Трансплантация островков: прорыв в новый мир

К. Рикорди

Diabetes Research Institute, University of Miami School of Medicine, Miami, Florida, USA

CAMILLO RICORDI, M.D.
ISLET CELL TRANSPLANTATION
Diabetes Research Institute, University of Miami, Miami, Florida

The discovery of insulin changed the course of history in the treatment of diabetes. However, despite tremendous progress in insulin formulations and treatment strategies, insulin treatment still cannot fully prevent chronic complications and intensive insulin treatment to improve metabolic control, has often paralleled an increased risk of severe hypoglycemia. A cure for Type 1 diabetes should include:

- Restoration of self tolerance, to prevent recurrence of autoimmunity
- Restoration of physiologic metabolism by replacement of the biologic function (insulin producing cells) that was partially of completely impaired as a result of the disease process.
- Prevention of destruction of the new insulin producing cells by the recipient immune system in the absence of any treatment that could introduce an additional risk to the patient, which could be comparable to, or higher than the risk imposed by disease progression under exogenous insulin treatment.

Pancreatic islets could be considered an ideal and more physiologic alternative to insulin, as they can restore metabolic control after transplantation, preventing the development of chronic complications. In fact, islets are capable of perfectly timed insulin release and can keep glucose levels in the normal range, functioning for an entire lifetime, if they are not destroyed by the recipient's immune system.

Significant progress has been recently reported in the translational research approach towards the development of a cure for Type 1 diabetes. There is now strong evidence for the technical feasibility of human islet isolation and purification procedures. Proof of function of isolated human islets has been clearly established both in animal models and in pilot clinical trials of human islet allotransplantation in patients with surgical and Type 1 diabetes.

Additional research in now needed to improve the current clinical results in terms of long term prevention of rejection and recurrence of autoimmunity, the development of safe, non diabetogenic immunomodulation strategies and ultimately the achievement of donor specific immune tolerance. If success will be achieved in these areas, then we will face the critical challenge of

identifying sufficient and suitable sources of insulin producing tissue to treat the increasing number of patients who could benefit from this form of therapy and which would not be limited to Type 1 diabetes. That is why the work on xenogeneic islets, embryonic and adult stem cells, islet regeneration and proliferation, as well as engineering of insulin producing cells must be continued, to identify the most ideal source of insulin producing tissue that could be utilized on a large scale once the impediments and limitations of immunosuppression will be resolved.

В работе представлены основные этапы развития трансплантации островков – от разработки гипотезы до клинического применения.

Главной целью является лечение диабета. Это заболевание было хорошо известно еще много сотен лет назад и потребовалось 3500 лет, чтобы установить связь между диабетом и поджелудочной железой, но до открытия инсулина он оставался изнуряющей болезнью со смертельным исходом. Открытие инсулина Бантингом и Бестом в 1922 г. изменило ход истории лечения диабета и дало детям с этим заболеванием новую надежду сохранить жизнь. Лечение инсулином не в состоянии полностью предотвратить хронические осложнения диабета, а интенсивная инсулинотерапия с целью нормализации обменных процессов чревата повышенным риском тяжелой гипогликемии [1]. Идея пересадки инсулинпродуцирующей ткани для коррекции дефекта эндокринного компонента поджелудочной железы как более физиологичного способа устранения инсулиновой недостаточности по сравнению с введением экзогенного гормона отнюдь не нова [2, 3]. Трансплантированные панкреатические островки нормализуют метаболический контроль и предотвращают развитие хронических осложнений. Они не только сами вырабатывают инсулин, но и обеспечивают его точно контролируемую во времени секрецию. Если трансплантат не разрушается иммунной системой реципиента, инсулинпродуцирующие клетки способны поддерживать нормальный уровень глюкозы в крови и остаются функционально активными на протяжении всей жизни пациента.

В 1893 г. английский хирург Уотсон Уильямс впервые попытался пересадить фрагменты поджелудочной железы овцы 15-летнему мальчику. Фактически это была первая попытка использовать ксенотранплантат островков, которая почти на три десятилетия опередила открытие инсулина [4]. В 1929 г. итальянцу Бранкати удалось продемонстрировать сохранение пересаженных островков в течение 1 мес после того, как он индуцировал ацинарную атрофию, перевязав проток поджелудочной железы. Однако истинным отцом трансплантации островков является Поль Е.Лейси, который в 1969 г. впервые описал методику получения островков из поджелудочной железы грызунов, а спустя несколько лет осуществил их успешную трансплантацию этим животным [2, 3].

Почему же потребовалось столько времени, чтобы получить островки поджелудочной железы человека в форме и количестве достаточных для устранения диабета после их пересадки больному? Причина в том, что человеческая поджелудочная железа сильно отличается от железы грызунов и других мелких животных, на которых такая работа была проведена впервые. Выделению сотен тысяч островков, рассеянных в поджелудочной железе человека, в значительно мере препятствовало отсутствие реактивов для ферментативного гидролиза панкреатической ткани, особенности ее со-

Permission Reguest Number № 030304-8 From: Diabetes, 2003, Vol.52, p. 1595-1603

става и плотная структура, а также индивидуальные различия доноров. В 1970-1980-х годах методика выделения человеческих островков была столь же травматичной для клеток сколько и неэффективной. В дело шло все, что попадалось под руку, начиная от ножниц для измельчения ткани и пункционных игл разного размера для ее извлечения, до смесителей, гомогенизиторов, пищевых миксеров и даже модифицированных мясорубок.

В 1984 г. нами предложен принципиально иной подход. Гвидо Поцца предоставил мне уникальную возможность разработать концепцию на базе центра по выделению островков в Университете Вашингтона в Сент-Луисе, в лабораториях Поля Е.Лейси и его сотрудника Дэвида Шарпа. В то время эта группа еще использовала мясорубку, которую называли «мацератором ткани» и которая напоминала один из инструментов, применявшихся компанией Эли Лилли для измельчения ткани поджелудочной железы на ранних стадиях производства инсулина [5]. Вначале сама мысль о помещении цельной поджелудочной железы в камеру и получении свободных островков на выходе из нее без существенной механической обработки представлялась еретической. В 1986 г. мы перешли от «мацератора ткани» к автоматизированному выделению островков. Автоматизированная методика вытеснила все ранее использовавшиеся процедуры [6, 7]. Сначала поджелудочную железу осторожно отделяют от двенадцатиперстной кишки. Находят главный и вспомогательные протоки, накладывают на них лигатуры и разделяют. Затем в проток поджелудочной железы вставляют канюлю, через которую в нее поступает смесь ферментов, включающая коллагеназу. Железу помещают к экстракционную камеру, где происходит процесс непрерывного переваривания, и орган распадается на все более мелкие фрагменты.

Последние собирают на выходе из камеры, где ферменты инактивируются системами охлаждения и разбавления. Весь процесс контролируется визуально. Когда разрабатывалась эта методика, дитизон (дифенилтиокарбазон) еще не использовался для окрашивания островков в характерный красный цвет [8] и для идентификации островков при мониторинге процесса переваривания иногда требовался немалый навык. Заключительной стадией была очистка островков, основанная на использовании градиентов плотности, в ходе которой небольшую фракцию островков отделяли от преобладающей экзокринной и неостровковой ткани. Впоследствии для очистки стали использовать специализированные процессоры клеток (COBE 2991 Cell Processor; COBE Lakewood, CO) [9, 10]. Островки, заключенные в тонкую оболочку из экзокринной ткани [11], также пригодны для использования. Задача состоит в том, чтобы сохранить требуемый объем ткани (обычно менее 5-7 мл), инфузируемой в портальную вену реципиента.

Чем моложе донор, тем труднее получить высокоочищенные островки [12]. У доноров в возрасте нескольких месяцев поджелудочная железа настолько мала, что нет необходимости в заключительной процедуре очистки, и большинство клеточных кластеров островки либо, вероятно, их предшественники. В последние 15 лет автоматизированная методика была значительно усовершенствована благодаря сотрудничеству ведущих лабораторий в Сент-Луисе, Майами, Милане, Гессене, Эдмонтоне, Миннеаполисе и других центрах, которым принадлежит коллективная заслуга в разработке той методологии, которая теперь используется в большинстве клинических исследований по трансплантации островков [13, 17].

Доказательство функциональной состоятельности пересаженных островков у человека является значительно более трудной задачей. Нас, однако, не удовлетворяла краткосрочность функции островков, поскольку стало известно, что их действие прекратилось через 12 дней после отмены инсулина [18].

В январе 1990 г. мы провели первую успешную серию пересадок 6 островковых аллотрансплантатов, которые обеспечили независимость от инсулина больным с полностью удаленной поджелудочной железой. Было получено неопровержимое доказательство возможности долгосрочного (до 5 лет) устранения диабета и зависмости от инсулина путем аллотрансплантации человеческих островков [19-21]. Успех питтсбургского исследования позволил включить применение FK-506 (прографа) для аллотрансплантации человеческих островков в протокол нестероидной иммуносупрессии. Беспрецедентно длительный срок инсулинонезависимости у реципиентов островков был воспринят как важный прорыв в трансплантологии и вызвал энтузиазм среди специалистов в этой области.

Гистологические исследования биоптатов печени показали, что островки, имплантированные в этот орган, сохраняются в печени на протяжении нескольких лет без отторжения или рецидивов аутоиммунной реакции [22-24]. Исследователи нашего центра установили, что то небольшое число островковых аллотрансплантатов, которые продолжали длительное время функционировать у больных диабетом, обеспечивало нормализацию содержания HbA1c без тяжелых приступов гипогликемии [25, 26]. Важным достижением стало получение ферментативных смесей с низким содержанием эндотоксинов. К 1996 г. все реагенты для выделения человеческих островков соответствовали требованиям Управления по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств США [27]. Отрицательная роль эндотоксинов при пересадке островков была установлена в исследовании группы Л.Инверарди [28].

С помощью разработанной методики, включая применение свободных от эндотоксинов реагентов [27] и современные способы ведения больных до и после трансплантации, группе из Гессена под руководством д-ра Херинга и д-ра Бретцеля удалось полностью устранить потерю трансплантатов в раннем послеоперационном периоде. Все пересаженные островки оставались функционально активными в течение следующего года, а 40% больных не нуждались в инсулине [29]. Поступило сообщение об успешной серии пересадок островков в Милане, где инсулин был отменен у 60% больных с аллотрансплантатами [30]. Важный шаг был сделан Джеймсом Шапиро из эдмонтонской группы, который разработал протокол нестероидной иммуносупрессии на основе рапамицина [31]. Ис-

пользование этого протокола позволило отменить инсулин у 33 больных; у 70% из них независимость от инсулина сохранялась в течение последующих 2 лет наблюдения.

Эдмонтонское исследование не устранило всех проблем, касающихся трансплантации островков. Недавно мы представили новый протокол культивирования островков, позволяющий избежать их пересадки сразу после выделения, как это практиковалось в указанном исследовании [32, 33].

Достижением в области трансплантации островков стало применение окисленных перфторокарбонов для сохранения поджелудочной железы, впервые описанное Курода и Матсумото применительно к экспериментальным моделям. Мы успешно испытали методы претрансплантационного культивирования и использования перфторокарбонов в ходе исследования трансплантации островков в Майами [34].

Клиническое применение позволило обеспечить независимость от инсулина в течение года 15 больным, включая 3, которым островки были пересажены д-рами Гроссом, Бруникарди и их сотр. в Бэйлоровском медицинском колледже Хьюстона. При этом были использованы островки, полученные в Майами и переданные в Хьюстон [35]. Наш опыт показывает, что для устранения диабета обычно требовалась двукратная инфузия островков, хотя несколько пациентов смогли прекратить введение инсулина после первой инфузии. Результаты непрерывного мониторинга гликемии свидетельствуют о значительном улучшении состояния больных после пересадки при полном отказе от инъекций инсулина.

В нескольких клиниках Северной Америки и Европы с помощью трансплантации островков удалось освободить больных от инсулиновой зависимости. Во всех этих центрах больные СД 1 типа после пересадки островков на протяжении последних 12 мес не нуждаются в инсулинотерапии.

Одна из наиболее трудных задач, которую придется решать в ближайшем будущем, состоит в разработке стратегии иммуносупрессии веществами, не оказывающими токсического действия на пересаженные островки. Хорошо известно, что стероиды вызывают гибель островков [36], но известно также, что даже ингибиторы кальцинейрина, такие как FK506 [37] или циклоспорин, сами по себе в отсутствие стероидов могут оказывать неблагоприятное воздействие на трансплантаты.

Диабетогенность ингибиторов кальцинейрина, включаемых в протоколы нестероидной иммунодепрессии, была подтверждена нашей группой при исследовании реципиентов с трансплантатами в печени, которые получали поддерживающую терапию низкими дозами FK506 или циклоспорина А [38]. В исследовании под руководством Н.Кеньон показано, что применение недиабетогенной иммуносупрессии, основанной на ко-стимулирующей блокаде анти-CD154 монотерапией, заметно улучшает функцию островков в посттрансплантационном периоде. В течение первого года после пересадки постепенно нормализуются 1-я и 2-я фаза секреции инсулина во внутривенном тесте толерантности к глюкозе.

Инфузия донорских клеток костного мозга в неонатальном периоде может индуцировать у реципиента специфичную нечувствительность к донорским тканям [39]. Это позволило пересаживать органы и ткани от того же донора без подавления иммунных реакций.

Антонио Монако первым попытался использовать эту концепцию в клинической практике при аллотрансплантации почек взрослым пациентам [40].

В экспериментах по трансплантации костного мозга мы показали, как индукция толерантности к тканям донора способствует репродукции клеток, которые имели морфологическую структуру дендритов и обнаруживались во всех анализированных тканях, включая кожу, мозг и тимус [41, 42].

В антигенных клетках дендритного фенотипа имеет место экспрессия инсулина и других островковых аутоантигенов [43]. Дендриты не только участвуют в индукции толерантности к аллоантигенам, но и способствуют выработке аутотолерантности. У больных СД 1 типа индукция толерантности имеет критическое значение как для предотвращения отторжения пересаженных островков иммунной системой реципиента [44, 45], так и для предупреждения рецидивов аутоиммунной реакции.

Как известно, трансплантация костного мозга и образование химерных клеток либо обеспечивают защиту от диабета, либо способствуют его развитию [46-48]. Такая стратегия имеет двойной защитный эффект, индуцируя толерантность к пересаженным островкам и восстановление аутотолерантности, что предотвращает рецидивы аутоиммунной реакции.

Связь химерообразования с приживлением пересаженной ткани и толерантностью к ней в клинических условиях в последнее десятилетие служит темой оживленных дебатов. В 1992 г. мы сообщили, что после успешной клинической трансплантации донорские клетки костного мозга мигрируют в ткани реципиента [49], как и в предшествовавших экспериментах на грызунах [41]. Мы наблюдали двусторонний транспорт иммунных клеток: иммунные клетки реципиента мигрировали в пересаженный орган, а имевшиеся в последнем клетки костного мозга мигрировали в противоположном направлении и проникали в такни реципиента [49]

Анализ проб крови и тканевых биоптатов таких толерантных больных выявлял присутствие клеток костного мозга [50, 51]. В исследованиях по инфузии донорского костного мозга с целью индукции толерантности были получены весьма обнадеживающие результаты [52], особенно у лиц с пересаженной почкой, которым во время трансплантации вводили донорский костный мозг. Его инфузия предотвращала хроническое отторжение на протяжении

более 6 лет после пересадки [53-55]. Для индукции толерантности при пересадке островков в клинических условиях скорее всего потребуется повысить интенсивность химерообразования, поскольку в наших исследованиях по трансплантации островков и инфузии донорских клеток-предшественников костного мозга мы не могли предотвратить потерю имплантатов при отмене иммуносупрессии [56].

Избирательные моноклональные антитела могут найти применение для индукции толерантности [58]. Некоторые из них, изучаемые в настоящее время, действуют на уровне ко-стимуляторных механизмов, активирующих Т-клетки. Толерантность легче достигается в отсутствие ко-стимуляции. Мы изучили возможность применения одного вида таких антител (анти-CD154), при трансплантации островков. Блокада взаимодействия CD40-CD154 с этими антителами сопровождалась множественными эффектами не только на уровне В- и Т-клеток, но и на уровне других клеток, которые могут быстро узнавать и разрушать пересаженные островки [59, 60].

Эффективность монотерапии анти-CD154 продемонстрирована в доклинических исследованиях на обезьянах. Эти антитела играют ведущую роль в регуляции сигналов активации лимфоцитов [63].

Для стимулирования и объединения усилий в области изучения индукции толерантности Национальный институт здравоохранения недавно создал Сеть иммунотолерантности под руководством Джеффа Блустоуна. В настоящее время осуществляется первое многоцентровое исследование трансплантации островков с целью воспроизведения результатов эдмонтонской группы.

Необходим поиск новых источников инсулинпродуцирующих тканей. Даже после того, как индукция толерантности станет реальностью, мы сможем излечивать не более 1% больных диабетом, если доступность донорского панкреатического материала от человека останется на прежнем уровне. Для лечения большого числа больных диабетом необходима разработка альтернативных стратегий [64]. Прежде всего следует максимально повысить эффективность использования трупных поджелудочных желез, а также минимизировать потери островков до и после их выделения, чтобы использовать небольшое число или даже единственного донора как источник материала для введения нескольким реципиентам. Успешное культивирование островковых клеток in vitro позволило бы использовать часть поджелудочной железы живых доноров. Однако более радикальное решение проблемы связано, по-видимому, с применением островковых клеток животных или клеточных линий человека, получаемых методами генной инженерии. Еще одной альтернативой может стать использование человеческих островков, выращенных из эмбриональных стволовых клеток или даже из стволовых клеток взрослых людей.

Ряд подходов, направленных на улучшение функционирования пересаженных островков in vivo, основывается на обеспечении их максимального выживания и предотвращении апоптоза, например, посредством индукции гемоксигеназы-1 [65]. Другая стратегия состоит в трансдукции белковых доменов [66], основанной на способности протекторных и регуляторных белков диффундировать в такие клетки, не вызывая их устойчивой генетической модификации.

Достигнуты успехи и в области пролиферации зрелых β-клеток [67]. Установлена ко-локализация маркера пролиферации BrdU и инсулина в присутствии фактора роста. Последние исследования Стьюарта и сотр., проведенные в Питтсбургском университете, подтвердили правильность данной концепции, поскольку у трансгенных мышей с избыточной экспрессией фактора роста гепатоцитов островки поджелудочной железы оказались значительно крупнее, чем у нормальных особей того же помета [68].

Использование островков поджелудочной железы животных и техники инкапсулирования также может стать способом получения неограниченного количества инсулинпродуцирующих клеток. Проведенные нами и другими авторами исследования показали, что островки из свиной поджелудочной железы можно эффективно получать с помощью методов, сходных с используемыми при выделении человеческих островков [69].

Значительные усилия направлены на изучение стволовых клеток и возможности получения панкреатических клеток. Важной инициативой нашего института является программа клеточной биологии и передачи сигналов, которая осуществляется под руководством шведского специалиста Пер-Олофа Берггрена. Ожидается внедрение новых уникальных методов для выявления и мониторинга метаболических механизмов в β-клетках.

Выражаю благодарность моим учителям Гвидо Поцца, Полю Лейси, Томасу Старзлу, Андреасу Цакису и Даниэлю Минцу за их неоценимую помощь и поддержку, которыми я пользовался многие годы. Я признателен также моим заместителям по научной работе Родольфо Алейандро, Норме Кеньон и Луке Инверарди, которые являют собой наглядный пример истинной преданности и самоотдачи нашему делу. Хотел бы поблагодарить также Луиджи Менеджини, Рону Голдбергу и Джею Скайлеру – трем заместителям директора по клинической работе в Научно-исследовательском институте диабета. Я бы никогда не получил Награду за выдающиеся научные достижения 2002 г., если бы Джей Скайлер не осведомился о моем возрасте. Я благодарен моим многочисленным коллегам, написавшим прекрасные письма в поддержку моего выдвижения, а также сотрудникам Института диабета, Программы трансплантации в Университете Майами и многих других учреждений, вместе с которыми я работал все эти годы. Отдельного упоминания заслуживает Дэвид Харлан, который инициировал программу трансплантации в Национальном институте здравоохранения в сотрудничестве с нашим институ-

том в Майами. Хочу выразить благодарность Джеймсу Шапиро и Джонатану Лейки из Эдмонтона и Бернарду Херингу из Миннеаполиса за постоянное сотрудничество в работе по совершенствованию трансплантации островков и за их вклад в большинство описанных выше результатов в области клинической трансплантологии. Я признателен и благодарен учреждениям, которые поддерживали и продолжают поддерживать нашу работу, в первую очередь, NIDDK, поддержкой которого мы пользовались в течение последних 20 лет, а также NCRR, NIAID, JDRFI, ADA, IFW, NDRI, Объединению друзей и Фонду Якокка. В последние годы мы сотрудничали с Сетью иммунотолерантности, Регистром трансплантации островков и Сетью ресурсов островковых клеток. Мы не смогли бы выполнить нашу работу без поддержки Фонда НИИ диабета и его президента Роберта Перлмена. Хотел бы специально упомянуть семейство Рамона Пу, которое помогло нам разработать и внедрить в разных странах оборудование для разделения островковых клеток. Моя глубочайшая признательность – союзам AFL-CIO, которые дотировали строительство и оказывают поддержку работам нашего Института, а также Фонду Стаси Джой Гудмен, который выделил средства на мою кафедру и продолжает поддерживать важнейшие исследовательские программы Института.

Я хотел бы посвятить эту награду и лекцию Лилли за 2002 г. памяти Стаси Джой Гудмен. Стаси Джой болела диабетом и ей было всего 17 лет, когда однажды утром она не проснулась из-за тяжелой гипогликемии. Пусть ее судьба, как и судьбы многих других детей, служит нам постоянным напоминанием, что одного инсулина недостаточно и что нужно упорнее, чем когда-либо, продолжать поиск других средств лечения диабета.

Настоящая работа частично поддержана Национальным институтом здравоохранения (гранты 2R01 DK25802-20, SU42 RP016603-02, 5R01 DK56953-03), Фондом изучения ювенильного диабета, Американской диабетической ассоциацией и Фондом НИИ диабета.

Литература

1. The DCCT Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 329:977–986, 1993
2. Lacy PE, Kostianovsky M // Diabetes 16:35–39, 1967
3. Ballinger WF, Lacy PE // Surgery 72:175–186, 1972
4. Ricordi C, Ed. Pancreatic Islet Cell Transplantation; 1892–1991 // Austin, TX, R.G. Landes, 1992
5. Bliss M: The Discovery of Insulin. Chicago, The University of Chicago Press, 1982
6. Ricordi C, Lacy PE, Finke EH, Olack BJ, Scharp DW // Diabetes 37:413–420, 1988
7. Ricordi C: // Austin, TX, R.G. Landes Company, 1992, p. 99–112
8. Latif ZA, Noel J, Alejandro R // Transplantation 45:827–830, 1988
9. Lake SP, Bassett PD, Larkins A, Revell J, Walczak K, Chamberlain J, Rumford GM, London NJ, Veitch PS, Bell PR // Diabetes 38 (Suppl. 1):143–145, 1989
10. C. Ricordi, Ed. Methods in Cell Transplantation. Austin, TX, RG Landes, 1995
11. Ricordi C, Alejandro R, Rilo HHL, Carroll PB, Tzakis AG, Starzl TE, Mintz DH // Transplant Proc 27:3382, 1995
12. Ricordi C, Alejandro R, Zeng Y, Tzakis A, Cassavilla A, Jaffe R, Mintz DH, Starzl TE // Transplant Proc 23:783–784, 1991
13. Ricordi C, Lacy PE, Sterbenz K, Davie JM // Proc Natl Acad Sci U S A84:8080 –8084, 1987
14. Ricordi C, Scharp DW, Lacy PE // Transplantation 45:994 –996, 1988
15. Ricordi C, Kneteman NM, Scharp DW, Lacy PE // World J Surg 12:861–865, 1988
16. Ricordi C, Hering BJ, London NJM, Rajotte RV, Gray DWR, Sutherland DER, Socci C, Alejandro R, Carroll PB, Bretzel RG, Scharp DW // Pancreatic Islet Cell Transplantation; 1892–1992: One Century of Transplantation for Diabetes. Ricordi C, Ed. Austin,TX, R.G. Landes Company, 1992, p. 132–142
17. Ricordi C, Gray D, Hering B, Kaufman D, Warnock G, Kneteman N, Lake S, London N, Socci C, Alejandro R, Zeng Y, Scharp D, Viviani G, Tzakis A, Bretzel R, Federlin K, Pozza G, James R, Rajotte R, Di Carlo V, Morris P, Sutherland D, Starzl T, Mintz D, Lacy P // Acta Diabetol Lat 27:185–195, 1990
18. Scharp DW, Lacy PE, Santiago JV, McCullough CS, Weide LG, Falqui L, Marchetti P, Gingerich RL, Jaffe AS, Cryer PE // Diabetes 39:515–518, 1990
19. Tzakis A, Ricordi C, Alejandro R, Zeng Y, Fung J, Todo S, Demetris A, Mintz D, Starzl T // Lancet 336:402–405, 1990
20. Ricordi C, Tzakis AG, Carroll PB, Zeng Y, Rilo HLR, Alejandro R, Shapiro R, Fung JJ, Demetris AJ, Mintz DH, Starzl TE // Transplantation 53:407–414, 1992
21. Ricordi C, Rilo HL, Carroll PB, Fontes P, Shapiro R, Tzakis AG, Alejandro R, Behboo R, Rastellini C, Fung JJ // Transplant Proc 26:569, 1994
22. Ricordi C, Tzakis A, Alejandro R, Zeng Y, Demetris AJ, Carroll P, Mintz DH, Starzl TE // Transplantation 52:1079 –1080, 1991
23. Ricordi C, Sever CE, Carroll PB, Tzakis AG, Zeng Y, Rilo HLR, Demetris AJ, Alejandro R, Starzl TE // Transplant Proc 24:976, 1992
24. Sever CE, Demetris AJ, Tzakis A, Carroll P, Zeng Y, Fung JJ, Starzl TE, Ricordi C // Am J Pathol 140:1255–1260, 1992
25. Wahoff DC, Sutherland DE // Ann Surg 222:562–579, 1995
26. Alejandro R, Lehmann R, Ricordi C, Angelico MC, Kenyon NS, Burke G, Esquenazi V, Nery J, Betancourt AE, Kong SS, Miller J, Mintz DH // Diabetes 46:1983–1989, 1997
27. Linetsky E, Bottino R, Lehmann R, Alejandro R, Inverardi L, Ricordi C // Diabetes 46:1120 –1123, 1997
28. Berney T, Molano RD, Cattan P, Pileggi A, Vizzardelli C, Oliver R, Ricordi C, Inverardi L // Transplantation 70:125–132, 2001
29. Hering BJ, Ernst W, Eckhard M, Brandhorst H, Brandhorst D, Jahr H, Grossmann R, Brendel M, Friemann S, Federlin K, Bretzel RG // Diabetes 46 (Suppl. 1):64A, 1997
30. Bertuzzi F, Grohovaz F, Maffi P, Caumo A, Aldrighetti L, Nano R, Hengster P, Calori G, Di Carlo V, Bonifacio E, Secchi A // Diabetologia 45:77–84, 2002
31. Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV // N Engl J Med 343:230 –238, 2000
32. Alejandro R, Caulfield A, Froud T, Ferreira J, Rothenberg L, Al-Abdullah IH, Baidal D, Kirlew TJ, Kenyon NS, Ricordi C // Cell Transplant 10:520, 2001
33. Alejandro R, Ferreira JV, Caulfield A, Froud T, Baidal D, Geiger M, Rothenberg L, Al-Abdullah IH, Kirlew T, Kenyon NS, Ricordi C // Am J Transplant 2 (Suppl. 3):227, 2002
34. Ricordi C, Fraker C, Szust J, Al-Abdullah I, Poggioli R, Kirlew T, Khan A, Alejandro R // Transplantation 75:1524 –1527, 2003
35. Goss JA, Schock AP, Brunicardi FC, Goodpastor SE, Garber AJ, Soltes G, Barth M, Froud T, Alejandro R, Ricordi C // Transplantation 74: 1761–1766, 2002
36. Rodriguez Rilo HL, Carroll PB, Zeng YJ, Fontes P, Demetris J, Ricordi C // Transplantation 57:181–187, 1994
37. Ricordi C, Zeng Y, Alejandro R, Tzakis A, Venkataramanan R, Fung J, Bereiter D, Mintz DH, Starzl TE // Transplantation 52:519 –522, 1991
38. Fernandez LA, Lehmann R, Luzi L, Battezzati A, Angelico MA, Ricordi C, Tzakis A, Alejandro R // Transplantation 68:1532–1541, 1999
39. Billingham RE, Brent L, Medawar PB // Nature 172:603–606, 1953
40. Monaco AP, Wood ML, Maki T, Madres PN, Sahyoun AI, Simpson MA // Transplant Proc 17:1312, 1985

41. Ricordi C, Ildstad ST, Demetris AJ, Abou El-Ezz AY, Murase N, Starzl TE // Lancet 339:1610 –1611, 1992
42. Ricordi C, Ildstad ST, Starzl TE // Transplant Sci 2:34 –38, 1992
43. Pugliese A, Brown D, Garza D, Murchison D, Zeller M, Redondo M, Diez J, Eisenbarth GS, Patel DD, Ricordi C // J Clin Invest 107:555–564, 2001
44. Zeng Y, Ricordi C, Tzakis AG, Rilo HLR, Carroll PB, Starzl TE, Ildstad ST // Transplantation 53:277–283, 1992
45. Ricordi C, Zeng Y, Carroll PB, Rilo HLR, Bereiter DR, Starzl TE, Ildstad ST // Surgery 112:327–332, 1992
46. LaFace DW, Peck AB // Diabetes 38:894 –901, 1989
47. Li H, Kaufman CL, Boggs SS, Johnson PC, Patrene KD, Ildstad ST // J Immunol 156:380 –388, 1996
48. Mathieu C, Casteels K, Bouillon R, Waer M: // J Immunol 158:1453–1457, 1997
49. Starzl TE, Demetris AJ, Noriko M, Ildstad ST, Ricordi C, Trucco M // Lancet 339:1579 –1582, 1992
50. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Zeevi A, Ramos H, Terasaki P, Rudert WA, Kocova M, Ricordi C, Ildstad A, Murase N // Transplantation 55:1272–1277, 1993
51. Starzl TE, Demetris AJ, Murase N, Thomson AW, Trucco M, Ricordi C // Trends Pharmacol Sci 14:217–223, 1993
52. Ricordi C, Karatzas T, Nery J, Webb M, Selvaggi G, Fernandez L, Khan FA, Ruiz P, Schiff E, Olson L, Fernandez H, Bean J, Miller J, Tzakis AG // Transplantation 63:7–11, 1997
53. Garcia-Morales R, Carreno M, Mathew J, Zucker K, Ciancio G, Burke G, Roth D, Temple D, Rosen A, Fuller L, Esquenazi V, Karatzas T, Ricordi C, Tzakis A, Miller J // J Clin Invest 99:1118 –1129, 1997
54. Miller J, Mathew J, Garcia-Morales R, Zucker K, Carreno M, Jin Y, Fuller L, Burke G, Ciancio G, Tzakis A, Ricordi C, Olson L, Rosen A, Roth D, Esquenzai V // Transplantation 68:1079 –1090, 1999
55. Ciancio G, Miller J, Garcia-Morales RO, Carreno M, Burke GW III, Roth D, Kupin W, Tzakis AG, Ricordi C, Rosen A, Fuller L, Esquenazi V // Transplantation 71:827–835, 2001
56. Ferreira JV, Froud T, Caulfield A, Rothenberg L, Al-Abdullah IH, Geiger MC, Baidal DA, Kirlew TJ, Garcia-Morales R, Kenyon NS, Alejandro R, Ricordi C // Transplantation 74:108, 2002
57. Ricordi C, Linetsky E, Molano RD, Pileggi A, Serafini AN, Paganelli G, Inverardi L // Transplantation 74:99, 2002
58. Hering BJ, Ricordi C, Sutherland D, Bluestone JA // Oxford, UK, Blackwell Publishing, 2001, p. 512–518
59. Parker DC, Greiner DL, Phillips NE, Appel MC, Steele AW, Durie FH, Noelle RJ, Mordes JP, Rossini AA // Proc Natl Acad Sci U S A92:9560 –9564, 1995
60 Molano RD, Berney T, Li H, Cattan P, Pileggi A, Vizzardelli C, Kenyon NS, Ricordi C, Burkly LC, Inverardi L // Diabetes 50:270 –276, 2001
61. Kenyon NS, Fernandez LA, Lehmann R, Masetti M, Ranuncoli A, Chatzipetrou M, Iaria G, Han D, Wagner JL, Ruiz P, Berho M, Inverardi L, Alejandro R, Mintz DH, Kirk AD, Harlan DM, Burkly LC, Ricordi C // Diabetes 48:1473–1481, 1999
62. Kenyon NS, Chatzipetrou M, Masetti M, Ranuncoli A, Oliveira M, Wagner JL, Kirk AD, Harlan DM, Burkly LC, Ricordi C // Proc Natl Acad Sci U S A 96:8132–8137, 1999
63. Molano RD, Pileggi A, Berney T, Poggioli R, Zahr E, Oliver R, Ricordi C, Rothstein DM, Basadonna GP, Inverardi L // Diabetes 53:957–964, 2003
64. Hering B, Ricordi C // Graft 2:12–27, 1999
65. Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattan P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L // Diabetes 50:1983–1991, 2001
66. Embury J, Klein D, Pileggi A, Ribeiro M, Jayaraman S, Molano RD, Fraker C, Kenyon N, Ricordi C, Inverardi L, Pastori RL // Diabetes 50:1706 –1713, 2001
67. Hayek A, Beattle GM, Cirulli V, Lopez AD, Ricordi C, Rubin JS // 1458–1460, 1995
68. Garcia-Ocaнч a A, Vasavada RC, Cebrian A, Reddy V, Takane KK, Lopez-Talavera J-C, Stewart AF // Diabetes 50:2752–2762, 2001
69. Ricordi C, Socci C, Davalli A, Staudacher C, Baro P, Vertova A, Sassi I, Gavazzi F, Pozza G, Di Carlo V // Surgery 107:688 –694, 1990