

Возможности и проблемы трансплантации β -клеток поджелудочной железы при сахарном диабете

И.И. Дедов, М.И. Балаболкин

ГУ Эндокринологический научный центр
(дир. – акад. РАН и РАМН И.И. Дедов) РАМН, Москва

Сахарный диабет типа 1 (СД 1), как известно, характеризуется аутоиммунной деструкцией островков поджелудочной железы с последующим развитием абсолютной инсулиновой недостаточности, сопровождающейся инсулинопенией. В таких случаях без введения экзогенного инсулина у больных очень быстро развивается диабетическая кома и смерть. Сохранность жизни и работоспособности больных СД типа 1 обеспечивается проведением пожизненной заместительной инсулинотерапии. Несмотря на значительные успехи в производстве препаратов инсулина (монокомпонентные генноинженерные препараты инсулина человека короткого и средней длительности действия; аналоги инсулина человека как ультракороткого действия – новорапид и хумалог, так и аналоги инсулина человека продленного действия – лантус, детемир) и средствах его введения (инсулиновые шприцы, шприц-ручки, помпы для постоянной инфузии инсулина), в клинической практике сохраняется множество проблем, обусловленных невозможностью достижения полной компенсации диабета, т.е. нормализации углеводного обмена на протяжении длительного времени, что является необходимым условием для предупреждения развития сосудистых осложнений диабета, которые, как известно, являются причиной ранней инвалидизации и высокой летальности.

Для снижения частоты развития сердечно-сосудистых заболеваний, их стабилизации и профилактики необходима строгая компенсация углеводного обмена, близкая к той, которая наблюдается у здорового человека, а также сохранение нормальных показателей липидного обмена и артериального давления. Достижение строгой компенсации углеводного обмена на протяжении длительного времени сопряжено с высоким риском развития частых гипогликемий, которые могут быть причиной летального исхода. Именно этим объясняется стремление разработать такие методы лечения сахарного диабета, которые предполагали бы достижение целевых установок по компенсации углеводного и липидного обменов при отсутствии гипогликемий, что может быть достигнуто только применением технологий, предусматривающих наличие нормальной обратной связи регуляции углеводного обмена, обеспечивающей поддержание гликемии в пределах нормальных показателей. Идеальными для достижения такого состояния являются пересадка поджелудочной железы, β -клеток островков поджелудочной железы и разра-

ботка генноинженерных конструкций, функционирующих на принципах гормональной, главным образом, инсулиновой регуляции углеводного обмена.

Пересадка поджелудочной железы или островков поджелудочной железы необходима, в первую очередь, больным СД типа 1, количество которых увеличивается во всех странах мира. Так, в США насчитывается около 1 млн больных СД типа 1, в Российской Федерации – около 300 тыс. В США, по данным Институтов национального здравоохранения (NIH), ежегодно имеется около 6000 трупных донорских почек (почки, взятые у лиц с мозговой травмой, несовместимой с жизнью), из которых лишь 25-30% пригодны для трансплантации с поджелудочной железой. Помимо высокой стоимости операции по трансплантации поджелудочной железы, ограничением для ее проведения во всех случаях при наличии показаний является и ограниченный ресурс в донорском материале, необходимом для больных сахарным диабетом, которым из-за наличия у них конечной стадии почечной недостаточности (уремия), печеночной или сердечной недостаточности показано проведение трансплантации соответствующих органов и, желательного, одновременно с поджелудочной железой.

На протяжении десятилетий проводятся исследования, направленные на возможность замещения у больных СД типа 1 утраченной функции островков поджелудочной железы, восстановления функции инсулярного аппарата поджелудочной железы и нормальной регуляции углеводного обмена. Научные исследования проводятся по нескольким направлениям: аллогенная трансплантация поджелудочной железы или ее фрагментов; пересадка островков поджелудочной железы, полученных от аллогенного или ксеногенного донора; разработка и создание искусственной поджелудочной железы.

Первая пересадка поджелудочной железы для лечения диабетической нефропатии и сахарного диабета была выполнена W.D. Kelly и соавт. (1967). Однако выживаемость больных и функция пересаженного органа оставались крайне низкими, что определялось отсутствием средств и методов, позволяющих успешно воздействовать на процессы отторжения и функцию пересаженного органа. Внедрение современных иммуносупрессивных средств (метилпреднизолон, азатиоприн, циклоспорин А, антисывороток к субпопуляциям Т-лимфоцитов) способствовало предупреждению отторжения пересаженной поджелудочной

железы, которая, как правило, проводится одновременно с трансплантацией почки при сохранении в течение длительного времени их функции. Такую органную трансплантацию поджелудочной железы проводят больным, находящимся в терминальной стадии диабетической нефропатии (ДН). К 1998 г., по данным А. Gruessner и D. E. R. Sutherland (1998), в мире было проведено свыше 10 000 подобных операций, причем наибольшее их количество приходилось на 1991-1997 гг. В большинстве случаев такие операции проводятся у больных сахарным диабетом и уреимией с использованием трупной поджелудочной железы или ее части и почки. По данным международного регистра по пересадке поджелудочной железы к августу 2000 г. количество проведенных трансплантаций поджелудочной железы увеличилось до 15 710. В настоящее время в мире ежегодно проводится около 1500 пересадок поджелудочной железы, причем более 90% проводится в США.

Несмотря на значительное количество проведенных трансплантаций поджелудочной железы совместно с почкой или без таковой, результаты и эффективность таких операций остаются неоднозначными. Так, А. О. Ожо и соавт. (2001) изучили эффективность и длительную выживаемость больных СД после пересадки им поджелудочной железы совместно с почкой и показали, что выживаемость больного и пересаженной почки значительно улучшились на фоне пересаженной поджелудочной железы. Однако К. S. Reddy и соавт. (2003) не выявили статистической достоверности в таких взаимоотношениях спустя несколько лет после проведенной трансплантации поджелудочной железы совместно с почкой или после пересадки только почки. И, наконец, S. Bunnapradist и соавт. (2003) при изучении эффективности одновременной трансплантации почки и поджелудочной железы не смогли установить положительного влияния пересаженной поджелудочной железы на функцию почки. Смертность после одновременной трансплантации поджелудочной железы и почки значительно выше, чем после пересадки только одной почки.

Основная проблема пересадки поджелудочной железы или ее фрагментов обусловлена, с одной стороны, особенностью наличия ее экзокринной функции, сравнительно низким ее кровоснабжением, что способствует таким осложнениям, как сосудистый тромбоз, панкреатит, инфекции. Все это сказывается на длительности пребывания больного в стационаре и необходимости проведения повторных операций. Сама по себе операция по пересадке поджелудочной железы является очень дорогостоящим видом лечения, а частые осложнения значительно увеличивают общие расходы по лечению. Отторжение пересаженной поджелудочной железы, как и почки, диктует необходимость применения для профилактики этого осложнения иммуносу-

прессивных препаратов, которые также ухудшают прогноз у больных диабетом.

Для предупреждения отторжения пересаженной ткани применяется антилимфоцитарная сыворотка, а также другие методы, видимо, оказывающие положительное влияние на реакцию отторжения посредством иммуномодулирующего воздействия на иммунную систему реципиента (длительное сохранение культуры клеток при низкой (22-24°) температуре или 37°С при высоких или гипербарических концентрациях кислорода, криоконсервирование, облучение ультрафиолетом или рентгеновскими лучами, обработка культуры островковой ткани моноклональными антителами к антигенам 2-го класса системы гистосовместимости). Иммуносупрессивная терапия после трансплантации почек и фрагментов поджелудочной железы включает моно- или поликлональные антитела к Т-клеткам, ингибиторы кальцинеурина (циклоsporин или такролимус), антимагметболиты (азатиоприн или мофетил микофенолат) и кортикостероиды.

В течение первого года после трансплантации почка-поджелудочная железа полная инсулинонезависимость сохраняется у 94% больных, а при трансплантации только поджелудочной железы — у 89%. Спустя 5 лет эти взаимоотношения сохраняются — 81 и 67% соответственно. После трансплантации улучшается качество жизни больных: не требуется введения экзогенного инсулина, нет необходимости в проведении мониторинга глюкозы, отсутствуют ограничения в диете, наиболее выраженные положительные изменения наблюдаются в течении нейропатии, что проявляется не только задержкой ее прогрессирования, но и значительным регрессом клинических симптомов, включая восстановление имеющегося гастропареза. Восстановление функциональной активности почек выражено в большей степени и на более длительное время после трансплантации почка-поджелудочная железа, чем после трансплантации только почки. Проллиферативная ретинопатия не подвергается обратному развитию, хотя скорость ее прогрессирования замедляется (Kumar A. и соавт., 1999).

Несмотря на то что количество одновременных трансплантаций почки и поджелудочной железы больным СД I в сочетании с уреимией увеличивается, преимущества такой терапии (качество жизни больных и стоимость лечения) по сравнению с трансплантацией почки и последующей интенсивной инсулиновой терапией остаются под сомнением. В этой связи расширяются показания для проведения трансплантации почка-поджелудочная железа на более ранней стадии почечной недостаточности. Пересмотру показаний к подобной трансплантации способствовало широкое использование современных иммуносупрессоров (такролимус и микофенолат) и кишечного дренажа внешнесекреторной функции поджелудочной железы. Мо-

делирование «стоимость — эффективность», проведенное Т. V. Holohan (1996), показало, что расходы в течение 3 лет на 100 условных реципиентов при проведении им пересадки почек составляют 10,7 млн. долларов, а при трансплантации почки и поджелудочной железы — 16,11 млн. долларов.

Пересадка островков поджелудочной железы с целью освобождения больных от инсулинозависимости проводится также на протяжении многих десятилетий. Клинические трансплантации островков поджелудочной железы осуществляются с 1974 г. и вплоть до 1997-1998 гг. эффективность таких операций была крайне низкая. Меньше чем у 10% больных СД типа 1, которым была проведена трансплантация островковых клеток, достигалось состояние инсулинонезависимости, продолжавшееся в течение непродолжительного времени.

Исследования, проведенные на экспериментальных животных и в клинической практике, показали, что трансплантация (суспензия) островковых клеток проводится различными путями и в различные ткани:

- инъекция в портальную вену, т.е. в печень;
- инъекция в селезеночную вену и в селезенку;
- инъекция в пульпу селезенки;
- инъекция и имплантация в брюшную полость;
- пересадка (трансплантация или инъекция) под капсулу почки;
- инъекция в прямую мышцу живота;
- имплантация в подкожную жировую клетчатку передней стенки живота;
- имплантация культуры предварительно инкапсулированных островковых клеток (макро- и микроинкапсулирование).

Однако надежды на помощь больным сахарным диабетом и с помощью трансплантации поджелудочной железы животных или человека достичь инсулинонезависимости не оправдались из-за того, что пересаживаемые фрагменты содержали не только островковую, но и ацинозную ткань поджелудочной железы. Это стимулировало исследования, направленные на очистку островков поджелудочной железы от ацинозной ткани, что было осуществлено S. Moskalewsky (1969) с помощью коллагеназы с использованием поджелудочной железы морской свинки. Очищенные и трансплантируемые с помощью инфузии в печень крыс такие островки сохраняли функциональную активность в течение длительного времени.

Уже в первой работе, выполненной J. S. Najarian и соавт. (1977), было показано, что из 7 больных СД типа 1, получивших интраперитонеальную и интрапортальную трансплантацию (около 50 000 островков не полностью очищенных от ацинозной ткани) суспензированной поджелудочной железы взрослого человека и ребенка, ни у одного больного не было достигнуто инсулинонезависимости и лишь у 4

больных, получивших интрапортальную трансплантацию, отмечалось временное снижение потребности в инсулине.

Первая отечественная аллотрансплантация культур плодных островковых клеток была проведена В.И.Шумаковым в 1979 г. (В.И. Шумаков и соавт., 1981) в пульпу селезенки. Несмотря на субъективные симптомы улучшения течения заболевания, суточная потребность в инсулине составляла 32-34 ед. С 1981 по 1984 г. было осуществлено 65 аллотрансплантаций (В.И. Шумаков и соавт., 1985); 42 больных наблюдались в течение года. У 18 больных доза вводимого инсулина оставалась сниженной на 18-67%, а у 7 больных потребность в инсулине вернулась к до-трансплантационному уровню. Из 20 больных с лабильным до трансплантации течением сахарного диабета у 15 оно оставалось стабильным и лишь у 3 возобновилось лабильное течение заболевания. К сожалению, авторы не осуществляли мониторинг показателей функции пересаженных островковых клеток, функционального состояния иммунной системы в разные сроки после трансплантации, особенно отдаленные, что наиболее важно для оценки эффективности предложенной терапии. Следует отметить, что после проведенных операций не наблюдалось случаев полной инсулинонезависимости, т.е. отмены инсулинотерапии. В различные периоды после проведенных аллотрансплантаций отмечалось улучшение в основном субъективных показателей состояния больных диабетом (улучшение общего самочувствия, снижение интенсивности болей в конечностях, улучшение зрения и др.), тогда как динамика некоторых объективных показателей была чаще всего временной. Так, базальная секреция С-пептида (показатель секреции и высвобождения инсулина) повышалась до 0,3-0,49 нг/мл через 1 мес. после пересадки, а затем снижалась до уровня, наблюдаемого до трансплантации — 0,1-0,2 нг/мл.

Определенным прорывом в трансплантации островков поджелудочной железы оказались разработка и получение «высокоочищенной» коллагеназы, методов автоматической ферментации, фильтрации и сепарации островков из поджелудочной железы взрослых трупных доноров с использованием клеточных сепараторов фирмы COBE 2991, что позволяет получать из одной железы до 800 000 островков, доводя чистоту конечного материала до 90% (С. Ricordi и соавт., 1988, 1989). С этого времени стало возможным получать и трансплантировать больным СД такое количество островков поджелудочной железы, которое имеется у здорового человека и которое необходимо для восстановления нарушенного углеводного обмена при полном отказе от экзогенного введения инсулина. Одновременно было показано, что островки человека, трансплантированные в печень, способны к выживанию и функционированию в течение не-

скольких лет, при отсутствии признаков отторжения пересаженных клеток и рецидива аутоиммунитета, что было подтверждено соответствующими гистологическими исследованиями. В некоторых случаях трансплантированные больным СД типа 1 островки поджелудочной железы человека функционировали в течение нескольких лет, способствуя нормализации углеводного обмена и уровня HbA_{1c} при отсутствии гипогликемии (R. Alejandro и соавт., 1997).

Поджелудочная железа взрослого человека весит около 70 г и содержит от 400 000 до 1,5 млн. островков, диаметр каждого составляет около 150 мкм (μm), что соответствует 0,5-4% объема поджелудочной железы. Эффективная функция пересаженной островковой ткани возможна в том случае, если количество трансплантируемых островков составляет 6000 или более на 1 кг массы больного, при условии введения указанного количества островков в порталную систему. Трансплантируемые островки поджелудочной железы должны быть свободны от бактерий и грибков, а доноры тестированы на содержание антител к вирусу гепатита А, В и С, ВИЧ 1 и 2 типа, цитомегаловирусу. Подготовленные для трансплантации островки поджелудочной железы должны быть тестированы на способность секреции инсулина в инкубационной среде с высоким содержанием глюкозы — 16,7 ммоль/л. За несколько десятков лет, по данным В. J. Hering и С. Ricordi (1999), было проведено более 300 трансплантаций островков поджелудочной железы человека, но успех таких пересадок, как уже отмечалось, был менее 10%.

Как было установлено исследованиями последних лет, высокая частота отторжения пересаженных островков человека обусловлена влиянием эндотоксинов, содержащихся в трансплантируемом материале, так как островки способны абсорбировать эндотоксины через LPS рецепторы с развитием последующей воспалительной реакции в месте пересадки. Используя эндотоксинсвободные реагенты и улучшив перитрансплантационное лечение реципиента, F. Vertuzzi и соавт. (2002) добились состояния инсулинонезависимости у 60% оперированных ими больных.

Одной из причин временной инсулинонезависимости после трансплантации островков поджелудочной железы был рецидив аутоиммунной деструкции пересаженных клеток, что диктовало необходимость применения новых методов для профилактики отторжения пересаженных тканей. N. S. Kenyon и соавт. (1999) сообщили о возможности сохранения длительной внутрипеченочной функции пересаженных островков поджелудочной железы у обезьян, у которых в качестве иммуносупрессивного средства при этом были применены антитела к человеческим CD 154. Другой группой исследователей было установлено, что анти-CD3 иммунотоксин также способен индуцировать иммуносупрессию, что позволяет

пересаженным островкам поджелудочной железы длительно функционировать без признаков их отторжения (J. L. Contreras и соавт., 1999). Эти исследования показали возможность выхода из тупика, в котором оказалась проблема пересадки островков поджелудочной железы.

Сенсационным прозвучало сообщение группы ученых из Эдмонтона (Канада), которые во главе с проф. А. Shapiro в 2000 г. доложили на заседании 60-й конференции Американской диабетической ассоциации результаты успешной трансплантации островков поджелудочной железы 5 больным СД типа 1 с полной отменой инсулинотерапии в послеоперационном лечении (А. М. Shapiro и соавт., 2000а). Высокая эффективность описанного метода трансплантации островков поджелудочной железы человека обусловлена несколькими факторами. Каждый больной получил достаточное количество очищенных островков, которое составляло в среднем 11 392 островка на 1 кг массы тела больного. Такое количество островков поджелудочной железы для каждого больного было получено из 2-3 донорских трупных желез. С момента смерти и взятия поджелудочной железы у донора до получения суспензии островков и введения их в порталную систему печени проходило не более 3-4 ч, т.е. был ликвидирован этап приготовления культуры островков поджелудочной железы. Таким образом, для сохранения функции пересаженных островков было оптимизировано время общей холодовой ишемии путем немедленной пересадки изолированных островков. Следует отметить, что в других центрах применялась культура островков поджелудочной железы, для получения которой требовалось несколько дней. Ликвидировав стадию подготовки культуры островков, авторы исключили дополнительную иммуногенность пересаживаемой ткани, так как для получения культуры островков поджелудочной железы использовалась сыворотка плодов крупного рогатого скота.

Кроме того, для профилактики отторжения была использована иммуносупрессивная терапия, не содержащая глюкокортикоидов. Основу такой терапии составили антитела к CD25 (зенапакс или даклизумаб) и очень низкие дозы такролимуса (FK506) и сиролимуса (рапамицина). После трансплантации островков поджелудочной железы экзогенный инсулин был отменен и у всех 5 больных гликемия оставалась в течение 7,2 мес. в пределах нормы. Через несколько месяцев было опубликовано более расширенное сообщение уже о 7 больных сахарным диабетом (А. V. Shapiro и соавт., 2000 в), которым была проведена указанная операция. В качестве иммуносупрессии использовали рапамицин (сиролимус) и FK-506 (такролимус) с антителами к рецепторам ИЛ-2 (даклизумаб). Клиническая эффективность и качество жизни больных после проведенной транс-

плантации островковых клеток была представлена в последующей публикации указанных авторов (E. A. Ryan и соавт., 2001), в которой рассмотрены результаты лечения ранее оперированных 12 больных (4 женщин и 8 мужчин), страдающих сахарным диабетом, которым трансплантация островковых клеток была проведена в соответствии с Эдмонтонским протоколом. Средний возраст больных составил $40 \pm 2,7$ лет, а средняя длительность диабета — $29 \pm 3,2$ лет. У 17% больных до проведенной трансплантации была диагностирована непролиферативная, а у 42% — пролиферативная ретинопатия. Практически у всех больных имелась нефропатия на стадии микроили макроальбуминурии. Средний период наблюдения после операции составил 10,2 мес. Содержание глюкозы в дооперационный период натощак и после приема пищи составлял $12,5 \pm 1,9$ и $20,0 \pm 2,7$ ммоль/л, а после трансплантации уровень глюкозы достоверно снизился до $6,3 \pm 0,3$ и $7,5 \pm 0,6$ ммоль/л. Концентрация HbA1c в крови также достоверно снизилась с $8,3 \pm 0,5\%$ до $5,8 \pm 0,1\%$. Содержание С-пептида натощак составляло $0,66 \pm 0,06$ нмоль/л, а через 1,5 ч после приема пищи — $1,29 \pm 0,25$ нмоль/л. На момент обследования у 4 больных сохранился нормальный глюкозотолерантный тест; у 5 — нарушенная толерантность к глюкозе и у 3 выявлялся посттрансплантационный диабет (2 больных принимали пероральные сахароснижающие препараты и 1 больной — менее 10 ед. инсулина в сутки). У 11 из 12 больных инсулиновая независимость была достигнута лишь после трансплантации 9000 островков на 1 кг массы тела. При проведении глюкозотолерантного теста четко выявлялся положительный ответ в секреции инсулина (область секреции инсулина под кривой). Применение у 8 больных антисыворотки к α -ФНО во время инфузии островков в портальную вену позволило у 3 больных (37%) получить инсулиновую независимость даже в условиях использования островков от одного донора. Используя приведенный протокол для пересадки островков поджелудочной железы, в ряде других центров удалось достичь хороших результатов у больных СД типа 1, освободив последних от инсулиновой зависимости. Результаты этих работ показывают, что островки поджелудочной железы, полученные от доноров, погибших после мозговой травмы, несовместимой с жизнью, после соответствующей процедуры «очистки» и пересадки в печеночную вену функционируют, адекватно регулируя уровень гликемии (J. Shapiro, 2002).

R. Alejandro и соавт. (2001, 2002) сообщили о 7 больных с полным отсутствием инсулиновой зависимости в течение года после внутривенной трансплантации культуры островков человека. Ими были предложены дополнительные к протоколу группы во главе с A. Shapiro процедуры, позволив-

шие уменьшить иммуногенность культуры островков и достичь лучшего уровня иммунологической супрессии до того как указанная культура островков была трансплантирована в печень больного. Эта группа исследователей (C. Ricordi и соавт., 2003) показала, что улучшение выживаемости трансплантированных островковых клеток может быть получен при применении оксигенированных перфторуглеродов для предварительного консервирования донорской поджелудочной железы.

Более длительное сохранение функции островковых клеток и профилактика их отторжения могут быть достигнуты путем индукции толерантности трансплантированным инсулинсекретируемым клеткам несколькими процедурами:

- применением минимально допустимых доз облучения с использованием радиоизотопа самария вместе с лексидроном, достигая при этом высокоуровня клеточного химеризма при минимальных дозах облучения (C. Ricordi и соавт., 2002);

- использованием антител к различным субпопуляциям Т-лимфоцитов и иммунокомпетентным клеткам, участвующим в индукции иммунного ответа (анти-CD154, анти-CD45).

Как известно, селективные моноклональные антитела играют ключевую роль в индукции иммунологической толерантности. Использование антител к CD154 блокирует взаимодействие CD40-CD154 и приводит к множественным эффектам не только на уровне В- и Т-лимфоцитов, но и других клеток (дендритические и эндотелиальные клетки, макрофаги), участвующих в раннем распознавании и деструкции трансплантированных островков, что было продемонстрировано R. D. Molano и соавт. (2003) в эксперименте на моделях аутоиммунного диабета у NOD мышей. Более длительное выживание трансплантированных островков наблюдалось и при блокаде CD45 клеток, которые играют большую роль в активировании лимфоцитов (R. D. Molano и соавт., (2003).

Опубликованы обнадеживающие результаты для улучшения выживания трансплантированных островков путем применения веществ, снижающих скорость апоптоза посредством индукции гемоксигеназы-1 (A. Pileggi и соавт., 2001) или защищающих инсулинпродуцирующие клетки с помощью диффузии в эти клетки протективных и регуляторных белков без их генетической модификации (J. Embury и соавт., 2001).

Наибольшая эффективность функции пересаженных островков сохраняется при проведении трансплантации в портальную вену, но при этом возможны такие осложнения, как кровотечение или тромбоз портальной вены (B. J. Hering и Ricordi C., 1999). Отрицательные последствия внутривенной пересадки островков заключаются также и в том, что в портальном кровообращении наблюдается наиболее высокая концентрация иммуносупрес-

сивных препаратов, принятых через рот, по сравнению с их содержанием в системном кровообращении (А. М. Shapiro и соавт., 1998), что проявляется прямым токсическим влиянием на трансплантированные островковые клетки или их выживание даже при применении нестероидных иммуносупрессивных препаратов (М. Guba и соавт., 2002). В исследованиях Т. Berney и соавт. (2001) продемонстрировано, что влияние эндотоксинов на недостаточность функции пересаженных островков осуществляется через их комплексирование с LPS рецепторами островков с последующим повышением образования цитокинов и усилением апоптоза клеток островка. Возможность оценки функциональной активности трансплантированных внутрипортальным путем островков поджелудочной железы была показана J. F. Markmann и соавт. (2003), применивших метод МРТ для выявления печеночного стеатоза, наличие которого отражает нарушение локальной утилизации инсулина, и ухудшение функции трансплантированных островков.

Следует отметить, что пересадка островков поджелудочной железы также сочетается с рядом осложнений, порой угрожающих жизни больного. Канюлизация портальной вены и инфузия островков поджелудочной железы может осложниться внутренним кровотечением, случайной пункцией желчного пузыря, частичным тромбозом портальной вены, который встречается у 10% больных (Е.А. Ryan и соавт., 2002). Наличие частых тромбозов портальной вены, по мнению L. Moberg и соавт. (2002), является частой причиной низкой эффективности трансплантации островков поджелудочной железы.

Несмотря на явную эффективность предложенной трансплантации островковых клеток, остается ряд моментов, которые свидетельствуют о том, что проблема излечения СД типа 1 пока еще далека от разрешения. Во-первых, для каждого больного требуется 2-3 донорской поджелудочной железы для получения достаточного количества островковых клеток, необходимых для трансплантации. Во-вторых, для предупреждения отторжения пересаженных островков поджелудочной железы следует применять иммуносупрессивную терапию. Хотя последняя и отличается от классической иммуносупрессивной терапии, тем не менее, она оказывает отрицательное влияние на функциональную активность иммунной системы организма. Однако нельзя не отметить, что основным достижением проведенных исследований является разработка метода профилактики отторжения трансплантата и предохранение пересаженных клеток от аутоиммунного разрушения.

Применение для профилактики отторжения пересаженных островков поджелудочной железы сиролимуса и такролимуса несомненно является успехом. Эффективность этих препаратов значительно

превышает использование глюкокортикоидов в качестве иммуносупрессантов, но и эти препараты обладают значительной токсичностью. В действительности трудно поддержать терапевтическую концентрацию препарата в крови на протяжении длительного времени из-за различной скорости абсорбции и их взаимодействия с другими препаратами. Для преодоления этих недостатков требуется разработка таких технологий, при которых трансплантированные клетки островков поджелудочной железы были бы лишены возможности контакта с иммунокомпетентными клетками иммунной системы реципиента, что является определяющим условием для физиологической регуляции секреции инсулина пересаженными клетками. Этому отвечают системы, в которых островковые клетки поджелудочной железы локализируются в «капсулах» или «трубочках», мембраны которых являются иммунологическим барьером для клеток иммунной системы. Исследования в этом направлении проводятся уже более 30 лет, но полученные результаты пока не отвечают всем требованиям, необходимым для сохранения физиологической функции трансплантированных островковых клеток, помещенных в такие капсулы или «забарьерные пространства», что позволило бы полностью изолировать пересаженный материал от клеток иммунной системы в организме человека (D.W. Gray, 2001).

В настоящее время имеется реальная возможность излечения сахарного диабета с помощью аллотрансплантации островковых клеток поджелудочной железы человека при условии выполнения всех требований Эдмонтонского протокола. Однако остается ограниченность биологического материала (поджелудочной железы человека), необходимого для лечения миллионов больных, страдающих диабетом, что диктует необходимость разработки альтернативных методов лечения, направленных на достижение инсулинезависимости у больных СД типа 1. Так, только в США примерно 1 млн больных СД типа 1 показана пересадка островков или поджелудочной железы в комплексе с почками, но при этом имеется дефицит необходимого количества поджелудочной железы. Ежегодно в США имеется около 6000 потенциальных доноров, умерших от травм головного мозга, несовместимых с жизнью. Из этих 6000 донорских органов 1500 поджелудочных желез требуется для пересадки как целого органа, а оставшиеся 4500 потенциальных поджелудочных желез могут быть использованы для получения островков и последующей их трансплантации. Для получения достаточного количества островков, необходимых для одного больного, требуется 3-4 донорских поджелудочных желез. Несложно подсчитать, что оставшихся донорских желез будет достаточно только для того, чтобы сделать последующую

дели
ное
чени
дени
ларс
желк
Г
цели
мос:
сяти
под:
вплс
ций
ных
тац
инсу
непц
У
ных
что
проп
•
•
•
•
•
•
•
•
перс
•
сули
инк
С
диаб
доч
сули
что
ко с
ной
пра
жел
S. M
пол
сви
шь
нял
тел
!
и сс
тип
пор
ков
сусл
чел
дос

трансплантацию островков поджелудочной железы лишь 1000 больных в год. Тогда как только больных сахарным диабетом в США насчитывается около 1 млн пациентов и еще 17 млн больных страдают СД типа 2. Понятно, что решить проблему «излечения» больных сахарным диабетом с помощью трансплантации островков поджелудочной железы, полученных от потенциальных доноров, нереально.

Несмотря на то, что внутрипеченочная пересадка островков поджелудочной железы сочетается с ликвидацией инсулиновой недостаточности у больного сахарным диабетом, остается много вопросов относительно длительности такого положительного эффекта и функции печени, в которой возникает очаг нефизиологической эндокринной секреции. Внутрипортальная инфузия островков поджелудочной железы сопровождается высоким риском кровотечения, портального тромбоза и развития портальной гипертензии. Только перечисленные состояния могут ухудшить работу жизненно важного органа, каким является печень. Кроме того, трансплантируемые с помощью инфузии в портальную систему островки поджелудочной железы образуют в печеночной ткани кластеры, диффузно локализованные в печеночной ткани, которые могут изменить структуру и функции печени. Известно, что 3-5% больных, которым проведена трансплантация почек, ежегодно умирают вследствие отторжения пересаженного органа. Есть основание полагать, что у такого же, если не у большего количества больных будет наблюдаться реакция отторжения пересаженных островков поджелудочной железы. Поэтому требуется длительное наблюдение за больными, которым уже успешно проведены трансплантации островков поджелудочной железы, с целью получения более достоверной информации.

Кроме перечисленных нерешенных проблем, связанных с трансплантацией пересаженных островков поджелудочной железы, остаются вопросы не только сохранения количества пересаженных островков и профилактики уменьшения их количества, которое наблюдается даже после успешно проведенных операций по пересадке островков поджелудочной железы. Необходимы методы, позволяющие на самых ранних этапах установить начало процесса, приводящего к отторжению пересаженного трансплантата. В. Ritz-Laser и соавт. (2002) разработали методику молекулярного определения циркулирующих β -клеток после интрапортальной трансплантации островков поджелудочной железы. Высокочувствительный и специфический молекулярный метод позволяет определить две β -клетки в 1 мл венозной крови с помощью RT-PCR мРНК инсулина. Наличие β -клеток в системном кровообращении определяется у больных СД типа 1 до 10-й недели после внутрипортальной трансплантации

островков поджелудочной железы.

Ранним предиктором начала отторжения пересаженных островков поджелудочной железы является методика, основанная на определении экспрессии генов цитотоксических лимфоцитов (D. Nap и соавт., 2002). Количественное определение с помощью PCR (real-time) методики уровня мРНК транскриптов позволяет идентифицировать время начала отторжения пересаженного органа. Т-клеточнозависимое иммунное активирование генов цитотоксических лимфоцитов является активным участником острой фазы реакции отторжения, а гены гранзима В и перфорина вовлечены в процессы апоптоза, фрагментации ДНК и гибели клеток. Указанная методика позволяет выявить на самых ранних стадиях реакцию отторжения пересаженных островковых клеток, что коррелирует со степенью снижения образования С-пептида еще до развития клинических симптомов нарушения функции островковых клеток.

Установлено, что после «успешной» трансплантации островков поджелудочной железы, полученных от нескольких трупных доноров, общее количество функционирующих островков в организме больного составляет только около 20% от их количества, наблюдаемого у практически здоровых лиц (E.A.Ryan и соавт., 2001). Учитывая, что при этом глюкокортикоиды не применялись в качестве иммуносупрессивных препаратов, было высказано предположение, что за снижение количества пересаженных островков поджелудочной железы ответственны другие еще не известные механизмы или определенные факторы. Одним из механизмов, повреждающих функциональную активность пересаженных островков поджелудочной железы и приводящих к уменьшению их количества, является так называемая «воспалительная реакция, опосредованная способностью крови к растворению». Этот феномен (воспалительная реакция, опосредованная способностью крови к растворению, или instant blood-mediated inflammatory reaction - IBMIR), который был описан W. Bennet и соавт. (2000), развивается *in vitro* при смешивании изолированных островков поджелудочной железы с цельной кровью и проявляется активированием коагуляции и систем компонента, быстрым связыванием и активированием тромбоцитов и активированием поступления лейкоцитов в островки поджелудочной железы. Такой же эффект наблюдался и при интрапортальной трансплантации островков поджелудочной железы обезьянам. Начальный эффект IBMIR сопровождается быстрым уменьшением количества тромбоцитов при одновременной стимуляции секреции β -тромбоглобулина, что является свидетельством активирования тромбоцитов, которые комплексируются с островками с последующим образованием фибрина, что сопровождается одновременным пассажем и ин-

фильтрацией островков лейкоцитами CD11b⁺.

Результаты этих исследований показывают, что для успешной функции пересаженных островков поджелудочной железы необходимо предупредить или снизить степень выраженности IBMIR с помощью аспирина или ингибиторов тромбина, который генерируется из протромбина с помощью серинпротеиназы. Тромбин, в свою очередь, активирует тромбоциты путем взаимодействия со специфическими клеточно-поверхностными рецепторами PAR-1 и PAR-4 (S. R. Coughlin, 2000). В качестве ингибиторов тромбина используются нефракционированный гепарин или герудин. Однако применение этих препаратов ограничено из-за узкого терапевтического окна и незначительной пенетрации в тромб. В последние годы разработан новый высокоспецифический низкомолекулярный ингибитор тромбина – мелагатран (фирма Astra Zeneca), который, имея низкую молекулярную массу (всего 430 Da) и высокую аффинность, способен быстро ингибировать тромбин (H. Eriksson и соавт., 1999). Преклинические исследования показывают, что ингибирование тромбина с помощью мелагатрана снижает степень выраженности IBMIR в исследовании *in vitro* (L. Ozmen и соавт., 2002). Мелагатран даже в высокой концентрации (10 мкмоль/л) не оказывал никакого токсического эффекта на островки или глюкозостимулированную секрецию инсулина. Наивысший эффект действия мелагатрана наблюдался при концентрации 1-4 мкмоль/л, которая приблизительно была в 3-10 раз выше по сравнению с той, которая использовалась для лечения больных с тромбозом глубоких вен (H. Eriksson и соавт., 1999). Эти данные свидетельствуют о том, что для угнетения тромбина *in vitro* обычно требуются более высокие концентрации соответствующего ингибитора. Разработана лекарственная форма мелагатрана в виде таблетированного препарата для приема внутрь (D. Gustafsson и соавт., 2001).

Таким образом, тромбин является одним из главных участников влияния на тромбоциты, коагуляцию и активирование комплемента, что наблюдается при реакции IBMIR, развивающейся после трансплантации островков поджелудочной железы. Ингибитор активности тромбина – мелагатран является перспективным кандидатом для предупреждения гибели и уменьшения количества пересаженных островков, что является следствием реакции IBMIR.

К сожалению, попытки отечественных и зарубежных ученых применения свободной трансплантации как культуры островковых клеток плодов человека, так и ксенотрансплантации (плодов крупного рогатого скота, плодов и новорожденных поросят или кроликов) не могут привести к желаемым результатам по нескольким причинам. Отсутствует возможность выделения и почти 100% очистки ост-

ровков поджелудочной железы от ацинозной и соединительной тканей, антигены которых являются инициаторами иммунного отторжения и аутоиммунной деструкции пересаженных тканей. Для единовременной пересадки требуется не менее 1 000 000 островков, получение которых сопряжено с отсутствием аппаратуры для автоматической сепарации и подсчета островков, которые должны быть получены в течение ограниченного времени и пересажены больному.

По нашему глубокому убеждению, **широкое применение (как это проводится до настоящего времени) отечественными учеными трансплантации культур островковых клеток, полученных из поджелудочной железы поросят или кроликов, должно быть запрещено** по нескольким причинам: во-первых, это ксенотрансплантация, которая вызывает последовательную активацию различных механизмов иммунной системы, приводя к отторжению пересаженных клеток; во-вторых, отсутствие иммуносупрессивной терапии приводит к гибели трансплантируемого материала и, возможно, активизации аутоиммунных механизмов, готовность к которым у больных СД типа 1 достаточно выражена; в-третьих, этические моменты (трансплантации культур островковых клеток новорожденных поросят или кроликов проводится больным на платной основе); в-четвертых, у больных создается иллюзия возможности излечения от сахарного диабета, поэтому у них отсутствует мотивация к проведению интенсивной инсулинотерапии, которая позволяет достичь строгой компенсации сахарного диабета и тем самым замедлить или остановить прогрессирование поздних сосудистых осложнений диабета. Нельзя также не отметить, что во многих странах мира приняты постановления о запрещении парантерального применения препаратов, полученных из различных органов животных, а также трансплантации тканей и органов животного происхождения в связи с возможностью заражения «бешенством коров» и другими заболеваниями.

Имеется ли выход из создавшейся ситуации? Да. Вполне обнадеживающими являются исследования возможности применения для лечения сахарного диабета стволовых клеток, а также подтверждение факта наличия пролиферации β-клеток у взрослого человека.

К стволовым клеткам относятся клетки, обладающие способностью регенерировать дочерние клетки, которые в свою очередь способны образовывать большое количество различных дифференцированных клеток. Различают эмбриональные стволовые клетки и стволовые клетки взрослых. Эмбриональные стволовые клетки являются производными бластоцитов млекопитающих (H.M. Blau и соавт., 2001). Они плюрипотентны и обладают способностью дифференцироваться в различные ткани эмбриона,

включая образование всех трех эмбриональных герминальных слоев и β -клеток поджелудочной железы (В. Е. Reubenoff и соавт., 2000). Взрослые стволовые клетки встречаются значительно реже и участвуют в регенерации различных тканей (печень, мозг, скелетные мышцы, кожа), но, в основном, они выявляются в костном мозге. Стволовые клетки костного мозга могут дифференцироваться в типичные клетки других органов, включая печень, мышцы, мозг и сердце. Эти клетки подобно эмбриональным стволовым клеткам способны к самовозобновлению и образованию дифференцированных клеток. Указанное позволяет считать, что стволовые клетки различных органов, помимо поджелудочной железы, у взрослого способны к образованию в них при особых условиях и β -клеток. Наличие стволовых клеток в поджелудочной железе пока не доказано. Однако обнаружение митоза и неогенеза β -клеток в поджелудочной железе крыс после химической (стрептозотин) или хирургической панкреатэктомии (L. Bouwens и G. Kloppel, 1966) позволяет предполагать, что эти клетки образуются из недифференцированных стволовых клеток. После панкреатэктомии увеличивается количество клеток с содержанием белка PDX1, которые являются производными эпителиальных стволовых клеток протоков поджелудочной железы (A. Sharma и соавт., 1999). Ген PDX1 и белок этого гена необходимы для развития экзокринной и эндокринной части поджелудочной железы в самом раннем периоде ее развития. Регенерация поджелудочной железы, наблюдаемая после панкреатэктомии у лабораторных животных, свидетельствует о возможности наличия стволовых клеток, которые служат источником для образования новых островков, содержащих β -клетки.

Особый интерес представляют исследования V. K. Ramiya и соавт. (2000). В культуре *in vitro* был получен монослой клеток из протоков мышинной поджелудочной железы, содержащих инсулин и глюкагон. Трансплантация такой клеточной суспензии, содержащей не только β -клетки, но и стволовые панкреатические клетки, под капсулу почек NOD мышам приводила к снижению уровня гликемии у них и исчезновению признаков диабета.

Имеются обнадеживающие данные о возможности применения для лечения сахарного диабета глюкагоноподобного пептида (GLP-1), который не только регулирует секрецию инсулина в ответ на поступление углеводов в желудочно-кишечный тракт, но и снижает скорость апоптоза β -клеток и усиливает их пролиферацию. Таким же эффектом обладает печеночный фактор роста. Показано, что у трансгенных мышей с повышенной экспрессией печеночного фактора роста имеются островки, значительно больших размеров, чем островки нормальных животных (A. Garcia-Ocana и соавт., 2001).

Вероятно, применение печеночного фактора роста и глюкагоноподобного пептида-1 и его аналогов будет возможно для терапии СД типа 2, при котором имеется достаточно высокий пул собственных β -клеток, способных под воздействием указанных препаратов увеличиться и полностью обеспечивать организм в необходимом количестве инсулина.

Реальной, по нашему мнению, альтернативой алло- или ксенотрансплантации культур или «свежих» островковых клеток является разработка биотехнологических методов, позволяющих полностью выполнять функцию естественных инсулинсекретирующих клеток.

Оптимизмом для этого являются данные, представленные на 61-м конгрессе Американской диабетической ассоциации 2001 г., о возможности генной терапии сахарного диабета и, в частности, лекция С.В. Newgard по искусственным конструкциям или системам, функционирующим почти адекватно естественным β -клеткам. За основу создания системы, секретирующей инсулин, была взята β -клетка (стволовые, а возможно и иммортализованные β -клетки) островка поджелудочной железы человека с использованием вектора аденовируса и цитомегаловируса. Инкорпорация аденовируса, содержащего ген β -галактозы, в изолированные островки крысы способствовала экспрессии гена в 70-80% островков. Используя INS-1 линию β -клеток, Н. Е. Hohmeier и соавт. (2000) получили высокореливантный клон 832/13, который обладал в течение 9 мес способностью к секреции инсулина в ответ на стимуляцию глюкозой, а затем с помощью аденовирусопосредованной методики была получена линия INS-1 β -клеток, способных к экспрессии гена глицеринкиназы, необходимого для осуществления глицеринстимулированного синтеза и высвобождения инсулина (R. J. Noel и соавт., 1997). Методом селекции клеток инсулиномы был получен клон, резистентный к γ -интерферону и интерлейкину-1 β , которые, как известно, опосредуют иммунный ответ (G. Chen и соавт., 2000). На пути успешной разработки генетической конструкции или системы из модифицированных β -клеток, способной автономно функционировать по принципу «обратной связи» и секретировать адекватное количество инсулина, как показано в лаборатории, руководимой С.В. Newgard (2002), возникает множество проблем. Считается, что в β -клетке при различных ее состояниях экспрессируется сотни и даже тысячи генов и необходима идентификация наиболее важного количества генов, которые должны являться мишенями для терапевтического воздействия как при СД типа 1, так и СД типа 2. Генная терапия СД типа 1, видимо, будет решена раньше, чем успешная терапия СД типа 2. Созданные отдельные

компоненты такой системы, функционирующие по принципу «обратной связи», способны контролировать скорость секреции инсулина в зависимости от содержания глюкозы в окружающей среде культуры таких клеток «инженерных» β -клеток. Такие «инженерные» β -клетки сохраняли свою функциональную активность при подкожном, внутрикожном и внутримышечном введении экспериментальным животным. Представленные исследования вселяют оптимизм в возможность создания в недалеком будущем новых терапевтических возможностей, позволяющих излечивать СД типа 1.

В одном из докладов на этом же конгрессе сообщалось о возможности проведения неинвазивной (пероральной) генной терапии экспериментального диабета. При этом модифицированная кДНК проинсулина человека помещается в специальную касету вместе с аденоассоциированным вирусным терминалом. После попадания в желудочно-кишечный тракт крысиный инсулиновый промотер осуществляет соответствующий контроль за экспрессией гена инсулина в нейроэндокринных клетках кишечника. Помимо снижения содержания глюкозы в крови у диабетических животных, наблюдаемого через 6-18 ч после перорального приема «системы», отмечалось длительное поддержание эугликемического состояния, опосредованного, вероятно, трандукцией гепатоцитов. Кроме того, были также представлены данные о возможном использовании генетически измененных печеночных клеток в качестве продуцентов инсулина. Два вида печеночных клеток человека (клетки HEP G2 и HUH7) с кДНК инсулина человека при специальном контроле цитомегаловирусного промотера секретировали проинсулин человека, который накапливался в гранулах цитозоля клеток и секретировался в ответ на изменение уровня глюкозы в окружающей среде. Такие клетки продолжали секретировать инсулин после их трансплантации диабетическим иммунонекомпетентным мышам в количестве, необходимом для поддержания эугликемического состояния животных. Впервые, таким образом, была продемонстрирована возможность использования клеток печени для индукции их в клетки, которые могут являться «полноценной заменой» панкреатическим β -клеткам с последующим их использованием для проведения радикальной терапии СД типа 1.

Еще одним доказательством возможности разработки биотехнологического метода лечения сахарного диабета являются исследования по изучению становления эндокринной функции поджелудочной железы в период эмбрионального развития, что привело к открытию белка, являющегося транскрипционным фактором (PDX-1), контролирующим развитие поджелудочной железы и транскрипцию гена инсулина (J. Jonsson и соавт., 1994). В по-

следующем было установлено, что указанный фактор также трансактивирует экспрессию гена соматостатина в островках поджелудочной железы и двенадцатиперстной кишке, в связи с чем он также известен под названием IDX-1/STF-1/IPF-1. Фактор PDX-1 экспрессируется не только в период эмбриогенеза, но и во взрослом состоянии, что сочетается с неогенезом островков и дифференцировкой инсулинпродуцирующих клеток из прогениторных (стволовых) клеток. Через несколько лет были открыты так называемые белковые транскрипционные домены (PTDs), позволяющие белкам транслоцироваться через плазматическую мембрану и затем поступать в ядро клетки без эндоцитоза (E.R. Schwarze и соавт., 1999). Наличие PTD в третичной структуре хомеодомена антеннапедиа (транскрипционный дрозодильный фактор) является необходимым и достаточным условием для транслокации этого пептида в цитоплазму и ядро клеток. Было установлено, что белок PDX-1 регулирует собственную экспрессию посредством А-элемента своего собственного промотера, что вызывает индукцию экспрессии других генов β -клеток, необходимых для экспрессии гена инсулина (S. Marshak и соавт., 2000).

H. Noguchi и соавт. (2003) впервые показали, что способность белка PDX-1 проникать внутрь клеток является следствием наличия в нем собственного специфического антеннапедиаподобного белка, и его функция аналогична действию PDX-1. Этот белок обладает способностью проникать в изолированные островки поджелудочной железы, комплексуясь с промотером гена инсулина и активируя его экспрессию. Кроме того, белок PDX-1 проникает в клетки панкреатических протоков, которые, как считают, являются прогениторными (стволовыми) клетками, индуцируя в них экспрессию гена инсулина. Эти исследования позволяют предположить, что экзогенный PDX-1 может быть использован в качестве своеобразного «усилителя» транскрипции гена инсулина, что позволяет разработать метод лечения СД типа 1 без применения генной трансферной технологии. Показана возможность дифференцировки *in vitro* и *in vivo* панкреатических клеток человека в инсулинпродуцирующие клетки под влиянием транскрипционного фактора, каким является белок PDX1 (De la Tour D. Dufayet и соавт., 2001).

Разрабатываются возможности применения генной терапии для лечения сосудистых осложнений диабета. Показана возможность использования генной терапии для индукции ангиогенеза с помощью ангиогенных ростовых факторов для лечения критической ишемии нижних конечностей (Т. Т. Rissanen и соавт., 2001) и лечения ИБС с помощью генной терапии плазмидой, ответственной за синтез сосудистого эндотелиального ростового фактора (С. Sylven и соавт., 2001).

В настоящее время имеется ряд биотехнологических методов и направлений лечения сахарного диабета.

- Генерация β -клеток из стволовых клеток, полученных от больного сахарным диабетом. Получение таких клеток *in vitro* в количестве, достаточном для поддержания нормального углеводного обмена. Культура таких клеток может быть реимплантирована в порталную систему печени или другие ткани и не будет подвержена процессам отторжения, так как является производным собственных клеток организма. В качестве такого «усилителя» образования β -клеток из стволовых может быть использован экзогенный (возможно, генноинженерного происхождения) белок PDX-1.

- Генетическая манипуляция человеческих островковых клеток с целью повышения их резистентности к окислительному стрессу, снижению или снятию антигенности, что позволит уменьшить или даже ликвидировать возможность их иммунологиче-

ского повреждения и отторжения.

- Индукция образования собственных β -клеток у больного сахарным диабетом с помощью различных генетических манипуляций, результатом чего может быть дифференцировка островковых или инсулин-секретирующих клеток из ацинозных клеток протоков поджелудочной железы.

- Генетическая модификация *in vitro* (может быть и *in vivo*) различных клеток (фибробластов, гепатоцитов и др.) больного диабетом с возможностью достижения регулируемой секреции инсулина этими клетками с последующей их ретрансплантацией в организм того же больного.

- Создание генетических конструкций *in vitro* с использованием островковых клеток различных животных, способных к регулируемой секреции инсулина, и трансплантируемых в организм человека в виде микрокапсул или других приспособлений, предохраняющих клетки от воздействия иммунной системы хозяина.

Литература

1. Gruessner A., Sutherland D. E. R., Pancreas transplants for United States (US) and non US cases reported to International Pancreas Transplant Registry (IPTR) and to the United network for organ sharing (UNOS), In: Cecka M., Terasaki P (eds): Clinical transplants, 1997, Los Angeles, UCLA Tissue Typing laboratory, 1998
2. Ojo A. O., Meier-Kriesche H. U., Hanson J. A. et al., The impact of simultaneous pancreas-kidney transplantation on long-term patient survival // *Transplantation* – 2001 – Vol. 71 – P. 82-90
3. Reddy K. S., Stablein D., Taranto S. et al., Long-term survival following simultaneous kidney-pancreas transplantation versus kidney transplantation alone in patients with type 1 diabetes mellitus and renal failure // *Am J Kidney Dis* – 2003 – Vol. 41 – P. 464-470
4. Bunnapradist S., Cho Y. W., Cecka J. M. et al., Kidney allograft and patient survival in type 1 diabetic recipients of cadaveric kidney alone versus simultaneous pancreas/kidney transplants: A multivariate analysis of the UNOS database // *J Am Soc Nephrol* – 2003 – Vol. 14 – P. 208-213
5. Najarian J. S., Sutherland D. E. R., Matas A. J. et al. Human islet transplantation: a preliminary report // *Transplant. Proc.* – 1977. – Vol. 9. – P. 233-236
6. Kumar A., Newstead C. G., Lodge J. P., Davidson A. M., Combined kidney and pancreatic transplantation: ideal for patients with uncomplicated type 1 diabetes and chronic renal failure // *B M J.* – 1999. – Vol. 318. – P. 886-887
7. Holohan T.V., The federal role in health technology assessment // *Lancet* – 1996 – Vol. 348 – P.1006-1007
8. Шумаков В.И., Блюмкин В. Н., Игнатенко С. Н. И др., Культуры островковых клеток поджелудочной железы плодов человека и трансплантация их больной сахарным диабетом // *Пробл. Эндокринолог.* – 1981. – №1. – стр.25-30
9. Шумаков В. И., Блюмкин В. Н., Игнатенко С. Н. И др. Результаты трансплантации культур островковых клеток поджелудочной железы больным сахарным диабетом // *Пробл. Эндокринолог.* – 1985. – №5. – стр.67-70
10. Ricordi C., Lacy P. E., Finke E/ et al. Automated method for isolation of human pancreatic islets // *Diabetes.* – 1988. – Vol. 37. – P. 413-420
11. Ricordi C., Lacy P. E., Scharp D. W. et al. Automated islet isolation from human pancreas // *Diabetes.* – 1989. – Vol. 38. – Suppl. 1. – P. 140-142
12. Alejandro R., Lehmann R., Ricordi C. et al., Long-term function (6 years) of islet allografts in type 1 diabetes mellitus // *Diabetes.* – 1997. – Vol. 46. – P. 1983-1989
13. Hering B. J., Ricordi C., Islet transplantation for patients with type 1 diabetes // *Graft Review.* – 1999. – Vol. 2. – P. 12-27
14. Bertuzzi F., Grohova F., Maffi P. et al., Successful transplantation of human islet in recipients bearing a kidney graft // *Diabetologia.* – 2002. – Vol. 45. – P. 77-84
15. Kenyon N. S., Fernandez L. A., Lehmann R. et al., Long-term survival and function of intrahepatic islet allografts in baboons treated with humanized anti-CD154 // *Diabetes* – 1999 – Vol. 48 – P. 1473-1481
16. Contreras J. L., Eckhoff D. E., Cartner S. et al., Tolerability and side effects of anti-CD3-immunotoxin in preclinical testing in kidney and pancreatic islet transplant recipients // *Transplantation* – 1999 – Vol. 68 – P. 215-219
17. Shapiro A. M., Lakey J. R., Ryan E. A. et al. Metabolic control after insulin independence in solitary islet transplantation for type 1 diabetes mellitus // *Diabetes.* – 2000a. – Vol. 49. – Suppl. 1. – P.A31
18. Shapiro A. M., Lakey J. R., Ryan E. A. et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a corticoid-free immunosuppressive regimen // *N. Engl. J. Med.* – 2000a. – Vol. 27. – P. 230-238
19. Ryan E. A., Lakey J., Rajotte R. V. et al. Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50. – P.710-719
20. Shapiro J., Eighty years after insulin: Parallels with modern islet transplantation // *CMAJ* – 2002 – Vol. 167 – P. 1398-1400
21. Alejandro R., Caulfield A., Froud T. et al., Insulin independence following transplantation of cultured human islets // *Cell Transplant.* – 2001. – Vol. 10. – P. 520
22. Alejandro R., Ferreira J. V., Caulfield A. et al., Insulin independence in 7 patients following transplantation of cultured human islets // *Am J Transplant.* – 2002. – Vol. 2. – Suppl. 3. – P. 227
23. Ricordi C., Fraker C., Szust J. et al., Improved human islet isolation outcome from marginal donors following addition of oxygenated perfluorocarbon to the cold storage solution // *Transplantation.* – 2003. – Vol. 75. – P. 1524-1527
24. Ricordi C., Linetsky E., Molano R. D. et al., High level stable hemolymphopoietic chimerism and long term islet allograft survival following novel targeted bone marrow radioablation, bone marrow transplantation and co-stimulatory blockade // *Transplantation.* – 2002. – Vol. 74. – P. 99
25. Molano R.D., Pileggi A., Berney T. et al., Prolonged islet allograft survival in diabetic NOD mice by targeting CD45RB and CD154 // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 53. – P. 957-964
26. Pileggi A., Molano R. D., Berney T. et al., HO-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved *in vivo* function after transplantation // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50. – P. 1983-1991
27. Embury J., Klein D., Pileggi et al., Proteins linked to a protein transduction domain (PTD) efficiently transduce pancreatic islets // *Diabetes.* – 2001. – Vol. 50. – P. 1706-1713
28. Shapiro A. M., Gallant H., Hao E. et al., Portal vein immunosuppressant levels and islet graft toxicity // *Transplant Proc.* – 1998. – Vol. 30. – P. 641-645
29. Guba M., von Breitenbuch P., Steinbauer M. et al., Rapamicin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor // *Nature Med.* – 2002. – Vol. 8. – P. 128-135
30. Berney T., Molano R. D., Cattan P. et al., Endotoxin-mediated delayed islet graft function is associated with increased intra-islet cytokine production and islet cell apoptosis // *Transplantation.* – 2001. – Vol. 70. – P. 125-132
31. Markmann J., F., Rosen M., Siegelman E. S. et al., Magnetic resonance-defined periportal steatosis following intraportal islet transplantation // *Diabetes.* – 2003. – Vol. 52. – P. 1591-1594
32. Ryan E. A., Lakey J., Paty B.W. et al., Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control // *Diabetes* – 2002 – Vol. 51 – P. 2148-2157
33. Moberg L., Johansson H., Lukinius A. et al., Production of tissue factor by pancreatic islet cells as a trigger of detrimental thrombotic reactions in clinical islet transplantation // *Lancet* – 2002 – Vol. 360 – P. 2039-2045