

УДК 576.314.63:612.6.089.6

К.И. Богуславский¹, Г.А. Божок^{1*}, Е.И. Легач¹, И.В. Фурда², Т.П. Бондаренко¹**Эпитоп Gal- α -1,3-Gal: роль в биологии клетки и трансплантации**

UDC 576.314.63:612.6.089.6

K.I. Bohuslavskiy¹, G.A. Bozhok^{1*}, E.I. Legach¹, I.V. Furda², T.P. Bondarenko¹**Gal- α -1,3-Gal Epitope: Role in Cell Biology and Transplantation**

Реферат: Эпитоп Gal- α -1,3-Gal (α -Gal) – это углеводная структура, которая экспрессируется на мембранах клеток млекопитающих, кроме некоторых видов обезьян и человека, и вызывает гиперострый иммунный ответ при ксено-трансплантации. В приведенной работе кратко рассматриваются вопросы эволюции эпитопа α -Gal, его распространенности в животном мире, биологической роли, а также обсуждаются проблемы использования протезов свиного происхождения в медицинской практике. По многим причинам данный вид животных является наиболее подходящим для получения биопротезов сердечных клапанов, сосудов и биоскаффолдов, однако вследствие экспрессии в их организме большого количества эпитопа α -Gal требуется специальная обработка для его удаления. В настоящей обзорной статье предпринята попытка обобщить результаты изучения экспрессии эпитопа α -Gal после низкотемпературной обработки, поскольку данный метод широко используется для хранения биопротезов перед имплантацией.

Ключевые слова: эпитоп α -Gal, трансплантация, биопротезы, гипотермическое хранение, криоконсервирование.

Реферат: Епітоп Gal- α -1,3-Gal (α -Gal) – це вуглеводна структура, яка експресується на мембранах клітин ссавців, окрім деяких видів мавп і людини, та викликає гіпергостру імунну відповідь при ксенотрансплантації. У наведеній роботі коротко розглядаються питання еволюції епітопа α -Gal, його поширеності у тваринному світі, біологічної ролі, а також обговорюються проблеми використання протезів свиного походження у медичній практиці. З багатьох причин даний вид тварин найбільш прийнятний для отримання протезів серцевих клапанів, судин та біоскаффолдів, однак внаслідок експресії в їх організмі великої кількості епітопа α -Gal необхідною є спеціальна обробка для його елімінації. У даній оглядовій статті зроблено спробу узагальнити результати вивчення експресії епітопа α -Gal після низькотемпературної обробки, оскільки цей метод широко використовується для зберігання біопротезів перед імплантацією.

Ключові слова: епітоп α -Gal, трансплантація, біопротези, гіпотермічне зберігання, криоконсервування.

Abstract: Gal- α -1,3-Gal (α -Gal) epitope is a carbohydrate structure, which is expressed on cell membranes of almost all the mammals except some species of monkeys and human, as well as causes a hyperacute immune response during xenotransplantation. This review briefly describes the issues of the evolution of α -Gal epitope, its distribution in the kingdom of animals, biological role and problems of using prostheses of porcine origin in medical practice. For many reasons, this species of animals is the most suitable to obtain the bioprostheses of cardiac valves, vessels and bioscaffolds, however, due to the high α -Gal epitope expression in their body a special treatment to eliminate it is required. This review attempts to summarize the results on studying the α -Gal epitope expression after low-temperature treatment, since it is widely used to store bioprostheses prior to implantation.

Key words: α -Gal epitope, transplantation, bioprosthesis, hypothermic storage, cryopreservation.

Эпитоп Gal- α -1,3-Gal (α -Gal) – углеводная структура, которая экспрессируется на мембранах клеток в организме млекопитающих, кроме человека и некоторых видов обезьян, обитающих на территории Старого Света. У человека в течение жизни вырабатывается высокий титр антител к этому эпитопу, который получил название «главный ксеноантиген» из-за безуспешных попыток в 60-х годах XX века трансплантировать человеку свиные органы. Известно, что связывание натуральных антител, постоянно присутствующих в крови человека, с α -Gal вызывает гиперострое отторжение ксенотрансплантата, что делает невозможным трансплантацию органов и тканей от млекопитающих человеку.

Epitope Gal- α -1,3-Gal (α -Gal) is a carbohydrate structure, which is expressed on cell membranes in the body of mammals, excluding humans and some species of monkeys inhabiting the Old World. A high titer of antibody to this epitope is produced in a human over a lifetime, and it is called as ‘major xenantigen’ due to numerous unsuccessful attempts conducted in the 1960s to transplant pig organs to a human. It is known that the binding of natural antibodies, constantly present in human blood, with the α -Gal causes a hyperacute xenograft rejection, making impossible the transplantation of organs and tissues from human to mammals. One of the ways to solve this problem could be using the organs from

¹Отдел криобиохимии и фармакологии нейрогуморальных систем, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковская государственная зооветеринарная академия

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016; тел.: (+380 57) 373-30-07, факс: (+380 57) 373-30-84, электронная почта: bozhokgaru@gmail.com

Поступила 29.09.2015

Принята в печать 14.01.2016

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, №1. – С. 3–12.
© 2016 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Department of Cryobiochemistry and pharmacology of Neuro-Humoral Systems, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Kharkov State Zooveterinary Academy, Kharkov, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61016; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: bozhokgaru@gmail.com

Received September, 29, 2015

Accepted January, 14, 2016

Probl Cryobiol Cryomed 2016; 26(1): 3–12.

© 2016 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Одним из решений данной проблемы может быть использование органов обезьян, в организме которых отсутствует эпитоп α -Gal. Однако сложность разведения и содержания в неволе, медленное воспроизводство поголовья, высокий риск межвидовой вирусной трансмиссии, противоречия, связанные с соблюдением этических норм, являются основными причинами, ограничивающими использование данного вида животных в качестве доноров.

В связи с этим одним из направлений современной экспериментальной биологии является выведение пород свиней для получения тканей и органов, пригодных для трансплантации [1]. Благодаря селекции были созданы трансгенные и «нокаутные» свиньи, клетки которых не экспрессируют эпитоп α -Gal. Предполагается, что в перспективе органы свиней таких пород могут использоваться при ксенотрансплантации человеку.

Получение свиных органов для трансплантации возможно в далеком будущем, однако использование протезов свиного происхождения широко распространено в медицинской практике уже сегодня, что придает важность исследованиям эпитопа α -Gal. Далее в обзоре будет проведен краткий анализ работ, связанных с изучением эволюционного происхождения α -Gal, особенностей распределения на разных клетках млекопитающих и влиянию на его экспрессию факторов получения и хранения биопротезов.

Присутствие эпитопа α -Gal на клетках млекопитающих

Эпитоп α -Gal не экспрессируется на клетках человека и некоторых высших приматов ввиду потери активности фермента α -1,3-галактозилтрансферазы (1,3-GT). У животных этот фермент, как и другие гликозилтрансферазы, участвует в преобразовании олигосахаридов для последующего синтеза мембранных гликопротеинов.

Считается, что изначально в организме всех представителей класса млекопитающих экспрессировался эпитоп α -Gal, а супрессия механизма его синтеза у некоторых видов произошла в ходе эволюционного развития вследствие действия эндемических факторов [19].

Наличие эпитопа на фибробластах опоссума и кенгуру доказывает, что его экспрессия в ядерных клетках млекопитающих началась еще до их разделения на *Metatheria* (сумчатых) и *Eutheria* (плацентарных) зверей. Эпитоп α -Gal обнаружен у представителей отрядов *Primates* (некоторых обезьян), *Lagomorpha* (кроликов), *Rodentia* (крыс), *Artiodactyla* (коров, свиней) и *Carnivora* (собак) [12].

Клетки примитивных приматов, например лему-ров (*Lemuridae*), широко экспрессируют данный

monkeys, which do not express α -Gal epitope. However, the difficulty of breeding and keeping, slow reproduction of livestock, a high risk of cross-species viral transmission, the controversial compliance with ethical standards, are the main reasons, limiting the use of this species as donors.

In this regard, one of the trends in contemporary experimental biology is the breeding of pig species to derive the transplantable tissues and organs [4]. Through the selection there were created the transgenic and knockout pigs, the cells of which did not express the α -Gal epitope. The organs of these pig species are assumed to be used in human xenotransplantation in the future.

Deriving of pig organs for transplantation is possible in far future, but the use of prostheses of a porcine origin is widespread in medical practice today, which makes important the research of α -Gal epitope. This review will deal with a brief analysis of the reports related to the study of the evolutionary origin of α -Gal, its specific distribution in various mammalian cells and the effect on its expression of the factors of the bioprotheses obtaining and storage.

Presence of α -Gal epitopes in mammalian cells

α -Gal epitope is not expressed in the cells of humans and some higher primates due to loss of activity of the enzyme α -1,3-galactosyltransferase (1,3-GT). In animals, this enzyme as well as other glycosyltransferases are involved into the transformation of oligosaccharides for the following synthesis of membrane glycoproteins.

It is believed that originally all the mammalian organisms expressed α -Gal epitope, and in some species its synthesis mechanism was suppressed during the evolution due to the action of endemic factors [19].

The epitope presence on the possum and wallaby fibroblasts proves that its expression in mammalian nucleated cells existed even before their dividing into *Metatheria* (marsupials) and *Eutheria* (placental) animals. α -Gal epitope was found in representatives of the *Primates* (some monkeys), *Lagomorpha* (rabbits), *Rodentia* (rats), *Artiodactyla* (cows, pigs), and *Carnivora* (dogs) [12].

The cells of primitive primates, e.g. lemurs (*Lemuridae*) widely express this epitope, as well as the New World monkeys (*Callitrichidae*, *Cebidae*, *Aotidae*, *Pitheciidae*, *Atelidae*) [6, 34]. However, it was not found in the representatives of *Cercopithecidae*, *Hylobatidae*, *Hominidae* families, inhabiting the Old World territory, including apes and humans [6].

эпитоп, как и обезьяны Нового Света (*Callitrichidae*, *Cebidae*, *Aotidae*, *Pitheciidae*, *Atelidae*) [6, 34]. Однако он не обнаружен у представителей семейств *Cercopithecidae*, *Hylobatidae*, *Hominidae*, обитающих на территории Старого Света, в том числе у человекообразных обезьян и человека [6].

Тестированию на присутствие эпитопа α -Gal были подвергнуты далеко не все виды животных, поэтому предстоит дальнейшее изучение инактивации экспрессии данного антигена в эволюционно-генетическом аспекте.

На основании открытия интрон-обедненных вставочных ДНК D. Joziasse и соавт. [26] предположили, что ген 1,3-GT инактивировался между 40 и 25 млн лет до н. э., то есть уже после эволюционного разделения на обезьян Старого и Нового Света. Данные, полученные при изучении эпитопа α -Gal у макак-резус, орангутанга и человека, свидетельствуют об инактивации его экспрессии у их общего предка [26, 28]. Однако U. Galili и соавт. [20] считают, что инактивация эпитопа у этих видов произошла гораздо позже, причем независимо друг от друга.

Желудочно-кишечный тракт человека сразу после рождения заселяется бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, которые несут на клеточной стенке липополисахариды с галактозными остатками [17, 19]. На протяжении всей жизни кишечная микрофлора постоянно стимулирует выработку иммунной системой антител к α -Gal, которую трудно устранить даже путем интенсивной иммуносупрессии [10, 16]. У человека антитела к α -Gal представлены в основном IgG и в меньшей степени – IgM и IgA.

Интересно, что при определенных условиях в организме человека возможны активация гена 1,3-GT и продукция эпитопа α -Gal на мембранах различных клеток [9]. Это приводит к взаимодействию циркулирующих в крови антител, связывание с которыми вызывает аутоиммунную реакцию. Даже незначительной экспрессии эпитопа на мембране достаточно, чтобы вызвать антителозависимый цитолиз и тем самым индуцировать аутоиммунный процесс.

Активация гена 1,3-GT может быть вызвана вирусной инфекцией, облучением или воздействием химических веществ [9]. Результаты экспериментов *in situ* свидетельствуют, что α -1,3-Gal-галактозилтрансферазной активностью в определенных условиях обладают клетки семенников, поджелудочной железы, селезенки, печени, синовиальной мембраны суставной капсулы и крови [40].

Установлено, что 1% нормальных человеческих эритроцитов может взаимодействовать с антителами к α -Gal [11, 13–15], поэтому некоторые исследо-

Not all animal species were tested for the α -Gal epitope presence, therefore the evolutionary-genetic aspect of the inactivated antigen expression should be studied in future.

Basing on the discovery of the intron-depleted intercalated DNA V. Joziasse *et al.* [26] suggested that 1,3-GT gene was inactivated between 40 and 25 million years BC, *i. e.* after the evolutionary division of the monkeys of the Old and New Worlds. The data obtained when studying the α -Gal epitope in rhesus monkeys, orangutans and humans indicate about its inactivated expression in their common ancestor [26, 28]. However, U. Galili *et al.* [20] believe that inactivation of epitope in these species occurred much later, and independently of each other.

Immediately after birth the human gastrointestinal tract is populated with *Enterobacteriaceae* bacteria, bearing the lipopolysaccharide with galactose residues on the cell wall [17, 19]. Throughout the life an intestinal microflora constantly stimulates the production by an immune system of the antibodies to the α -Gal, which is difficult to be eliminated even by an intensive immune suppression [10, 16]. In humans, the antibodies to α -Gal are mainly represented by IgG and with IgM and IgA in a lesser extent.

It is interesting that under certain conditions the 1,3-GT gene activation and production of α -Gal epitope in a human body are possible on the membranes of various cells [9]. This leads to an interaction of antibodies circulating in the blood, which binding causes an autoimmune reaction. Even slight epitope expression on membrane is sufficient to cause an antibody-dependent cytolysis and thereby to induce an autoimmune process.

1,3-GT gene activation may be caused by a viral infection, radiation or exposure to chemicals [9]. The results of *in situ* experiments indicate that α -1,3-Gal-galactosyltransferase activity under certain conditions are possessed by the cells of the testes, pancreas, spleen, liver, synovial membrane of articular capsule and blood [40].

It has been established that 1% of normal human erythrocytes can interact with antibodies to α -Gal [11, 13–15], therefore some researchers have suggested that antibodies against α -Gal may play a role in the removal of senescent and pathological erythrocytes from circulatory channel [1, 15, 17, 18].

J. Etienne-De Cerf *et al.* [8] have shown in the studies *in vitro* that antibodies against α -Gal can interact not only with erythrocytes but also with trypsin-treated human thyroid cells. This effect confirms the presence of Gal- α -1,3-Gal latent structures and in other tissues of human body.

ватели предполагают, что антитела к α -Gal могут играть роль в удалении стареющих и патологических эритроцитов из циркуляторного русла [2, 15, 17, 18].

J. Etienne-Decerf и соавт. [8] в исследованиях *in vitro* показали, что антитела к α -Gal могут взаимодействовать не только с эритроцитами, но и с клетками щитовидной железы человека, которые были обработаны трипсином. Данный эффект свидетельствует о присутствии латентных структур Gal- α -1,3-Gal и в других тканях человеческого организма.

Особый интерес с точки зрения биотехнологии представляет изучение присутствия эпитопа α -Gal в свиных органах. Результаты исследований многих авторов показали, что α -Gal встречается у свиней разных пород и имеет высокую частоту экспрессии в популяции [37].

Известно, что α -Gal в высокой плотности экспрессируется на сосудистой эндотелии свиньи [3, 21, 39], а также на некоторых других тканях, в частности, на проксимальных почечных канальцах [24], эпителии бронхов и легочных альвеол, стенках желчного и панкреатического канальцев [36, 43, 44]. I. McKenzie и соавт. [33] обнаружили во всех долях печени стойкое позитивное окрашивание гепатоцитов антителами к эпитопу α -Gal.

В исследовании G. Rayat и соавт. [38], было установлено, что незрелые клетки островков поджелудочной железы неонатальных поросят не несут антигенов данной группы. Однако уже в первые сутки после трансплантации островковых клеток под капсулу почки SCID мышей в ксенографте было обнаружено большое количество α -Gal-позитивных клеток. Это свидетельствует о том, что экспрессия эпитопа может запускаться как при созревании клеток, так и под действием других факторов, например трансплантации в ответ на стимулы иммунной системы реципиента.

Роль эпитопа α -Gal в экспериментальной ксенотрансплантации и клинической биоимплантации

На данный момент ксенотрансплантация органов свиньи человеку остается невозможной. В организме человека ксенотрансплантат от свиньи не выживает, поскольку происходит гиперострое отторжение, сопровождающееся массивным гемолизом, агглютинацией эритроцитов, множественным тромбозом сосудов пересаженного органа.

Ксенореактивные естественные антитела к эпитопу α -Gal, циркулирующие в крови человека, реализуют реакцию гиперострого отторжения через систему комплемента [26]. Связывание анти-Gal-IgM с эпитопами, экспрессируемыми эндотелиоцитами кровеносных сосудов свиного трансплантата, акти-

Of particular interest in terms of biotechnology is the study of the α -Gal epitope presence in porcine organs. The results reported by many authors demonstrated that α -Gal was found in pigs of various breeds and frequently had a high expression in the population [37].

α -Gal is known to have high expression on vascular endothelium of pigs [2, 21, 39] as well as on some other tissues, especially on the proximal renal tubules [24], on the epithelium of bronchi and pulmonary alveoli, walls of gall and pancreatic ducts [36, 43, 44]. I. McKenzie *et al.* [33] found a stable positive staining of hepatocytes with antibodies to an epitope of α -Gal in all liver lobes.

In the research of G. Rayat *et al.* [38] the immature pancreatic islet cells of neonatal piglets were found to carry no antigens of this group. However, a large amount of α -Gal-positive cells were detected in xenograft in the first days after islet cell transplantation under the renal capsule of SCID mice. This indicates that the epitope expression can be initiated both during cell maturation and under the influence of other factors, *e. g.* transplantation, in response to the recipient's immune system stimuli.

Role of α -Gal epitope in experimental xenotransplantation and clinical bioimplantation

At the moment, the xenotransplantation of pig organs to a human is impossible. In a human body the xenograft of a pig does not survive, as there is a hyperacute rejection, accompanied with a massive hemolysis, agglutination of red blood cells, multiple thrombosis of the vessels of the grafted organ.

Xenoreactive natural antibodies to α -Gal epitope, circulating in human blood, implement a hyperacute rejection via the complement system [26]. Binding of anti-Gal IgM to the epitopes expressed by endothelial cells of porcine graft blood vessels activates the complement-dependent cascade reactions and induces platelet aggregation. This leads to rapid destruction of vascular system, hemorrhage, cytolysis of cells and, ultimately finally to the destruction of xenografts [26]. For example, kidneys or heart grafted from pig to monkey are rejected within 30 min to several hours [7, 37].

It should be noted that xenotransplantation could be accompanied by various types of immune responses to xenograft: complement-mediated rejection; acute antibody-mediated rejection, induced either by natural or T-lymphocyte-dependent antibodies; acute rejection as a result of the activation of cell immunity link; chronic rejection.

Participation of anti-Gal IgM antibodies in hyperacute rejection has been proven by A. Good *et al.* [22], which showed the neutralization of cytolytic

вирует каскад комплемент-зависимых реакций и индуцирует агрегацию тромбоцитов. Это приводит к быстрому разрушению сосудистой системы, кровоизлиянию, цитолизу клеток и, в конечном счете, деструкции ксенографта [26]. Например, почки или сердце, пересаженные от свиньи обезьяне, отторгаются в течение 30 мин или нескольких часов [7, 37].

Важно отметить, что при ксенотрансплантации возможны разные типы иммунных реакций на ксенографт: комплемент-опосредованное отторжение; острое антител-опосредованное отторжение, индуцированное естественными или Т-лимфоцит-зависимыми антителами; острое отторжение в результате активации клеточного звена иммунитета; хроническое отторжение.

Участие антител анти-Gal-IgM в реакции гиперострого отторжения было доказано А. Good и соавт. [22], которые показали, что при удалении антител к эпитопу α -Gal из сыворотки нивелируется их цитолитическое действие на клетки свиного происхождения.

Определение роли эпитопа α -Gal в механизме гиперострого отторжения позволило выработать основные подходы для пролонгированного существования свиных ксенографтов: удаление специфических антител из крови реципиента с помощью гемосорбции или плазмафереза [4, 31, 45]; ингибирование системы комплемента реципиента посредством биологически активных веществ, например, фактора яда кобры (*cobra venom factor*, CVF) [25, 32]; использование для трансплантации органов от трансгенных и «нокаутных» свиней [30, 35].

К сожалению, применение вышеописанных методов все же не позволяет добиться длительного функционирования ксенографта. Например, в исследованиях на обезьянах Т. Ху и соавт. [45] показано, что удаление специфических антител к Gal- α -1,3-Gal с помощью плазмафереза предотвращает гиперострое отторжение свиного ксенографта, но только до повторного появления антител в циркуляторном русле. В работах других авторов было установлено, что уровень антител, специфичных к α -Gal, восстанавливается в течение нескольких дней после процедуры экстракорпоральной обработки [4].

Существовали попытки преодолеть гиперострое отторжение с помощью других методов, например, специфических ингибиторов В-клеток, которые продуцируют анти-Gal-антитела [43]. Результаты экспериментов, проведенных на мышах, были обнадеживающими, однако их эффективность при ксенотрансплантации другим животным еще не оценена.

При использовании биоматериала, полученного от неонатальных или генетически измененных α -Gal-дефицитных особей, или после его обработки

effect on the cells of porcine origin rendered by antibodies to α -Gal epitope after their removal.

Determining the role of α -Gal epitope in the mechanism of hyperacute rejection allowed to develop basic approaches for the sustained existence of porcine xenografts: removal of specific antibodies from the recipient's blood via hemisorption or plasmapheresis [3, 31, 45]; inhibition of the recipient complement system by means of biologically active substances, such as cobra venom factor (CVF) [25, 32]; application of transgenic and knockout pigs for organ transplantation [30, 35].

Unfortunately, the use of the methods described above has not yet allowed the xenograft to function for a long time. For example, in the researches in monkeys T. Xu *et al.* [45] has demonstrated that the removal of specific antibodies to the Gal- α -1,3-Gal via plasmapheresis prevented hyperacute rejection of porcine xenografts, but only until the re-appearance of the antibodies in the circulatory channel. Other scholars reported that the level of antibodies specific for α -Gal, is restored within a few days after extracorporeal treatment procedure [3].

There were the attempts to overcome hyperacute rejection by other methods, *e. g.* specific inhibitors of B-cells which produce anti-Gal-antibodies [43]. Results of experiments performed in mice were encouraging, but their efficiency during xenotransplantation to other animals has not been evaluated yet.

When using a biomaterial derived either from neonatal or genetically modified α -Gal-deficient animals, or after its processing with the enzyme α -galactosidase, removing the α -Gal epitope from the surface of cells, the lowering of immune response to the xenograft was found [21, 23, 29].

The paper of P. Simon *et al.* [42] reported that intravenous administration of purified oligosaccharide Gal- α -1,3-Gal to baboons resulted in neutralizing the specific antibodies and temporarily delayed a hyperacute rejection of pig organs.

While transplantation of organs from pigs to humans is not yet possible, the bioprostheses made from porcine tissues are now used quite widely. Thus, the bioprosthetic heart valves and biomatrices derived from the submucosa of small intestine and skin are popular in clinical practice. In this case the problem of hyperacute rejection using porcine biomaterial does not exist, since all the bioimplants are processed and lose the layer of cells carrying the α -Gal epitope. However, long-term observations of patients with cardiovascular prostheses of porcine origin showed that the bioprostheses over time are subjected to degeneration because of tissue

ферментом α -галактозидазой, который удаляет эпитоп α -Gal с поверхности клеток, установлено снижение иммунного ответа на ксенотрансплантат [21, 23, 29].

В работе P. Simon и соавт. [42] показано, что внутривенное введение очищенного олигосахарида Gal- α -1,3-Gal бабуинам приводило к нейтрализации специфических антител и временно задерживало гиперострое отторжение свиных органов.

Если трансплантация органов от свиной человеку пока невозможна, то биопротезы, изготовленные из свиных тканей, активно применяются уже сегодня. Так, в клинической практике популярны биопротезы сердечных клапанов и биоматрикссы, полученные из подслизистой оболочки тонкой кишки и кожи. В данном случае проблемы гиперострого отторжения при использовании свиного биоматериала не существует, так как все биоимплантаты проходят обработку, в результате которой элиминируется слой клеток, несущих эпитоп α -Gal. Однако по результатам долгосрочных наблюдений за пациентами с сердечно-сосудистыми протезами свиного происхождения установлено, что биопротезы со временем испытывают дегенерацию вследствие кальцификации ткани и структурных перестроек коллагена [41].

В 2005 году K. Konakci и соавт. [29] предположили, что иммунные реакции могут играть роль в деградации биопротезов сердечных клапанов, поскольку в них были обнаружены остатки эпитопов α -Gal даже после использования глутарово-альдегидной предобработки. Более того, уже через 10 суток после имплантации свиных клапанов у реципиентов в сыворотке крови значительно увеличился титр специфических антигенов к данному эпитопу.

Таким образом, проблема элиминации Gal- α -1,3-Gal из свиных биопротезов остается актуальной, также как и разработка чувствительных тестовых систем для определения наличия данных антигенов в биоматериале для клинической имплантации.

Влияние низкотемпературного хранения клеток на присутствие эпитопа α -Gal

Криоконсервирование является одним из способов долгосрочного хранения клеток и тканей перед трансплантацией. С целью забора, получения и хранения свиного биоматериала, пригодного для имплантации, могут использоваться специальные среды. Однако исследования, в которых детально было бы изучено влияние факторов криоконсервирования или гипотермического хранения на эпитоп α -Gal, практически не проводятся.

M. Keller и соавт. [27] получили данные о влиянии гипотермии и кардиоплегических растворов на

calcification and collagen structural rearrangements [41].

In 2005, K. Konak *et al.* [29] suggested that the immune responses may play a role in degradation of the heart valve bioprostheses, since the residues of α -Gal epitopes were found there even after glutaric aldehyde pre-treatment. Moreover, even 10 days later the implantation of porcine valves the titer of specific antigens to this epitope was significantly increased in the recipients' blood serum.

Thus, the problem of Gal- α -1,3-Gal elimination from porcine bioprostheses has remained important, as well as the development of sensitive test systems to determine the presence of these antigens in biomaterial for clinical implantation.

Effect of low-temperature storage of cells on α -Gal epitope presence

Cryopreservation is one of the methods of long-term storage of cells and tissues prior to transplantation. Sampling, storage and processing of porcine biomaterial suitable for implantation is performed in the specialized media. However, there are almost no detailed publications about influence of cryopreservation factors or hypothermic storage on α -Gal epitope.

M. Keller *et al.* [27] have got the data about the effect of hypothermia and cardioplegic solutions on the expression of α -Gal epitope in porcine aortic endothelial cells. The tissue storage at 4°C for 4 hrs in HTK solution containing mannitol resulted in a decrease in the expression of α -Gal epitopes by 32%. Storing the biomaterial in the University of Wisconsin solution under similar conditions resulted in 50% reduction of the antigen expression.

The authors suggested three hypotheses to explain the described phenomenon. The first assumption was that the components of cardioplegic solutions caused the changes in the α -Gal epitope chemical structure, preventing it from binding with xenoreactive antibodies. The second one supposed a decoupling between the membrane components and α -Gal epitope, and according the third one there was a masking of α -Gal epitope by the molecules of the substances comprising the hypothermic solutions.

Observations of P. Brenner *et al.* [5] have indirectly confirmed the effect of hypothermic storage on the α -Gal epitope presence. It has been found that a 4 hr perfusion of cardioplegic solutions prevented the development of heart hyperacute rejection.

Unfortunately, to date there are no other reports on the issue of changing the expression of Gal- α -1,3-Gal during low-temperature storage. This

экспрессию эпитопа α -Gal в эндотелиоцитах аорты свиньи. Установлено, что хранение ткани при 4°C на протяжении 4 ч в маннитолсодержащем растворе НТК вызывал уменьшение экспрессии эпитопов α -Gal на 32%. Установлено, что при хранении биоматериала в растворе Висконсинского университета в аналогичных условиях экспрессия антигена снижалась на 50%.

Авторы предложили три гипотезы для объяснения описанного феномена. Согласно первому предположению компоненты кардиоплегических растворов вызывают изменения в химической структуре эпитопа α -Gal, что исключает связывание с ним ксенореактивных антител; второму – происходит разрыв связей между компонентами мембраны и эпитопом α -Gal; третьему – имеет место маскировка эпитопа α -Gal молекулами веществ, входящих в состав гипотермических растворов.

Результаты наблюдений Р. Brenner и соавт. [5] были косвенным подтверждением влияния гипотермического хранения на присутствие эпитопа α -Gal. Установлено, что 4-часовая перфузия сердца кардиоплегическими растворами предотвращает развитие гиперострого отторжения.

К сожалению, других работ, посвященных вопросу изменения экспрессии Gal- α -1,3-Gal в условиях низкотемпературного хранения, в доступной научной литературе не обнаружено. Это свидетельствует о недостаточном изучении данного вопроса и необходимости дальнейших исследований в этом направлении.

Важно отметить, что наличие антигена Gal- α -1,3-Gal является не единственным препятствием для использования свиных тканей в медицине, поскольку только 25% от общего пула свиных антител, стимулирующих реакцию отторжения, приходится на эпитоп α -Gal. Идентификация всех трансплантационных антигенов свиньи, разработка способов их элиминации, в том числе и на основе низкотемпературных технологий, поможет в создании биопротезов и биоскаффолдов для использования в практике восстановительной и регенеративной медицины.

Литература

1. Бондаренко Т.П., Божок Г.А., Алабедалькарим Н.М., Легач Е.И. Ксенотрансплантация: исторический аспект и современное состояние проблемы // Трансплантология. – 2004. – Т. 7, №3. – С. 130–135.
 2. Anstee D.J. Blood group-active surface molecules of the human red blood cell // Vox Sang. – 1990. – Vol. 58, №1. – P. 1–20.
 3. Artrip J.H., Kwiatkowski P., Michler R.E. et al. Target cell susceptibility to lysis by human natural killer cells is augmented
1. Anstee D.J. Blood group-active surface molecules of the human red blood cell. Vox Sang 1990; 58(1): 1–20.
 2. Artrip J. H., Kwiatkowski P., Michler R. E. et al. Target cell susceptibility to lysis by human natural killer cells is augmented by alpha(1,3)-galactosyltransferase and reduced by alpha(1,2)-fucosyltransferase. J Biol Chem 1999; 274(16): 10717–10722.
 3. Azimzadeh A., Meyer C., Watier H. et al. Removal of primate xenoreactive natural antibodies by extracorporeal perfusion of pig kidneys and livers. Transpl Immunol 1998; 6(1): 13–22.
 4. Bondarenko T.P., Bozhok G.A., Alabedalkarim N.M., Legach E.I. Xenotransplantation: historical aspect and modern state of the problem. Transplantologia 2004; 7(3): 130–135.
 5. Brenner P., Hinz M., Huber H. et al. Influence of ischemic time on hyperacute xenograft rejection of pig hearts in a working heart perfusion model with human blood. Transpl Int 2000; 13 (Suppl. 1): S494–503.
 6. Collins B.H., Cotterell A.H., McCurry K.R. et al. Cardiac xenografts between primate species provide evidence of the α -galactosyl determinant in hyperacute rejection. J Immunol 1994; 154(10): 5500–5510.
 7. Cooper D.K., Koren E., Oriol R. Oligosaccharides and discordant xenotransplantation. Immun Rev 1994; 141: 31–58.
 8. Etienne-Decerf J., Malaise M., Mahieu P., Winand R. Elevated anti alpha-galactosyl antibody titers. A marker of progression in autoimmune thyroid disorders and endocrine ophthalmopathy. Acta Endocrinol 1987; 115: 67–74.
 9. Galili U. Abnormal expression of alpha-galactosyl epitopes in man. A trigger for autoimmune processes. Lancet 1989; 8(8659): 358–361.
 10. Galili U. Anti-Gal and anti-non Gal antibody barriers in xenotransplantation. Miyagawa S., editor. Xenotransplantation. InTech, 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/xenotransplantation/anti-gal-and-anti-non-gal-antibody-barriers-in-xenotransplantation>.
 11. Galili U., Clark M., Mohandas N. et al. The natural anti-c~galactosyl IgG on red cells in sickle cell disease. Blood Cells 1984; 14(1): 205–228.
 12. Galili U., Clark M.R., Shohet S.B. et al. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal- α -1,3-Gal epitope in primates. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(5): 1369–1373.
 13. Galili U., Clark M.R., Shohet S.B. Excessive binding of natural anti-alpha-galactosyl IgG to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction. J Clin Invest 1986; 77(1): 27–33.



- by alpha(1,3)-galactosyltransferase and reduced by alpha(1,2)-fucosyltransferase // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274, №16. – P. 10717–10722.
4. Azimzadeh A., Meyer C., Watier H. et al. Removal of primate xenoreactive natural antibodies by extracorporeal perfusion of pig kidneys and livers // *Transpl. Immunol.* – 1998. – Vol. 6, №1. – P. 13–22.
 5. Brenner P., Hinz M., Huber H. et al. Influence of ischemic time on hyperacute xenograft rejection of pig hearts in a working heart perfusion model with human blood // *Transpl. Int.* – 2000. – Vol. 13, Suppl. 1. – S494–503.
 6. Collins B.H., Cotterell A.H., McCurry K.R. et al. Cardiac xenografts between primate species provide evidence of the α -galactosyl determinant in hyperacute rejection // *J. Immunol.* – 1994. – Vol. 154, №10. – P. 5500–5510.
 7. Cooper D.K., Koren E., Oriol R. Oligosaccharides and discordant xenotransplantation // *Immun. Rev.* – 1994. – Vol. 141. – P. 31–58.
 8. Etienne-Decerf J., Malaise M., Mahieu P., Winand R. Elevated anti alpha-galactosyl antibody titers. A marker of progression in autoimmune thyroid disorders and endocrine ophthalmopathy // *Acta Endocrinol.* – 1987. – Vol. 115. – P. 67–74.
 9. Galili U. Abnormal expression of alpha-galactosyl epitopes in man. A trigger for autoimmune processes // *Lancet.* – 1989. – Vol. 8, №8659. – P. 358–361.
 10. Galili U. Anti-Gal and anti-non Gal antibody barriers in xenotransplantation // *Xenotransplantation* / Ed. by S. Miyagawa, InTech, 2012. [Электронный документ] [веб-сайт] <http://www.intechopen.com/books/xenotransplantation/anti-gal-and-anti-non-gal-antibody-barriers-in-xenotransplantation>.
 11. Galili U., Clark M., Mohandas N. et al. The natural anti-c-galactosyl IgG on red cells in sickle cell disease // *Blood Cells.* – 1984. – Vol. 14, №1. – P. 205–228.
 12. Galili U., Clark M. R., Shohet S. B. et al. Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal- α -1,3-Gal epitope in primates // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1987. – Vol. 84, №5. – P. 1369–1373.
 13. Galili U., Clark M. R., Shohet S. B. Excessive binding of natural anti-alpha-galactosyl IgG to sickle erythrocytes may contribute to extravascular cell destruction // *J. Clin. Invest.* – 1986. – Vol. 77, №1. – P. 27–33.
 14. Galili U., Flechner I., Knyszynski A. et al. The natural anti-alpha-galactosyl IgG on human normal senescent red blood cells // *Br J Haematol.* – 1986. – Vol. 62, №2. – P. 317–324.
 15. Galili U., Korkesh A., Kahane I., Rachmilewitz E.A. Demonstration of a natural antigalactosyl IgG antibody on thalassemic red blood cells // *Blood.* – 1983. – Vol. 61, №6. – P. 1258–1264.
 16. Galili U., Macher B.A., Buehler J., Shohet S.B. Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1-3)-linked galactose residues // *J. Exp. Med.* – 1985. – Vol. 162, №2. – P. 573–582.
 17. Galili U., Mandrell R.E., Hamadeh R.M. et al. Interaction between human natural anti- α -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora // *Infect. Immun.* – 1988. – Vol. 56, №7. – P. 1730–1737.
 18. Galili U., Rachmilewitz E.A., Peleg A., Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity // *J. Exp. Med.* – 1984. – Vol. 160, №5. – P. 1519–1531.
 19. Galili U., Shohet S.B., Kobrin E. et al. Man, apes and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cells // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263, №33. – P. 17755–17762.
 20. Galili U., Swanson K. Evolution gene sequences suggest inactivation of α -1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1991. – Vol. 88, №16. – P. 7401–7404.
 21. Galili U., Tibell A., Samuelsson B. et al. Increased anti-Gal activity in diabetic patients transplanted with fetal porcine islet cell clusters // *Transplantation.* – 1995 – Vol. 59, №11. – P. 1549–1556.
 22. Galili U., Flechner I., Knyszynski A. et al. The natural anti-alpha-galactosyl IgG on human normal senescent red blood cells. *Br J Haematol.* 1986; 62(2): 317–324.
 23. Galili U., Korkesh A., Kahane I., Rachmilewitz E.A. Demonstration of a natural antigalactosyl IgG antibody on thalassemic red blood cells. *Blood* 1983; 61(6): 1258–1264.
 24. Galili U., Macher B.A., Buehler J., Shohet S.B. Human natural anti-alpha-galactosyl IgG. II. The specific recognition of alpha (1-3)-linked galactose residues. *J Exp Med* 1985; 162(2): 573–582.
 25. Galili U., Mandrell R.E., Hamadeh R.M. et al. Interaction between human natural anti- α -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infect Immun* 1988; 56(7): 1730–1737.
 26. Galili U., Rachmilewitz E.A., Peleg A., Flechner I. A unique natural human IgG antibody with anti- α -galactosyl specificity. *J Exp Med* 1984; 160(5): 1519–1531.
 27. Galili U., Shohet S.B., Kobrin E. et al. Man, apes and Old World monkeys differ from other mammals in the expression of α -galactosyl epitopes on nucleated cells. *J Biol Chem* 1988; 263(33): 17755–17762.
 28. Galili U., Swanson K. Evolution gene sequences suggest inactivation of α -1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(16): 7401–7404.
 29. Galili U., Tibell A., Samuelsson B. et al. Increased anti-Gal activity in diabetic patients transplanted with fetal porcine islet cell clusters. *Transplantation* 1995; 59(11): 1549–1556.
 30. Good A.H., Cooper D.C.K., Malcolm A.J. et al. Identification of carbohydrate structures which bind human anti-porcine antibodies: implication for discordant xenografting in man. *Transplant Proc* 1992; 24(2): 559–562.
 31. Groth C.G., Korsgren O., Tibell A. et al. Transplantation of fetal porcine pancreas to diabetic patients. *Lancet* 1994; 344(8934): 1402–1404.
 32. Hayashi S., Katayama A., Nagasaka T. et al. Tissue distribution of Gal-alpha-1,3-Gal epitope in heart, kidney and liver of pig and mouse. *Transplant Proceedings* 1996; 28(1): 216.
 33. Igaz P. Recent strategies to overcome the hyperacute rejection in pig to human xenotransplantation. *Yale J Biol Med* 2001; 74(5): 329–340.
 34. Joziassse D.H., Oriol R. Xenotransplantation: the importance of the Gal-alpha-1,3-Gal epitope in hyperacute vascular rejection. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1455(2–3): 403–418.
 35. Keller M., Beiras-Fernandez A., Schmoekel M. et al. Influence of hypothermia and cardioplegic solutions on expression of alpha-Gal epitope on porcine aortic endothelial cells. *Exp Clin Transplant* 2010; 8(3): 250–257.
 36. Koike C., Fung J.J., Geller D.A. et al. Molecular basis of evolutionary loss of the 1,3-galactosyltransferase gene in higher primates. *J Biol Chem* 2002; 277(12): 10114–10120.
 37. Konakci K.Z., Bohle B., Blumer R. et al. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *European Journal of Clinical Investigation* 2005; 35(1): 17–23.
 38. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.W. et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295(5557): 1089–1092.
 39. Leventhal J.R., Dalmaso A.P., Cromwell J.W. et al. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement. *Transplantation* 1993; 55(4): 857–865.
 40. Mayo G.L., Posselt A.M., Barker C.F. et al. Prolongation of survival of donor-strain islet xenografts (rat-mouse) by intrathymic inoculation of xenogeneic islet and bone marrow cells. *Transplantation* 1994; 58(1): 107–109.
 41. McKenzie I.F., Xing P.X., Vaughan H.A. et al. Distribution of the major xenoantigen (Gal-alpha-1,3-Gal) for pig to human xenografts. *Transplant Immunol* 1994; 2(2): 81–86.
 42. Napier J.R., Napier P. H. The natural history of the primates. Cambridge: MIT Press, 1985.
 43. Oldmixon B.A., Wood J.C., Ericsson T.A. et al. Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an



22. Good A.H., Cooper D.C.K., Malcolm A.J. et al. Identification of carbohydrate structures which bind human anti-porcine antibodies: implication for discordant xenografting in man // *Transplant Proc.* – 1992. – Vol. 24, №2. – P. 559–562.
23. Groth C.G., Korsgren O., Tibell A. et al. Transplantation of fetal porcine pancreas to diabetic patients // *Lancet.* – 1994. – Vol. 344, №8934. – P. 1402–1404.
24. Hayashi S., Katayama A., Nagasaka T. et al. Tissue distribution of Gal- α -1,3-Gal epitope in heart, kidney and liver of pig and mouse // *Transplant. Proceedings.* – 1996. – Vol. 28, №1. – P. 216.
25. Igaz P. Recent strategies to overcome the hyperacute rejection in pig to human xenotransplantation // *Yale J. Biol. Med.* – 2001. – Vol. 74, №5. – P. 329–340.
26. Joziassie D.H., Oriol R. Xenotransplantation: the importance of the Gal- α -1,3-Gal epitope in hyperacute vascular rejection // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1999. – Vol. 1455, №2–3. – P. 403–418.
27. Keller M., Beiras-Fernandez A., Schmoeckel M. et al. Influence of hypothermia and cardioplegic solutions on expression of alpha-Gal epitope on porcine aortic endothelial cells // *Exp. Clin. Transplant.* – 2010. Vol. 8, №3. – P. 250–257.
28. Koike C., Fung J.J., Geller D.A. et al. Molecular basis of evolutionary loss of the 1,3-galactosyltransferase gene in higher primates // *J. Biol. Chem.* – 2002. – Vol. 277, №12. – P. 10114–10120.
29. Konakci K.Z., Bohle B., Blumer R. et al. Alpha-Gal on bio-prostheses: xenograft immune response in cardiac surgery // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2005. – Vol. 35, №1. – P. 17–23.
30. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K. W. et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning // *Science.* – 2002. – Vol. 295, №5557. – P. 1089–1092.
31. Leventhal J.R., Dalmaso A.P., Cromwell J.W. et al. Prolongation of cardiac xenograft survival by depletion of complement // *Transplantation.* – 1993. – Vol. 55, № 4. – P. 857–865.
32. Mayo G.L., Posselt A.M., Barker C.F. et al. Prolongation of survival of donor-strain islet xenografts (rat-mouse) by intrathymic inoculation of xenogeneic islet and bone marrow cells // *Transplantation.* – 1994. – Vol. 58, №1. – P. 107–109.
33. McKenzie I.F., Xing P.X., Vaughan H.A. et al. Distribution of the major xenoantigen (Gal- α -1,3-Gal) for pig to human xenografts // *Transplant. Immunol.* – 1994. – Vol. 2, №2. – P. 81–86.
34. Napier J.R., Napier P.H. The natural history of the primates. Cambridge: MIT Press, 1985. – 200 p.
35. Oldmixon B.A., Wood J.C., Ericsson T.A. et al. Porcine endogenous retrovirus transmission characteristics of an inbred herd of miniature swine // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76, №6. – P. 3045–3048.
36. Oriol R., Ye Y., Koren E., Cooper D.K. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation // *Transplantation.* – 1993. – Vol. 6, №6. – P. 1433–1442.
37. Platt J.L. A perspective on xenograft rejection and accommodation // *Immunol. Rev.* – 1994. – Vol. 141. – P. 127–149.
38. Rayat G.R., Rajotte R.V., Hering B.J. et al. In vitro and in vivo expression of Gal-(1,3)Gal on porcine islet cells is age dependent // *J. Endocrinol.* – 2003. – Vol. 177, №1. – P. 127–135.
39. Saadi S., Ihrcke N.S., Platt J.L. Endothelial cell shape and hyperacute rejection // *Transplant. Proc.* – 1994. – Vol. 26, №3. – P. 1149.
40. Sandrin M., Vaughan H.A., Dabkowski P.L., McKenzie I.F.C. Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal- α -1,3-Gal epitopes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1993. – Vol. 90, №23. – P. 11391–11395.
41. Schoen F.J., Levy R.J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention // *Ann. Thorac. Surg.* – 2005. – Vol. 79, №3. – P. 1072–1080.
42. inbred herd of miniature swine. *J Virol* 2002; 76(6): 3045–3048.
36. Oriol R., Ye Y., Koren E., Cooper D.K. Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potential targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man organ xenotransplantation. *Transplantation*. 1993; 56(6): 1433–1442.
37. Platt J.L. A perspective on xenograft rejection and accommodation. *Immunol Rev* 1994; 141: 127–149.
38. Rayat G.R., Rajotte R.V., Hering B.J. et al. In vitro and in vivo expression of Gal-(1,3)-Gal on porcine islet cells is age dependent. *J Endocrinology* 2003; 177(1): 127–135.
39. Saadi S., Ihrcke N.S., Platt J.L. Endothelial cell shape and hyperacute rejection. *Transplant Proc* 1994; 26(3): 1149.
40. Sandrin M., Vaughan H.A., Dabkowski P.L., McKenzie I.F.C. Anti-pig IgM antibodies in human serum react predominantly with Gal- α -1,3-Gal epitopes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(23): 11391–11395.
41. Schoen F.J., Levy R.J. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg* 2005; 79(3): 1072–1080.
42. Simon P.M., Neethling F.A., Taniguchi S. et al. Intravenous infusion of Gal- α -1,3-Gal oligosaccharides in baboons delays hyperacute rejection of porcine hearts xenografts. *Transplantation* 1998; 65(3): 346–353.
43. Tanemura M., Yin D., DiSesa V. J., Galili U. Preventing anti-Gal response in xenograft recipients by an alpha-Gal toxin. *Transplant Proc* 2001; 33(1–2): 699–700.
44. van de Kerkhove M.P. Evidence for Gal- α -1,3-Gal expression on primary porcine hepatocytes: implication for bioartificial liver systems. *J Hepatol* 2005; 42(4): 541–547.
45. Xu T., Lorf T., Sablinski T. et al. Removal of anti-porcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma in vitro and in vivo by a Gal- α -1,3-Gal- α -1,4-Glc-R immunoaffinity column. *Transplantation* 1998; 65(2): 172–179.

42. Simon P.M., Neethling F.A., Taniguchi S. et al. Intravenous infusion of Gal-alpha-1,3-Gal oligosaccharides in baboons delays hyperacute rejection of porcine hearts xenografts // *Transplantation*. – 1998. – Vol. 65, №3. – P. 346–353.
43. Tanemura M., Yin D., DiSesa V.J., Galili U. Preventing anti-Gal response in xenograft recipients by an alpha-Gal toxin // *Transplant Proc.* – 2001. – Vol. 33. №1–2. – P. 699–700.
44. van de Kerkhove M.P. Evidence for Gal-alpha-1,3-Gal expression on primary porcine hepatocytes: implication for bioartificial liver systems // *J. Hepatol.* – 2005. – Vol. 42, №4. – P. 541–547.
45. Xu T., Lorf T., Sablinski T. et al. Removal of anti-porcine natural antibodies from human and nonhuman primate plasma in vitro and in vivo by a Gal- α -1,3-Gal- α -1,4-Glc-R immunoaffinity column // *Transplantation*. – 1998. – Vol. 65, №2. – P. 172–179.

