



Univerzita Karlova v Praze – 2.lékařská fakulta

Posudek oponenta disertační práce

Jméno a příjmení studenta: **Mgr. Lucie Kosinová**

Název disertační práce: „**Ovlivnění kvality, funkce a výsledků transplantace pankreatických ostrůvků pomocí RNA interference**“

Studijní obor: **Doktorský studijní program Biochemie a patobiochemie na 1. LF UK**

Školitel: Doc. MUDr. Jan Kříž, Ph.D., IKEM

Titul, jméno a příjmení oponenta práce: Prof. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D. Interní klinika
UK 2.LF a FN v Motole

Aktuálnost řešeného tématu:

Diabetes mellitus (DM) představuje v současnosti jeden z největších zdravotních problémů lidstva. Je to dáno jednak jeho častým výskytem, ale především důsledky pro jednotlivce i společnost. Ty jsou způsobeny vznikem akutních i chronických komplikací diabetu, které se ve výsledku projeví zvýšenou morbiditou a dřívější mortalitou postižených jedinců. Tyto skutečnosti jsou samozřejmě sekundárně spojeny se zvýšenými socioekonomickými náklady.

V České republice trpí nějakou formou diabetu cca milion osob. Nejčastější formou je DM 2.typu, kdy se v jeho patogenezi uplatňuje nejprve zvýšená inzulinová rezistence. Ta je ale posléze provázena poklesem produkce inzulinu, která byla zprvu kompenzatorně zvýšena. Stav může vyústit až v totální inzulinoponii. Druhou nejčastější formou DM je DM 1.typu, kdy jsou v důsledku autoimunitního zánětu zničeny beta buňky Langerhansových ostrůvků (LO) slinivky produkující inzulin. Choroba je v běžné praxi léčitelná pouze injekční aplikací inzulinu. V poslední době se sice prosazuje technické řešení, kdy je například možné dosáhnout výrazně lepší kompenzace diabetu pomocí inzulinové pumpy s funkcí tzv. hybridní uzavřené smyčky (čím se zmírní i riziko vzniku chronických komplikací). Což je jistě významný pokrok. Nicméně pacient musí mít neustále na sobě přístroj (byť malých rozměrů), který je spojen s podkožně zavedenou kanylou pro dodávku inzulinu a na jiném místě musí mít aplikovaný glukózový senzor. Navíc ani ten nejlepší řídicí algoritmus nedokáže dosáhnout takové regulace glukóзовé homeostázy, která je přítomna za fyziologického stavu.



Ideální řešení pro všechny pacienty bez vlastní sekrece inzulínu (ať už vznikne jakkoliv) by tedy bylo spíše řešení biologické a v současnosti je jeho jediným v praxi reálně používaným představitelem transplantace inzulín produkující tkáně. Ta se provádí, ať už ve formě transplantace (Tx) celého pankreatu nebo jako transplantace izolovaných LO, které obsahují beta buňky. Oba postupy mají své jasné indikace a je třeba si také uvědomit, že není zaručena následná nezávislost na injekčním podávání inzulínu. Masivní rozšíření tohoto způsobu léčby diabetu pak brání mimo jiné nedostatek dárců. Pacient, který některou z těchto procedur podstoupí, musí doživotně užívat imunosupresivní terapii, a i tak stále hrozí poškození či úplné zničení štěpu. Při transplantaci LO, která je pro pacienta výrazně šetrnější, bývá až 60 % tkáně transplantované do jater již záhy zničeno, a to díky rychlé aktivaci koagulační kaskády příjemce v rámci nespecifické zánětlivé reakce (označované zkratkou IBMIR z angl. instant blood-mediated inflammatory reaction), kdy jejím hlavním aktivátorem je tkáňový faktor exprimovaný na povrchu LO. Tento faktor není ale jen škodlivý, v pozdější fázi je naopak potřebný pro revaskularizaci transplantované tkáně, protože pozitivně ovlivňuje angiogenezi.

Jakákoliv metoda zaměřená na zlepšení současného stavu transplantací inzulín produkující tkáně by tedy byla velmi přínosná. Zvolené téma tedy proto hodnotím jako vysoce aktuální.

Vyjádření k použitým metodám a postupům:

Inhibice genu pro tkáňový faktor v izolovaných LO pomocí RNA interference nabízí možnost elegantního řešení výše popsaného problému (vznik IBMIR), který výrazně zhoršuje dosavadní výsledky Tx LO. Dočasné potlačení exprese tkáňového faktoru na povrchu LO, který IBMIR iniciuje, pomocí vnesení siRNA (small/short interfering RNA) proti němu by bylo ideální z hlediska ochrany transplantovaných LO krátce po transplantaci a zároveň by později nebránilo nutné neovaskularizaci.

Jednalo se z hlediska metodologie o poměrně náročný několikastupňový proces zahrnující stanovení genové exprese v izolovaných LO a volbu referenčních genů pro posouzení účinnosti genové exprese (za využití metody RT-qPCR). Studentka se také zabývala optimalizací vlastní transfekční metody pro přenos siRNA do buněk LO, kdy porovnávala efekt mikroporace a lipofekce. Finálně byla hodnocena účinnost transfekce na úrovni mRNA (pomocí RT-qPCR) a na úrovni proteinu (technikou Western Blot a ELISA), byla ale ověřena i funkce transfekovaných ostrůvků *in vitro* i *in vivo*, kdy byl srovnáván efekt transplantace nativních LO vs transfekovaných



LO. Rovněž byl inovativně hodnocen klinický efekt na redukcí IBMIR prostřednictvím kvantifikace rozsahu ischemie jater s využitím MRI, kdy se toto hodnocení provádí na živém zvířeti, pro které toto vyšetření není nijak ohrožující. **Jednalo se tedy o širokou škálu postupů od optimalizace laboratorních metod a postupů (RT-qPCR, ELISA, Western Blot, mikroporace, lipofekce) až po hodnocení finálního klinického výstupu.**

Vyjádření k výsledkům

Studentka prokázala, že navržený postup s využitím lipofekce (ne mikroporace) efektivně redukuje IBMIR a zároveň nepoškozuje transplantované LO z hlediska jejich schopnosti normalizovat dříve přítomnou diabetickou poruchu u experimentálních potkanů. Vidím zde značný klinický potenciál. Své výsledky rovněž studentka zúročila publikačně, kdy je první autorkou 2 článků publikovaných v časopisech s IF a ve 3 dalších je spoluautorkou. Tyto články se přitom přímo vztahují k hodnocené práci. Její publikační aktivita je ovšem rozsáhlejší, což dokazují další články v impaktovaných časopisech, ty ale již nejsou v přímém vztahu k předkládané práci (1x první autorka, 11x spoluautorka).

Nemám připomínky k formálnímu zpracování práce.

Disertační práce rozhodně prokazuje předpoklady autora k samostatné tvořivé vědecké práci a k udělení titulu „Ph.D.“ za jménem.

Otázky

- Jaké jsou nejnovější zkušenosti s touto technikou (RNA-interference) u člověka?
- siRNA je nestabilní, což je pro danou situaci výhodou, jaké jsou ale obecně možnosti stabilnější a dlouhodobější blokace genové exprese?
- Jaké další postupy zaměřené na epigenetické mechanismy jsou reálné z hlediska budoucího klinického využití?

V Praze dne 24.5.2022

Univerzita Karlova
2. lékařská fakulta
Interní klinika
V Úvalu [redacted] a 5
IČO: 0021 [redacted] 16208

Prof. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D. Interní klinika