

## АЛЛОТРАНСПЛАНТАЦИЯ МАКРОИНКАПСУЛИРОВАННЫХ ПАРАТИРЕОЦИТОВ В ЛЕЧЕНИИ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ГИПОПАРАТИРЕОЗА: КЛИНИЧЕСКОЕ НАБЛЮДЕНИЕ

Хрыщанович В.Я.<sup>1</sup>, Третьяк С.И.<sup>1</sup>, Харламова А.Н.<sup>1</sup>, Мохорт Т.В.<sup>1</sup>, Богомазова Е.В.<sup>1</sup>, Кузьменкова Е.И.<sup>2</sup>, Кондратович В.А.<sup>3</sup>, Писаренко А.М.<sup>3</sup>, Романович А.В.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

<sup>2</sup> ГУ «Республиканский центр медицинской реабилитации и бальнеолечения»,

<sup>3</sup> УЗ «Минский городской клинический онкологический диспансер»,

<sup>4</sup> УЗ «4-я городская клиническая больница г. Минска», Республика Беларусь

Аллотрансплантация макроинкапсулированных клеток парашитовидной железы является длительной терапевтической альтернативой в лечении тяжелых форм послеоперационного гипопаратиреоза. Подобная технология позволяет восполнить гормонодефицит путем имплантации клеток или ткани парашитовидной железы без применения иммуносупрессии. В настоящем сообщении приводятся сведения о возможности эффективного функционирования паратиреоидного аллотрансплантата у пациентки с тяжелым гипопаратиреозом, длительное время получавшей парентеральную заместительную терапию препаратами кальция. Макрокапсула, содержащая ~100 000 паратиреоцитов, была сконструирована из микропористой мембраны поливинилидендифторида (ПВДФ) и имплантирована в глубокую бедренную артерию. Функциональная активность трансплантата, прослеженная на протяжении 3 месяцев, позволила исключить парентеральное введение препаратов кальция и компенсировать течение заболевания.

*Ключевые слова:* гипопаратиреоз, аллотрансплантация, паратиреоцит.

## ALLOTRANSPLANTATION OF MACROENCAPSULATED PARATHYROID CELLS IN SEVERE POSTSURGICAL HYPOPARATHYROIDISM: A CASE REPORT

Khryshchanovich V.Ja.<sup>1</sup>, Tretyak S.I.<sup>1</sup>, Kharlamova A.N.<sup>1</sup>, Mochort T.V.<sup>1</sup>, Bogomazova E.V.<sup>1</sup>, Kuzmenkova E.I.<sup>2</sup>, Kondratovich V.A.<sup>3</sup>, Pisarenko A.M.<sup>3</sup>, Romanovich A.V.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Belarusian State Medical University,

<sup>2</sup> Republic rehabilitation and balneotherapy centre,

<sup>3</sup> Minsk clinical oncological hospital,

<sup>4</sup> 4th Minsk clinical hospital.

The last therapeutic alternative in severe postsurgical hypoparathyroidism is allotransplantation of macroencapsulated parathyroid cells. With this technique, it is possible to implant cells or tissue of parathyroid origin to replace them in such patients, without immunosuppression. We report an allotransplant of parathyroid cells in a patient with continuous endovenous requirement of calcium to survive. The macroencapsulation was carried out with a polyvinylidene difluoride (PVDF). We implant ~100 000 parathyroid cells in the deep femoral artery. In this article, we show functionality of the graft for at least 3 months without requirement of endovenous calcium. We report this procedure as a therapeutical alternative in severe hypoparathyroidism.

*Keywords:* hypoparathyroidism, allotransplantation, parathyroid cell.

Статья поступила в редакцию 26.05.11 г.

**Контакты:** Хрыщанович Владимир Янович, к. м. н., ассистент кафедры хирургических болезней УО Белорусского государственного медицинского университета.

**Тел.** +375 172 87 86 52, **моб.** +375 29 624 55 78, **e-mail:** vladimirkh77@mail.ru

## ВВЕДЕНИЕ

Паратиреоидная аллотрансплантация является обоснованной и зачастую единственной терапевтической альтернативой для пациентов с тяжелыми формами послеоперационного гипопаратиреоза. Исследования, проведенные Tolloczko et al. [11], показали возможность выживания и функционирования пересаженной паратиреоидной ткани в течение 18 месяцев без применения иммуносупрессии. Однако основной проблемой подобных пересадок является реакция отторжения как следствие аллоиммунизации или воспалительного ответа с последующим развитием фиброза, что существенно сокращает продолжительность функционирования трансплантата.

С целью преодоления реакции отторжения и увеличения сроков жизнеспособности паратиреоидного трансплантата предпринимались попытки типирования пар «донор – реципиент» по гаплотипу и системе АВО. Кроме того, для предупреждения реакции отторжения была предложена методика микро- и макроинкапсуляции пересаживаемой ткани, принцип которой основан на создании механического барьера, препятствующего проникновению антител, комплемента и лейкоцитов и в то же время позволяющего беспрепятственно диффундировать нутриентам и гормонам [16]. Наши предыдущие исследования в отношении панкреатических островковых клеток и тироцитов показали, что в токе крови возможно долговременное сохранение жизнеспособности и функционирования ксеногенной ткани без использования иммуносупрессивной терапии, то есть сосудистое русло является одной из иммунологически привилегированных зон [13]. В настоящем сообщении представлено трехмесячное клиническое наблюдение за пациенткой, страдающей тяжелой формой послеоперационного гипопаратиреоза, которой была произведена аллотрансплантация макроинкапсулированных паратиреоцитов. Проведенное лечение позволило исключить парентеральное введение препаратов кальция, стабилизировать показатели сывороточной кальциемии, купировать основные симптомы заболевания на фоне сниженных дозировок пероральной заместительной терапии. Предварительные результаты исследования свидетельствуют о возможности применения аллотрансплантации макроинкапсулированных паратиреоцитов как альтернативного метода лечения тяжелых форм гипопаратиреоза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реципиентом была женщина 39 лет, которой в анамнезе (в возрасте 23 лет) выполнялась тотальная тиреоидэктомия по поводу тиреоидита Хашимото. Течение послеоперационного периода ослож-

нилось развитием тяжелой симптоматической гипокальциемии, потребовавшей ежедневного приема таблетированных препаратов кальция (1 000 мг), холекальциферола (400 МЕ), дигидротахистерола (48 капель), а также 1–2 раза в неделю внутривенного введения 40 мг кальция хлорида. Несмотря на проводимую заместительную терапию, сохранялись мышечные судороги и парестезии, а уровень общего сывороточного кальция не превышал 1,22 ммоль/л. Концентрация паратгормона в периферической крови составила 6,87 пг/мл. Парентеральное введение кальция хлорида неоднократно осложнялось развитием длительно не заживающих некрозов мягких тканей верхних и нижних конечностей. Компьютерная томография головного мозга выявила кальцификацию базальных ганглиев.

Учитывая тяжелое течение послеоперационного гипопаратиреоза и неэффективность заместительной терапии, было принято решение о проведении аллотрансплантации макроинкапсулированных и криоконсервированных паратиреоцитов, полученных из паратиреоидной ткани живого неродственного донора (мужчина в возрасте 27 лет), страдающего вторичным гиперпаратиреозом на фоне хронической почечной недостаточности [2]. Фрагмент каждой из удаленных гиперплазированных паратиреоидных желез подвергался патоморфологическому исследованию. Результаты сывороточного серологического исследования исключили контаминацию донора вирусами иммунодефицита, гепатита В и С, *Treponema pallidum*.

Выделение, обработка донорской паратиреоидной ткани и культивирование клеток проводились в асептических условиях в ламинарном боксе. Образцы железы доставлялись в лабораторию в транспортной среде на основе DMEM, содержащей 10% сыворотку и антибиотики (гентамицин – 100 мкг/мл, пенициллин – 100 МЕ/мл). Время хранения биоматериала до посева клеток составило не более 5 часов при температуре +4 °С. Выделение клеточной биомассы осуществляли путем механического измельчения ткани до фрагментов размером 0,1–2 мм<sup>3</sup>, а также ферментативной обработки коллагеназой II типа (1%), трипсином (0,25%), ДНК-азой (0,01%). Время инкубации с ферментами составило 18 часов при 4 °С, затем 10 минут при 37 °С. Длительность криоконсервации паратиреоцитов до пересадки – 30 суток. Концентрация паратгормона в культуральной жидкости после размораживания – 1385–5000 пг/мл. Последующее культивирование паратиреоцитов подтвердило микробиологическую чистоту и стерильность трансплантата.

Макрокапсулу конструировали в виде цилиндрической трубки длиной 15–20 мм и наружным диаметром 3–4 мм из микропористой мембраны поливи-

нилиндифторида (ПВДФ) толщиной  $157 \pm 2$  мкм, диаметром пор  $0,55\text{--}1,37$  мкм и пористостью 28,2%, после чего  $\sim 100\,000$  паратиреоцитов путем инъекционного введения помещали в просвет капсулы. Под спинно-мозговой анестезией инкапсулированный трансплантат имплантировали в просвет глубокой бедренной артерии с последующей пластикой артериотомического отверстия PTFE-заплатой. Проходимость артерии подтверждали пальпаторно в конце операции, а также в послеоперационном периоде при помощи ультразвуковой доплерографии. В посттрансплантационном периоде осуществляли лабораторный контроль сывороточных показателей кальциемии, фосфатемии, паратгормона (Roche, PTH-DRG).

Исследование было выполнено в рамках государственного научно-технического проекта «Разработать и внедрить способ хирургического лечения больных гипотиреозом и гипопаратиреозом путем трансплантации тироцитов и паратиреоцитов» (№ госрегистрации 20101562), проведение которого было одобрено этическим комитетом УЗ «Городская клиническая больница скорой медицинской помощи г. Минска» после получения информированного согласия пациентки на проведение хирургического вмешательства.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Послеоперационный период протекал без осложнений, рана зажила первичным натяжением, швы сняты на 10-е сутки. Умеренный болевой синдром в области раны в течение первых трех суток после операции купировали назначением противовоспалительных препаратов (кетопрофен 100 мг внутримышечно 3 раза в сутки). Профилактику артериальных тромботических осложнений осуществляли путем подкожного введения низкомолекулярного гепарина в течение 5 суток (фрагмин 5 000 ЕД/сутки).

На рис. изображена динамика послеоперационных показателей кальциемии и паратгормона. Показатели общего сывороточного кальция в течение первых 30 суток после операции колебались в пределах  $1,22\text{--}1,7$  ммоль/л, к 39-м суткам –  $1,65$  ммоль/л, к 47-м суткам –  $1,9$  ммоль/л. Через 7 суток после пересадки концентрация паратгормона составила  $5,8$  пг/мл, однако уже на 33-и сутки увеличилась до  $12,3$  пг/мл, а на 90-е сутки послеоперационного периода – до  $21,15$  пг/мл, что явилось основанием для прекращения парентерального введения кальция и двукратного снижения дозировки таблетированных препаратов заместительной терапии. В посттрансплантационном периоде показатели сывороточного фосфора снизились с  $1,97$  до  $1,66$  ммоль/л, что свидетельствовало об адекватном влиянии паратгормона на процессы почечной реабсорбции.

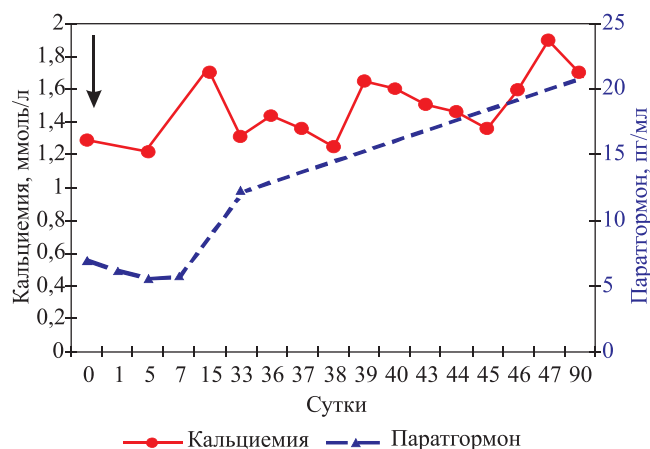


Рис. Показатели общего сывороточного кальция (непрерывная линия) и паратгормона (пунктирная линия) у пациентки с тяжелым послеоперационным гипопаратиреозом после аллотрансплантации макроинкапсулированных паратиреоцитов. Стрелкой указан момент трансплантации

Симптомы гипокальциемии на протяжении всего периода наблюдения манифестировали однократно (33-и сутки после операции), а их развитию предшествовали диспепсические расстройства – боли в эпигастрии и правом подреберье, тошнота, многократная рвота. Следует отметить, что уровни сывороточного кальция не коррелировали с показателями паратгормона, что можно объяснить нерегулярным пероральным приемом препаратов кальция вследствие периодически возникавших эпизодов гастродуоденита. Ультразвуковая доплерография, выполненная через 3 месяца после операции, подтвердила проходимость глубокой бедренной артерии в месте имплантации капсулы с паратиреоцитами без существенных нарушений гемодинамики: диаметр основного ствола глубокой бедренной артерии и ее ветвей I порядка на стороне оперативного вмешательства составил 5,5 и 4,3 мм соответственно (линейная скорость кровотока – 36 и 50 см/с) vs 5,6 и 4,4 мм на противоположной стороне (линейная скорость кровотока – 82 и 52 см/с).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Тотальная тиреоидэктомия является стандартным оперативным вмешательством, выполняемым по поводу рака щитовидной железы. В последнее время отмечается расширение показаний к выполнению тотальной тиреоидэктомии у пациентов с доброкачественными тиреоидными заболеваниями, включая тиреоидит Хашимото и болезнь Грейвса, с невысокими показателями послеоперационных осложнений. Тем не менее после подобных операций послеоперационный гипопаратиреоз развивается у 1,5–2,5% пациентов. В большинстве случаев положительный клинический эффект оказыва-

ет традиционная заместительная терапия таблетированными препаратами кальция и витамина Д, однако у некоторых пациентов вследствие персистирующей тетании возникает необходимость в частых госпитализациях и парентеральном введении хлорида или глюконата кальция [9]. Вместе с тем следствием длительной медикаментозной терапии гипопаратиреоза может быть развитие гастрита, уrolитиаза, нефрокальциноза, кальцифилаксии, которые существенно снижают качество жизни пациентов. Таким образом, лечение целого ряда пациентов с гипопаратиреозом требует поиска постоянной терапевтической альтернативы, которая бы позволила эффективно восстановить паратиреоидную функцию, исключить или сократить объем заместительной медикаментозной терапии, а также уменьшить количество ее осложнений. Последнее обстоятельство особенно важно, поскольку, по данным экспериментальных исследований, использование синтетического паратгормона в лечении гипопаратиреоза сопряжено с риском развития остеосаркомы [7].

В связи с этим паратиреоидная трансплантация выгодно отличается от уже существующих методов лечения гипопаратиреоза, но до настоящего времени накоплен совсем небольшой клинический опыт подобных пересадок. С целью преодоления реакции отторжения путем снижения иммуногенности трансплантата предпринимались попытки HLA-типирования, облучения и культуральной модификации клеток. Поскольку перманентный гипопаратиреоз в очень редких случаях представляет угрозу для жизни пациента, применение иммуносупрессивной терапии крайне нежелательно. Максимальная продолжительность функционирования паратиреоидного аллотрансплантата (13 лет) была зафиксирована у пациента, страдающего хронической почечной недостаточностью, которому производилась пересадка почки и паратиреоидной ткани с последующей иммуносупрессией [1, 12]. Tolloczko et al. [10] осуществили пересадку культивированных аллогенных паратиреоцитов под фасцию недоминирующего предплечья 44 пациентам с предварительным определением концентрации паратгормона в культуральной жидкости, уровня экспрессии МНС-антигенов и HLA-типированием. В одном случае длительность функционирования трансплантата без применения иммуносупрессии достигла 18 месяцев, однако потребность в заместительной терапии препаратами кальция осталась на исходном уровне. В 1983 г. впервые возникла идея о необходимости инкапсуляции-иммунопротекции паратиреоидной ткани с целью предотвращения реакции отторжения и увеличения периода жизнедеятельности трансплантата [8]. Указанная концепция предполагала предтрансплантационную иммубилизацию клеток или ткани в гелевые микросфе-

ры, представляющие собой молекулярный фильтр до 150 кД, создающий механический барьер для иммуноглобулинов, компонентов комплемента и иммунокомпетентных клеток реципиента и вместе с тем не препятствующий транспорту нутриентов и продуктов клеточной секреции. Однако большинство подобных микрокапсул провоцируют развитие неспецифического воспалительного ответа с последующим перикапсулярным фиброзом и неминуемым снижением функциональной активности трансплантата.

Hasse et al. [5] одними из первых выполнили аллотрансплантацию совместимых по системе АВО микроинкапсулированных паратиреоцитов в плечелучевую мышцу двум пациентам с тяжелым гипопаратиреозом. В течение 3 месяцев после имплантации 20 альгинат-гелевых микросфер отмечалось постепенное повышение концентрации паратгормона и кальция в сыворотке крови реципиентов. В то же время сотрудники этой же исследовательской группы Zimmerman et al. [17] сообщили о дисфункции трансплантата через 3 месяца после внутримышечной пересадки. Несмотря на то что еще на протяжении 1 года наблюдалось некоторое увеличение концентрации паратгормона (Casanova-тест) в периферической крови одной из верхних конечностей (место трансплантации), гистологическое исследование соответствующих образцов, взятых с согласия одного из пациентов, не обнаружило даже следов как паратиреоидной ткани, так и микросфер. По мнению авторов, столь парадоксальные результаты могли быть обусловлены биodeградацией альгината и/или миграцией микрокапсул. Несколько позже Ulrich et al. [15] создали микрокапсулы из целлюлозосодержащих гелей и сообщили о повышении уровня паратгормона (цифровые данные не указываются) и уменьшении на 50% потребности в заместительной терапии препаратами кальция у одного из двух пациентов, которым была произведена паратиреоидная аллотрансплантация. Необходимо отметить, что авторы не приводят сведений о количестве имплантированных микросфер.

Накопленный к настоящему времени относительно небольшой опыт паратиреоидной аллотрансплантации не позволяет провести сравнительный анализ эффективности разных иммуноизолирующих подходов. Некоторые исследователи производили микроинкапсуляцию предварительно культивированных *in vitro* клеток, что приводило к уменьшению их иммуногенности посредством элиминации антигенов I и II классов гистосовместимости. По мнению других авторов, более предпочтительной является трансплантация нативной или криоконсервированной паратиреоидной ткани, поскольку строгая клеточная селекция может приводить к нарушению эндокринной функции паратиреоцитов

вследствие диссоциации межклеточных взаимодействий и снижению чувствительности кальциевых рецепторов [4].

В настоящее время важное значение придается физико-химическим характеристикам микропористых полимерных материалов, используемых для макроинкапсуляции клеточных трансплантатов. К традиционным проблемам, связанным с инкапсуляцией, относятся воспалительная реакция окружающих тканей на имплантируемый материал, рациональный выбор и стандартизация оптимального диаметра пор, химическая нестабильность пористых материалов в биологической среде [18]. В этой связи необходимо отметить, что недостаточно длительная стабильность иммуноизолирующего материала присуща, как правило, для альгинат-поли-L-лизиновых микрокапсул. Учитывая постимплантационный некроз и разрушение ~60% клеток в процессе криоконсервации, некоторые авторы рекомендуют идти по пути инкапсуляции большего количества клеточной биомассы для достижения длительного терапевтического эффекта пересадки [14].

Несмотря на определенные положительные результаты клеточной аллотрансплантации с использованием полимерных микрокапсул, в проведенном исследовании мы изучили эффективность макроинкапсуляции криоконсервированных паратиреоцитов, полученных от живого неродственного и несовместимого донора. В результате клинического применения разработанной технологии у пациентки с тяжелым гипопаратиреозом нами были получены объективные доказательства функционирования паратиреоидного трансплантата в течение 3 месяцев: повышение концентрации паратгормона и двукратное снижение дозировки таблетированных препаратов заместительной терапии. Ультразвуковое ангиосканирование артерий в области вмешательства через 3 месяца после операции выявило фиксированный трансплантат в просвете глубокой бедренной артерии, признаков тромбоза и сужения артерии отмечено не было. Опираясь на результаты собственных исследований, можно утверждать, что артериальное сосудистое русло как место для имплантации инкапсулированных паратиреоцитов обладает достаточными иммунопротективными свойствами, поскольку неповрежденная интима является мощным гистогематическим барьером, который обеспечивает нестандартный иммунный ответ на пересаженную ткань, что в конечном итоге позволяет длительно сохраняться чужеродной ткани в организме реципиента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По нашему мнению, в перспективе аллотрансплантация макроинкапсулированных паратирео-

цитов может стать методом выбора в лечении тяжелых форм гипопаратиреоза. Наряду с невысокой травматичностью оперативного вмешательства и возможностью его выполнения в большинстве хирургических стационаров, дополнительным преимуществом разработанного способа является возможность проведения повторных пересадок в случае снижения функциональной активности паратиреоидного трансплантата. Дальнейшего изучения требуют вопросы, касающиеся пористости, биосовместимости и длительной стабильности микропористых мембран, а также необходимости МНС- и АВО-типирования пар «донор – реципиент» и потребности в иммуносупрессии [6, 3]. Разработанная нами технология макроинкапсуляции аллогенных паратиреоцитов с последующей их имплантацией в артериальное сосудистое русло позволила существенно увеличить сроки функционирования клеточного трансплантата, не применяя иммуносупрессию.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Alfrey E.J., Perloff L.J., Asplund M.W. et al.* Normocalcemia thirteen years after successful parathyroid allografting in a recipient of a renal transplant // *Surgery*. 1992. Vol. 111. P. 234.
2. *Cabané P., Oviedo S., Romero C. et al.* Primary culture and immortalization of parathyroid cells to cell transplant in postsurgical hypoparathyroidism // *Rev Chil Cirugi'a*. 2003. Vol. 55. P. 617.
3. *Cabané P., Rossi R., Oviedo S. et al.* Establecimiento de la primera linea celular de paratiroides humana // *Rev Hospital Clinico U de Chile*. 2006. Vol. 17. P. 13.
4. *Cabané P., Gac P., Amat J. et al.* Allotransplant of microencapsulated parathyroid tissue in severe postsurgical hypoparathyroidism: a case report // *Transplant Proc.* 2009. Vol. 41. P. 3879–3883.
5. *Hasse C., Klöck G., Schlosser A. et al.* Parathyroid allotransplantation without immunosuppression // *Lancet*. 1997. Vol. 350. P. 1296.
6. *Mallet A., Korbitt G.* Alginate modification improves long-term survival and function of transplanted encapsulated islets // *Tissue Eng.* 2008. Vol. 14. P. 1.
7. *Sato M., Ma L., Hock J.M. et al.* Skeletal efficacy with parathyroid hormone in rats was not entirely beneficial with long-term treatment // *J. Pharmacol Exp. Ther.* 2002. Vol. 302. P. 304.
8. *Sollinger H., Mack E., Cook K. et al.* Allotransplantation of human parathyroid tissue without immunosuppression // *Transplantation*. 1983. Vol. 36. P. 599.
9. *Tartaglia F., Giuliani A., Sgueglia M. et al.* Randomized study on oral administration of calcitriol to prevent symptomatic hypocalcemia after total thyroidectomy // *Am. J. Surgery*. 2005. Vol. 190. P. 424.
10. *Tolloczko T., Wozniwicz B., Sawicki A. et al.* Cultured parathyroid cell transplantation without immunosuppression in the treatment of surgical hypoparathyroidism // *Transplant. Proc.* 1994. Vol. 26. P. 1901.

11. Tolloczko T., Wozniewicz B., Sawicki A. *et al.* Allotransplantation of cultured human parathyroid cells: present status and perspectives // *Transplant. Proc.* 1997. Vol. 29. P. 998.
12. Torregosa N., Rodríguez J.M., Llorente S. *et al.* Definitive treatment of persistent hypoparathyroidism: parathyroid allotransplant // *Cir. Esp.* 2004. Vol. 75. P. 97.
13. Tretyak S.I., Prochorov A.V., Khryshchanovich V.J. *et al.* Long-term preservation of vitality of the xenogenic thyrocytes in the recipient after their transplantation into the blood stream // *Advances in Medical Sciences.* 2008. Vol. 53 (1). P. 76–79.
14. Ulrich F., Steinmüller T., Rayes N. *et al.* Cryopreserved human parathyroid tissue: cell cultures for in vitro testing of function // *Transplant. Proc.* 2001. Vol. 33. P. 666.
15. Ulrich F., Klupp J., Thurmer F. *et al.* Allotransplantation of encapsulated human parathyroid tissue in patients with permanent hypoparathyroidism // *Transplantation.* 2004. Vol. 78. P. 79.
16. Uludag H., De Vos P., Tresco P.A. Technology of mammalian cell encapsulation // *Adv Drug Deliv Rev.* 2000. Vol. 42. P. 29.
17. Zimmermann U., Cramer H., Jork A. *et al.* Microencapsulation based cell therapy // In G. Reed, H.-J. Rehm (eds): *Biotechnology.* 2001. Vol. 10. Weinheim, Germany: Wiley-VCH. P. 547.
18. Zimmermann U., Thürmer F., Cork A. *et al.* A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunisolated transplantation // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001. Vol. 944. P. 199.