *Transplantation* **85**, 1246-1252 (2008).
54. Arzouni, A.A., *et al.* Mesenchymal stromal cells improve human islet function through released products and extracellular matrix. *Clin Sci (Lond)* **131**, 2835-2845 (2017).
55. Luca, G., *et al.* Effects of simulated microgravity on the morphology and function of neonatal porcine cell clusters cultured with and without Sertoli cells. *Cell Transplant* **15**, 55-65 (2006).
56. Navaei-Nigjeh, M., *et al.* Reduction of marginal mass required for successful islet transplantation in a diabetic rat model using adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **20**, 1124-1142 (2018).
57. Rackham, C.L., *et al.* Co-transplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. *Diabetologia* **54**, 1127-1135 (2011).

58. Rackham, C.L. & Jones, P.M. Potential of mesenchymal stromal cells for improving islet transplantation outcomes. *Curr Opin Pharmacol* **43**, 34-39 (2018).
59. Takemoto, N., Liu, X., Takii, K., Teramura, Y. & Iwata, H. Transplantation of co-aggregates of Sertoli cells and islet cells into liver without immunosuppression. *Transplantation* **97**, 287-293 (2014).
60. Berkova, Z., *et al.* Combining Donor Characteristics with Immunohistological Data Improves the Prediction of Islet Isolation Success. *J Diabetes Res* **2016**, 4214328 (2016).
61. Kosinova, L., *et al.* Unstable Expression of Commonly Used Reference Genes in Rat Pancreatic Islets Early after Isolation Affects Results of Gene Expression Studies. *PLoS One* **11**, e0152664 (2016).
62. Berkova, Z., *et al.* Vitality of pancreatic islets labeled for magnetic resonance imaging with iron particles. *Transplant Proc* **37**, 3496-3498 (2005).
63. Zacharovova, K., *et al.* In vitro assessment of pancreatic islet vitality by oxymetry. *Transplant Proc* **37**, 3454-3456 (2005).
64. Kriz, J., *et al.* Formation of Cholangiogenic Cysts Following Intrahepatic Islet Transplantation in Streptozotocin Diabetic Rats. *Transplant Proc* **47**, 2763-2767 (2015).
65. Fabryova, E., *et al.* Effect of mesenchymal stem cells on the vascularization of the artificial site for islet transplantation in rats. *Transplant Proc* **46**, 1963-1966 (2014).
66. Galisova, A., *et al.* Multimodal Imaging Reveals Improvement of Blood Supply to an Artificial Cell Transplant Site Induced by Bioluminescent Mesenchymal Stem Cells. *Mol Imaging Biol* **19**, 15-23 (2017).
67. Galisova, A., *et al.* The Optimal Timing for Pancreatic Islet Transplantation into Subcutaneous Scaffolds Assessed by Multimodal Imaging. *Contrast Media Mol Imaging* **2017**, 5418495 (2017).
68. Kasoju, N., *et al.* In vivo vascularization of anisotropic channeled porous polylactide-based capsules for islet transplantation: the effects of scaffold architecture and implantation site. *Physiol Res* **64 Suppl 1**, S75-84 (2015).
69. Kriz, J., *et al.* Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging as a tool to monitor the blood supply to an artificial cavity used as a site for islet transplantation in rats. *Transplant Proc* **43**, 3226-3230 (2011).
70. Kriz, J., *et al.* Vascularization of artificial beds for pancreatic islet transplantation in a rat model. *Transplant Proc* **42**, 2097-2101 (2010).
71. Kriz, J., *et al.* A novel technique for the transplantation of pancreatic islets within a vascularized device into the greater omentum to achieve insulin independence. *Am J Surg* **203**, 793-797 (2012).
72. Herynek, V., *et al.* Improved detection of pancreatic islets in vivo using double contrast. *Contrast Media Mol Imaging* **6**, 308-313 (2011).
73. Herynek, V., *et al.* Pre-Microporation Improves Outcome of Pancreatic Islet Labelling for Optical and ¹⁹F MR Imaging. *Biol Proced Online* **19**, 6 (2017).
74. Koblas, T., *et al.* Magnetic resonance imaging of intrahepatically transplanted islets using paramagnetic beads. *Transplant Proc* **37**, 3493-3495 (2005).
75. Kriz, J., Jirak, D., White, D. & Foster, P. Magnetic resonance imaging of pancreatic islets transplanted into the right liver lobes of diabetic mice. *Transplant Proc* **40**, 444-448 (2008).
76. Jirak, D., *et al.* MRI of transplanted pancreatic islets. *Magn Reson Med* **52**, 1228-1233 (2004).

77. Girman, P., Kriz, J., Dovolilova, E., Cihalova, E. & Saudek, F. The effect of bone marrow transplantation on survival of allogeneic pancreatic islets with short-term tacrolimus conditioning in rats. *Ann Transplant* **6**, 43-45 (2001).
78. Girman, P., Saudek, F. & Kriz, J. Enhancement of rat islet tolerance with bone marrow transplantation using a non-myeloablative procedure part I: positive effect in semiallogeneic Lewis Brown-Norway to Brown Norway rat transplant model. *International Journal of Immunotherapy* **20**, 1-7 (2004).
79. Kriz, J., Saudek, F., Girman, P. & Novota, P. Enhancement of rat islet tolerance with bone marrow transplantation using a non-myeloablative procedure II: failure despite the presence of lymphocyte microchimerism in the fully allogeneic Lewis/Brown-Norway model. *Int J Tissue React* **26**, 75-83 (2004).
80. Markmann, J.F., *et al.* Magnetic resonance-defined periportal steatosis following intraportal islet transplantation: a functional footprint of islet graft survival? *Diabetes* **52**, 1591-1594 (2003).
81. Ye, Q., *et al.* In vivo detection of acute rat renal allograft rejection by MRI with USPIO particles. *Kidney Int* **61**, 1124-1135 (2002).
82. Zhang, Y., Dodd, S.J., Hendrich, K.S., Williams, M. & Ho, C. Magnetic resonance imaging detection of rat renal transplant rejection by monitoring macrophage infiltration. *Kidney Int* **58**, 1300-1310 (2000).
83. Moore, A., *et al.* MRI of insulinitis in autoimmune diabetes. *Magn Reson Med* **47**, 751-758 (2002).
84. Dodd, S.J., *et al.* Detection of single mammalian cells by high-resolution magnetic resonance imaging. *Biophys J* **76**, 103-109 (1999).
85. Wang, Y.X., Hussain, S.M. & Krestin, G.P. Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol* **11**, 2319-2331 (2001).
86. Reimer, P. & Balzer, T. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. *Eur Radiol* **13**, 1266-1276 (2003).
87. Stegall, M.D., *et al.* Interstitial class II-positive cell depletion by donor pretreatment with gamma irradiation. Evidence of differential immunogenicity between vascularized cardiac allografts and islets. *Transplantation* **49**, 246-251 (1990).
88. Stock, P.G., *et al.* Generation of allospecific cytolytic T-lymphocytes stimulated by pure pancreatic beta-cells in absence of Ia+ dendritic cells. *Diabetes* **38 Suppl 1**, 161-164 (1989).
89. Shienvold, F.L., Alejandro, R. & Mintz, D.H. Identification of Ia-bearing cells in rat, dog, pig, and human islets of Langerhans. *Transplantation* **41**, 364-372 (1986).
90. Yonekawa, Y., *et al.* A new mouse model for intraportal islet transplantation with limited hepatic lobe as a graft site. *Transplantation* **82**, 712-715 (2006).
91. Jansson, L. The regulation of pancreatic islet blood flow. *Diabetes Metab Rev* **10**, 407-416 (1994).
92. Carreau, A., El Hafny-Rahbi, B., Matejuk, A., Grillon, C. & Kieda, C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* **15**, 1239-1253 (2011).
93. Carlsson, P.O. & Mattsson, G. Oxygen tension and blood flow in relation to revascularization in transplanted adult and fetal rat pancreatic islets. *Cell Transplant* **11**, 813-820 (2002).

94. Komatsu, H., *et al.* Oxygen environment and islet size are the primary limiting factors of isolated pancreatic islet survival. *PLoS One* **12**, e0183780 (2017).
95. Eich, T., Eriksson, O., Lundgren, T. & Nordic Network for Clinical Islet, T. Visualization of early engraftment in clinical islet transplantation by positron-emission tomography. *N Engl J Med* **356**, 2754-2755 (2007).
96. Smink, A.M., *et al.* A Retrievable, Efficacious Polymeric Scaffold for Subcutaneous Transplantation of Rat Pancreatic Islets. *Ann Surg* **266**, 149-157 (2017).
97. Kawakami, Y., *et al.* Modified subcutaneous tissue with neovascularization is useful as the site for pancreatic islet transplantation. *Cell Transplant* **9**, 729-732 (2000).
98. Diegelmann, R.F. & Evans, M.C. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci* **9**, 283-289 (2004).
99. Kasoju, N., *et al.* Dip TIPS as a facile and versatile method for fabrication of polymer foams with controlled shape, size and pore architecture for bioengineering applications. *PLoS One* **9**, e108792 (2014).

Přílohy

Přiloženy jsou vlastní publikace s IF vztahující se k problematice habilitační práce

- č. 1 Jirak D, **Kriz J**, Herynek V, Andersson B, Girman P, Burian M, Saudek F, Hajek M. MRI of transplanted pancreatic islets. *Magnetic Resonance in Medicine* 2004 Dec;52(6):1228-33. **IF 3,468** **65**
- č. 2 Berkova Z, **Kriz J**, Girman P, Zacharovova K, Koblas T, Dovolilova E, Saudek F. The vitality of pancreatic islets labeled for magnetic resonance imaging with iron particles. *Transplantation Proceedings* 2005 Oct;37(8):3496-8. **IF 0,511** **72**
- č. 3 Koblas T, Girman P, Berkova Z, Jirak D, **Kriz J**, Dovolilova E, Zacharovova K, Hajek M, Saudek F. Magnetic resonance imaging of intrahepatally transplanted islets using paramagnetic beads. *Transplantation Proceedings* 2005 Oct;37(8):3493-5. **IF 0,511** **76**
- č. 4 **Kriz J.**, Jirak D., Girman P., Berkova Z., Honsova E., Lodererova A., , Hajek M., Saudek F. Magnetic resonance imaging of pancreatic islets in tolerance and rejection. *Transplantation* 2005 Dec 15;80(11):1596-1603. **IF 3,879** **80**
- č. 5 Berkova Z, Jirak D, Zacharovova K, **Kriz J**, Lodererova A, Girman P, Koblas T, Dovolilova E, Vancova M, Hajek M, Saudek F. Labeling of Pancreatic Islets With Iron Oxide Nanoparticles for In Vivo Detection With Magnetic Resonance. *Transplantation*. 2008 Jan 15;85(1):155-159. **IF 3.641** **89**
- č. 6 **Kriz J.**, Jirak D., White D.J., Foster P.J. Magnetic resonance imaging of pancreatic islets transplanted into the right liver lobes of diabetic mice. *Transplantation proceedings*. 2008, 40(2), 444-448. **IF 1.027** **95**
- č. 7 Jirak D., **Kriz J.**, Strzelecki M., Yang J., Hasilo C., White D.J., Foster P.J. Monitoring the survival of islet transplants by MRI using a novel technique for their automated detection and quantification. *MAGMA*. 2009 Aug;22(4):257-65. Epub 2009 Apr 24. **IF 1,494** **101**
- č. 8 Saudek F, Jirak D., Girman P., Herynek V., Dezortova M., **Kriz J.**, Peregrin J., Berkova Z., Zacharovova K., Hajek M. Magnetic Resonance Imaging of Pancreatic Islets Transplanted Into the Liver in Humans. *Transplantation* 2010; 90(12):1602–1606 - **IF 3.498** **111**
- č. 9 **Kriz J.**, Jirak D., Berkova Z., Herynek V., Lodererova A., Girman P., Habart D., Hajek M., Saudek F. Detection of pancreatic islet allograft impairment in advance of functional failure using magnetic resonance imaging. *Transplant International* 2012 Feb;25(2):250-60. Epub 2011 Dec; **IF 3,211** **117**
- č. 10 Herynek V., Berkova Z., Dovolilova E., Jirak D., **Kriz J.**, Girman P., Saudek F., Hajek M. Improved detection of pancreatic islets in vivo using double contrast. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2011 Jul-Aug;6(4):308-13; **IF 3.392** **129**
- č. 11 Herynek V, Gálisová A, Srinivas M, van Dinther EAW, Kosinová L, Ruzicka J, Jiráková M, **Kriz J**, Jiráček D. Pre-Microporation Improves Outcome of Pancreatic Islet Labelling for Optical and (19)F MR Imaging. *Biol Proced Online*. 2017 Jun 28;19:6. doi: 10.1186/s12575-017-0055-4. eCollection 2017. PubMed PMID: 28674481; PubMed Central PMCID: PMC5488379. **IF 3.581** **136**
- č. 12 Garcia Ribeiro RS, Gysemans C, da Cunha JPMCM, Manshian BB, Jirak D, **Kriz J**, Gallo J, Bañobre-López M, Struys T, De Cuyper M, Mathieu C, Soenen SJ, Gsell W, Himmelreich U. Magnetoliposomes as Contrast Agents for Longitudinal in vivo Assessment of Transplanted Pancreatic Islets in a Diabetic **149**

- Rat Model. Sci Rep. 2018 Jul 31;8(1):11487. doi: 10.1038/s41598-018-29136-9. PubMed PMID: 30065302; PubMed Central PMCID: PMC6068133. **IF 4.122**
- č. 13 **Kriz J**, Jirak D, Vilk GJ, Girman P, White DJ, Hajek M, Saudek F. Vascularization of artificial beds for pancreatic islet transplantation in a rat model. *Transplant Proc.* 2010 Jul-Aug;42(6):2097-101. **IF 0,994** **162**
- č. 14 **Kriz J.**, Jirak D., Koblas T., Vilk G., Girman P., Hajek M., Saudek F. Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging as a tool to monitor the blood supply to an artificial cavity used as a site for islet transplantation in rats. *Transplantation Proceedings* 2011; 43:3226-3230. **IF 0.993** **168**
- č. 15 **Kriz J.**, Vilk G., Mazzuca D.M., Toleikis P.M., Foster P.J., White D.J. A novel technique for the transplantation of pancreatic islets within a vascularized device into the greater omentum to achieve insulin independence. *The American Journal of Surgery* 2012 Jun;203(6):793-7. Epub 2011 Jun 17. **IF 2.363** **174**
- č. 16 Fabryova E., Jirak D., Girman P., Zacharovova K., Galisova A., Saudek F., **Kriz J.** Effect of Mesenchymal Stem Cells on the Vascularization of the Artificial Site for Islet Transplantation in Rats. *Transplantation Proceedings* 2014, 46, 1963-1966. **IF 0.984** **180**
- č. 17 Gálisová A., Fábryová E., Jiráček D., Sticová E., Lodererová A., Herynek V., **Kříž J.**, Hájek M. Multimodal Imaging Reveals Improvement of Blood Supply to an Artificial Cell Transplant Site Induced by Bioluminescent Mesenchymal Stem Cells. *Mol Imaging Biol.* 2016 Jul 27. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27464498. **IF 3.608** **185**
- č. 18 Gálisová A, Fábryová E, Sticová E, Kosinová L, Jiráček M, Herynek V, Berková Z, **Kříž J**, Hájek M, Jiráček D. The Optimal Timing for Pancreatic Islet Transplantation into Subcutaneous Scaffolds Assessed by Multimodal Imaging. *Contrast Media Mol Imaging.* 2017 Dec 26;2017:5418495. doi: 10.1155/2017/5418495. eCollection 2017. PubMed PMID: 29440984; PubMed Central PMCID: PMC5758856. **IF 2.934** **195**
- č. 19 Kasoju N, Kubies D, Kumorek MM, **Kříž J**, Fábryová E, Machová L, Kovářová J, Rypáček F. Dip TIPS as a Facile and Versatile Method for Fabrication of Polymer Foams with Controlled Shape, Size and Pore Architecture for Bioengineering Applications. *PLoS One.* 2014 Oct 2;9(9):e108792. **IF 3.534** **207**
- č. 20 Kasoju N., Kubies D, Fábryová E., **Kříž J.**, Kumorek M.M., Sticová E., Rypáček F. In Vivo Vascularization of Anisotropic Channeled Porous Polylactide-based Capsules 1 for Islet Transplantation: Effects of Scaffold Architecture and Implantation Site. *Physiological Research.* 2015 Oct 8;64 Suppl 1:S75-84. **IF 1.487** **224**