

Трансплантация эмбриональных стволовых клетокА.В. КАРПЕНКО¹, В.Н. БУГАЕВ¹, А.И. СМІКОДУБ¹, Т.Н. ЮРЧЕНКО²¹Координационный центр трансплантации органов, тканей и клеток

МЗ Украины, г. Киев

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков**Embryonic Stem Cell Transplantation**KARPENKO A.V.¹, BUGAYEV V.N.¹, SMIKODUB A.I.¹, YURCHENKO T.N.²¹Coordinating Center of Transplantation of Organs, Tissues and Cells
of the Ministry of Health Care of Ukraine²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences
of the Ukraine, Kharkov

Приводятся результаты многолетних клинических исследований лечения больных диабетом, онкологическими и гематологическими заболеваниями с помощью трансплантации эмбриональных клеточных суспензий: стойкое снижение необходимой суточной дозы инсулина и компенсация инсулинзависимого диабета, увеличение периодов и глубины ремиссий, уменьшение проявлений осложнений (анемии, дистрофий и т.д.); быстрое восстановление количества гранулоцитов (3-7 дней) и формулы крови при миелотоксических агранулоцитозах у онко- и гематологических больных, повышение толерантности к химиотерапии, снижение количества рецидивов и метастазирования, повышение качества жизни, существенное улучшение психоэмоционального статуса, уменьшение депрессивного компонента. Обсуждаются источники стволовых клеток (СК), исключается допустимость применения материала из жизнеспособных эмбрионов после искусственной фертилизации. Приводится законодательная и методическая база для развития и координации исследований в области трансплантации эмбриональных стволовых клеток (ЭСК).

Приводяться результати багаторічних досліджень лікування хворих діабетом, онкологічними і гематологічними захворюваннями за допомогою трансплантації ембріональних клітинних суспензій: стійке зниження необхідної добової дози інсуліну і компенсація інсулінозалежного діабету, збільшення періодів і глибини ремісій, зменшення проявів ускладнень (анемії, дистрофії і т.д.), швидке відновлення кількості гранулоцитів (3-7 днів) і формули крові при мієлотоксичних агранулоцитозах у онко- і гематологічних хворих, підвищення толерантності до хіміотерапії, зменшення кількості рецидивів і метастазування, підвищення якості життя, суттєве покращення психоемоційного статусу, зменшення депресивного компоненту. Обговорюються джерела стовбурових клітин, виключається допустимість використання матеріалу з життєздатних ембріонів після штучної фертилізації. Приводиться законодавча і методична база для розвитку і координації досліджень в галузі трансплантації ембріональних стовбурових клітин.

The results of long-term clinical investigations of treating patients with diabetes, oncological and hematological diseases using the transplantations of embryonic cellular suspensions are presented: a persistent decrease in the essential daily insulin dose in insulin-dependent diabetes mellitus, increase in the periods and depth of remission, reduction of complications' manifestations (anemia, dystrophy, etc); rapid recovery of granulocytes number (3 to 7 days) and blood count in myelotoxic agranulocytoses in oncology and hematology patients, increase in tolerance to chemotherapy, reduction of relapses and metastasising, quality life improvement, a considerable increase in psychoemotional status, decrease in depression component. The sources of stem cells (SCs) are discussed, the unacceptability of material from viable embryos after artificial fertilisation is stated. Legislative and methodological base for the development and coordination of research in the field of embryonic stem cells (ESCs) transplantation is provided.

В истории медицины нам не известны случаи большего внимания общества к проблемам медицинских исследований, более резонансных дискуссий, большего вовлечения влиятельных политических и религиозных деятелей, чем изучение и применение ЭСК. В частности, несколько слушаний сенатских комиссий в 1999-2000 годах, подписание одним президентом и отмена сразу после инаугурации следующим президентом США рекомендаций, регулирующих научные и медицинские исследования с использованием ЭСК [18], высказывание Папы римского о своем отношении к проблеме, обращение к нации находившегося в отпуске президента.

Смысл происходящего при трансплантации ЭСК заключается в том, что клетки, введенные в организм реципиента, размножаются и дифференцируются так,

No cases of such great attention of society to the problems of medical investigations, the resonant discussions, the greater involvement of powerful political and religious figures, as the ESCs study and application, are known in the history of medicine. In particular, there were several hearings of senate commissions in 1999-2000, signing by one president and the revocation just after inauguration by the following President of USA, the recommendations, regulating scientific and medical investigations with ESCs usage [18], the statement of the Pope on his attitude to the problems, the address to the nation of the President of USA, being at vacations.

The matter of the fact during the ESCs transplantation consists in the fact, that the cells, introduced into a recipient's organism are reproduced

как они развивались бы в организме донора. Если некоторая функция организма реципиента ослаблена или отсутствует, то новые клетки “вовлекаются” в выполнение этой функции. Практически нет области медицины, которую подобный подход не мог бы революционизировать, как сказал директор Национального института здоровья Гарольд Вармус сенаторам США [29].

Каждый организм проходит развитие от объединения двух клеток до сложной системы из сотен типов специализированных клеток. Этот процесс развития и состоит в постепенной дифференциации клеток. Клетки, способные самовоспроизводиться, а также порождать более специализированное потомство, называются стволовыми клетками. Существует иерархия СК разной степени специализации. Прогениторные клетки (предшественники), которые занимают промежуточное место между стволовыми и специализированными клетками, дают только специализированное потомство и не самовоспроизводятся в своем недифференцированном виде [28]. Общепринятая классификация СК пока отсутствует, отдельные их классификации носят несовершенный характер, содержат противоречия [28].

К наименее специализированным СК относят тотипотентные клетки, создающие новый организм; затем – плюрипотентные СК, способные к детерминации и дифференциации в клетки любого из трех зародышевых листков. Далее следуют клетки, которые могут дифференцироваться только в пределах одного зародышевого листка. Наиболее изучены стволовые гемопоэтические клетки (эмбриональные до 8-й недели гестации включительно, фетальные с 9-й недели гестации и взрослые) [16, 28]. Выявлены нервные, мышечные, другие СК, подобные открытия продолжают [28].

Известно, что наиболее короткоживущие виды клеток в организме (в первую очередь – крови и эпителия) обеспечены СК в течение всей его жизни. Например, считалось, что нервная ткань взрослого человека полностью лишена СК. Результаты исследований последних лет позволяют оптимистичнее смотреть на репаративные возможности, заложенные в организме, поскольку сообщается об открытии все новых типов СК в организме взрослого человека, а также о способности некоторых из них проявлять высокую пластичность и включаться в репарацию не только собственных им, но и других видов клеток [17, 19, 28]. По нашим клиническим наблюдениям, в ряде случаев можно говорить даже о проявлениях “плюрипотентности” специализированными СК, в том числе гемопоэтическими. В настоящее время клинические результаты предшествуют методическим и методологическим подходам к изучению СК.

Несмотря на концептуальную простоту, эффективное и безопасное использование лечебных возможностей СК требует новых знаний. Последствия применения трансплантации ЭСК изучаются не во всех

and differentiated in such a way if they would develop in a donor's organism. If certain function of a recipient's organism is weakened or absent, new cells are “involved” in this function accomplishment. “There are practically no fields in medicine, which could not be revolutionised by such approach”, - said Harold Varmus, the Director of National Health Institute to the senators of USA [29].

Each organism develops starting from the joining up of two cells up to a complicated system of hundreds types of specialised cells. This developmental process consists in a gradual cell differentiation. Cells, which are capable to reproduce themselves as well as to give rise to more specialised posterity are called as stem cells. There is the SCs hierarchy of different specialisation degree. Progenitor cells (precursors), which take an intermediate place between stem cells and specialised ones, provide only specialised posterity and do not reproduce themselves in their non-differentiated type [28]. There is no commonly used SCs classification yet, their separate classifications are not improved and have some contradictions [28].

The totipotent cells, creating a new organism, then the pluripotent SCs, capable to the determination and differentiation into the cells of any of three germinal layers, are related to the less specialised ones. Then follow the cells, which can be differentiated only within the limits of one germinal layer. Stem hemopoietic cells (embryonic ones up to the 8th gestation week inclusive, fetal ones from the 9th gestation week and the adult ones) [17, 28] are the most studied. There were discovered neuronal, muscular, other SCs, the similar discoveries are in progress now [28].

It is known, that the most short-term living cell types in the organism (first of all blood and epithelium) are provided with SCs during all life of the organism. For example, one considered that the neuronal tissue of the adult person was completely deprived of SCs. The recent investigations allow to optimistically consider the reparative possibilities of the organism, since there are reported on the development of new SCs types in adult organism, as well as on the capability of some of them to manifest a high plasticity and to join the reparation of not only inherent to them, but other types of cells [16, 19, 28]. According to our clinical observations in some cases we can even speak about the manifestations of “pluripotency” by specialised stem cells, including hemopoietic ones. Nowadays the clinical results precede the methodical and methodological approaches to the SCs study.

In spite of a conceptual simplicity, an efficient and safe usage of SCs therapeutic possibilities requires the new knowledge. The application consequences of ESCs transplantation are studied not in all investigations. Some examples of an excessive application testify to the danger of an easy

исследованиях. Отдельные примеры применения свидетельствуют об опасности легкого отношения к кажущейся простоте их трансплантации.

Касаясь источников материала для трансплантации ЭСК, отметим, что один источник – это трупная эмбриональная ткань человека. Использование этой ткани в медицинских целях имеет длительную историю. После легализации аборт в большинстве цивилизованных стран была проведена значительная юридическая работа в отношении регламентации применения трупной ткани после медицинских абортов. В конце 80-х годов были приняты Рекомендации 1046 (1986) и 1100 (1989) парламентской Ассамблеи Совета Европы, сформулировавшие юридически и этически приемлемый подход к использованию трупной эмбриональной ткани человека [20, 21]. Эти Рекомендации учитываются в большинстве известных нам исследований. Отступление от них противоречит врачебной этике. На основе подходов, обобщенных этими Рекомендациями, было выполнено большинство исследований по проблеме трансплантации эмбриональных и фетальных стволовых клеток в 70-90-х годах [14, 17]. С учетом этих Рекомендаций были разработаны также более детализированные регламенты, среди которых следует выделить рекомендации 1993 года Европейской ассоциации по трансплантации и восстановлению ЦНС (NECTAR).

Другим источником является побочный продукт искусственного оплодотворения “в пробирке”. “Когда врачи соединяют яйцеклетку и сперму, чтобы создать жизнь вне матки, они обычно делают больше эмбрионов, чем будет имплантировано матери. Дополнительные эмбрионы остаются замороженными в лаборатории”, - так президент Буш объяснил согражданам происходящее [30]. И он указал на два фундаментальных вопроса: первый: являются ли эти замороженные эмбрионы человеческой жизнью, а посему, чем-то ценным, что требует защиты? И второй: если они все равно будут уничтожены, то нельзя ли их использовать для исследований, которые имеют возможность сохранить и улучшить другие жизни?

В Украине интенсивно развивается эмбриональная стволовая клеточная трансплантология, и мы не можем оставить без внимания проблему, волнуящую мир.

В отношении ЭСК мы полностью разделяем и применяем Рекомендации 1100 Совета Европы. Закон Украины о трансплантации соответствует этим Рекомендациям и обеспечивает развитие и использование соответствующего научного направления в медицине страны [2].

Что касается получения СК в результате искусственного оплодотворения в пробирке, то никогда медицинская общественность не предлагала использовать жизнеспособные эмбрионы – не важно свежие или консервированные – как лечебное средство.

attitude to the seeming simplicity of their transplantation.

Concerning the material sources for ESCs transplantation it should be noted, that one source is human cadaveric embryonic tissues. The usage of this tissue in medical purposes has a long history. After abortion legalisation in the majority of civilised countries there was carried-out a considerable juridical work concerning the regulation of cadaveric tissue application after medical abortions. At the end of the 80s there were accepted the Recommendations 1046 (1986) and 1100 (1989) of the Parliamentary Assembly of the Council of Europe, formulated the juridically and ethically acceptable approach to the usage of human cadaveric embryonic tissue [20, 21]. These Recommendations are taken into account in the majority of investigations known by us. The deviation from them contradicts to medical ethics. Basing on the approaches, summarised by these Recommendations, there was performed the majority of investigations on the problem of embryonic and fetal stem cell transplantation in the 70-90s [14, 17]. Taking into consideration these Recommendations there were developed more detailed regulations, among which we should emphasise the recommendations of 1993 of the European Association on CNSs Transplantation and Recovery (NECTAR).

Another source is the IVF side product. Here is the President Bush's explanation of this fact for citizens: “When doctors match sperm and egg to create life outside the womb, they usually produce more embryos than are planted in the mother. Once a couple successfully has children, or if they are unsuccessful, the additional embryos remain frozen in laboratories” [30]. And he pointed to two fundamental questions: the first one was in the fact if these frozen human embryos were human life, and therefore something valuable, that required to be protected? And the second one: if they are finally destroyed, can they be used for investigations, which are capable to preserve and improve other lives?

In Ukraine there is an intensive development of embryonic stem cellular transplantation and we can not disregard the problem, which is of anxiety for the whole world.

Concerning the ESCs, we completely share and apply the Recommendations 1100 of the Council of Europe. The Law of Ukraine on transplantation corresponds to these Recommendations and provides the development and usage of corresponding scientific direction in medicine of the country [2].

Concerning the SCs procurement as a result of IVF, never the medical community has proposed to use the viable embryos, without importance, fresh or preserved ones, as a medical mean or as a source of medicines.

We are not prone to discuss philosophical and theological question about the moment of life

Мы не склонны обсуждать философско-теологический вопрос о моменте возникновения жизни в эмбрионе или моменте вселения души. Но в отношении эмбриона, полученного в рамках искусственного оплодотворения, с нашей точки зрения, – это полноценная человеческая жизнь, ибо, как и его более счастливый имплантированный в матку “брат” (можно и без кавычек), он будет жить, если ему предоставить соответствующие условия. В США весной 2000 года была создана организация по “усыновлению” “лишних” эмбрионов после искусственного оплодотворения как демонстрация недопустимости разрушения этих эмбрионов в научных или терапевтических целях, поскольку это человеческая жизнь.

Возможность гибели эмбрионов в процессе длительного хранения не может быть поводом для преднамеренного их уничтожения. Замороженные в жидком азоте по оптимальным программам, они, по-видимому, смогут сохранять жизнеспособность неограниченно долго. Практика сохранения замороженных эмбрионов у лиц с высоким профессиональным риском повреждения репродуктивной функции дает многократные фактические подтверждения высокой сохранности жизнеспособного состояния эмбрионов спустя годы после оплодотворения и консервации. Удачное искусственное оплодотворение и рождение ребенка, по-видимому, не должно рекомендоваться родителям в качестве времени принятия решения о ликвидации не востребуемых эмбрионов. Вопрос об использовании остальных эмбрионов, несомненно, может возникать в семье и позже под влиянием многих обстоятельств.

Таким образом, с нашей точки зрения, следует продолжать развивать эмбриональную клеточную трансплантологию на основе использования трупного эмбрионального материала после медицинских аборт в первом триместре и не следует втягиваться в дискуссию о допустимости применения для этих целей “лишних” эмбрионов после искусственного оплодотворения. Тем более, что именно на основе использования ЭСК в конце 80-х годов украинские ученые включились в развитие проблемы их трансплантации, которая тогда обозначалась проще – трансплантация эмбриональной печени, но ориентировалась на лечебные эффекты СК [3]. В настоящее время Украина является одним из лидеров клинического применения этого метода в мире [3, 8, 10, 23, 26, 31]. Уже в 1989 году появились первые утвержденные Минздравом методические рекомендации по приготовлению суспензий, содержащих эмбриональные гемопоэтические стволовые клетки, для клинического применения, разработанные Институтом проблем криобиологии и криомедицины. Это создало правовую базу для клинических исследований.

Медицинская общественность в Украине подготовлена к практическому восприятию методов лечения на основе трансплантации ЭСК в большей мере, чем в любой другой стране мира. Минздравом и Академией наук утверждены методические регламенты клинического применения их трансплантации,

appearance in the embryo or the moment of soul moving in. But as for the embryo, obtained as a result of artificial fertilisation, from our point of view, this is a valuable human life, therefore as well as its happier “brother” implanted into the uterus (it can be written without inverted commas as well), it will live if the proper conditions are provided to it. In summer 2000 in USA there was established the organisation on the “adoption” of “surplus” embryos after artificial fertilisation as the demonstration of intolerance of these embryos destruction for scientific or therapeutic purposes, since this is a human life.

The possibility of embryos death during the process of long-term storage can not be the reason for the intentional destruction of them. Frozen in a liquid nitrogen according to the optimal programs they apparently will be able to preserve the viability for a long time without any limits. The practice of frozen embryo preservation in the persons with a high professional risk of reproductive function damage provides the multiple real confirmations of a high integrity rate of embryos’ viable state in many years after fertilisation and preservation. Successful artificial fertilisation and the birth of a child apparently should not be recommended to the parents as the time for making decision on the unclaimed embryos elimination. The question about the usage of rest embryos can undoubtedly rise in the family later under the effect of many circumstances.

Thus, from our point of view, the embryonic cell transplantation should be developed basing on the usage of cadaveric embryonic material after medical abortions in the first trimester, and we should not be involved in the discussion about the application accessibility of “surplus” embryos after IVF. Especially, namely on the base on the ESCs usage at the end of the 80s the Ukrainian scientists were involved in the development of transplantation problem, which then was simpler referred as the transplantation of embryonic liver, but was oriented to the SCs medical effects [3]. Nowadays Ukraine is one of the leaders in this method clinical application in the world [3, 8, 10, 23, 26, 31]. Even in 1989 there were appeared the first methodical recommendations, certified by the Ministry of Health Care on the suspension preparing, containing embryonic hemopoietic stem cells, for clinical application, elaborated by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine. This established the lawful base for clinical investigations.

Medical community in Ukraine is prepared to practical interpretation of the methods of treatment on the base of ESCs transplantation in a greater extent, than in any other country. There were approved by the Ministry of Health Care and the Academy of Sciences the methodical regulations of clinical application of their transplantation, elaborated at the National Medical University,

разработанные в Национальном медицинском университете; Институтах онкологии и радиологии, гематологии и трансфузиологии, эндокринологии и обмена веществ; Институте проблем криобиологии и криомедицины; Центре “EmCell” и Киевской медицинской Академии последипломного образования [4 - 6].

Если обратиться к публикациям 70-80-х годов, послужившим нам отправной точкой в разработке методов лечения с использованием трансплантации ЭСК [1, 12 - 15, 17], то можно отметить значительный прогресс в приготовлении суспензий, технике клинического применения, снижении риска осложнений, повышении воспроизводимости результатов лечения, выраженности лечебных эффектов.

За эти годы трансплантация ЭСК ушла от предтрансплантационного кондиционирования пациентов, заимствованного тогда из опыта трансплантации костного мозга [14, 15], и не требует посттрансплантационной иммунной супрессии, которая неизбежна при использовании более зрелых, чем эмбриональные стволовые, дифференцированных клеток. За счет криоконсервирования резко снизилась вероятность контаминации пациента в процессе трансплантации ЭСК [3, 12], так как хранение дает возможность тестировать донорский материал.

Трансплантация ЭСК значительно расширяет возможности врача при лечении целого ряда патологических состояний. Ниже мы приводим некоторые данные по заболеваниям, применительно к которым в стране создана методическая база для использования трансплантации ЭСК. Подробно данные изложены более чем в 100 отечественных и международных публикациях, 6 диссертациях аспирантов Национального медицинского университета, в 11 патентах, в том числе 6 украинских, доложены на 20 отечественных и международных конгрессах и съездах.

В исследованиях и лечении онкологических и гематологических больных в течение 1993-2001 годов наблюдалось около 200 пациентов [4, 5, 9, 24, 26, 27]. Некоторые результаты этих работ приводятся ниже.

У онкологических больных при развитии миелотоксического агранулоцитоза трансплантация ЭСК позволяет резко сократить сроки восстановления количества нейтрофилов (до 5-7 дней при 30 днях в контроле), уменьшить число инфекционных осложнений, особенно тяжелых (вдвое по сравнению с контролем), при необходимости проводить более агрессивную химиотерапию с меньшим риском для жизни больного.

В комплексном лечении онкологических больных с солидными опухолями применение трансплантации ЭСК позволяет подготовить тяжелобольных к операции, преодолев анемию (93,7% случаев в течение 2-х недель), стабилизировав вес (кроме случаев раковой кachexии), существенно восстановив общее состояние, в том числе проявления астенизации и утомляемости (достоверные изменения, начиная с 2-х недель после трансплантации), а также снизив риск осложнений от кровопотери и обеспечив более быструю реабилитацию больного.

Institutes of Oncology and Radiology, Haematology and Transfusiology, Endocrinology and Metabolism, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, “EmCell” Centre and Kiev Medical Academy of Post-Diploma Education [4-6].

If we address to the publications of the 70-80s, which served for us as a starting-point when developing the methods of treatment using ESCs transplantation [1, 12-15, 17], we can note a considerable progress in the suspension preparations, technique of clinical application, reduction of complication risk, increase in the reproduction of treatment results, manifestation of treatment effects.

For these years the ESCs transplantation stepped aside from the patients' pre-transplantation conditioning, taken then from the experience of bone marrow transplantation [14, 15] and does not require a post-transplantation immune suppression, which is inevitable when using more mature, than the embryonic stem cells, the differentiated ones. Due to the cryopreservation there was a sharp decrease in the probability of patient's contamination during the ESCs transplantation [3, 12], since the storage provides the possibility for donor material testing.

ESCs transplantation considerably widens the physician's possibilities when treating several pathological states. Certain data concerning the diseases, using which the methodical base for ESCs transplantation application was created in the country, are mentioned below. The data are cited in detail more than in 100 national and international publications, 6 theses of PhD students of the National Medical University, in 11 patents, including 6 Ukrainian ones, as well as reported at 20 national and international congresses and symposia. During 1993-2001 in the investigations and treatment of oncological and haematological patients about 200 patients were examined [26, 27, 4, 5, 9, 24]. Some results of these works are mentioned below.

In oncological patients at the development of myelotoxic agranulocytosis the ESCs transplantation allows to sharply reduce the terms of neutrophile number recovery (to 5-7 days at 30 days in the control), to decrease the number of infection complications, namely the severe ones (twice in comparison with the control), to perform when it is necessary more aggressive chemotherapy with a less risk for a patient's life.

In a combined treatment of oncological patients with solid tumors the application of ESCs transplantation allows to prepare the severely ill patients to the operation by overcoming anaemia (93.7% of cases during 2 weeks), by stabilising the weight (excepting the cases of cancer kachexia), by considerably recovering the general state, including the asthenisation and fatigability manifestations (statistically true changes starting from 2 weeks after transplantation), as well as by diminishing the complication risk of blood loss, and providing a patient's faster rehabilitation.

После трансплантации больные значительно легче переносят курсы химиотерапии: протекторный эффект трансплантации в отношении показателей формулы крови обеспечил возможность цитостатического лечения в течение 90-100 сут у больных с опухолью Вильмса и 60-70 сут у больных с остеогенной саркомой. Через 2 мес после трансплантации у больных наблюдалось достоверное улучшение показателей иммунитета, хотя они и не достигали уровня нормы.

У больных раком шейки матки процент рецидивов снизился после трансплантации более чем вдвое при сроке наблюдения 2 года. Отмечено достоверное увеличение срока выживания пациентов (в полтора раза) наиболее тяжелой группы инкурабельных больных, которым были выполнены паллиативные операции по поводу рака поджелудочной железы, осложненного желтухой.

Трансплантация способствовала повышению качества жизни пациентов, что проявлялось достоверным увеличением индекса Карновского, постепенно возраставшего в течение 2-х месяцев после трансплантации. Отмечены выраженные положительные изменения психологического, эмоционального и психофизиологического характера, значительное снижение выраженности депрессивных проявлений, начиная с первых дней после трансплантации [24].

По данным [9, 25, 26], применение трансплантации ЭСК у онкологических больных позволило подготовить тяжелобольных к операции, обеспечить более высокую толерантность по отношению к химиотерапии и ускорить репарацию после нее, восстановить противоопухолевый иммунитет, снизить вероятность рецидивирования и метастазирования.

В ряде публикаций 80-х годов предсказывалось эффективное лечебное влияние трансплантации ЭСК на течение сахарного диабета 1 типа. К настоящему времени мы располагаем 8-летним опытом успешного лечения более 150 больных диабетом (часть исследований проводилась совместно с Институтом эндокринологии и обмена веществ) [7, 8, 22]. Ниже приводим ряд результатов.

Трансплантации ЭСК в комплексном лечении больных впервые выявленным инсулинзависимым диабетом приводят к устойчивой компенсации заболевания. При этом после трансплантации постепенно снижается необходимая суточная доза инсулина (на 20-100%, в среднем по группе на 40,8%) в течение 2-3-х месяцев (через $59,0 \pm 4,3$ дней достигается максимальное снижение). Восстановление исходной дозы инсулина не наблюдалось на протяжении как минимум года. Это позволило существенно замедлить или остановить прогресс впервые выявленного инсулинзависимого диабета. При необходимости производились повторные

Patients endure much easier the chemotherapy courses after transplantation: the transplantation protective effect in respect to the blood count indices provided the possibility of cytostatic treatment during 90-100 days in patients with William's tumour and during 60-70 days in those with osteogenic sarcoma. In patients in 2 months after transplantation there was observed a statistically true improvement of the immunity indices, although they did not reach the norm level.

In patients with cervical carcinoma the percentage of relapses decreased after transplantation more than twice during 2 years' observation term. There was noted a statistical and significant increase in terms of patients' survival (in 1.5 times) of the most severe group of non-curable patients, to whom the palliative operations on pancreas cancer, complicated by jaundice, were carried-out.

Transplantation contributed to the increase in the patients' life quality, that was manifested in a statistical and significant increase in Karnavsky's index, gradually increased during 2 months after transplantation. There were noted the manifested positive changes of psychological, emotional and psychophysical character, a considerable reduction of the depressive signs manifestations, starting from the first days after transplantation [24].

According to the data [9, 25, 26] the application of ESCs transplantation in oncological patients allowed to prepare the severely ill patients to the operation, to provide a higher tolerance to the chemotherapy and an accelerated recovery after it, to recover an anti-tumour immunity, to reduce the probability of relapsing and metastasising.

In publications of the 80s there was predicted an efficient therapeutic effect of ESCs transplantation on the Diabetes mellitus I type course. Nowadays we have the 8 years' experience of a successful treatment of more than 150 diabetic patients (a part of the investigations was performed together with the Institute of Endocrinology and Metabolism) [7, 8, 22]. Some results are presented below.

ESCs transplantations in a combined treatment of patients with the firstly revealed insulin-dependent diabetes result in a resistant compensation of the disease. In this case after transplantation there is a gradual reduction in the necessary daily insulin dose (by 20-100%, in average in the group by 40.8%) during 2-3 months (the maximum reduction is gained in 59.0 ± 4.3 days). The initial insulin dose recovery was not observed during a year as minimum. This allowed to considerably slow down or stop the progress of the firstly revealed insulin-dependent diabetes. The repeated transplantations with the ESCs preference of the same genetic material for the polychimerism limitation were carried-out when it was necessary [11].

The main mechanism of the ESCs transplantation therapeutic effect at the firstly revealed diabetes is

трансплантации с предпочтением ЭСК того же генетического материала для ограничения полихимеризма [11].

Основным механизмом лечебного действия трансплантации ЭСК при впервые выявленном диабете, по-видимому, является прерывание или существенное ослабление аутоиммунной агрессии с частичным восстановлением продукции инсулина. На вероятность именно этого механизма указывает восстановление иммунных показателей больного после трансплантации. Так, через 14-28 дней после трансплантации наблюдалось увеличение абсолютного количества лимфоцитов – в среднем на $35,9 \pm 10,7\%$; количества Т-лимфоцитов: CD3⁺-клеток – на $58,1 \pm 17,2\%$, CD4⁺-клеток – на $54,9 \pm 24,2\%$, CD8⁺-клеток – на $57,7 \pm 13,1\%$. При повторных обследованиях через 2-3 мес после трансплантации этот эффект сохранялся: количество CD3⁺-клеток – на $43,0 \pm 12,7\%$, CD8⁺-клеток – на $56,2 \pm 15,4\%$. Снизилось количество В-лимфоцитов: CD22⁺-клеток – на $28,4 \pm 13,9\%$.

Коррекция иммунного статуса наблюдается также у пациентов с осложнениями в виде нефропатии, почечной недостаточности и т.д. В этой группе больных через 29-45 дней после трансплантации изменились следующие показатели: увеличилось абсолютное количество лимфоцитов – в среднем на $50,7 \pm 14,5\%$; Т-лимфоцитов: CD3⁺-клеток – на $72,3 \pm 11,5\%$, CD4⁺-клеток – на $62,7 \pm 11,9\%$, CD8⁺-клеток – на $84,3 \pm 21,2\%$. Через 2-3 мес указанные изменения увеличились еще на 5-12%.

Трансплантация гемопоэтических ЭСК оказалась весьма эффективной в отношении основных осложнений диабета. У больных сахарным диабетом, осложненным диабетической нефропатией I-II стадии, хронической почечной недостаточностью I-II ступени, анемическим синдромом, она позволила восстановить показатели красной крови через 30-45 дней после трансплантации с дальнейшей стабилизацией их уровня в течение 2-11 мес. Уменьшились дистрофические проявления, возросла работоспособность.

Как известно, в настоящее время не существует надежного метода прерывания аутоиммунной агрессии при любых аутоиммунных заболеваниях, а применяющиеся химио- и гормонотерапия являются паллиативом с тяжелыми побочными действиями. Выявленный эффект коррекции иммунной системы при аутоиммунных заболеваниях проверен нами на ряде болезней с аутоиммунным генезом (неспецифический язвенный колит, рассеянный склероз, ревматоидный артрит и т.д.). Этот эффект оказался характерным для влияния ЭСК на иммунную систему реципиента в случаях аутоиммунных заболеваний, и его изучение продолжается.

apparently the interruption or considerable weakening of autoimmune aggression by a partial insulin recovery. The recovery of a patient's immune indices after transplantation points to the probability of namely this mechanism. Thus, in 14-28 days after transplantation there was observed an increase in lymphocyte number by $35.9 \pm 10.7\%$ in average; for T-lymphocyte number: CD3⁺-cells by $58.1 \pm 17.2\%$, CD4⁺-cells by $54.9 \pm 24.2\%$, CD8⁺-cells by $57.7 \pm 13.1\%$. At the repeated observations in 2-3 months after transplantation this effect was kept: for CD3⁺-cells number by $43.0 \pm 12.7\%$, CD8⁺-cells by $56.2 \pm 15.4\%$. There was a reduction of B-lymphocyte number: CD22⁺-cells by $28.4 \pm 13.9\%$.

The immune status correction is also observed in patients with the complications in the form of nephropathy, renal insufficiency etc. In this group of patients in 29-45 days after transplantation there was a change in the following indices: an increase in absolute number of lymphocytes by $50.7 \pm 14.5\%$ in average; for T-lymphocytes: CD3⁺-cells by $72.3 \pm 11.5\%$, CD4⁺-cells by $62.7 \pm 11.9\%$, CD8⁺-cells by $84.3 \pm 21.2\%$. In 2-3 months the mentioned changes augmented some more by 5-12%.

Transplantation of hemopoietic ESCs occurred to be quite efficient in respect to the main diabetic complications. In patients with Diabetes mellitus, complicated with diabetic nephropathy of I-II grade, chronic renal insufficiency of I-II grade, anaemic syndrome, it allowed to recover the red blood indices in 30-45 days after transplantation with further stabilisation of their level during 2-11 months. There was the reduction of dystrophic signs, the augmentation of capacity for work.

As it is known, nowadays there is no reliable method for autoimmune aggression interruption at any autoimmune diseases, and the applied chemotherapy and hormonotherapy are the palliative with severe side-effects. The revealed effect of immune system correction at autoimmune diseases was checked by us in several diseases with autoimmune genesis (non-specific ulcerative colitis, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis etc.). This effect occurred to be typical for ESCs effect on a recipient's immune system in the cases of autoimmune diseases and its study is in progress.

It should be noted, that the methods of ESCs transplantation and the indications to their application are at the beginning of their development and therefore a detailed examination and study of each patient is quite valuable from scientific point of view. We hope, that the correct joint work coordination in the field of ESCs transplantation will allow to efficiently unite the forces of national scientists on the important direction of modern transplantology and contribute to the prosperity of all national schools, developing this method.

Следует отметить, что методы трансплантации ЭСК и показания к их применению находятся в начале своего развития, и поэтому подробное обследование и изучение каждого пациента весьма ценно с научной точки зрения. Мы надеемся, что корректная коллегиальная координация работы в области трансплантации ЭСК позволит эффективно объединить усилия отечественных ученых на важном направлении современной трансплантологии и способствовать процветанию всех отечественных школ, развивающих его.

Литература

1. Бубнов А. Н., Абдулкадыров К. М., Балашова В. А. и др. Методика получения и некоторые морфофункциональные характеристики гемопоэтических клеток фетальных органов // Пробл. гематологии.– 1982.– 27.– N5.– С. 12-16.
2. Бугаев В.Н. Сучасний стан і перспективи розвитку трансплантології в Україні // Трансплантологія.– Т.2.– №1.– С. 4-15.
3. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. и др. Гемопоэтические клетки эмбриональной печени.– Киев: Наук. думка, 1988.– 190 с.
4. Застосування трансплантації кріоконсервованих гемопоетичних клітин ембріональної печінки в комплексному лікуванні хворих на злоякісні новоутворення // Ю.Я. Гриневич, О.І. Смикодуб та ін. Метод. рекомендації.– Київ: Мінздрав України, 1999.– 16 с.
5. Лікування мієлотоксичного агранулоцитозу у хворих на гострий лейкоз гемопоетичними клітинами ембріональної печінки людини // О.І. Смикодуб, С.М. Гайдюкова та ін. Метод. рекомендації.– Київ: Мінздрав України. АМН України, 2001.– 13 с.
6. Лікування хворих з вперше виявленим інсулінозалежним цукровим діабетом гемопоетичними клітинами ембріональної печінки // А.С. Єфимов, О.І. Смикодуб та ін. Метод. рекомендації.– Київ: Мінздрав України, 2000.– 16 с.
7. Новицька А. В. Лікування хворих на цукровий діабет з імунними та гематологічними порушеннями гемопоетичними клітинами ембріональної печінки людини: Автореф. дис... канд. мед. наук.– Київ, 2000. - 21 с.
8. Смикодуб О.І. Лікування хворих на вперше виявлений інсулінозалежний цукровий діабет гемопоетичними клітинами ембріональної печінки // Ендокринологія.– 2001.– Т. 6, № 1.– С. 80-88.
9. Снігир Н.В. Застосування гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини в лікуванні пітостатичної мієлодепресії у онкологічних хворих: Автореф. дис... канд. мед. наук.– Київ, 2001.– 20 с.
10. Цимбалюк В.І., Пічкур Л.Д., Руденко В.А., Пічкур Н.О. Клініко-імунологічні дослідження впливу нейротрансплантації при спастичних формах дитячого церебрального паралічу // Трансплантологія.– 2000.– Т.1, №1.– С. 156-157.
11. Bacchetta R., Vandekerckhove B. A. E., Touraine J. L., Bigler M. et al. Chimerism and Tolerance to Host and Donor in Severe Combined Immunodeficiencies Transplanted with Fetal Liver Stem Cells.– The American Society for Clinical Investigation. Inc. – Volume 91. March 1993, P. 1067-1078.
12. Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Cryopreservation of fetal stem cells // Bone Marrow Transplantation.– 11, 1993.– P.1-123
13. Fine A. Transplantation of fetal cells and tissue: an overview // CMAJ.– 1994, Nov 1; 151(9).– P. 1261-1268.
14. Gale R.P., Touraine J.L., Kochupillai V. Synopsis and perspectives on fetal liver transplantation // Thymus.– 1987.– 10(1-2).- P.1-4.

References

1. Bubnov A.N., Abdulkadyrov K.M., Balashova V.A et al. The methods for obtaining certain morphofunctional characteristics of hemopoietic cells of fetal organs // Problemy gematologii.– 1982.– 27.– N5.– P. 12-16.
2. Bugayev V.N. Current state and the development perspectives of the transplantology in Ukraine // Transplantologiya, V2.– N1.– P.4-15.
3. Grischenko V.I., Lobyntseva G.S., Votyakova I.A. et al. Hemopoietic cells of embryonic liver.– Kiev: Naukova dumka, 1988.– 190p.
4. Application of transplantation of embryonic liver hemopoietic cells in a combined treatment of patients with malignant tumours // Grinevich Yu.Ya., Smikodub O.I. et al. Methodical recommendations.– Kyiv: Ministry of Health Care of Ukraine, 1999.– 16 p.
5. Treatment of myelotoxic agranulocytosis in patients with acute leukosis by means of hemopoietic cells of human embryonic liver // Smikodub O.I., Gajdukova S.M. et al. Methodical recommendations.– Kyiv: Ministry of Health Care of Ukraine. Academy of Medical Sciences of Ukraine, 2001.– 13p.
6. Treatment of patients with firstly revealed insulin-dependent Diabetes mellitus by means of embryonic liver hemopoietic cells // Efimov A.S., Smikodub O.I. et al. Methodical recommendations.– Kyiv: Ministry of Health Care of Ukraine. Academy of Medical Sciences of Ukraine, 2000.– 16p.
7. Novitskaya A.V. Treatment of patients with Diabetes mellitus with the immune and hematological disorders using the human embryonic liver hemopoietic cells: The author's abstract of thesis for cand. med. sci.– Kyiv, 2000.– 21p.
8. Smikodub O.I. Treatment of patients with the firstly revealed insulin-dependent Diabetes mellitus by hemopoietic cells of embryonic liver // Endokrinologiya.– 2001.– V6, N1.– P. 80-88.
9. Snigir N.V. Application of hemopoietic cells of human embryonic liver when treating pitostatic myelodepression in oncological patients: The author's abstract of thesis for cand. med. sci.– Kyiv, 2001.– 20p.
10. Tsimbalyuk V.I., Pichkur L.D., Rudenko V.A., Pichkur N.O. Clinical and immunological investigations of neurotransplantation effect at spastic forms of infantile cerebral paralysis // Transplantologiya.– 2000.– V1, N1.– P. 156-157.
11. Bacchetta R., Vandekerckhove B. A. E., Touraine J. L., Bigler M. et al. Chimerism and Tolerance to Host and Donor in Severe Combined Immunodeficiencies Transplanted with Fetal Liver Stem Cells.– The American Society for Clinical Investigation. Inc. – Volume 91. March 1993, P. 1067-1078.
12. Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Cryopreservation of fetal stem cells // Bone Marrow Transplantation.– 11, 1993.– P.1-123
13. Fine A. Transplantation of fetal cells and tissue: an overview // CMAJ.– 1994, Nov 1; 151(9).– P. 1261-1268.
14. Gale R.P., Touraine J.L., Kochupillai V. Synopsis and perspectives on fetal liver transplantation // Thymus.– 1987.– 10(1-2).- P.1-4.
15. Izzi T., Polchi P., Galimberti M., Delfini C. et al. Fetal liver transplant in aplastic anemia and acute leukemia // Prog. Clin. Biol. Res.– 1985.– V.193.– P. 237-249.
16. Lansdorp P.M., Dragowska W., Mayani H. Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells // Journal of Experimental Medicine.– 1993.– 178 (3).– P. 787-91.
17. Lindvall O. Transplants in Parkinson's disease // European Neurology.– 1991.– 31, Suppl 1.– P. 17-27.
18. National Institutes of Health Guidelines for Research Using Human Pluripotent Stem Cells, NIH Stem Cell Information Archives, August 25, 2000 (corrected November 21, 2000).– <http://www.nih.gov/news/stemcell/stemcellguidelines.htm>
19. NIH: What would you hope to achieve from human pluripotent stem cell research?, NIH Stem Cell Information Archives, April 26, 2000.– <http://www.nih.gov/news/stemcell/achieve.htm>

15. *Izzi T., Polchi P., Galimberti M., Delfini C. et al.* Fetal liver transplant in aplastic anemia and acute leukemia // *Prog. Clin. Biol. Res.*— 1985.— V.193.— P. 237-249.
16. *Lansdorp PM., Dragowska W., Mayani H.* Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells // *Journal of Experimental Medicine.*— 1993.— 178 (3).— P. 787-91.
17. *Lindvall O.* Transplants in Parkinson's disease // *European Neurology.*— 1991.— 31, Suppl 1.— P. 17-27.
18. *National Institutes of Health Guidelines for Research Using Human Pluripotent Stem Cells*, NIH Stem Cell Information Archives, August 25, 2000 (corrected November 21, 2000).— <http://www.nih.gov/news/stemcell/stemcellguidelines.htm>
19. *NIH: What would you hope to achieve from human pluripotent stem cell research?*, NIH Stem Cell Information Archives, April 26, 2000.— <http://www.nih.gov/news/stemcell/achieve.htm>
20. *Parliamentary Assembly of the Council of Europe* (1986) On the use of human embryos and fetuses for diagnostic, therapeutic, scientific, industrial and commercial purposes. Council of Europe, Strasbourg, Recommendation 1046
21. *Parliamentary Assembly of the Council of Europe* (1989) On the use of human embryos and fetuses for scientific research. Council of Europe, Strasbourg, Recommendation 1100
22. *Smikodoub A.I., Novitskaya A.V., Yefimov A.S.* Experience in treatment of patients suffering from diabetes mellitus with the use of fetal cell suspensions. Abstracts of Fourth International Congress "The Cell Transplantation Society. Montreux / Switzerland, March 21-24, 1999 // *Cell Transplantation*, V.8, N 2, March/April 1999, p. 200, p. 121.
23. *Smikodoub A.I., Bushneva V.A.* New method of treatment the patients suffering from autoimmune intestinal diseases with the use of embryonic stem cell transplantation cellular therapy / Abstracts of Institute Pasteur Euroconferences.— Paris, France, 3-4 February 2000.— P. 20
24. *Smikodoub A., Karpenko A.* Psychophysiological changes in patients due to fetal cell transplantations. Abstracts of Fourth International Congress "The Cell Transplantation Society. Montreux / Switzerland, March 21-24, 1999 // *Cell Transplantation.*— 1999.— V. 8, N 2.— P. 200.
25. *Smikodub A.I.* Embryonic stem cell transplantation in anti-cancer treatment. Abstracts of the 12th International Symposium Supportive Care in Cancer, May 2000, Washington, USA // *Supportive Care in Cancer.*— 2000.— V. 8, N 3.— P. 256.
26. *Smikodub A.I., Grinevich Yu.A., Bendyug G.D. et al.* Transplantation of cryopreserved fetal liver hemopoietic cells in complex treatment of cancer patients. The 25th Anniversary Meeting of the International Society for oncodevelopmental biology and medicine 19-24 september 1997, Montreux, Switzerland // *Tumor biology.*— 1997.— N 18, suppl. 2.— p.127.
27. *Smikodub A., Tretyar N., Snigyr N.* Treatment of cytostatic agranulocytosis in patients with leukemia by human embryonic liver hemopoietic cells. Abstracts. Society for Minimally Invasive Therapy Ninth Annual International Meeting 14-16 July 1997, Kyoto, Japan // *Minimally Invasive Therapy.*— 1997.— V.5, Suppl. 1.— P. 67.
28. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*, National Institutes of Health Stem Cell Information, July 2001.— <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>
29. *The Director's Congressional Testimony on Stem Cell Research*, NIH Stem Cell Information Archives, December 2, 1998.— <http://www.nih.gov/about/director/120298.htm>
30. *The President's Address to the Nation*, National Institutes of Health Stem Cell Information, August 9, 2001.— <http://www.whitehouse.gov/news/releases/2001/08/20010809-2.html>
31. *United State patent. Number: 6,184,033 B1.* Date of patent: Feb. 6, 2001. Medicinal preparation based on fetal suspension having immune substituting effect for patients with acquired immune deficiency syndrome (HIV infection). Inventor: Smikodub A.I.
20. *Parliamentary Assembly of the Council of Europe* (1986) On the use of human embryos and fetuses for diagnostic, therapeutic, scientific, industrial and commercial purposes. Council of Europe, Strasbourg, Recommendation 1046
21. *Parliamentary Assembly of the Council of Europe* (1989) On the use of human embryos and fetuses for scientific research. Council of Europe, Strasbourg, Recommendation 1100
22. *Smikodoub A.I., Novitskaya A.V., Yefimov A.S.* Experience in treatment of patients suffering from diabetes mellitus with the use of fetal cell suspensions. Abstracts of Fourth International Congress "The Cell Transplantation Society. Montreux / Switzerland, March 21-24, 1999 // *Cell Transplantation*, V.8, N 2, March/April 1999, p. 200, p. 121.
23. *Smikodoub A.I., Bushneva V.A.* New method of treatment the patients suffering from autoimmune intestinal diseases with the use of embryonic stem cell transplantation cellular therapy / Abstracts of Institute Pasteur Euroconferences.— Paris, France, 3-4 February 2000.— P. 20
24. *Smikodoub A., Karpenko A.* Psychophysiological changes in patients due to fetal cell transplantations. Abstracts of Fourth International Congress "The Cell Transplantation Society. Montreux / Switzerland, March 21-24, 1999 // *Cell Transplantation.*— 1999.— V. 8, N 2.— P. 200.
25. *Smikodub A.I.* Embryonic stem cell transplantation in anti-cancer treatment. Abstracts of the 12th International Symposium Supportive Care in Cancer, May 2000, Washington, USA // *Supportive Care in Cancer.*— 2000.— V. 8, N 3.— P. 256.
26. *Smikodub A.I., Grinevich Yu.A., Bendyug G.D. et al.* Transplantation of cryopreserved fetal liver hemopoietic cells in complex treatment of cancer patients. The 25th Anniversary Meeting of the International Society for oncodevelopmental biology and medicine 19-24 september 1997, Montreux, Switzerland // *Tumor biology.*— 1997.— N 18, suppl. 2.— p.127.
27. *Smikodub A., Tretyar N., Snigyr N.* Treatment of cytostatic agranulocytosis in patients with leukemia by human embryonic liver hemopoietic cells. Abstracts. Society for Minimally Invasive Therapy Ninth Annual International Meeting 14-16 July 1997, Kyoto, Japan // *Minimally Invasive Therapy.*— 1997.— V.5, Suppl. 1.— P. 67.
28. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*, National Institutes of Health Stem Cell Information, July 2001.— <http://www.nih.gov/news/stemcell/scireport.htm>
29. *The Director's Congressional Testimony on Stem Cell Research*, NIH Stem Cell Information Archives, December 2, 1998.— <http://www.nih.gov/about/director/120298.htm>
30. *The President's Address to the Nation*, National Institutes of Health Stem Cell Information, August 9, 2001.— <http://www.whitehouse.gov/news/releases/2001/08/20010809-2.html>
31. *United State patent. Number: 6,184,033 B1.* Date of patent: Feb. 6, 2001. Medicinal preparation based on fetal suspension having immune substituting effect for patients with acquired immune deficiency syndrome (HIV infection). Inventor: Smikodub A.I.

Accepted in 02.03.2002

Поступила 02.03.2002