

Liečba cukrovky transplantáciou pankreatických ostrovčiek a buniek produkujúcich inzulín chránených pred imunitným systémom enkapsuláciou

Treatment of diabetes by transplantation of pancreatic islets and insulin-producing cells protected from the immune system by encapsulation

Igor Lacík

Ústav polymérov SAV, v.v.i., Bratislava

Súhrn

V súčasnosti je zrejmé, že bunková terapia prostredníctvom transplantácie buniek produkujúcich inzulín, t.j. primárnych pankreatických ostrovčiek alebo preprogramovaných kmeňových buniek, predstavuje možnosť liečby diabetes mellitus 1. typu (DM1T) u pacientov, u ktorých nie je možné dosiahnuť požadovanú kontrolu hladiny cukru administráciou inzulínu. Jedným z kľúčových obmedzení sú komplikácie spojené s dlhodobým užívaním imunosupresív. Toto obmedzenie je možné eliminovať enkapsuláciou buniek v polopriepustnej polymérnej membráne, ktorá zabezpečuje selektívny prestup glukózy, inzulínu, živín a metabolitov a bráni efektívnemu prestupu imunitného systému. Vo svete posledných 40 rokov prebieha intenzívny výskum s cieľom poskytnúť klinické riešenie kontroly glykémie bunkovou terapiou bez nutnosti podávania imunosupresív. Cieľom tohto príspevku je poskytnúť prehľad o súčasnom stave liečby DM1T bunkovou terapiou so zameraním na enkapsulačné technológie. Touto témou sa zaoberajú stovky pracovníkov vo svete pracujúcich na rôznych aspektoch týkajúcich sa tejto terapie. Autor tohto príspevku pracuje v oblasti vývoja polymérnych mikrokapsúl pre imunitnú ochranu transplantovaných pankreatických ostrovčiek. Snahou tohto príspevku nie je saturovať čitateľa odkazmi na existujúcu rozsiahlu literatúru, ale poskytnúť sumárnu informáciu s odkazmi hlavne na najnovšie články, z ktorých si čitateľ bude schopný identifikovať potrebnú informáciu v oblasti svojho záujmu.

Kľúčové slová: β -bunky získané preprogramovaním kmeňových buniek – bunková terapia – diabetes mellitus 1. typu (DM1T) – enkapsulácia pre imunitnú ochranu transplantovaných buniek – imunosupresia – pankreatické ostrovčiky – transplantácia

Summary

It is now clear that cell therapy via transplantation of insulin-producing cells, i.e. primary pancreatic islets or re-programmed stem cells, is an option for the treatment of type 1 diabetes mellitus (T1DM) in patients in whom the desired control of sugar levels cannot be achieved by insulin administration. The complications associated with long-term use of immunosuppressive drugs represent the key limitation of cell therapy. This limitation can be eliminated by encapsulating the cells in a semipermeable polymeric membrane that provides selective permeation of glucose, insulin, nutrients, and metabolites and prevents efficient permeation of the immune system. An intensive research has been ongoing in the world for the last 40 years to provide a clinical solution to glycemic control by cell therapy without the need for immunosuppressive drugs. The aim of this paper is to provide an overview of the current status of T1DM cell therapy with a focus on encapsulation technologies. This topic is being addressed by hundreds of centers around the world working on various aspects related to this therapy. The author of this paper is working in the field of polymeric microcapsules development for immune protection of transplanted pancreatic islets. This paper does not attempt to saturate the reader with references

to the existing extensive literature, but to provide a summary with references mainly to recent articles from which the reader will be able to identify the necessary information in his/her area of interest.

Keywords: β -cells derived from stem cell reprogramming – cell therapy – type 1 diabetes mellitus (T1DM) – encapsulation for immune protection of transplanted cells – immunosuppression – pancreatic islets – transplantation

✉ Ing. Igor Lacík, DrSc. | igor.lacik@savba.sk | www.polymer.savba.sk

Doručené do redakcie | Received 1. 9. 2024

Prijaté po recenzii | Accepted 23. 10. 2024

Úvod

Strata schopnosti organizmu produkovať inzulín vedie k nutnosti dodávať inzulín exogénne typicky inzulínovými perami niekoľkokrát denne alebo kontinuálne inzulínovou pumpou. Napriek rastúcemu technologickému pokroku poskytujúcemu nové typy inzulínov, sofistikované monitorovanie glukózy a dávkovanie inzulínu, v Spojených štátoch menej ako 30 % diabetikov s diabetes mellitus 1. typu (DM1T) dosahujú odporúčané ciele hladiny cukru a predpokladá sa, že táto situácia je horšia mimo Spojených štátov [1].

U selektovaných diabetických pacientov, u ktorých je potrebná transplantácia obličky alebo u ktorých sa vyskytujú časté a nekontrolované hypoglykémie napriek optimálnej inzulínovej terapii, transplantácia pankreasu ako celého orgánu alebo transplantácia izolovaných pankreatických ostrovčiek predstavujú riešenia obnovujúce fyziologickú koncentráciu hladiny cukru v krvi. Kritériá pre transplantáciu celého orgánu alebo transplantáciu pankreatických ostrovčiek závisia od klinickej dostupnosti týchto procedúr, zdravotného stavu pacienta a terapeutického cieľa, ktorý sa má transplantáciou dosiahnuť [2]. Transplantácia ostrovčiek predstavuje nízke riziko vyplývajúce z chirurgického zákroku a je vysoko efektívna pri eliminácii výskytu hypoglykémii (primárny cieľ), zabezpečuje zlepšenú kontrolu hladiny cukru a tiež vedie k nezávislosti na exogénnom inzulíne (sekundárny cieľ). Transplantácia celého orgánu nesie so sebou vysoké riziko komplikácií z operácie, avšak poskytuje kontrolu hladiny cukru bez nutnosti podávania exogénneho inzulínu (primárny aj sekundárny cieľ). Oba tieto prístupy sú limitované jednak malým počtom donorov a jednak imunosupresiou, ktorá je potrebná pre zabránenie aloimunitnej rejekcie cudzieho tkaniva a tiež autoimunitnej rejekcii β -buniek.

Edmontonský protokol a transplantácia pankreatických ostrovčiek

Transplantácia pankreatických ostrovčiek bola úspešne klinicky zavedená v roku 2020 v Edmontone v Kanade [3]. Táto procedúra, známa ako Edmontonský proto-

kol, je založená na transplantácii ostrovčiek izolovaných z pankreasu mŕtveho darcu cez portálnu žilu do pečene za použitia imunosupresív bez glukokortikoidov. Po skúsenostiach v rôznych centrách vo svete je zrejmé, že transplantácia ostrovčiek predstavuje možnosť nielen eliminácie výskytu hypoglykémie, ale aj dlhodobej (viac ako 10 rokov [4]) kontroly fyziologickej hladiny cukru [5,6]. Transplantovanými ostrovčkami sa dosahuje prevencia pred hyper- a hypoglykémiami a zastavenie až zvrátenie mikrovaskulárnych komplikácií a s tým súvisiacimi sekundárnymi následkami diabetu.

Neďávno boli publikované dlhodobé štúdie z transplantácie pankreatických ostrovčiek. Výstupom 20-ročnej skúsenosti v Edmontone po transplantácii ostrovčiek do 255 pacientov je nezávislosť na exogénnom inzulíne u 79 % pacientov po roku, u 32 % pacientov po 5 rokoch a u 8 % pacientov po 20 rokoch [7]. Komplikácie počas transplantácie boli u 5–10 % pacientov a kožné nádorové ochorenia u 5–16 % pacientov. Výsledky 10-ročnej skúsenosti v Škótsku (zahrňujúce 60 pacientov) hovoria o strednom prežívaní ostrovčiek počas 9 rokov u pacientov, ktorí dosiahli nezávislosť na exogénnom inzulíne, oproti 4,4 rokov u pacientov, u ktorých sa táto nezávislosť nedosiahla [8]. Táto štúdia zvyrazňuje dosiahnutie priaznivých výsledkov v prípade pacientov, ktorí po transplantácii ostrovčiek vykazujú nezávislosť na exogénnom inzulíne. Tiež transplantácia ostrovčiek po transplantácii obličky predstavuje vhodnú indikáciu pre transplantáciu ostrovčiek vzhľadom na už existujúcu chronickú imunosupresiu [9]. Takáto transplantácia poskytuje bezpečnú a účinnú alternatívu k transplantácii pankreasu po transplantácii obličky, ktorej výhodou je minimálna invazívnosť procedúry a vyhnutie sa opakovanej diabetickej nefropatii po transplantácii obličky dosiahnutím lepšej kontroly glykémie transplantovanými ostrovčkami.

Transplantácia alogénnych ostrovčiek nesporne priniesla významnú alternatívu pre kontrolu glykémie. V mnohých štátoch vo svete predstavuje klinicky odsúhlasenú procedúru, ktorá je k dispozícii pacientom in-

dikovaným pre takúto transplantáciu. Nedávna práca sumarizuje, že v počte aktívnych centier v období rokov 2000–2020 dominuje Európa (cca 2 600 transplantácií u 1 300 pacientov) a severná Amerika (cca 1 500 transplantácií u 700 pacientov), pričom ďalšie transplantáčnej centrá sú v Číne, Japonsku, Kórei, Austrálii, Iráne a v južnej Amerike [10]. Donedávna v Spojených štátoch transplantácia ostrovčiek bola experimentálnou procedúrou [11] a až v roku 2023 bola odsúhlasená FDA ako bunková terapia pre liečbu DM1T pod názvom Lantidra firmou CellTrans Inc. [12].

Obmedzenia Edmontonského protokolu

Edmontonský protokol jednoznačne predstavuje zásadný míľnik v liečbe diabetu s potenciálom eliminovať nutnosť podávania exogénneho inzulínu pre kontrolu glykémie. Zároveň však tento princíp má niekoľko limitácií uvedených v tab. 1. Jednou z limitácií je okamžitá imunitná odpoveď po nastreknutí ostrovčiek do krvného riečiska (**IBMIR** – Instant Blood-Mediated Immune Response) [13]. Jedná sa nešpecifickú a trombotickú imunitnú reakciu, ktorej dôsledkom je akútne alebo postupné odumieranie ostrovčiek po ich transplantácii, čo znemožňuje dosiahnuť primárne, resp. sekundárne ciele v kontrole glykémii. Následne je potrebné transplantovať viac ostrovčiek, často krátko aj od niekoľkých darcov. Tým sa zvyšujú nároky na už aj tak ďalšiu kľúčovú limitáciu, ktorou je nedostatok pankreasov ako alogénneho zdroja ostrovčiek pre ich izoláciu a transplantáciu. Ďalší otáznik je spojený s miestom transplantácie ostrovčiek namiesto pečene, keďže po transplantácii do pečene nedochádza len k strate ostrovčiek IBMIR mechanizmom, ale tiež nie je možné ostrovčeky explantovať pre prípad monitorovania ich stavu alebo z akéhokoľvek iného dôvodu súvisiacom s bezpečnosťou pre pacienta. V neposlednom rade je kľúčovou limitáciou

nutnosť chronickej imunosupresie, ktorá negatívne vplyva na prežívanie ostrovčiek a zdravotný stav diabetických pacientov.

Tab. 1 sumarizuje popri týchto obmedzeniach riešenia predstavujúce principiálne aktivity súvisiace s optimalizáciou bunkovej terapie pre liečbu DM1T na základe nedávno publikovaných prehľadových článkov [14,15], ktoré zahŕňujú stovky publikovaných prác s primárnymi informáciami. Aj keď informácia v tejto tabuľke vyzerá na prvý pohľad skromne, zahŕňuje rozsiahly počet aktivít rôznymi smermi a zároveň vysoký počet zatiaľ otvorených otázok bez jednoznačných odpovedí. V tomto zmysle je dôležité uviesť prácu Wang et al v časopise Cell [16], ktorá bola publikovaná v čase prípravy tohto príspevku.

Riešenie za horizontom Edmontonského protokolu?

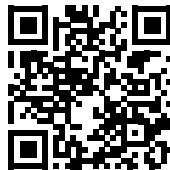
Práca čínskeho kolektívu [16] posúva poznanie v možnosti liečby cukrovky bunkovou terapiou v niekoľkých aspektoch týkajúcich sa buniek, miesta transplantácie ako aj imunitnej odozvy. Zdrojom buniek produkujúcich inzulín sú bunky podobné ostrovčekom získané preprogramovaním pluripotentných kmeňových buniek z tukového tkaniva diabetického pacienta. Keďže tieto kmeňové bunky sú získané z toho istého organizmu, do ktorého sú po preprogramovaní na bunky produkujúce inzulín transplantované, v princípe by nemalo byť potrebné použiť imunosupresiu. V tomto článku tento princíp nemožno byť potvrdený vzhľadom na to, že pacientka po predchádzajúcich transplantáciách pečene je dlhodobo na imunosupresii. Ďalším novým aspektom je miesto transplantácie, ktorým je predné priame brušné puzdro (**abdominal anterior rectus sheath**) [16,17]. Toto miesto transplantácie bolo selektované v predklinických testoch na primátoch [17] a predstavuje niekoľko výhod v porovnaní s transplantáciou ostrovčiek do pečene v Ed-

Tab. 1 | Obmedzenia Edmontonského protokolu a oblasti aktivít poskytujúce riešenia

| obmedzenie | riešenie |
|--|---|
| okamžitá imunitná odpoveď po transplantácii | ochrana pred imunitným systémom enkapsuláciou |
| chronická imunosupresia | ochrana pred imunitným systémom enkapsuláciou |
| nedostatok darcov pre alogénnu transplantáciu ostrovčiek | <ul style="list-style-type: none"> xenogénne ostrovčeky z prasiat (dospelé alebo neonatálne ostrovčeky) kmeňové bunky preprogramované na β-bunky (autológne, alebo alogénne) |
| miesto transplantácie namiesto pečene | <ul style="list-style-type: none"> obličková kapsula omentum mezenterium tenkého čreva podkožne |

montonskom protokole. Predné priame brušné puzdro zabezpečuje vaskularizáciu a dozrievanie buniek, ich monitorovanie, potláča odumieranie buniek IBMIR-mechanizmom a poskytuje možnosť opakovanej transplantácie ako aj explantácie buniek, ak by to bolo potrebné.

Výsledok tejto štúdie je nadmieru nádejny. Transplantovanými bunkami sa dosiahli primárne ciele zahŕňajúce zníženie koncentrácie glykozylovaného hemoglobínu a absenciu výskytu hypoglykémii. Taktiež sa dosiahli aj sekundárne ciele, v ktorých dominuje nezávislosť na podávaní inzulínu. Nezávislosť na exogénom inzulíne sa pozorovala 75 dní po transplantácii ostrovčiek. Od tohto času sa dosiahla plne kompenzovaná glykémia transplantovanými bunkami s hodnotou TIR (Time-In-Range) > 98 % (TIR = 43 % pred transplantáciou) a hodnota HBA_{1c} klesla zo 7,6 % pred transplantáciou na 4,8 % rok po transplantácii. Celkovo táto štúdia predstavuje významný posun ku klinickej transplantácii ostrovčiek ako alternatívy Edmontonského protokolu. Táto štúdia je v súčasnosti verifikovaná z pohľadu funkčnosti transplantovaných buniek a bezpečnosti takejto terapie pre pacienta. Autori ďalej uvádzajú, že bude potrebné sa venovať hlavným limitom štúdie, ktorými sú počet pacientov a tiež otázka nutnosti použiť imunosupresiu, keďže transplantované autológne preprogramované kmeňové bunky môžu byť atakované autoimunitným mechanizmom podobne ako pôvodné pankreatické ostrovčiky [16]. Originálna dokumentácia je dostupná z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2024.09.004>>.



Enkapsulácia: ochrana transplantovaných ostrovčiek pred imunitným systémom

Nutnosť ochrany transplantovaných buniek pred imunitným systémom je predmetom výskumu v posledných desaťročiach s víziou získať poznatky pre klinické aplikácie. Princiálnym dôvodom pre navrhnutie enkapsulácie pre izoláciu transplantovaných buniek od imunitného systému bola ochrana alo-, resp. xeno-transplantovaných primárnych pankreatických ostrovčiek. Súčasná doba je charakterizovaná stále novými poznatkami ohľadne nových zdrojov buniek produkujúcich inzulín v prepojení na napr. už vyššie uvedenú liečbu autológnyimi bunkami z preprogramovaných kmeňových buniek [16] ako aj z alogénnych hypoimunitných buniek získaných editovaním genómu použitím CRISPR-Cas9 technológie [18]. Aj keď tieto stratégie majú potenciál vylúčiť nutnosť imunosupresie, zatiaľ neznámym faktorom je autoimunitná reakcia voči β -bunkám, ktorej riešením je práve enkapsulácia buniek.

Princíp enkapsulácie bol navrhnutý v pionierskej práci publikovanej v roku 1980 v časopise Science, v ktorej bolo ukázané, že potkanie ostrovčiky enkapsulované v hydrogélových mikrokapsulách zabezpečili normoglykémiu u diabetických potkanov počas 3 týždňov [19]. Prvý klinický test v roku 1994 s podobnými hydrogélovými mikrokapsulami [20] inicioval vedecké aktivity s cieľom identifikovať klinické riešenie kontroly hladiny cukru transplantovanými ostrovčkami pre pacientov s DM1T, u ktorých dostupné spôsoby dávkovania inzulínu zlyhávajú.

Stratégie v enkapsulácii pankreatických ostrovčiek

Podstatou princípu enkapsulácie je polopriepustná membrána, ktorá je schopná sprostredkovať komunikáciu enkapsulovaných ostrovčiek s organizmom, t. j. dlhodobé prežívanie a fungovanie ostrovčiek za zabezpečením prestupu glukózy, inzulínu, živín, kyselín a metabolitov, a zároveň spĺňa požiadavku ich izolácie od organizmu zabránením efektívneho prestupu imunitného systému, t. j. imunitných buniek ako aj humorálnej zložky imunitného systému. Polopriepustnou membránou s takýmito charakteristikami je polymérny biomateriál, ktorý je dizajnovaný vo forme nanokapsúl, mikrokapsúl a makrokapsúl.

Princiálné požiadavky na enkapsulačné biomateriály sú:

- fyziologické podmienky počas enkapsulácie ostrovčiek
- dlhodobá (mesiace-roky) stabilita in vivo prostredím pre zabezpečenie imunitnej ochrany transplantovaných ostrovčiek
- dlhodobé (mesiace-roky) prežívanie a fungovanie transplantovaných ostrovčiek, t. j. produkcia inzulínu na základe aktuálnej hladiny cukru
- biokompatibilita vzhľadom na tkanivo v mieste transplantácie s nutnosťou identifikovať materiály odolných voči obrastaniu fibrotickým tkanivom

V tab. 2 sú predstavené základné charakteristiky enkapsulačných systémov s uvedením ďalších odkazov na literatúru, ktoré dopĺňajú informáciu nedávno publikovaných prehľadových článkov [14,15].

Nanokapsuly

V tomto prípade sú ostrovčiky enkapsulované v polymérnej vrstve o hrúbke niekoľkých desiatok nanometrov. Boli testované mnohé postupy tvorby týchto tenkých vrstiev zahŕňajúce namáčanie a obalovanie ostrovčiek v polymérnych roztokoch a následnú stabilizáciu kovalentnými a elektrostatickými väzbami a tiež hydrofóbnymi a vodíkovými interakciami [24]. Nádejné vý-

sledky u primátov boli publikované pred 10 rokmi firmou Novocell [21]. V tejto štúdií alogénne ostrovčeky obalené do polymérnej vrstvy tvorenej kovalentne presieťovaným poly(etylénglykolom) a transplantované podkožne do predklinického modelu primátov dokázali kontrolovať glykémiu bez exogénneho inzulínu počas mnohých mesiacov, v niektorých prípadoch aj vyše roka. Na základe týchto výsledkov boli FDA odsúhlasené klinické testy, ktoré však následne po prvých neúspešných výsledkoch boli ukončené [21]. V súčasnosti prebieha výskum s cieľom zvýšenia stability a imunitnej ochrany ostrovčiek nanokapsulami v predklinickom modeli na primátoch a optimalizovanie procesu enkapsulácie [22].

Mikrokapsuly

Hydrogélové mikrokapsuly s priemerom typicky medzi 0,3 a 1,5 mm predstavujú doteraz najviac využívaný princíp enkapsulácie pankreatických ostrovčiek. Na tvorbu polopriepustnej membrány vo forme hydrogélových sfér, obsahujúcich len niekoľko percent polyméru a zvyšok je prirodzené vodné prostredie pre enkapsulované bunky, sa využívajú rôzne typy prírodných a syntetických polymérov [24,25]. Z nich je najviac využívaným alginát sodný, aniónový polysacharid izolovaný z morských rias, ktorý má schopnosť vytvárať hydrogél interakciou s dvojmocnými kationmi (napr. vápnik, stroncium, bárioium). Vzniknutá hydrogélová sieť je dostatočne stabilná vo fyziologickom prostredí a vhodná pre imunitnú ochranu transplantovaných buniek, čo bolo využité v klinických testoch s enkapsulovanými ľudskými ostrovčkami [27,28]. Pre zvýšenie stability alginátovej siete a imunitnej ochrany enkapsulovaných ostrovčiek sa využívajú viaccomponentné mikrokapsuly na báze alginátu sodného v kombinácii s rôznymi polykationmi. Mikrokapsuly na

báze polyelektrolytového komplexu medzi alginátom sodným a poly-L-lyzínom boli použité pre prvú klinickú transplantáciu [20]. Podobné mikrokapsuly s poly-L-ornitínom ako polykationom namiesto poly-L-lyzínu boli klinicky testované s enkapsulovanými ľudskými ostrovčkami [29,30]. Takéto mikrokapsuly boli tiež klinicky testované s neonatálnymi prasačmi ostrovčkami [31] s celkovou pozitívnou spätnou väzbou od pacientov 10 rokov po takejto transplantácii [32].

Tieto klinické testy viedli k záveru, že transplantácia enkapsulovaných pankreatických ostrovčiek je bezpečná procedúra pre pacienta. Ostrovčeky enkapsulované v mikrokapsulách boli v týchto klinických testoch transplantované do peritoneálnej dutiny. Z pohľadu kontroly glykémie sa u pacientov pozorovala prítomnosť C-peptidu a zníženie hodnoty HbA_{1c}, zníženie výskytu hypoglykémii ako aj zníženie dávky exogénneho inzulínu [29,31]. Tieto výsledky sú nádejné pre pokračovanie v klinických testoch. Na druhej strane explantácia enkapsulovaných ostrovčiek v niektorých týchto klinických štúdiách poukazuje na nedostatočnú biokompatibilitu mikrokapsúl. Dôsledkom je tvorba fibrotického tkaniva na povrchu mikrokapsúl, ktorá zabraňuje efektívnej difúzii látok cez polymérnu membránu a postupnému odumretiu enkapsulovaných ostrovčiek. Nedávne testy u primátov s rôznymi typmi mikrokapsúl použitými v predchádzajúcich klinických testoch [33] poukazujú na vysokú mieru fibrotického obrastania týchto mikrokapsúl, čo je ukázané na obr. 1.1.

V posledných rokoch sa preto venuje pozornosť zvýšeniu biokompatibility mikrokapsúl na báze alginátov. Jej výsledkom je zistenie, že mikrokapsuly s vyšším priemerom (1,5 mm) vykazujú lepšiu odolnosť voči tvorbe fibrotického tkaniva než mikrokapsuly s nižším priemerom (0,5 mm) [34]. Ďalšou aktivitou v tomto smere je zlepšenie biokompatibility alginátu sodného

Tab. 2 | Dizajny polopriepustnej membrány pre transplantáciu ostrovčiek

| typ | výhody | nevýhody | literatúra |
|--------------|--|---|------------|
| nanokapsuly | malá difúzna vzdialenosť < 100 nm | nedostatočná stabilita | [21–23] |
| | malý transplantovaný objem | nedostatočná imunitná ochrana | |
| | možnosť transplantácie do pečene | kapacita procesu enkapsulácie | |
| mikrokapsuly | hydrogély zabezpečujúce efektívnu difúziu | vyššia difúzna vzdialenosť (veľkosť 0,3–1,5 mm) | [24,25] |
| | flexibilný dizajn z pohľadu vlastností, procesu enkapsulácie a materiálov | transplantovaný objem desiatky ml | |
| | | otázna explantácia | |
| makrokapsuly | vaskularizácia | imunitná ochrana len pred imunitnými bunkami | [26] |
| | možnosť explantácie | | |
| | možnosť otvorených (s imunosupresiou) aj uzatvorených (bez imunosupresie) systémov | dostupnosť kyslíka pre ostrovčeky | |

jeho modifikáciou chemickými skupinami s antifibrotickým účinkom [35]. Tieto pozitívne výsledky spolu s definovanejším miestom transplantácie, t. j. **bursa omentalis** namiesto peritoneálnej dutiny pre zabránenie nežiadúcej sedimentácii a agregácii mikrokapsúl po transplantácii, boli úspešne využité v predklinických experimentoch v primátoch [33]. Na obr. 1.2 sú ukázané prázdne alginátové mikrokapsuly pripravené z nemodifikovaného a modifikovaného alginátu explantovaného z primátov. Mikrokapsuly z nemodifikovaného alginátu vykazujú významné fibrotické obrastanie už po 1. mesiaci, pokiaľ čo mikrokapsuly z modifikovaného alginátu sú odolné voči obrastaniu.

Enkapsulované alogénne ostrovčekom vykazujú vysokú viabilitu okolo 90 % v 4. mesiaci po transplantácii [33]. Tieto výsledky sú v súčasnosti podkladom pre iniciovanie klinických testov s ľudskými ostrovčekom enkapsulovanými v 1,5 mm alginátových mikrokapsulách pripravených z modifikovaného alginátu, ktoré sú transplantované do bursa omentalis. Na týchto klinických testoch sa zúčastňuje aj Ústav polymérov SAV, v.v.i., v rámci Chicago Diabetes Projektu [36]. V našich paralelných aktivitách sa venujeme viackomponentným

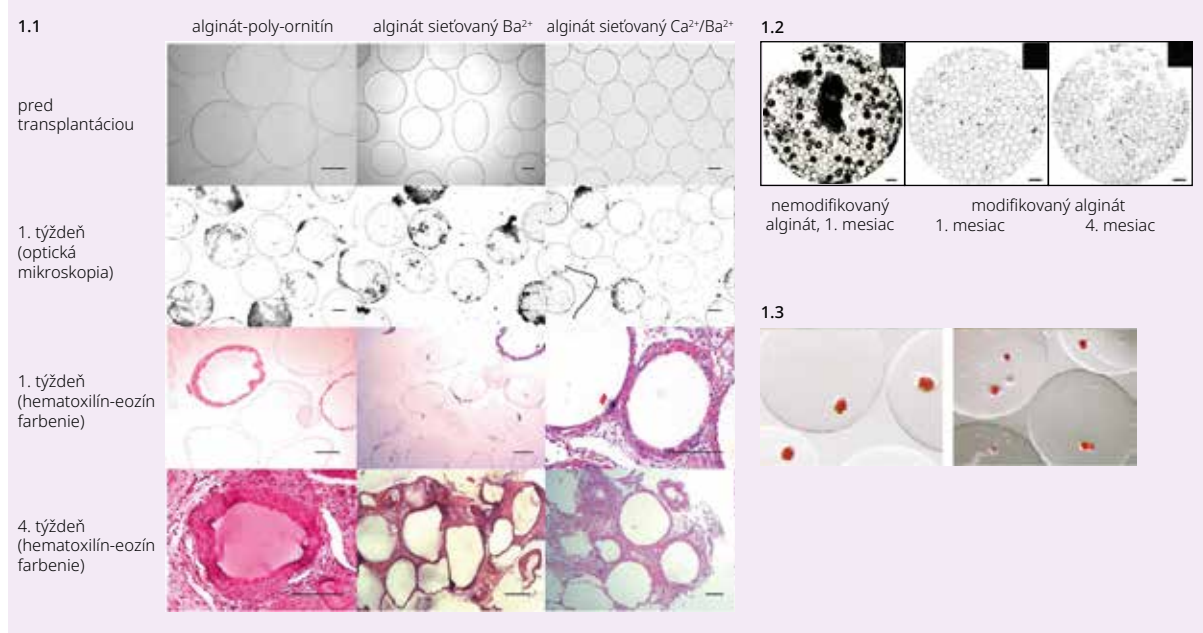
mikrokapsulám z pohľadu biokompatibility, stability a selekcie biomateriálov pre in vivo experimenty [37].

Makrokapsuly

Dizajn mikrokapsúl je logickým riešením nevýhod prítomných v nanoenkapsulácii a v mikroenkapsulácii. Makrokapsuly majú rozmery rádovo v centimetroch s kapacitou enkapsulovať stovky až tisíce ostrovčiek väčšinou pre podkožnú transplantáciu. Výhodou makrokapsúl je ich jednoduchá retransplantácia a tiež monitorovanie a doplnenie ostrovčiek v prípade potreby. V priebehu rokov bolo vyvinutých veľa typov makrokapsúl z rôznych biomateriálov zahrňujúcich syntetické polyméry (napr. expandovaný teflón, polyester, polyolefiny, polyvinyl alkohol, polyetylén glykol) a prírodné polyméry (napr. alginát sodný, kolagén) [24].

V poslednom období sa dosiahli významné výsledky až po klinickú fázu s 3 typmi makrokapsúl. Makrokapsuly vyvinuté firmou ViaCyte [26], ktorá sa medzičasom stala súčasťou Vertex Pharmaceuticals [38], sú v súčasnosti klinicky testované z pohľadu bezpečnosti, tolerovateľnosti a účinnosti s enkapsulovanými alogénnymi β -bunkami získanými preprogramovaním

Obr. 1 | Alginátové mikrokapsuly na báze alginátu. (1.1) Obrastanie mikrokapsúl testovaných v predchádzajúcich klinických testoch fibrotickým tkanivom po transplantácii do peritoneálnej dutiny primátov: po príprave a po explantácii po 1. a 4. týždni, mierka 0,2 mm. **(1.2)** Prázdne alginátové mikrokapsuly explantované po 1. mesiaci (pripravené z nemodifikovaného a modifikovaného alginátu) a po 4 mesiacoch (pripravené z modifikovaného alginátu), mierka 2,0 mm. **(1.3)** Explantované mikrokapsuly pripravené z modifikovaného alginátu s ostrovčekom farbenými ditizónom, mierka 0,2 mm. Upravené s povolením od Bochenek et al., Nat Biomed Eng 2018; 2(11): 810–821. Copyright © 2018 Springer Nature [33]



kmeňových buniek. Testované makrokapsuly sú vaskularizované buď len na povrchu (transplantácia bez nutnosti imunosupresie) alebo vaskulatura prerastá aj do vnútra makrokapsúl (transplantácia s nutnosťou imunosupresie). Ohľadne firmy Vertex je potrebné tiež doplniť, že touto firmou boli iniciované klinické testy s alogénnymi kmeňovými bunkami, ktoré sú transplantované do pečene pacientov podľa Edmuntovského protokolu. Firma Sernova Corp. vyvíja makrokapsuly Cell Pouch System™ pre bunkové terapie, z ktorých jednou je klinické testovanie u pacientov s DM1T. Tento systém je cieleň pre podkožnú transplantáciu, pri ktorej najprv dochádza k jeho vaskularizácii a následne sú do vytvoreného priestoru nastrekované bunky produkujúce inzulín. Použitie Cell Pouch System™ vyžaduje podávanie imunosupresívnych látok. Tieto dva prístupy sú v súčasnosti testované klinicky [15]. V nedávnej minulosti sa klinicky tiež testovala makrokapsula β -Air firmy Beta-O2 s ľudskými a tiež prasačimi ostrovčkami bez nutnosti použitia imunosupresív [39]. V tomto type makrokapsuly bola adresovaná nutnosť prítomnosti kyslíka, ktorý je externe dodávaný do objemu makrokapsuly v intervale raz za 24 hodín. Podľa posledných informácií firma Beta-O2 ukončila svoju činnosť.

Záver

Globálne aktivity spojené s bunkovou terapiou v liečbe DM1T zaznamenávajú v súčasnosti významný progres. Ich súčasťou je identifikácia zdroja buniek a tiež hľadanie spôsobov, ako sa vyhnúť imunosupresii chrániacej transplantované bunky pred imunitnou reakciou.

Súčasná už klinicky validovaná fáza bunkovej terapie v liečbe DM1T je alogénna transplantácia pankreatických ostrovčiek s imunosupresiou. Ďalšou fázou je klinicky validovaná alogénna transplantácia enkapsulovaných ostrovčiek bez imunosupresie. Následnou fázou je alogénna alebo autológna transplantácia enkapsulovaných β -buniek získaných preprogramovaním kmeňových buniek, alebo xenotransplantácia zvieracích buniek, v oboch prípadoch bez imunosupresie. Inými nádejnými smermi v bunkovej terapii pre liečbu DM1T je potenciál využitia hypoimúnných alogénných β -buniek [18] a β -buniek získaných z autológnych preprogramovaných kmeňových buniek [16].

Takéto inovatívne spôsoby terapie musia spĺňať stanovené primárne a sekundárne ciele a zároveň musia byť bezpečné pre pacienta. Keďže už sú tieto terapie v štádiu klinických testov, zároveň s ich vývojom sa musia dodržiavať regulačné usmernenia pre schválenie týchto terapií [15]. Súčasťou prebiehajúcich aktivít je tiež pochopenie dominantných faktorov zodpovedných za prepojenie medzi vlastnosťami

enkapsulačných systémov a funkčnosťou transplantovaných buniek [40]. Obdobie budúcich rokov určite prinesie ďalšie nové poznatky v tejto oblasti a v manažmente diabetického pacienta s DM1T bunkovou terapiou priblíži časový horizont klinickej dostupnosti kontroly glykémie enkapsulovanými bunkami bez nutnosti použitia imunosupresie.

Autor vyslovuje úprimné poďakovanie svojmu tímu na Oddelení pre vývoj biomateriálov Ústavu polymérov SAV, v.v.i., a tiež zahraničným spolupracujúcim pracovníkmi. Táto téma sa rieši vďaka projektu Agentúry na podporu výskumu a vývoja APVV-22-0565 a vďaka zahraničnej spolupráci v rámci The Chicago Diabetes Project.

Literatúra

1. Latres E, Finan DA, Greenstein JL et al. Navigating Two Roads to Glucose Normalization in Diabetes: Automated Insulin Delivery Devices and Cell Therapy. *Cell Metab* 2019; 29(3): 545–563. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.007>>.
2. Bellin MD, Dunn TB. Transplant strategies for type 1 diabetes: whole pancreas, islet and porcine beta cell therapies. *Diabetologia* 2020; 63(10): 2049–2056. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00125-020-05184-7>>.
3. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343(4): 230–238. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200007273430401>>.
4. Williams J, Jacus N, Kavalackal K et al. Over ten-year insulin independence following single allogeneic islet transplant without T-cell depleting antibody induction. *Islets* 2018; 10(4): 168–174. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1080/19382014.2018.1451281>>.
5. Barton FB, Rickels MR, Alejandro R et al. Improvement in outcomes of clinical islet transplantation: 1999–2010. *Diabetes Care* 2012; 35(7): 1436–1445. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.2337/dc12-0063>>.
6. Bretzel RG, Jahr H, Eckhard M et al. Islet cell transplantation today. *Langenbecks Arch Surg* 2007; 392(3): 239–253. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00423-007-0183-4>>.
7. Marfil-Garza BA, Imes S, Verhoeff K et al. Pancreatic islet transplantation in type 1 diabetes: 20-year experience from a single-centre cohort in Canada. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2022; 10(7): 519–532. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587\(21\)00147-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2213-8587(21)00147-9)>.
8. Stanley AK, Duncan K, Anderson D et al. Insulin independence following islet transplantation improves long-term metabolic outcomes. *Diabet Med* 2024; 41(2): e15257. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/dme.15257>>.
9. Markmann JF, Rickels MR, Eggerman TL et al. Phase 3 trial of human islet-after-kidney transplantation in type 1 diabetes. *Am J Transplant* 2021; 21(4): 1477–1492. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/ajt.16174>>.
10. Berney T, Andres A, Bellin MD et al. A Worldwide Survey of Activities and Practices in Clinical Islet of Langerhans Transplantation. *Transpl Int* 2022; 35: 10507. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.3389/ti.2022.10507>>.
11. Ricordi C, Japour A. Transplanting islet cells can fix brittle diabetes. Why isn't it available in the U.S.? *CellR4 Repair Replace Regen Reprogram* 2019; 7:e2768. Dostupné z DOI: <http://dx.doi.org/10.32113/cellr4_201910_2768>.
12. Lantidra. Dostupné z WWW: <<https://www.lantidra.com/>>.
13. Naziruddin B, Iwahashi S, Kanak MA et al. Evidence for Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction in Clinical Autologous Islet

- Transplantation. *Am J Transplant* 2014; 14(2): 428–437. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/ajt.12558>>.
14. Kioulaphides S, García AJ. Encapsulation and immune protection for type 1 diabetes cell therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2024; 207 (2024): 115205. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2024.115205>>.
 15. Liu SS, Shim S, Kudo Y et al. Encapsulated islet transplantation. *Nat Rev Bioeng* 2024. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/s44222-024-00238-6>>.
 16. Wang S, Du Y, Zhang B et al. Transplantation of chemically induced pluripotent stem-cell-derived islets under abdominal anterior rectus sheath in a type 1 diabetes patient. *Cell* 2024; S0092-8674(24)01022-5. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2024.09.004>>.
 17. Liang Z, Sun D, Lu S et al. Implantation underneath the abdominal anterior rectus sheath enables effective and functional engraftment of stem-cell-derived islets. *Nature Metabolism* 2023; 5(1): 29–40. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/s42255-022-00713-7>>.
 18. Hu X, White K, Young C et al. Hypoimmune islets achieve insulin independence after allogeneic transplantation in a fully immunocompetent non-human primate. *Cell Stem Cell* 2024; 31(3): 334–340.e5. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2024.02.001>>.
 19. Lim F, Sun AM. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 1980; 210(4472): 908–910. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1126/science.6776628>>.
 20. Soon-Shiong P, Heintz RE, Merideth N et al. Insulin independence in a type 1 diabetic patient after encapsulated islet transplantation. *Lancet* 1994; 343(8903): 950–951. Dostupné z DOI: <[http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)90067-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(94)90067-1)>.
 21. Scharp DW, Marchetti P. Encapsulated islets for diabetes therapy: history, current progress, and critical issues requiring solution. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 67–68: 35–73. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.018>>.
 22. Stock AA, Gonzalez GC, Pete SI et al. Performance of islets of Langerhans conformally coated via an emulsion cross-linking method in diabetic rodents and nonhuman primates. *Sci Adv* 2022; 8(26) (2022): eabm3145. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abm3145>>.
 23. Teramura Y, Oommen OP, Olerud J et al. Microencapsulation of cells, including islets, within stable ultra-thin membranes of maleimide-conjugated PEG-lipid with multifunctional crosslinkers. *Biomaterials* 2013; 34(11): 2683–2693. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.015>>.
 24. Lacík I. Current Status on Immunoprotection of Transplanted Islets: Focus on Islet Microencapsulation. *Micro and Nanosystems* 2013; 5(3): 168–176. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.2174/1876402911305030004>>.
 25. Lacík I. Polymer Chemistry in Diabetes Treatment by Encapsulated Islets of Langerhans: Review to 2006. *Australian Journal of Chemistry* 2006; 59(8): 508–524. Dostupné z DOI: <<https://doi.org/10.1071/CH06197>>.
 26. Shapiro AM, Thompson D, Donner TW et al. Insulin expression and C-peptide in type 1 diabetes subjects implanted with stem cell-derived pancreatic endoderm cells in an encapsulation device. *Cell Rep Med* 2021; 2(12): 100466. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100466>>.
 27. Tuch BE, Keogh GW, Williams LJ et al. Safety and Viability of Microencapsulated Human Islets Transplanted Into Diabetic Humans. *Diabetes Care* 2009; 32(10): 1887–1889. <<http://dx.doi.org/10.2337/dc09-0744>>.
 28. Jacobs-Tulleeneers-Thevissen D, Chintinne M, Ling Z et al. [Beta Cell Therapy Consortium EU-FP7]. Sustained function of alginate-encapsulated human islet cell implants in the peritoneal cavity of mice leading to a pilot study in a type 1 diabetic patient. *Diabetologia* 2013; 56(7): 1605–1614. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00125-013-2906-0>>.
 29. Basta G, Montanucci P, Luca G et al. Long-term metabolic and immunological follow-up of nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes treated with microencapsulated islet allografts: four cases. *Diabetes Care* 2011; 34(11): 2406–2409. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.2337/dc11-0731>>.
 30. Calafiore R, Basta G, Luca G et al. Standard technical procedures for microencapsulation of human islets for graft into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes mellitus. *Transplant Proc* 2006; 38(4): 1156–1157. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2006.03.014>>.
 31. Matsumoto S, Abalovich A, Wechsler C et al. Clinical Benefit of Islet Xenotransplantation for the Treatment of Type 1 Diabetes. *EBioMedicine* 2016; 12: 255–262. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.08.034>>.
 32. Matsumoto S, Abalovich A, Wynyard S et al. Patients' opinions 10 years after receiving encapsulated porcine islet xenotransplantation without immunosuppression. *Xenotransplantation* 2023; 30(3): e12798. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1111/xen.12798>>.
 33. Bochenek MA, Veiseh O, Vegas AJ et al. Alginate encapsulation as long-term immune protection of allogeneic pancreatic islet cells transplanted into the omental bursa of macaques. *Nat Biomed Eng* 2018; 2(11): 810–821. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41551-018-0275-1>>.
 34. Veiseh O, Doloff JC, Ma M et al. Anderson, Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and non-human primates. *Nat Mater* 2015; 14(6): 643–651. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nmat4290>>.
 35. Vegas AJ, Veiseh O, Doloff JC et al. Combinatorial hydrogel library enables identification of materials that mitigate the foreign body response in primates. *Nat Biotechnol* 2016; 34(3): 345–352. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3462>>.
 36. Chicago Diabetes Project. Dostupné z WWW: <<https://www.chicagodiabetesproject.org/>>.
 37. Dorchei F, Heydari A, Kroneková Z et al. Postmodification with Polycations Enhances Key Properties of Alginate-Based Multicomponent Microcapsules. *Biomacromolecules* 2024; 25(7): 4118–4138. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.biomac.4c00222>>.
 38. Vertex Pharmaceuticals. Dostupné z WWW: <https://clinicaltrials.vrtx.com/>.
 39. Ludwig B, Reichel A, Steffen A et al. Transplantation of human islets without immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(47): 19054–19058. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1317561110>>.
 40. Rokstad AM, Lacík I, de Vos P et al. Advances in biocompatibility and physico-chemical characterization of microspheres for cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev* 2014; 67–68: 111–130. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.010>>.