

PL ISSN 0324-833X

POLSKIE
TOWARZYSTWO
ANATOMICZNE

POLSKIE
TOWARZYSTWO
BIOLOGII
KOMÓRKI

POLISH
ANATOMICAL
SOCIETY

POLISH SOCIETY
FOR CELL
BIOLOGY

VOL. 32, 2005

Suplement nr 23

Redaktorzy:

Andrzej Trzebski i Zbigniew Czernicki

**KOMÓRKI MACIERZYSTE
WYZWANIA BIOMEDYCZNE,
KONTROWERSJE ETYCZNE I PRAWNE**

4.02.05
**Postępy
Biologii
Komórki**

**Advances
in Cell
Biology**

Kwartalnik Polskiego Towarzystwa Anatomicznego, Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki, Polskiej Sieci UNESCO oraz Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej wydawany z częściową pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych.

Quarterly of the Polish Anatomical Society, the Polish Society of Cell Biology, the Polish UNESCO Net, and the Foundation for Cell Biology and Molecular Biology, partially supported by the Committee for Scientific Research (KBN)

Redaguje Kolegium – Editors:

Lilla HRYNIEWIECKA – energetyka komórki, mitochondria – cell energetics, mitochondria – *Zakład Bioenergetyki, Uniwersytetu im. A. Mickiewicza, 61-701 Poznań, ul. Fredry 10*

Bożena KAMIŃSKA-KACZMAREK – neurobiologia, biologia molekularna – neurobiology, molecular biology – *Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego 02-097 Warszawa, ul. Pasteura 3*

Jerzy KAWIAK – immunologia, cytometria, hematologia, biologia nowotworów – immunology, cytometry, hematology, cancer biology – *Zakład Cytologii Klinicznej CMKP, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99*

Wincenty KILARSKI – mięśnie, skurcz mięśniowy, ruchy komórek – muscles, muscle contraction, cell movements – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*

Janusz KUBRAKIEWICZ – biologia rozwoju, embriologia, różnicowanie komórek, cytoszkielet – developmental biology, embryology, cell differentiation, cytoskeleton – *Instytut Zoologiczny UW, 50-335 Wrocław, ul. Sienkiewicza 21*

Maria OLSZEWSKA – komórki roślinne, informacja genetyczna w komórkach roślinnych i zwierzęcych – plant cells, genetic information in plant and animal cells – *Zakład Cytologii i Cytochemii Roślin Instytutu Fizjologii i Cytologii UŁ, 90-237 Łódź, ul. Banacha 12/16*

Barbara PŁYTYCZ – immunologia – immunology – *Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Ingardena 6*
Maciej ZABEL – histologia ogólna, endokrynologia, histochemia (immunocytochemia, hybrydocytochemia), ultrastruktura komórek – histology, endocrinology, histochemistry (immunocytochemistry, hybridocytochemistry), cell ultrastructure – *Zakład Histologii AM, 50-368 Wrocław, ul. Chalubińskiego 6a*

Jan ŻEROMSKI – patologia, immunologia, cytometria – pathology, immunology, cytometry – *Katedra i Zakład Immunologii AM 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49*

Rada Redakcyjna – Advisory Board:

Zofia OSUCHOWSKA – przewodnicząca, Szczepan BILIŃSKI, Mieczysław CHORAŻY, Leszek CIECIURA, Aleksander KOJ, Włodzimierz KOROHODA, Leszek KUŹNICKI, Olgierd NARKIEWICZ, Aleksandra PRZEŁĘCKA, Aleksandra STOJAŁOWSKA, Lech WOJTCZAK

Adres Redakcji – Editorial Office: Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa, Poland, tel. 8340 344, fax 8340470, e-mail: jkawiak@cmkp.edu.pl.

@ *Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej – Foundation for Cell Biology and Molecular Biology*

Indexed in: National Library of Medicine, Bathesda, Biosis, Philadelphia, Ulrich's International Periodicals Directory, New Jersey.

Wszystkie prawa zastrzeżone. Zabrania się kopiowania części lub całości bez uprzedniego pisemnego zezwolenia Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced in any form or by any means without the prior written permission of the publisher. Requests to the publisher for permission should be addressed to the Fundacja Biologii Komórki i Biologii Molekularnej.

Ark. wyd. 11,4. Ark. druk 9,5. Podpisano do druku w grudniu 2004 r., druk ukończono w styczniu 2005 r.

**KOMÓRKI MACIERZyste
WYZWANIA BIOMEDYCZNE,
KONTROWERSJE ETYCZNE I PRAWNE**

STEM CELLS, THE CHALLENGE TO MEDICAL SCIENCES –
BIOETHICAL AND LEGAL CONTROVERSIES

Warszawa, 22 kwietnia 2004 roku

Redaktorzy
Andrzej Trzebski i Zbigniew Czernicki



WSTĘP OD KOMÓREK MACIERZYSTYCH DO MEDYCyny REGENERACYJNEJ

INTRODUCTION FROM STEM CELLS TO REGENERATIVE MEDICINE

Andrzej TRZEBSKI

Wydział Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Summary: Regenerative medicine, a new chapter of medical sciences presents emerging impact on public opinion and politics and challenge to bioethics, philosophy of science and to law in its national and international dimension. All these topics are presented and discussed on the conference "Stem Cells, the Challenge to Medical Sciences – Bioethical and Legal Controversies" organized by the Medical Division of the Polish Academy of Sciences in April 2004. Original experimental research on the nonembryonal stem cells, including neuronal stem cells, results of clinical application of human stem cells, including umbilical blood cells, in hematology and leukemia, postinfarction congestive heart cardiology, human skin and epithelium regeneration are presented. Joint debate by top experts in medical research and regenerative medicine confronted with specialists in philosophical, ethical and international legal aspects of stem cells manipulation is presented. In this respect a clear distinction between nonembryonal and embryonal stem cells is stressed. Hopes on controlled transformation of nonembryonal human ovarian cells into pluripotential stem cells are articulated.

Key words: stem cells, clinical experiment, medical risk, bioethics, legal aspects.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, eksperyment kliniczny, ryzyko lekarskie, bioetyka, aspekty prawne.

Pobranie, identyfikacja i hodowla ludzkich komórek macierzystych oraz przeszczepienie ich pacjentom docelowo, tak aby trafiły do uszkodzonych miejsc w narządach, otwiera nowy rozdział w historii medycyny – medycynę regeneracyjną. Możliwość odnowienia i odmłodzenia uszkodzonych chorobą lub zużytych w starości tkanek budzi ogromne i zrozumiałe zainteresowanie opinii publicznej na całym świecie. Celem naszej konferencji było pokazanie, w jakim stopniu te nadzieje i oczekiwania, a także zagrożenia, znajdują swe uzasadnienie w faktach, w aktualnym stanie badań medycznych i leczniczych zastosowań praktycznych również w Polsce.

Cechą szczególną wszystkich wielkich osiągnięć nauk medycznych jest ich ogromny bezpośredni wpływ na życie człowieka, na jego długość i jakość, a tym samym na zmieniający się demograficzny kształt społeczeństw. Chwila śmierci odsunięta została od człowieka w ciągu ostatnich 100 lat średnio od urodzenia o około 30 lat, bardziej niż kiedykolwiek przedtem w historii ludzkości. Nauki medyczne i medycyna uratowały w tym czasie setki miliardów lat życia ludzkiego, o rzędy wielkości więcej niż pochłonęła

je złowroga cywilizacja śmierci w postaci wojen, masowych mordów i ludobójstwa. Jest to niedoceniony jeszcze dostatecznie przez społeczeństwa triumf nauk medycznych nad ciemną stroną postępu cywilizacji naukowo-technicznej, cywilizacją śmierci. Setki miliardów lat życia ofiarowane ludzkości w ciągu ostatniego stulecia ilustrują rolę, jaką odegrały i odgrywają nauki medyczne.

W odróżnieniu od dotychczasowych sukcesów, obecne perspektywy, jakie roztacza medycyna regeneracyjna, postawiły, bardziej niż kiedykolwiek, wielkie wyzwania dla rozważań daleko wykraczających poza nauki medyczne, dla sposobu myślenia o osobie ludzkiej, dla redefinicji podstawowych wartości ludzkich w aspekcie etycznym, filozoficznym i prawnym. Należy podkreślić, że w rozważaniach tych należy ostro rozgraniczyć pluri- czy omnipotencjalne komórki macierzyste zarodkowe, pobierane w okresie najwcześniejszych faz podziału zygoty ludzkiej (blastocysta), od komórek macierzystych niezarodkowych, pobieranych ze szpiku kostnego, krwi pępowinowej, mięśni szkieletowych czy innych narządów. Nie ma dziś już jakichkolwiek poważnych dyskusji nad koniecznością zakazu wykorzystania komórek macierzystych do celów reprodukcyjnych. Ta sprawa została ostatecznie zamknięta, a próby takie są prawnie zakazane w większości krajów oraz przez stosowne regulacje międzynarodowe. Natomiast przedmiotem kontrowersji jest wykorzystanie zarodkowych sklonowanych komórek macierzystych człowieka do celów terapeutycznych. Badania takie są objęte zakazem w wielu krajach. Przewidują to regulacje prawne niektórych krajów europejskich, a także Stanów Zjednoczonych, jeśli wykorzystywane byłyby w tym celu fundusze publiczne (federalne). Aspekty prawne aktualnej sytuacji w Polsce i ostrożne zalecenia Unii Europejskiej w tym zakresie prezentujemy na naszej konferencji.

Pierwsza udana i udokumentowana próba pozyskania do hodowli ludzkich sklonowanych zarodkowych komórek macierzystych w celach terapeutycznych, przeprowadzona w roku 2004 przez badaczy południowokoreańskich, gdzie zakaz takich badań nie obowiązuje, uznana za wielkie osiągnięcie nauk medycznych wzbudziła nową ogromną dyskusję w wymiarze międzynarodowym. W odpowiedzi na to wyzwanie rysują się pierwsze doświadczalne możliwości uniknięcia zastrzeżeń etycznych i religijnych przez stymulację niezapłodnionych (niezarodkowych) oocytów w kierunku transformacji do komórek dzielących się podobnie jak zapłodniona komórka jajowa. Gdyby takie próby, jak również próby cofnięcia rozwoju młodych niezarodkowych komórek macierzystych do stadium pluripotencjalnych komórek zarodkowych, uwieńczone zostały praktycznym sukcesem, zniknąłby główny powód kontrowersji etycznych i prawnych. Obecne tempo rozwoju nauk medycznych pozwala mieć nadzieję, że w kolejnej nadchodzącej dekadzie zbliżą nas one do rozwiązania tego problemu.

Debaty toczą się także w Polsce. Wypowiadają się gremia ekspertów, w tym także z grona uczonych Polskiej Akademii Nauk. Konferencja nasza różni się tym od poprzednich, że jest pierwszą w Polsce, która skupiła na wspólnej sali obrad obok siebie, etyków, filozofów, prawników wraz z lekarzami-badaczami, którzy zaprezentowali tu własne wyniki doświadczalne i własne rezultaty kliniczne u pacjentów i własne lekarskie doświadczenie. Uczestnikami konferencji byli ci, którzy nie tylko pozyskują i hodują niezarodkowe komórki macierzyste, ale przede wszystkim ci wszyscy w Polsce, którzy skutecznie próbują je przeszczepiać pacjentom. To w ich klinikach

rodzi się w Polsce, nie bez problemów i trudności, medycyna regeneracyjna. Dlatego wśród aspektów etycznych i prawnych diskutowanych na konferencji, wysunął się na czoło wątek ryzyka medycznego. Ten aspekt nie zawsze jest należycie eksponowany w podobnych dyskusjach. Tylko lekarze mają pełną świadomość takiego ryzyka. Medycyna i nauki medyczne mają bowiem swoją specyficzną bioetykę, etykę lekarską wpisaną w samą istotę medycyny. Medycyna jest i zapewne na zawsze pozostanie ustawiczną grą z żywą materią organizmu ludzkiego. Nikt lepiej niż doświadczony lekarz nie rozumie i nie czuje reguł tej gry, jej nieprzekraczalnych granic i rozmiarów ryzyka. Stawka w grze jest najwyższa: zdrowie i życie pacjenta. Zasada *Salus aegroti suprema lex* wpisana jest w samą istotę medycyny i nauk medycznych. Rozmiary przewidywanego i potencjalnego ryzyka lekarskiego przy przeszczepianiu komórek macierzystych były istotnym elementem dyskusji na naszej konferencji.

Mamy nadzieję, wraz ze współprzewodniczącym, współorganizatorem konferencji i współredaktorem tego tomu profesorem Zbigniewem Czernickim, dyrektorem Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, który był gospodarzem konferencji, że będzie ona istotnym i znaczącym głosem w dyskusji toczącej się dziś w Polsce i na świecie.

Wyrażamy serdeczne podziękowanie za ogromną pomoc w organizacji konferencji i za przygotowaniu do druku materiału, łącznie z tekstem wielodyscyplinarnej szerokiej dyskusji, Paniom Profesor Krystynie Domańskiej-Janik i Barbarze Łukomskiej oraz, przede wszystkim, Panu Profesorowi Jerzemu Kawiakowi, za udostępnienie łamów *Postępów Biologii Komórki* do publikacji

*Adres autora: Pałac Kultury i Nauki,
Plac Defilad 1, 00-901 Warszawa*

DOPUSZCZALNOŚĆ WYKORZYSTANIA ZARODKOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH DO CELÓW BADAWCZYCH

Eleonora ZIELIŃSKA

Wydział Prawa i Administracji Uniwersytetu Warszawskiego

1. Wstępne poznanie właściwości komórek macierzystych rodzi nadzieje na wykorzystanie ich w przyszłości, w leczeniu niektórych schorzeń o podłożu genetycznym lub pourazowym. Zdaniem naukowców doprowadzić to może do przełomu w rozwoju medycyny regeneracyjnej i stanowić istotne uzupełnienie klasycznej transplantologii [1].

Komórki takie występują we wszystkich tkankach i narządach osób dorosłych, we krwi pępowinowej noworodków, a także w zarodkach ludzkich.

Zaletą pozyskiwania komórek macierzystych z zarodków ludzkich jest ich szczególna podatność na przekształcanie w dowolne komórki i tkanki ludzkie (w tym kontekście mówi się o ich omnipotencji). Ponadto są one liczniejsze i na obecnym etapie rozwoju nauki tylko one dają się łatwo hodować, co umożliwia ich wystarczające mnożenie do celów badawczych.

Prowadzone obecnie badania nad terapeutycznym zastosowaniem somatycznych komórek macierzystych nie budzą większych zastrzeżeń etyczno-prawnych. Wiele kontrowersji wywołuje natomiast prawna dopuszczalność pozyskiwania i wykorzystywania ludzkich komórek zarodkowych.

W moim wystąpieniu przedstawię ten problem w świetle prawa polskiego oraz uregulowań międzynarodowych.

2. Badania nad ludzkimi zarodkowymi komórkami macierzystymi są nadal w fazie wstępnej, a ich ewentualne wykorzystywanie w terapii wymaga dalszych badań podstawowych. Dyskutowany problem stanowi jeden z aspektów szerszej problematyki wykorzystania ludzkich embrionów w eksperymentach poznawczych (badaniach naukowych).

Źródłem pozyskiwania zarodkowych komórek macierzystych mogą być wczesne zarodki z okresu poprzedzającego ich zagnieżdżenie w tkankach macicy (blastocyty). W Polsce, zarodki takie są dostępne w ramach praktyk medycyny wspomaganego

rozrodu w sytuacji, gdy doszło do powstania zarodków nadliczbowych, a dawcy gamet nie przewidują następnych ciąży. Zarodki takie są skazane na obumarciu lub ewentualne przechowywanie w stanie zamrożonym.

Druga możliwość pozyskiwania zarodkowych komórek macierzystych polega na tworzeniu zarodków w drodze klonowania, z przeznaczeniem do uzyskania z nich komórek macierzystych o zdeterminowanym genotypie, przeznaczonych dla z góry określonych potencjalnych biorców. Obie sytuacje – z punktu widzenia oceny prawnej – bardzo się różnią. Celowe jest, więc ich oddzielne omówienie.

3. W Polsce brak jest szczegółowych regulacji prawnych, odnoszących się do prokreacji wspomaganej. Oznacza to w konsekwencji nieistnienie prawnych ograniczeń tworzenia zarodków nadliczbowych, pod warunkiem (i tu panuje konsens oparty na standardach międzynarodowych), że z założenia miałyby być one wykorzystane w celach reprodukcyjnych do leczenia niepłodności (a właściwie bezdzietności).

Prawo nie przewiduje też żadnych szczególnych reguł postępowania z zarodkami nadliczbowymi, które nie mają szans na wszczęcie do macicy kobiety.

Jeżeli jednak przyjąć, że takie zarodki mogą być uznane za „dziecko poczęte” lub „człowieka w stanie embrionalnym”, to odnoszą się do nich ogólne normy, w których używa się tych pojęć, zamieszczone w: art. 26 ust. 3 ustawy o zawodzie lekarza [2], art. 157a kodeksu karnego z 1997 r. [3], oraz art. 45 Kodeksu Etyki Lekarskiej [4].

Wiele argumentów medyczno-etycznych przemawia za nieuznawaniem kilku- czy kilkunastokomórkowego produktu zapłodnienia (zwanego często pre-embriem) za desygnat nazwy „dziecko poczęte”, a zwłaszcza za pierwszy człon tej nazwy („dziecko”).

Ja osobiście podzielam ten pogląd, przede wszystkim z uwagi na fakt, iż zapłodnienie nie jest momentem, a procesem, w wyniku, którego – dopiero po kilkunastu dniach różnicowania się komórek, powstaje indywidualny organizm ludzki. Z tego też względu stoję na stanowisku, że ochrona prawna życia ludzkiego powinna rozpoczynać się dopiero po wykształceniu się embrionu i mieć charakter dynamiczny w miarę jego rozwoju. Nie będę jednak przedstawiała szerszych argumentów na poparcie tego poglądu, gdyż mam nadzieję, że temu właśnie będą m.in. służyć dalsze wystąpienia, zwłaszcza przedstawicieli nauk medycznych.

Ograniczę się do stwierdzenia, że z punktu widzenia prawnego przyjęcie takiego założenia oznacza, że problem pobierania komórek macierzystych od pre-embrionu nie został jeszcze prawnie uregulowany. W konsekwencji prowadzi to do uznania, że *de lege lata* pozyskiwanie takich komórek z zapasowych zarodków pozostałych z zabiegów wspomaganej prokreacji, jest prawnie dopuszczalne. *De lege ferenda* można tylko zastanawiać się, czy i jakie wymagania lub warunki powinno prawo nakładać na badaczy zamierzających przeprowadzać takie procedury medyczne.

Przy założeniu zaś odwrotnym, że zarodek od momentu zapłodnienia powinien być uznany za „dziecko poczęte” w rozumieniu wyżej wymienionych przepisów, stan prawny przedstawia się następująco:

Przepis artykułu 26 ust. 3 ustawy o zawodzie lekarza stanowi, że: „dzieci poczęte... nie mogą uczestniczyć w eksperymentach badawczych”..

Podobnie, w myśl artykułu. 45 ust. 2 KEL „lekarzowi nie wolno przeprowadzać eksperymentów badawczych z udziałem człowieka w stadium embrionalnym”.

Przyjmując, że badania nad komórkami macierzystymi są w eksperymentalnej fazie badań naukowych należałoby uznać, że przepisy te zakazują lekarzowi pozyskiwania takich komórek z zarodków ludzkich i prowadzenia na nich badań naukowych.

Nasuwa się pytanie, czy fakt, iż bezpośrednimi adresatami norm zawartych zarówno w ustawie o zawodzie lekarza, jak i w KEL są lekarze, oznacza, iż zakaz prowadzenia eksperymentów naukowych na dziecku poczętym (przy przyjęciu założenia, że pre-embriion stanowi desygnat tej nazwy) dotyczy wyłącznie przedstawicieli tego zawodu.

Odpowiedź na to pytanie powinna być raczej negatywna, przede wszystkim z uwagi na fakt istnienia w obowiązującym kodeksie karnym przepisu art. 157 a. Przepis ten wprowadzony do kodeksu karnego w 1999 r. [6]. przewiduje karę grzywny, ograniczenia wolności albo pozbawienia wolności do lat 2 za spowodowanie uszkodzenia ciała dziecka poczętego lub rozstroju zdrowia zagrażającego jego życiu. Przyjmując, że pozyskiwanie zarodkowych komórek macierzystych wiąże się zawsze ze spowodowaniem rozstroju zdrowia zarodka zagrażającego jego życiu, każda osoba (a więc nie tylko lekarz), która będzie prowadziła tego typu badania, może być pociągnięta do odpowiedzialności karnej.

Dodatkowy argument przemawiający za uznaniem, że zakaz prowadzenia eksperymentów naukowych na dziecku poczętym dotyczy wszystkich badaczy (czyli również tych niebędących lekarzami) wynika też z treści, mającego charakter normy powszechnej, przepisu art. 27 k.k. regulującego instytucję ryzyka nowatorstwa. Paragraf 3 tego przepisu stanowi, iż zasady i warunki dopuszczalności eksperymentu medycznego określa ustawa. Obecnie czyni to głównie ustawa o zawodzie lekarza [5], niemniej jednak ta delegacja może świadczyć o tym, że intencją ustawodawcy było, by zawartym w niej regulom podporządkowały się wszystkie osoby biorące udział w takich eksperymentach.

Warto na marginesie dodać, że przeciwko dopuszczalności prowadzenia eksperymentów badawczych na zarodkach ludzkich przemawia także treść uchwały Trybunału Konstytucyjnego z 17 marca 1993 r. [6], w której na tle poprzednio obowiązującego przepisu art. 23 a kodeksu karnego z 1969 r. [7]. dotyczącego zgody na eksperyment, Trybunał zastrzegł, że „eksperyment biomedyczny na człowieku, nie mający charakteru leczniczego, dokonany bez osobiście wyrażonej zgody osoby poddanej temu eksperymentowi, nie jest prawnie dopuszczalny”.

Jeśli więc uznać eksperyment na dziecku poczętym *in vitro* za eksperyment na człowieku (a takie stanowisko reprezentował Trybunał Konstytucyjny), to niezależnie od tego, kto go przeprowadza, zawsze będzie on niedopuszczalny, gdyż dla legalności takiego eksperymentu nie wystarczy zgoda dawców materiału genetycznego, a „osoba” poddana eksperymentowi (zarodek), z natury rzeczy, takiej zgody wyrazić nie może.

4. Podobnie, jeżeli przyjąć, że do zarodka ludzkiego od momentu jego zaistnienia mają zastosowanie przepisy dotyczące „dziecka poczętego”, to prawny zakaz prowadzenia eksperymentów naukowych na zarodkach ludzkich, w tym polegających na tworzeniu zarodkowych linii komórek macierzystych, czyni częściowo bezprzedmiotowymi rozważania nad dopuszczalnością klonowania człowieka do celów terapeutycznych.

Po co bowiem klonować organizmy pochodzenia ludzkiego, kiedy niedopuszczalne jest ich późniejsze wykorzystanie terapeutyczne. Niemniej jednak możliwa jest interpretacja, która podważa takie stwierdzenie. W związku bowiem z użyciem w art. 26 ustawy o zawodzie lekarza oraz w art. 157 a k.k. pojęcia „dziecko poczęte” można

dowodzić, że do bytu składającego się z kilku niezróżnicowanych komórek nie tylko jest nieadekwatne określenie „dziecko” (jak przy embrionach zapasowych, niewszczepionych w ramach zabiegu wspomagananej prokreacji), ale ponadto, w przypadku zastosowania techniki klonowania, nie może być mowy o tradycyjnie rozumianym „poczęciu”, jako efekcie zapłodnienia komórki jajowej plemnikiem. W związku z tym wszelkie zakazy prawne dotyczące eksperymentów na dziecku poczętym nie mają w przypadku klonowania zastosowania.

Warto przy tym zasygnalizować, że w 2003 r. do KEL wprowadzono nowy przepis zakazujący lekarzowi „uczestniczenia w procedurach klonowania ludzi” i to nie tylko do celów reprodukcyjnych, lecz również terapeutycznych (art. 39 w KEL). W tym jednak przypadku nie ma wątpliwości, że z uwagi na umieszczenie go w kodeksie deontologicznym niemającym charakteru aktu normatywnego, zakaz ten nie dotyczy badaczy nie będących lekarzami.

5. Należy przy tym podkreślić, że przyjęcie założenia, iż wszystkie przepisy odnoszące się do dziecka poczętego mają zastosowanie do pre-embryonu lub zarodka, niezależnie od sposobu jego kreacji, prowadzi do stwierdzenia, że obowiązujący w Polsce stan prawny w zakresie prowadzenia badań nad uzyskiwaniem z tego źródła zarodkowych linii komórek macierzystych jest znacznie bardziej restryktywny niż obowiązujący w wielu innych krajach.

Wśród krajów członkowskich Unii Europejskiej [8], najbardziej liberalny stan prawny obowiązuje w Wielkiej Brytanii, gdzie dopuszcza się nie tylko wykorzystanie zarodków ludzkich w celu pozyskiwania zarodkowych linii komórek macierzystych, lecz nawet tworzenie zarodków do celów badawczych [9].

W wielu jednak krajach wyraźnie dopuszcza się tworzenie zarodkowych linii komórek macierzystych z nadliczbowych zarodków. Na przykład w Finlandii: ustawa z 1999 r., w Grecji: ustawa z 2002 r., w Holandii: ustawa o embrionie z września 2002 r., w Szwecji, na podstawie uzgodnionej interpretacji ustawy z 1991 r., dotyczącej badań naukowych i leczenia z wykorzystaniem zapłodnionych ludzkich jajeczek.

W niektórych krajach ustawy dopuszczające pozyskiwanie komórek macierzystych z zarodka wprowadzają ograniczenia czasowe do ich pobrania (np. do 14 dnia rozwoju embrionu – w Finlandii i Szwecji). Niektóre regulacje prawne uzależniają także *expressis verbis* dopuszczalność takich badań od uzyskania specjalnej licencji przez ośrodek badawczy (Finlandia, W. Brytania) lub pozytywnej opinii komitetu etycznego (Finlandia, Holandia), czy też zgody obu dawców gamet (Grecja, Holandia, W. Brytania), albo spełnienia wymogu doniosłości celu poznawczego, nowego w naukach medycznych (Holandia). Zdarza się też, że wprowadzają zakaz stosowania zachęt finansowych (np. Grecja).

W Niemczech obowiązuje zakaz tworzenia zarodkowych komórek macierzystych, jednakże prawo zezwala, w pewnych warunkach, na import i używanie takich linii komórkowych. Taki stan prawny wynika z ustawy z 1990 r. o ochronie embrionu, zakazującej tworzenia większej liczby embrionów, niż planuje się wszczepić do macicy kobiety oraz prowadzenia badań naukowych na zarodkach ludzkich, chyba że mają one przynieść korzyść terapeutyczną embrionowi, na którym są prowadzone.

Nowa ustawa z 28 czerwca 2002 r. dopuszcza, na zasadzie wyjątku od generalnego zakazu, możliwość prowadzenia badań na zarodkowych komórkach macierzystych z tym, że tylko pochodzących z importu przy spełnieniu kilku dodatkowych warunków.

Uprawniony organ przed wyrażeniem zgody na taki import musi stwierdzić, że:

- 1) zarodkowe komórki macierzyste zostały pozyskane w kraju pochodzenia zgodnie z obowiązującym tam prawem, przed dniem 1 stycznia 2002 r. i były przechowywane w odpowiednich warunkach hodowlanych lub w stanie zamrożenia,
- 2) embriony, z których komórki te pochodzą, zostały stworzone przy okazji wspomagananej reprodukcji mającej na celu uzyskanie ciąży i nie zostały wykorzystane do sztucznej prokreacji, z innych przyczyn niż leżące po stronie embrionu,
- 3) dawcom gamet nie oferowano żadnej korzyści majątkowej lub osobistej,
- 4) inne przepisy prawa niemieckiego, a w szczególności ustawa o ochronie embrionu, nie stoją na przeszkodzie importowi lub wykorzystaniu takich embrionów.

Do krajów, które zakazują tworzenia zarodkowych linii komórek macierzystych, należą: Austria, Dania, Francja, Irlandia i Hiszpania.

W kilku krajach (jak np. w Belgii, we Włoszech, Luksemburgu i Portugalii) brak jest specjalnych regulacji tego problemu i w związku z tym problem dopuszczalności tworzenia zarodkowych linii komórek macierzystych pozostaje sprawą otwartą.

W USA i w Kanadzie brak jest prawa federalnego regulującego tę kwestię. W 2002 r. w Kalifornii wydano ustawę dopuszczającą wykorzystanie nadliczbowych zarodków do badań komórek macierzystych. Przyjęcie podobnej legislacji jest dyskutowane w Stanie Nowy Jork oraz Massachusetts. W sierpniu 2001 r. Prezydent USA ogłosił decyzję zezwalającą na wykorzystywanie federalnych środków finansowych na badania prowadzone na istniejących już zarodkowych komórkach macierzystych, o ile: a) zostały one przed tą decyzją wyizolowane z zapasowych embrionów, b) pieniądze federalne nie będą wykorzystywane do pozyskiwania komórek macierzystych, których skutkiem będzie unicestwienie embrionu. Oznacza to w praktyce, że takie pozyskiwanie musi być finansowane z funduszy prywatnych, bo prowadzenie badań nad embrionami, finansowanych z takiego źródła, nie podlega ograniczeniom.

W Kanadzie dyskusje nad nową legislacją jeszcze trwają, niemniej jednak Kanadyjski Instytut Zdrowia wydał wytyczne dotyczące komórek macierzystych, których przestrzeganie umożliwia ośrodkom badawczym ubieganie się o finansowanie takich badań, prowadzonych na nadliczbowych zarodkach.

6. Uregulowania ponadnarodowe nie zawierają zapisów odnoszących się bezpośrednio do kwestii pozyskiwania zarodkowych komórek macierzystych.

Konwencja Rady Europy o Ochronie Praw Człowieka i Godności Istoty Ludzkiej Wobec Zastosowań Biologii i Medycyny z 4.04.1997 r. (tzw. Konwencja Bioetyczna) nakazuje państwom stronom zapewnienie odpowiedniej ochrony płodowi oraz wprowadzenie zakazu tworzenia embrionów do celów badawczych (art.18), a także klonowania ludzi w celach reprodukcyjnych (protokół pierwszy do tej Konwencji), pozostawiając pozostałe kwestie do regulacji w ustawodawstwach krajowych. Polska podpisała tę Konwencję w 1999 r., lecz jej jeszcze nie ratyfikowała.

Unia Europejska nie ma kompetencji do regulacji kwestii badań naukowych, niemniej jednak niektóre dyrektywy wspólnotowe odnoszą się do badań na embrionach i

dopuszczalności ich wykorzystywania. W szczególności dyrektywa 98/44 EC w sprawie ochrony prawnej odkryć biotechnologicznych (patentowania życia) uznaje za niepodlegające opatentowaniu klonowanie istot ludzkich oraz wykorzystywanie ludzkich embrionów do celów komercyjnych lub handlowych. Ponadto Dyrektywa 98/79/EC w sprawie diagnostycznych wyrobów medycznych tworzonych *in vitro* (przy wykorzystaniu tkanek ludzkich) stanowi, że usuwanie, gromadzenie oraz używanie komórek, tkanek i substancji pochodzenia ludzkiego może być dokonywane wyłącznie w zgodzie z ustawodawstwem krajowym oraz w zgodzie z przepisami Konwencji Bioetycznej.

Karta Praw Podstawowych zakazuje tylko reprodukcyjnego klonowania oraz prowadzenia prenatalnych praktyk eugenicznych mających na celu selekcję osób.

Zakaz klonowania w celach reprodukcyjnych zawiera też art. 11 deklaracji UNESCO, dotyczącej genotypu ludzkiego oraz ochrony praw człowieka.

7. W konkluzji należy stwierdzić, że uwzględniając fakt, że obowiązujący w Polsce stan prawny jest daleki od jasności i może prowadzić w kontekście terapeutycznego wykorzystania komórek macierzystych, do paradoksalnych wniosków oraz że ustawodawca zdaje się raczej stymulować klonowanie do celów badawczych niż wykorzystywanie embrionów już istniejących, tworzonych na potrzeby wspomaganej prokreacji wydaje się celowe poddanie pod publiczną dyskusję kwestii kompleksowego uregulowania tego problemu.

Przyszłe uregulowania powinny wziąć pod uwagę specyfikę statusu pre-embryonu i embryonu *in vitro* oraz fakt, że zalecenia międzynarodowe nie wymagają wprowadzenia zakazu wykorzystywania zarodkowych komórek macierzystych do celów terapeutycznych, a w wielu krajach dopuszcza się takie badania.

Przyjęte rozwiązania prawne powinny z jednej strony jasno określić wymagania, jakie muszą spełniać badacze podejmujący takie badania i warunki ich prowadzenia. Nie powinny jednak, z drugiej strony, uniemożliwiać obywatelom naszego kraju w przyszłości dostępu do najnowszych osiągnięć wiedzy i techniki medycznej, wynikających z postępu nauk medycznych, a tym samym ograniczać możliwości korzystania z ich praw człowieka do ochrony zdrowia.

LITERATURA

- [1] TARKOWSKI A K. Stanowisko w sprawie wykorzystania zarodkowych komórek macierzystych (projekt).
- [2] Ustawa z 5.12.1996; Dz.U. 1997 Nr 28, poz. 152 ze zmianami.
- [3] Ustawa z 6 czerwca 1997, Dz.U. 1997 Nr 88, poz. 553 ze zmianami.
- [4] Kodeks Etyki Lekarskiej z 1991 r., po zmianach z 2003 r.
- [5] Dz.U.1999, Nr 84, poz. 729.
- [6] Uchwała w sprawie wykładni art. 41, w związku z art. 15 pkt. 1 Ustawy z dnia 17.05.1989 o izbach lekarskich oraz art. 23a k.k. U1./92 Orzecznictwo Trybunału Konstytucyjnego 1993, Nr 12, poz. 28.
- [7] Dz.U. 1969, Nr 13, poz. 94 ze zmianami.
- [8] Commission Staff Working Paper. Report on Human Embryonic Stem Cell Research, April 4, 2003.
- [9] Ustawa z 1990 r, dot. zapładniania człowieka oraz embriologii, uzupełniona rozporządzeniem z 2001 r.

KOMÓRKI MACIERZyste – WYZWANIE XXI WIEKU?

STEM CELLS – GREAT EXPECTATIONS?

Mariusz Z. RATAJCZAK, M. KUCIA

Zakład Transplantologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego Collegium Medicum,
Kraków-Prokocim

Streszczenie: Strategie terapeutyczne polegające na wykorzystaniu w klinice komórek macierzystych rozbudziły wielkie nadzieje w świecie lekarskim, stając się jednocześnie przedmiotem wielu kontrowersji wśród naukowców, prawników, duchowieństwa, dziennikarzy oraz innych środowisk opiniotwórczych. Praca ta jest streszczeniem wykładu autora, który został przedstawiony na konferencji zorganizowanej przez PAN, poświęconej zastosowaniu klinicznemu komórek macierzystych. Opierając się na danych literaturowych, jak i wynikach badań własnych autor przedstawił swoje stanowisko w tej budzącej ogromne nadzieje i kontrowersje, dynamicznie rozwijającej się dziedzinie.

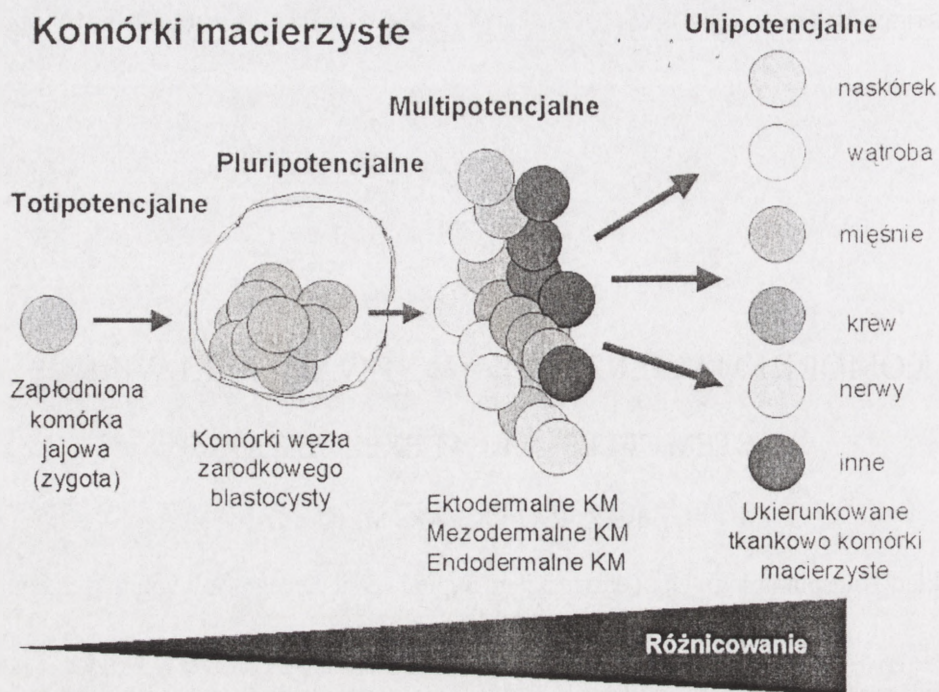
Słowa kluczowe: komórki macierzyste, komórki macierzyste pluripotencjalne, regeneracja, oś CXCR4 - SDF-1.

Summary: The therapeutic strategies based on the clinical application of stem cells woke up great expectations in the medical world. The same strategies, however, become a subject for many controversies among scientists, lawyers, clergy, journalists and several other influential lobbies. This paper was presented at a special meeting prepared by Polish Academy of Sciences that was devoted to the ethical problems of stem cell based therapies. Based on the literature and own experience the author presented his own point of view on this both promising and controversial area of clinical medicine.

Key words: stem cells, CXCR4 - SDF-1 axis, regeneration, pluripotent stem cells.

WSTĘP

Każdy organizm rozwija się z komórek macierzystych. Komórka macierzysta zgodnie z definicją ma zdolność do samoodnawiania, jak i różnicowania się w komórki potomne. Często zapominamy o tym, że wśród komórek macierzystych istnieje duże zróżnicowanie pod względem potencjału do dalszego różnicowania się [1]. W przedziale komórek macierzystych występują bowiem komórki mniej lub bardziej „macierzyste” (ryc. 1).



RYCINA 1. Komórki macierzyste mają zdolność do samoodnawiania, przy czym charakteryzuje je różny stopień możliwości do dalszego różnicowania. Komórka totipotencjalna (zapłodniona komórka jajowa lub zygota) może dać początek komórkom embrionu i łożyska. Komórki pluripotencjalne znajdują się w węźle zarodkowym blastocysty i mogą dać początek komórkom embrionu. Pośród komórek multipotencjalnych można wyróżnić komórki multipotencjalne dla endodermy, ektodermy i mezodermy. Unipotencjalne lub ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste (UTKM) różnicują się wyłącznie w komórki danego narządu lub tkanki, np. wątroby, mięśni. W tkankach dojrzałych osobników znajdują się komórki unipotencjalne (UTKM). Istnieją jednak pewne dane, że u młodych osobników mogą się również znajdować komórki pluripotencjalne/multipotencjalne

Zgodnie z przedstawionym schematem zapłodniona komórka jajowa (zygota) jest najwcześniejszą tzw. totipotencjalną komórką macierzystą (TKM), dającą początek komórkom tworzącym zarówno embriion, jak i łożysko. Pluripotencjalna komórka macierzysta (PKM) występuje w węźle zarodkowym wczesnej blastocysty i może dać początek już tylko komórkom zarodka, tracąc zdolność do utworzenia komórek łożyska [2]. Pluripotencjalna komórka macierzysta daje początek multipotencjalnym komórkom macierzystym poszczególnych listków zarodkowych – ektodermy, endodermy i mezodermy. Tak więc rozróżniamy teoretycznie multipotencjalne komórki macierzyste (MKM) dla ekto-, endo- i mezodermy. W obrębie tworzących się listków zarodkowych wyodrębnia się z czasem pula komórek macierzystych unipotencjalnych ukierunkowanych tkankowo (UTKM), które dają początek komórkom danego narządu/tkanki. Pośród komórek tych wyróżniamy np. UTKM dla układu hemato/limfopoetycznego (krwiotwórcze komórki macierzyste – KKM), UTKM naskórka, UTKM nabłonka jelitowego, UTKM tkanki nerwowej, UTKM wątroby, UTKM wysepek trzustki, UTKM nabłonka kanalików nerkowych itd.

Podziały takie są wprowadzane umownie, podczas gdy różnicowanie komórek macierzystych jest zjawiskiem płynnym. Rodzi się również pytanie, czy w tkankach dorosłego organizmu obok UTKM mogą występować również wcześniejsze komórki macierzyste, np. pluripotencjalne lub multipotencjalne komórki macierzyste.

KLINICZNE WYKORZYSTANIE KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Terapie wykorzystujące komórki macierzyste w regeneracji narządów stwarzają nadzieje na przełom w medycynie klinicznej. Komórki macierzyste mogą być wykorzystane do odtworzenia/regeneracji uszkodzonych procesem chorobowym narządów np. w regeneracji szpiku kostnego, oparzeniach skóry, obszarów objętych zawałem mięśnia sercowego, czy udarem mózgu, rdzenia kręgowego, w cukrzycy czy dystrofiach mięśniowych itp.

Komórki macierzyste są również potencjalnym kluczem do przedłużenia życia pacjentów i osiągnięcia długowieczności. Nie ulega wątpliwości, że w przyrodzie istnieje proste równanie mówiące, że: komórki macierzyste = regeneracja = długowieczność. Istnieje również jego odwrotność mówiąca, iż starzenie = upośledzenie regeneracji = zmniejszenie liczby/funkcji puli komórek macierzystych.

TABELA 1. Potencjalne źródła komórek macierzystych do terapii

	Zalety	Potencjalne wady
UTKM	Stosowane obecnie z powodzeniem w leczeniu schorzeń układu krwiotwórczego (UTKM dla hemato/limfopoeczy) lub oparzeń skóry (UTKM dla naskórka)	Trudność pozyskania odpowiedniej liczby tych komórek z narządów mięsnych np. wątroby, serca, nerki czy trzustki. Konieczność posiadania zgodnego tkankowo dawcy
Plastyczne KM	Możliwość pozyskania KM dla różnych narządów (np. tkanki nerwowej, wątroby) z np. stosunkowo łatwych do izolacji macierzystych komórek hematopoetycznych	Badania naszego, jak i innych zespołów, podważają istnienie plastyczności nieembrionalnych komórek macierzystych ssaków.
Komórki embrionalne	Po opracowaniu odpowiednich technik klonowanie terapeutyczne może doprowadzić do pozyskania źródła zgodnych tkankowo UTKM do celów regeneracji tkanek/narządów.	Wymaga uzyskania powszechnej akceptacji w naszym kręgu kulturowo-religijnym Metody klonowania terapeutycznego znajdują się we wstępnej fazie rozwoju i wymagają niewątpliwie dalszego udoskonalenia

Tabela 1 przedstawia potencjalne źródła komórek macierzystych, które mogą być wykorzystane w medycynie klinicznej i terapii. W prezentowanej pracy w skrócie omówimy wymienione rodzaje tych komórek oraz ich potencjalne zalety, jak i wady w ich możliwym wykorzystaniu klinicznym.

ZASTOSOWANIE KLINICZNE UTKM

Strategie kliniczne opierające się na wykorzystaniu UTKM stosuje się w medycynie klinicznej od prawie 40 lat. Przykładem są tutaj krwiotwórcze komórki macierzyste – KKM (UTKM dla układu hemato/limfopoetycznego) stosowane w tzw. przeszczepach krwiotwórczych [3, 4]. Komórki te pobiera się ze szpiku kostnego lub z tzw. mobilizowanej farmakologicznie krwi obwodowej lub mobilizowanej stresem porodowym krwi pępowinowej. Zaletą ich stosowania jest łatwość izolacji ze szpiku kostnego lub krążącej krwi. Komórki te bowiem w szpiku kostnym występują w postaci niezwiązanej z innymi strukturami tkankowymi i mogą być łatwo aspirowane w postaci zawiesiny komórkowej, a następnie oczyszczone z bardziej zróżnicowanych komórek układu krwiotwórczego za pomocą dostępnych przeciwciał.

Stosunkowo niedawno podjęto skuteczne próby wykorzystania klinicznego UTKM dla naskórka [5, 6]. Wczesne komórki macierzyste z bioptatów skórnych tej tkanki można namnożyć, a następnie namnożonymi *in vitro* komórkami pokryć nawet rozległe oparzenia skóry lub trudno gojące się rany. Pierwsze próby kliniczne udokumentowały słusność powyższej strategii leczniczej.

Innym przykładem klinicznego zastosowania komórek izolowanych z dojrzałych tkanek są próby kliniczne z użyciem tzw. komórek mezenchymalnych szpiku kostnego w leczeniu schorzenia, polegającego na wrodzonej łamliwości kości, jakim jest *osteogenesis imperfecta*. Pierwsze wyniki nie są jednak w pełni zadowalające. Uzyskuje się znikomy stopień chimeryzmu komórek kości po przeszczepieniu allogenicznych komórek mezenchymalnych. Jedną z przyczyn takiego stanu może być brak dostatecznej wiedzy na temat pochodzenia komórek mezenchymalnych. Pomimo że populacje komórek wzbogacone w hipotetyczne komórki mezenchymalne występują w aspiratach izolowanych ze szpiku kostnego, do tej pory nie udało się jednak wyseparować jednorodnej ich frakcji.

Wykorzystanie innych komórek macierzystych izolowanych z tkanek dorosłych osobników w terapii wiąże się jednak z podstawowym problemem ich wydajnego pozyskania w ilościach pozwalających na zastosowanie kliniczne. UTKM dla mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego czy wątroby są jeszcze słabo zdefiniowane i stosunkowo trudne do pozyskania z narządów mięźszowych. Ponieważ nie dysponujemy efektywnymi modelami ekspansji/namnażenia *ex vivo* komórek macierzystych, nie-embryonalne UTKM w chwili obecnej nie mogą stać się skutecznym narzędziem terapeutycznym. Kolejnym problem ich pozyskania np. od dawców allogenicznych jest konieczność izolacji stosunkowo dużej masy tkankowej, co nie jest możliwe w przypadku

dawców zdrowych. Czy komórki takie będzie można pozyskiwać od dawców narządowych i wykorzystywać w terapii zamiast całych narządów jest wciąż pytaniem, na które nie potrafimy jednoznacznie odpowiedzieć. Nawet gdy opracowane zostaną wydajne metody izolacji UTKM z narządów mięszszowych, to wciąż pozostanie problem zgodności tkankowej i dostępności takich dawców.

ZJAWISKO PLASTYCZNOŚCI KM

Plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych jest jednym z najbardziej kontrowersyjnych zagadnień współczesnej biologii i medycyny doświadczalnej. Szereg liczących się pism naukowych zamieściło w ostatnich kilku latach prace pokazujące, że nieembrionalne komórki macierzyste izolowane z tkanek dojrzałych osobników mają ogromne możliwości transróżnicowania się w komórki charakterystyczne dla innych tkanek i narządów. Pokazano przykładowo, że macierzyste komórki nerwowe lub komórki macierzyste mięśni szkieletowych mogą się różnicować w kierunku komórek hematopoetycznych [7–10]. Największą plastyczność i zdolność do transróżnicowania przypisano krwiotwórczym komórkom macierzystym (KKM). Miały one dawać początek komórkom macierzystym mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, wątroby, trzustki, tkanki nerwowej oraz nerki [11–20]. Tak więc komórki macierzyste układu hematopoetycznego, które jak wiadomo pochodzą z mezodermi, miały posiadać właściwości transróżnicowania się w komórki macierzyste wywodzące się z innych listków zarodkowych – endodermi (np. hepatocyty) czy też ektodermi (np. neurocyty lub keratynocyty). Koncepcja, że komórki macierzyste ukierunkowane tkankowo są plastyczne i mogą się odróżnicowywać, dając początek komórkom macierzystym innych tkanek i narządów, stworzyła z jednej strony nadzieję na opracowanie nowych strategii terapeutycznych w medycynie regeneracyjnej, wykorzystujących właśnie te komórki do leczenia, z drugiej zaś stała się ważnym argumentem przyczyniającym się do spowolnienia badań nad wykorzystaniem w podobnym celu komórek embrionalnych.

W ślad za optymistycznymi doniesieniami ukazującymi niemal nieograniczoną zdolność do transróżnicowania się komórek macierzystych izolowanych z różnych tkanek w komórki pochodzące z innych listków zarodkowych pojawiły się sygnały ostrzegawcze. Wielu wyników, uprzednio opublikowanych w pismach o wysokim tzw. „*impact factor*”, nie można było powtórzyć [21–24]. Zaczęto szukać przyczyn ewentualnych „błędów” lub alternatywnego tłumaczenia obserwowanego zjawiska plastyczności [25]. Obecnie uważa się, że opisywana plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych wynikać może z:

- 1) zdolności komórek macierzystych do fuzji z komórkami zróżnicowanymi [26, 27],
- 2) indukowania zmian epigenetycznych w komórkach podczas ich hodowli poza organizmem, które prowadzą do pojawienia się odmiennych tkankowo markerów różnicowania [28] oraz
- 3) obecności heterogennych populacji komórek macierzystych w różnych tkankach.

W dalszej części pracy w skrócie omówimy powyższe alternatywne wytłumaczenia zjawiska plastyczności nieembrionalnych komórek macierzystych.

ALTERNATYWNE WYTLUMACZENIE ZJAWISKA PLASTYCZNOŚCI KM

Fuzja komórek

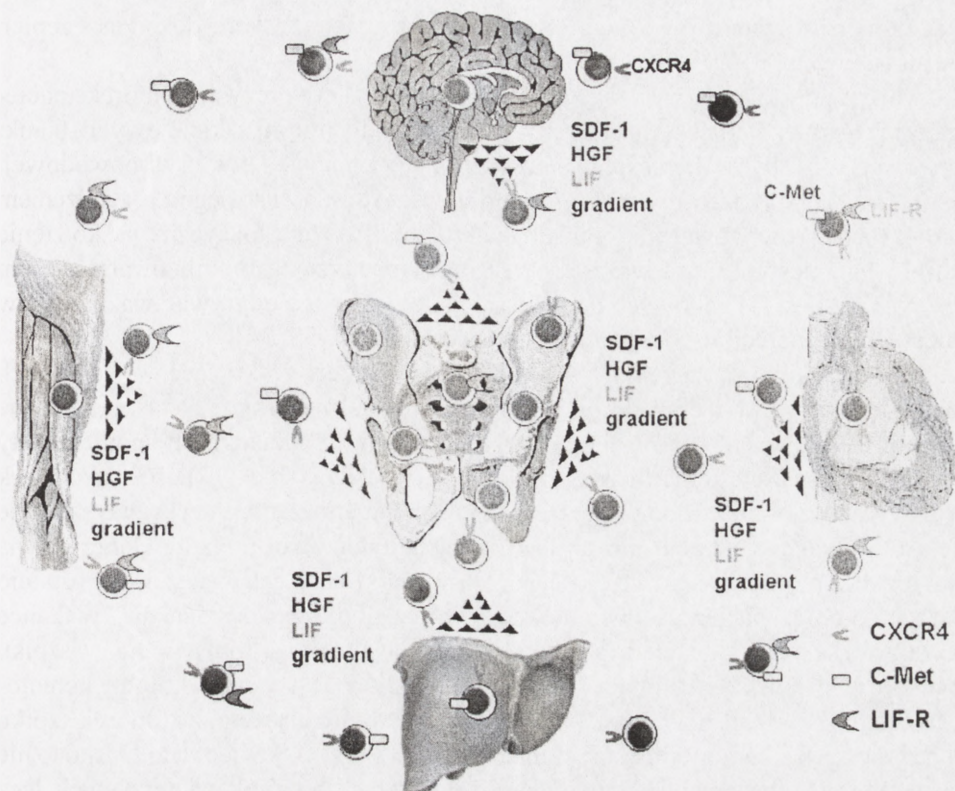
Stosunkowo wcześniej jako jedną z przyczyn, tłumaczących ewentualne artefakty pokazujące plastyczność, przyjęto fuzję komórek. Fuzja komórek polega na połączeniu się dwóch różnych komórek w jedną nową będącą hybrydą genotypową i fenotypową komórek wyjściowych. Zjawisko fuzji komórek występuje niezwykle rzadko, lecz od dawna jest dobrze znane w biologii doświadczalnej. Aby zwiększyć częstość jego występowania np. podczas tworzenia komórek hybrydomy – stosowane są specjalne strategie zwiększające zdolność błon do fuzji (np. glikol polietylenowy lub wirus Sendai). Występowanie fuzji komórek embrionalnych ze zróżnicowanymi, prowadzące do pojawienia się komórek posiadających nowe markery różnicowania, zostało przyjęte szybko jako „wygodne wytłumaczenie” ewentualnych artefaktów w doświadczeniach nad transróżnicowaniem się komórek macierzystych. Zdaniem autorów jest to jednak zjawisko zbyt rzadkie, aby przypisywać mu większe znaczenie biologiczne *in vivo*. Jeżeli zjawisko to ma miejsce, to głównie w warunkach hodowli *in vitro* i nie może tłumaczyć w pełni uzyskanych poprzednio wyników, wskazujących na istnienie plastyczności macierzystych komórek nieembrionalnych [29].

Zmiany epigenetyczne w komórkach hodowanych poza organizmem

Komórki hodowane poza ustrojem *in vitro*, znajdują się w warunkach, które zdecydowanie odbiegają od warunków panujących w organizmie *in vivo*. Mogą więc podlegać zmianom epigenetycznym warunkowanym przez mikrośrodowisko hodowli [27, 28]. Spośród najważniejszych czynników, które mogą prowadzić do zmian epigenetycznych w hodowanych komórkach, warto wymienić niefizjologiczne stężenie czynników wzrostowych, obecność obcogatunkowej surowicy, plastikowe podłoże naczynia hodowlanego, zaburzoną homeostazę znajdujących się w hodowli komórek, powtarzane zabiegi ich pasażowania itp. Zmianom tym znacznie łatwiej ulegają prawidłowe, wczesne, nieróżnicowane komórki. W tak odbiegających od normy warunkach, w komórkach tych mogą pojawić się markery charakterystyczne dla innych linii komórkowych. Przypuszcza się, że wynikiem takich zmian są m.in. uzyskiwane w wyniku wielokrotnych pasażów tzw. wielopotentjalne komórki progenitorowe pochodzenia mezenchymalnego [30]. Zmiany epigenetyczne obserwowane w warunkach hodowlanych są w pewnym stopniu podobne do zmian indukowanych w prawidłowych komórkach organizmu przez przewlekłe czynniki zapalne (np. w metaplazjach nabłonka szyjki macicy, nabłonka oddechowego lub wpustu przetyku oraz rogowaceni błon śluzowych).

Plastyczność komórek dojrzałych ssaków jako wynik obecności heterogennej populacji komórek macierzystych w tkankach

Wyniki badań naszego zespołu wskazują, że występowanie heterogennej populacji UTKM w tkankach obwodowych jest najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem



RYCINA 2. Schemat postulowanej przez nas teorii krążenia w ustroju ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych (UTKM). Szpik kostny pełni w proponowanym modelu kluczową rolę jako narząd, w którym UTKM mogą czasowo się znajdować i z którego mogą ulegać mobilizacji do krwi obwodowej w sytuacjach stresu i uszkodzenia narządów. UTKM mają na powierzchni receptor CXCR4 i odpowiadają na gradient stromalnego czynnika wzrostowego – 1 (ang. *stromal derived factor-1*; SDF-1). SDF-1 wydzielany jest przez komórki podścieliska szpiku kostnego, ale również obecny jest w innych niszach tkankowych dla komórek macierzystych. Powoduje to, że krążące UTKM mogą się gromadzić w miejscach heterotropowych, czego skutkiem jest możliwość wykrycia w danej tkance UTKM dla innych narządów (np. UTKM hemato/limfopoetycznych w mięśniach lub mięśniowych UTKM w szpiku kostnym). W krążeniu UTKM istotną rolę odgrywają również osie HGF/SF-c-Met receptor oraz LIF-LIFR. Nie można również wykluczyć udziału innych motomorfogenów. Cytokiny wydzielane w niszach decydują o wybiórczości i swoistości gromadzenia się UTKM w danej tkance

obserwowanego „zjawiska plastyczności” nieembrionalnych komórek macierzystych. Występowanie tych komórek w różnych tkankach wynika z ich zdolności do krążenia w ustroju oraz współzawodniczenia/konkurowania o nisze narządowe [31].

Zakładamy, że jedną z właściwości UTKM jest ich zdolność do krążenia w ustroju i tkankach (ryc. 2). Zgodnie z przedstawionym schematem komórki swoiste tkankowo krążą w krwi obwodowej w celu utrzymania w równowadze ich puli w różnych obszarach anatomicznych tej samej tkanki (np. różnych obszarach szpiku kostnego, tkanki mięśniowej lub nerwowej). Najbardziej widoczne jest to dla UTKM układu krwiotwórczego i UTKM endotelialnych. Liczbę tych komórek można zwiększyć w warunkach tzw. mobilizacji farmakologicznej, co wykorzystuje się obecnie w hematologii klinicznej,

podczas pozyskiwania krwiotwórczych komórek macierzystych do przeszczepień krwiotwórczych [32].

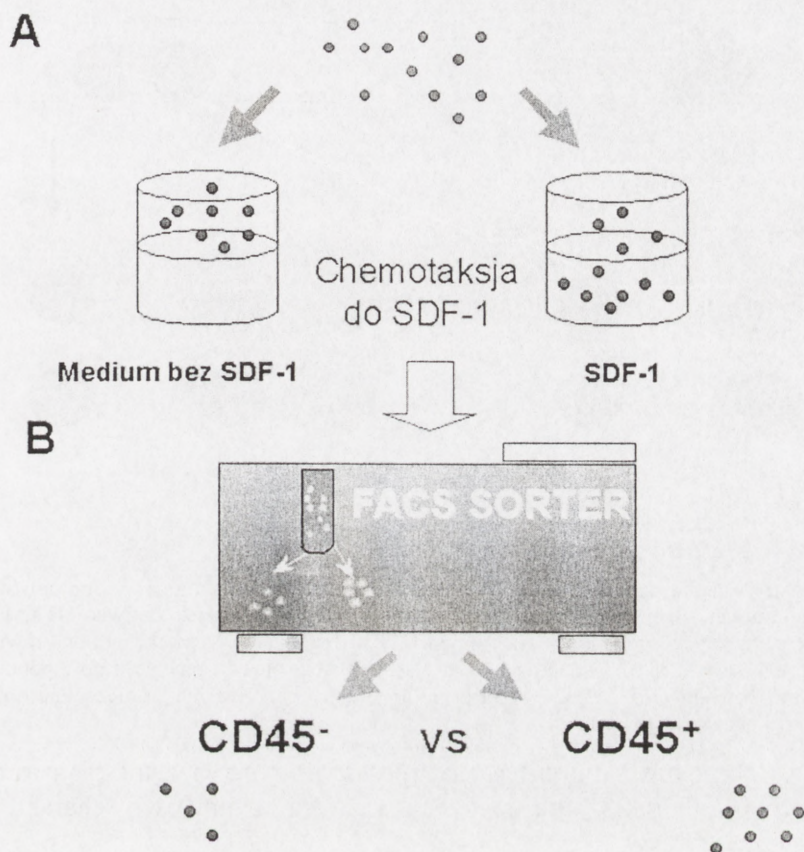
Wyniki badań własnych wskazują, że oprócz krwiotwórczych komórek macierzystych, również komórki macierzyste swoiste np. dla mięśni szkieletowych, tkanki nerwowej, wątroby oraz mięśnia sercowego mogą pojawić się w krwi obwodowej. Zjawisko to, jak wykazaliśmy, występuje np. podczas stresu związanego z uszkodzeniem tkanek i narządów (zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, toksyczne uszkodzenie wątroby lub mięśni) [33]. Uważamy, że komórki macierzyste, mobilizowane stresem urazowym z niszy tkankowych do krwi obwodowej, mogą odgrywać ważną rolę w procesach regeneracji uszkodzonych tkanek i narządów [33, 34].

Jak przedstawiono na rycinie 2, zakładamy również, że krążące w warunkach fizjologicznych we krwi obwodowej UTKM mogą współzawodniczyć o nisze tkankowe znajdujące się w tkankach i narządach. Nisze takie wydzielają chemoatraktanty przyciągające krążące komórki, zachowując przy tym pewną selektywność dla komórek swoistych danej tkance. Ponieważ szereg tych chemoatraktantów wykazuje szerokie spektrum działania istnieje możliwość, że nisze tkankowe mogą zawierać pewną domieszkę komórek macierzystych dla innych tkanek. Tak np. jak wykazaliśmy ostatnio krążące komórki macierzyste układu krwiotwórczego mogą „osiedlać się” w tkance mięśniowej, a komórki macierzyste układu mięśniowego mogą „pojawić się” w szpiku kostnym [31]. Fakt ten tłumaczy, dlaczego możliwy jest wzrost kolonii hematopoetycznych z izolowanych komórek mięśni i odwrotnie dlaczego z komórek szpiku mogą powstawać komórki mięśni szkieletowych [31–33]. Tak więc za zjawisko to nie odpowiada ani „plastyczność”, ani „transróżnicowanie” komórek macierzystych, lecz fakt występowania heterogennej populacji komórek macierzystych w tkankach (hematopoetycznych w mięśniach i mięśniowych w szpiku kostnym).

Na rycinie 2 pokazano główne założenia teorii krążenia komórek macierzystych i ich konkurencji o nisze tkankowe. Zakładamy, że szpik kostny zajmuje tutaj ważne i eksponowane miejsce. Rozbudowany układ naczyniowy, jak i fakt wydzielania szeregu chemoatraktantów oraz czynników wzrostowych przez komórki podścieliska szpiku kostnego powodują, że krążące, ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste znajdują tutaj sprzyjające warunki do osiedlenia i przeżycia. Uwzględniając powyższe założenia można stwierdzić, że szpik kostny jest nie tylko „domem” UTKM dla układu krwiotwórczego (KKM), ale dodatkowo „kryjówką” dla krążących w ustroju UTKM (np. mięśni, tkanki nerwowej, wątroby lub nabłonka kanalików nerkowych).

Teoria zaprezentowana na rycinie 2 wymagała potwierdzenia doświadczalnego pokazującego, iż ukierunkowane tkankowo komórki faktycznie znajdują się w szpiku kostnym. Przedstawienie takiego dowodu nie jest możliwe przy użyciu tradycyjnych metod doświadczalnych. Jak wiadomo, brak jest specyficznych markerów powierzchniowych występujących na poszczególnych rodzajach ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych. Utrudnia to znacznie wykazanie obecności tych komórek w szpiku kostnym za pomocą bezpośredniej analizy cytochemicznej lub immunofluorescencyjnej przy użyciu swoistych przeciwciał monoklonalnych. Podobnie pokazanie, że będą one proliferowały w hodowlach i tworzyły komórki mięśniowe lub

Izolacja komórek jednojądrowych szpiku kostnego

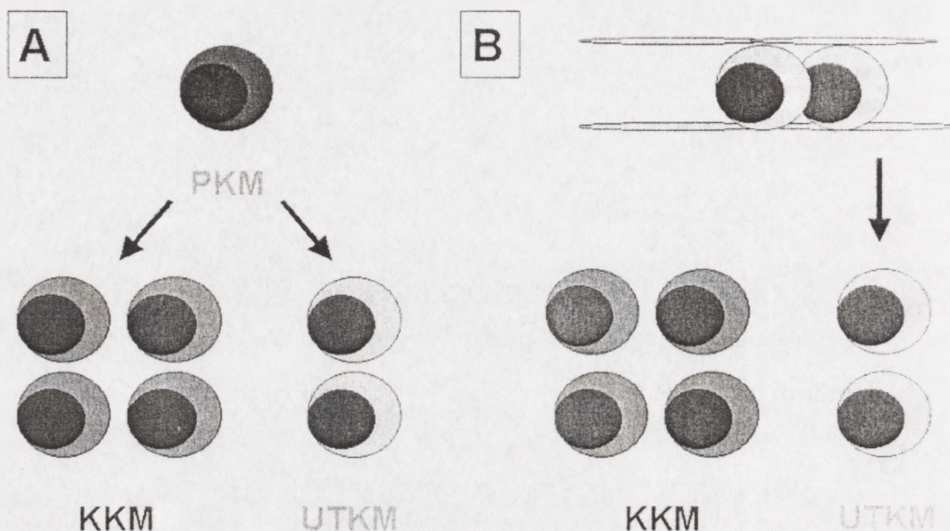


RYCINA 3. Panel A – Zastosowana przez nas oryginalna strategia tzw. „izolacji chemotaktycznej”. Izolowane ze szpiku kostnego komórki jednojądrowe nakładane są do górnej komory „transwelu” i ekspozowane na gradient kluczowych czynników chemotaktycznych/motomorfogenów, które biorą udział w organogenezie (np. SDF-1). Komórki, które wykazują chemotaksję, są następnie izolowane z dolnej komory transwelu i badane na obecność markerów dla komórek macierzystych poszczególnych tkanek/narządów (mięśnie szkieletowe, wątroba, ośrodkowy układ nerwowy, mięsień sercowy). Panel B – Komórki uzyskane w wyniku izolacji chemotaktycznej mogą być następnie izolowane za pomocą sortera komórkowego. Zespół nasz stwierdził, że rozdzielenie, uzyskanych w wyniku izolacji chemotaktycznej do SDF-1, populacji komórek CXCR4⁺ na populacje CD45⁺ i CD45⁻ pozwala na wyseparowanie z komórek szpiku kostnego 1) UTKM dla hemato/limfopoetyzy (CXCR4⁺ CD45⁻) oraz 2) UTKM niehematopoetycznych (CXCR4⁺ CD45⁺)

nerwowe, mogłoby się spotkać z zarzutem, że komórki te pojawiły się w wyniku transróżnicowania krwiotwórczych komórek macierzystych.

W związku z powyższym zespół nasz posłużył się stosunkowo prostym testem chemotaksji (ryc. 3 panel A). Założono, że skoro w szpiku kostnym występują wczesne komórki macierzyste ukierunkowane tkankowo, to powinny one wykazywać chemotaksję do ważnych czynników/chemoatraktantów regulujących ich migrację podczas

DWA MODELE WYJAŚNIAJĄCE OBECNOŚĆ UTKM W SZPIKU KOSTNYM



RYCINA 4. Wykrywane w szpiku kostnym, niehematopoetyczne UTKM mogą być potomstwem wcześniejszej pluripotencjalnej komórki macierzystej (PKM), dającej początek zarówno UTKM dla układu limfo/hematopoetycznego (KKM) oraz innym UTKM (panel A). Komórki te mogą również stopniowo gromadzić się w szpiku kostnym na wczesnych etapach rozwoju ontogenetycznego z populacji krążących w krwi obwodowej UTKM. W tym ostatnim przypadku PKM nie są niezbędne do ich pojawienia się w szpiku kostnym (panel B)

embriogenezy. W przeprowadzonych badaniach posłużyliśmy się więc strategią separacji chemotaktycznej komórek szpiku do trzech ważnych czynników o charakterze motomorfogenów, jakimi są:

- 1) stromalny czynnik wzrostowy -1 (ang. *stromal derived factor-1* – SDF-1),
- 2) czynnik rozproszenia lub tzw. czynnik wzrostowy hepatocytów (ang. *scatter factor/hepatocyte growth factor* – SF/HGF) oraz
- 3) czynnik hamujący wzrost białaczek (ang. *leukemia inhibitory factor* – LIF). Dobór powyższych czynników był podyktowany obserwacjami, że te ostatnie pełnią istotną rolę w ontogenezie m.in. układu krwiotwórczego, mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, ośrodkowego układu nerwowego oraz wątroby, regulując migrację komórek macierzystych odpowiedzialnych za tworzenie tych narządów [35–45].

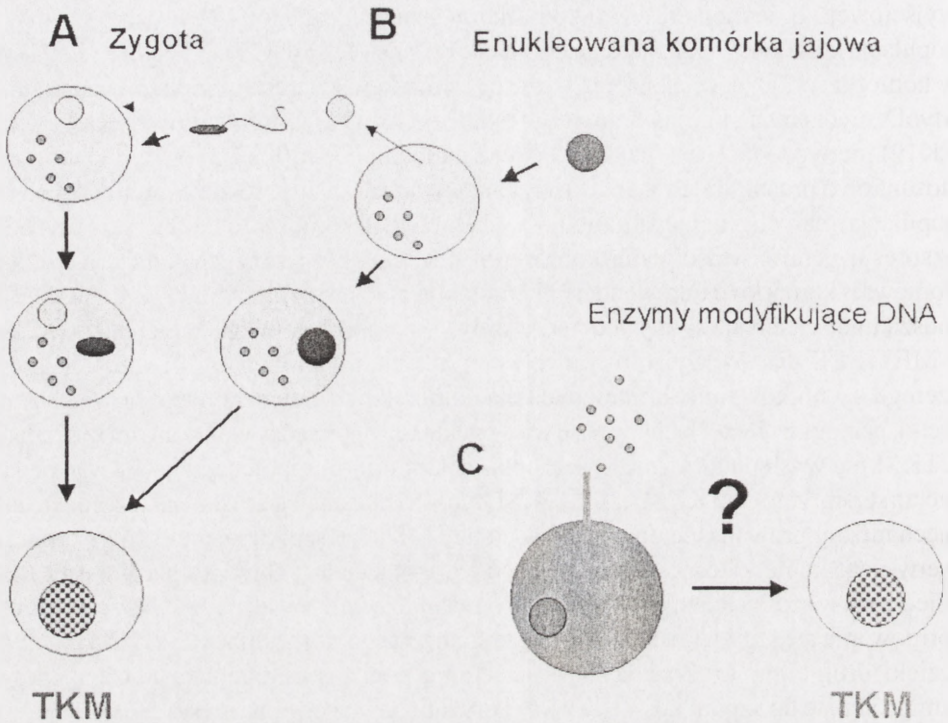
W naszych układach doświadczalnych komórki jednojądrowe świeżo izolowane ze szpiku kostnego były nakładane do górnych komór „transwelów” oddzielonych od dolnych komór membraną syntetyczną zawierającą pory o średnicy 5 mikrometrów [46, 47]. W dolnych komorach umieszczono samo medium (kontrola) lub medium zawierające jeden z chemoatraktantów (SDF-1, SF/HGF lub LIF). Po 5 godzinach chemotaksji z komórek znajdujących się w dolnych komorach izolowano mRNA i poddawano odwrotnej transkrypcji do cDNA. Następnie za pomocą techniki RT-PCR

w czasie rzeczywistym (ang. *real time RT-PCR*) porównywano ekspresję wczesnych genów charakterystycznych dla wczesnych komórek macierzystych pomiędzy komórkami wykazującymi chemotaksję do SDF-1, SF/HGF lub LIF a komórkami populacji wyjściowej, tj. jednojądrowymi komórkami szpiku kostnego [48]. Stwierdziliśmy, że populacja komórek wykazująca chemotaksję do SDF-1, SF/HGF i LIF była wzbogacona w komórki wykazujące ekspresję wczesnych markerów mięśni szkieletowych (Myf-5, MyoD, myogenina), mięśnia sercowego (Nkx2.5/Csx, GATA-4), wątroby (α -fetoproteina, CK19), nerwowych (nestyna, GFAP) oraz endotelialnych (KDR, von Willebrand). Ta stosunkowo prosta strategia doświadczalna wykazała, że w szpiku kostnym obecna jest populacja małych, mających zdolność chemotaksji komórek charakteryzujących się ekspresją genów właściwych komórkom macierzystym różnych tkanek/narządów. Ponieważ komórki te odpowiadały chemotaktycznie na gradient SDF-1, SF/HGF i LIF muszą mieć ekspresję swoistych receptorów powierzchniowych, takich jak: CXCR4, c-MET i LIF-R. W wyizolowanych komórkach stwierdziliśmy również ekspresję szeregu czynników trans-krypcyjnych dla komórek pluripotencjalnych (np. mRNA dla Oct-4, Nanog czy Rex-1). Pojawia się więc pytanie, czy pomiędzy izolowanymi komórkami UTKM nie występują również wcześniejsze komórki pluripotencjalne (PKM), będące prekursorami zarówno KKM, jak i UTKM (ryc. 4). Zakładamy, że istnieją dwa potencjalne mechanizmy prowadzące do nagromadzenia UTKM w szpiku kostnym. W przypadku pierwszego komórki te mogą pochodzić od pluripotencjalnej komórki macierzystej, która osiedla się w szpiku kostnym wraz z KKM pochodzącymi z wątroby płodowej w okresie formowania się szpiku kostnego na początku trzeciego trymestru ciąży (ryc. 4 panel A). Dzięki drugiemu krążące UTKM zasiedlają podczas ontogenezy nisze szpikowe wmigrowując do szpiku kostnego z krwi obwodowej (ryc. 4 panel B).

Z dalszych badań wykonanych na ludzkim szpiku kostnym stwierdziliśmy, że UTKM wzbogacone są w sortowane za pomocą cytometru przepływowego frakcje komórek szpiku mające ekspresję antygenów CD34 oraz AC133 [49–51]. Ta ostatnia obserwacja wskazuje, że antygeny CD34 i AC133 nie są swoiste wyłącznie dla komórek macierzystych układu krwiotwórczego, ale mogą również ulegać ekspresji na innych tkankowo ukierunkowanych komórkach macierzystych. Tłumaczy to między innymi, dlaczego komórki CD34⁺ szpiku kostnego mają pewną zdolność do regeneracji np. mięśnia sercowego [52–55]. Zdolność ta, jak uważamy, nie jest wynikiem transróżnicowania się hematopoetycznych komórek macierzystych CD34⁺ w komórki mięśnia sercowego, lecz wynikiem występowania w szpiku kostnym komórek macierzystych mięśnia sercowego, które jednocześnie mają antygen CD34. Jest to kolejny przykład, jak błędnie można interpretować zjawisko regeneracji mięśnia sercowego jako wynik transróżnicowania KKM nie uwzględniając alternatywnych możliwości pochodzenia komórek biorących udział w regeneracji.

Ostatnio dzięki zastosowaniu do SDF-1 izolacji chemotaktycznej w połączeniu z sortowaniem uzyskanych komórek CXCR4⁺ (ryc. 3 panel B) udało nam się rozdzielić w szpiku kostnym KKM od UTKM. Z badań naszych wynika, że komórki CXCR4⁺ Sca-1⁺ lin⁻ CD45⁺ są wzbogacone w KKM, natomiast komórki CXCR4⁺ Sca-1⁺ lin⁻ CD45⁻ nie mają aktywności hematopoetycznej zarówno w testach *in vitro*, jak *in vivo*,

“Chemo-odróżnicowanie komórki somatycznej”



RYCINA 5. Hipotetyczna możliwość pozyskania pluripotencjalnych komórek macierzystych w wyniku tzw. chemo-odróżnicowania. W cytoplazmie komórki jajowej znajdują się enzymy, odpowiedzialne za demetylację i modyfikację chromaty (np. usunięcie histonów) DNA plemnika podczas zapłodnienia (Panel A). Te same enzymy odpowiadają za odróżnicowanie jądra komórki somatycznej podczas transferu jądrowego zróżnicowanego jądra do enukleowanej komórki jajowej (Panel B). W efekcie obu procesów powstaje totipotencjalna komórka macierzysta (TKM). Zakładamy, że jeżeli uda się zidentyfikować enzymy występujące w cytoplazmie komórki jajowej, biorące udział w modyfikacji/odróżnicowaniu DNA, mikroiniekcja tych czynników do komórki somatycznej może indukować jej przeprogramowanie, prowadząc do powstania totipotencjalnej/pluripotencjalnej komórki macierzystej. Ta ostatnia strategia pozwoli uzyskać TKM bez wykorzystania tak kontrowersyjnej obecnie, a niezbędnej w klonowaniu terapeutycznym, enukleowanej komórki jajowej

wzbogacone są natomiast w komórki o wysokiej ekspresji mRNA dla UTKM i PKM. Należy nadmienić, że do izolacji komórek CD45 pozytywnych używaliśmy przeciwciała skierowanego przeciwko formie antygenu CD45, która występuje na KKM, a nie przeciwciała anti-CD45 (B220), skierowanego przeciwko epitopowi CD45, który występuje na komórkach linii B-limfocytowej.

POTENCJALNE WYKORZYSTANIE KOMÓREK EMBRIONALNYCH

Ze względu na trudności w izolacji odpowiedniej liczby UTKM do celów regeneracji i biorąc pod uwagę fakt, że plastyczność komórek nieembrionalnych jest prawdopodobnie artefaktem doświadczalnym, uważamy, że należy poważnie rozpatrzyć alternatywną opcję wykorzystania w medycynie regeneracyjnej innego alternatywnego źródła komórek macierzystych, jakimi są komórki embrionalne. Zastosowanie kliniczne tych ostatnich budzi jednak często szereg niepotrzebnych emocji i sprzeciwów natury etycznej. Wiele tych sporów wynika z błędnej interpretacji i niezrozumienia założeń takiej strategii leczniczej. Uważamy, że dialog nad wykorzystaniem komórek embrionalnych, np. w celu klonowania terapeutycznego, powinien zostać jak najszybciej podjęty przez różne środowiska opiniotwórcze. Poszukiwanie kompromisu w tej sprawie jest nakazem rozwijających się technik biotechnologicznych. Nie da się uniknąć prób poszukiwania kompromisu. Ucieczka od konstruktywnej dyskusji nad wykorzystaniem tych komórek w medycynie odbywa się ze szkodą dla przyszłych pokoleń, które będą poszukiwać nowych skuteczniejszych metod leczniczych. Nie ulega wątpliwości, że klonowanie terapeutyczne poprzez transfer jąder komórkowych stworzyło poważne nadzieje na dokonanie się przewrotu w medycynie regeneracyjnej i transplantologii [56]. Szansę tę należy jak najszybciej wykorzystać.

Pewnym kompromisem godzącym zwolenników i oponentów klonowania terapeutycznego może okazać się strategia chemo-odróżnicowania komórek nieembrionalnych (ryc. 5). Zakładamy, że jeżeli udałoby się wyizolować/sklonować enzymy występujące w komórce jajowej biorące udział w fizjologicznym „odblokowaniu” DNA z histonów, jak i jego demetylacji np. DNA plemnika podczas zapłodnienia lub DNA jądra wykorzystywanego w transferze jądrowym (ang. *nuclear transfer*), enzymy te mogłyby zostać wykorzystane w odróżnicowaniu komórek somatycznych. Zakładamy, że iniekcja takich enzymów do cytoplazmy np. wczesnej komórki hematopoetycznej pozwoli na jej odróżnicowanie do stadium PKM. Najbliższe lata pokażą, czy strategia ta rzeczywiście okaże się alternatywnym sposobem pozyskania PKM z pominięciem konieczności użycia enukleowanych komórek jajowych. Technologia taka stała by się niewątpliwie prawdziwym przełomem w medycynie klinicznej.

PODSUMOWANIE

Burzliwy rozwój nauk biologicznych i genetyki podczas ostatniego stulecia doprowadził do pojawienia się nowych metod terapeutycznych opartych na potencjalnym wykorzystaniu komórek macierzystych. Tak więc ludzkość w ostatnim półwieczu dostała do dyspozycji technologie, które mogą stać się przełomem w leczeniu wielu schorzeń. Od metod tych nie ma odwrotu, ponieważ są szansą na urzeczywistnienie odwiecznych

dążeń ludzkości do przedłużenia życia, możliwości leczenia nieuleczalnych schorzeń i osiągnięcia długowieczności. Należy wierzyć, że wkrótce zostanie osiągnięty kompromis co do przyszłego klinicznego zastosowania komórek embrionalnych. Nie można więc odwlekać podjęcia odpowiednich decyzji.

LITERATURA

- [1] WEISSMAN IL. Stem cells – scientific, medical, and political issues. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1576–1579.
- [2] WEISSMAN IL, ANDERSON DJ, GAGE F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 387–403.
- [3] FRUEHAUF S, SEGGEWISS R. It's moving day: factors affecting peripheral blood stem mobilization and strategies for improvement. *B J Hematol* 2003; **122**: 360–375.
- [4] ROWLEY SD, YU J, GOOLEY T, HEIMFELD S, HOLMBERG L, MALONEY D, BENSINGER WI. Trafficking of CD34⁺ cells into the peripheral circulation during collection of peripheral blood stem cells by apheresis. *Bone Marrow Transplant* 2001; **28**: 649–656.
- [5] LIMAT A, FRENCH LE, BLAL L, SAURAT JH, HUNZIKER T, SALOMON D. Organotypic cultures of autologous hair follicle keratinocytes for the treatment of recurrent leg ulcers. *J Am Acad Dermatol* 2003; **48**: 207–214.
- [6] DRUKALA J, BANDURA L, CIESLIK K, KOROHODA W. Locomotion of human skin keratinocytes on polystyrene, fibrin, and collagen substrata and its modification by cell-to-cell contacts. *Cell Transplant* 2001; **10**: 765–771.
- [7] SHIH CC, DIGIUSTO D, MAMELAK A, LEBON T, FORMAN SJ. Hematopoietic potential of neural stem cells: plasticity versus heterogeneity. *Leuk Lymphoma* 2002; **43**: 2263–2268.
- [8] GEIGER H, TRUE JM, GRIMES B, CARROLL EJ, FLEISCHMAN RA, VAN ZANT G. Analysis of the hematopoietic potential of muscle-derived cells in mice. *Blood* 2002; **100**: 721–723.
- [9] KAWADA H, OGAWA M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* 2001; **98**: 2008–2013.
- [10] ASAKURA A, KOMAKI M, RUDNICKI M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 2001; **68**: 245–253.
- [11] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 2003; **7** (3 Suppl): 86–88.
- [12] LABARGE MA, BLAU HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate stem cells to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; **111**: 589–601.
- [13] CORTI S, STRAZZER S, DEL BO R, SALANI S, BOSSOLASCO P, FORTUNATO F, LOCATELLI F, SOLIGO D, MOGGIO M, CISCATO P, PRELLE A, BORSOTTI C, BRESOLIN N, SCARLATO G, COMI GP. A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiates along the myogenic pathway and participates in muscle repair in the mdx dystrophic mouse. *Exp Cell Res* 2002; **277**: 74–85.
- [14] SANCHEZ-RAMOS JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 2002; **69**: 880–893.
- [15] PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N, BOGGS SS, GREENBERGER JS, GOFF JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; **284**: 1168–1170.
- [16] IANUS A, HOLZ GG, THEISE ND, HUSSAIN MA. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; **111**: 843–850.
- [17] KORBLING M, KATZ RL, KHANNA A, RUIFROK AC, RONDON G, ALBITAR M, CHAMPLIN R, ESTROV Z. Hepatocyte and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; **346**: 738–746.
- [18] HAO HN, ZHAO J, THOMAS RL, PARKER GC, LYMAN WD. Fetal human hematopoietic cells can differentiate sequentially into neural stem cells and then astrocytes *in vitro*. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; **12**: 23–32.

- [19] STAMM C, WESTPHAL B, KLEINE HD, PETZSCH M, KITTER C, KLINGE H, SCHUMICHEN C, NIENABER CA, FREUND M, STEINHOFF G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *The Lancet* 2003; **361**: 45–46.
- [20] LIN F, CORDES K, LI L, HOOD L, COUSER WG, SHANKLAND SJ, IGARASHI P. Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 1188–1199.
- [21] LEMISCHKA IA. Few thoughts about the plasticity of stem cells. *Exp Hematol* 2002; **30**: 848–852.
- [22] HOLDEN C, VOGEL G. Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? *Science* 2002; **296**: 2126–2129.
- [23] CASTRO RF, JACKSON KA, GOODELL MA, ROBERTSON CS, LIU H, SHINE HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells *in vivo*. *Science* 2002; **297**: 1299.
- [24] MCKINNEY-FREEMAN SL, JACKSON KA, CAMARGO FD, FERRARI G, MAVIJO F, GOODELL MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 1341–1346.
- [25] LIU Y, RAO MS. Transdifferentiation – fact or artifact. *J Cell Biochem* 2003; **1**: 29–40.
- [26] TERADA N, HAMAZAKI T, OKA OM, HOKI M, MASTALERZ DM, NAKANO Y, MEYER EM, MOREL L, PETERSON BE, SCOTT EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; **416**: 542–544.
- [27] YING QL, NICHOLS J, EVANS EP, SMITH AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; **416**: 545–548.
- [28] MORSEHEAD CM, BENVENITE P, ISCOVE NN, Van der KOOY D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nature Medicine* 2002; **8**: 268–273.
- [29] WANG X, WILLENBRING H, AKKARI Y, TORIARU Y, FOSTER, AL-DHALIMY M, LAGASSE E, FINEGOLD M, OLSON S, GROPPE M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; March: 1–4 (advance online publication).
- [30] OGURA A, INOUE K, Ogonuku N, LEE J, KOHDA T, ISHINO F. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. *Cloning and Stem Cells* 2002; **4**: 397–405.
- [31] RATAJCZAK MZ, MAJKA M, KUCIA M, DRUKALA J, PIETRZKOWSKI Z, PEIPER S, JANOWSKA-WIECZOREK A. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells* 2003; **21**: 363–371.
- [32] PITUCH-NOWOROLSKA A, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, BAJ-KRZYWORZEKA A, URBANOWICZ B, MALEC E, RATAJCZAK MZ. Circulating CXCR4-positive stem/progenitor cells compete for SDF-1-positive niches in bone marrow, muscle and neural tissues: an alternative hypothesis to stem cells plasticity. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; **41**: 13–21.
- [33] RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells „hide out” in the bone marrow. *Leukemia* 2004, **18**, 29–40.
- [34] HATCH H, ZHENG D, JORGENSEN ML, PETERSEN BE. SDF-1 α /CXCR4: A mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning and Stem Cells* 2002; **4**: 339–351.
- [35] ZOU Y, KOTTMANN AH, KURODA M, TANIUCHI I, LITTMAN DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; **393**: 595–599.
- [36] LAZARINI F, THAM TN, CASANOVA P, ARENZANA-SEISDEDOS F, DUBOIS-DALCQ M. Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia* 2003; **42**: 139–148.
- [37] DOITSIDOU M, REICHMAN-FRIED M, STEBLER J, KÖPRUNNER M, DÖRRIES J, MEYER D, ESGUERRA CV, LEUNG T, RAZ E. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 2002; **111**: 647–659.
- [38] REISS K, MENTLEIN R, SIEVERS J, HARTMANN D. Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* 2002; **115**: 295–305.
- [39] CRANE IJ, WALLACE CA, MCKILLOP-SMITH S, FORRESTER JV. CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from blood-retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1 α . *J Immunol* 2000; **165**: 4372–4378.

- [40] BAJETTO A, BONAVIA R, BARBERO S, PICCIOLI P, COSTA A, FLORIO T, DSCHETTINI G. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J Neurochem* 1999; **73**: 2348–2357.
- [41] MAINA F, KLEIN R. Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nature Neuroscience* 1999; **2**: 213–217.
- [42] WEIMAR IS, MIRANDA N, MULLER EJ, HEKMAN A, KERST JM, DE GAST GC, GERRITSEN WR. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) is produced by human bone marrow stromal cells and promotes proliferation, adhesion and survival of human hematopoietic progenitor cells (CD34⁺). *Exp Hematol* 1998; **26**: 885–894.
- [43] BIRCHMEIER C, GHERARDI E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends in Cell Biology* 1998; **8**: 404–410.
- [44] HATTA T, MORIYAMA K, NAKASHIMA K, TAGA T, OTANI H. The role of gp130 in cerebral cortical development: in vivo functional analysis in a mouse exo utero system. *J Neurosci* 2002; **22**: 5516–5524.
- [45] HILTON J. LIF: lots of interesting functions. *TIBS* 1992; **2**: 72–76.
- [46] LIBURA J, DRUKALA J, MAJKA M, TOMEASCU O, NAVENOT JM, KUCIA M, MARQUEZ L, PEIPER SC, BARR FG, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis and adhesion. *Blood* 2002; **100**: 2597–2606.
- [47] RECA R, MASTELLOS D, MAJKA M, MARQUEZ L, RATAJCZAK J, FRANCHINI S, GLODEK A, HONCZARENKO M, SPRUCE LA, JANOWSKA-WIECZOREK A, LAMBRIS JD, RATAJCZAK MZ. Functional receptor for C3a anaphylatoxin is expressed by normal hematopoietic stem/progenitor cells, and C3a enhances their homing-related responses to SDF-1. *Blood* 2003 May 15; **101**: 3784–3793.
- [48] JANKOWSKI K, KUCIA M, WYSOCZYNSKI M, RECA R, DONGLING ZHAO, TRZYNA E, ZEMBALA M, RATAJCZAK J, HOUGHTON P, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Both HGF and SDF-1 regulate the metastatic behavior of human *Rhabdomyosarcoma* Cells, but only HGF enhances their resistance to radio-chemotherapy. *Cancer Research* 2003 (przyjęta do druku).
- [49] GALLACHER L, MURDOCH B, WU DM, KARANU FN, KEENEY M, BHATIA M. Isolation and characterization of human CD34⁺ Lin⁻ and CD34⁺ Lin⁺ hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 2000; **95**: 2813–2820.
- [50] CORBEIL D, ROPER K, HELLWIG A, TAVIAN M, MIRAGLIA S, WATT SM, SIMMONS PJ, PEAULT B, BUCK DW, HUTTNER WB. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem* 2000; **275**: 5512–5520.
- [51] LEVESQUE JP, HENDY J, WINKLER IG, TAKAMATSU Y, SIMMONS PJ. Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 2003; **31**: 109–117.
- [52] JANKOWSKI RJ, DEASY BM, CAO B, GATES C, HUARD J. The role of CD34 expression and cellular fusion in the regeneration capacity of myogenic progenitor cells. *J Cell Sci* 2002; **115**: 4361–4374.
- [53] TORRENTE Y, TREMBLAY JP, PISATI F, BELICCHI M, ROSSI B, SIRONI M, FORTUNATO F, EL FAHIME M, D'ANGELO MG, CARON NJ, COSTANTIN G, PAULIN D, SCARLATO G, BRESOLIN N. Intraarterial injection of muscle-derived CD34⁺ Sea-1⁺ stem cells restored dystrophin in *mdx* mice. *JCB* 2001; **152**: 335–348.
- [54] BADORFF C, BRANDES RP, POPP R, RUPP S, URBICH C, AICHER A, FLEMING I, BUSSE R, ZETHER AM, DIMMELER S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; **107**: 1024–1032.
- [55] JACKSON KA, MAJKA SM, WANG H, POCIUS J, HARTLEY CJ, MAJESKY MW, ENTMAN ML, MICHAEL LH, HIRSHI KK, GOODELL MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; **107**: 1355–1356.
- [56] OGURA A, INOUE K, OGONUKU N, LEE J, KOHDA T, ISHINO F. Phenotypic effects of somatic cell cloning in the mouse. *Cloning and Stem Cells* 2002; **4**: 397–405.

Adres autora: Kraków-Prokocim, ul. Wielicka 265.

ZARODKOWE *VERSUS* SOMATYCZNE KOMÓRKI MACIERZYSTE W TERAPII REGENERACYJNEJ MÓZGU

EMBRYONIC VERSUS SOMATIC STEM CELLS
IN REGENERATIVE THERAPY OF BRAIN

Krystyna DOMAŃSKA-JANIK

Zakład Neurobiologii Naprawczej,
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN

Streszczenie: Spełnienie wizji terapii wielu nieuleczalnych chorób przez wykorzystanie stale proliferujących i różnicujących się do wszystkich tkanek organizmu ludzkich zarodkowych komórek macierzystych (KM) do tej pory nie wyszło poza fazę eksperymentalnych badań przedklinicznych. Również liczne próby zastosowania do tych samych celów somatycznych KM pozyskiwanych z tkanek dojrzałych przyniosły jedynie umiarkowane skutki kliniczne. W artykule przedstawiono podstawowe trudności spowalniające rozwój terapii komórkowej. Nie leżą one wyłącznie w sferze problemów etycznych czy prawnych, ale w poważnych i ciągle nierozwiązanych zagrożeniach biologicznych (niestabilność genomu, tumorogenność) w przypadku zarodkowych KM oraz w niedostatecznej znajomości mechanizmów regulujących proliferację i ukierunkowane różnicowanie również KM pochodzących z tkanek dojrzałych. Dotychczasowe rezultaty bardzo intensywnych badań są niewątpliwie zachęcające, jednak perspektywy ich pełnego rozwiązania zależą od trudnego do przewidzenia w skali czasowej postępu naszej wiedzy o podstawowej biologii KM.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, zarodkowe, somatyczne, regeneracja mózgu.

Summary: Proponents of embryonic stem cell (SC) research in humans make promises of cure for a multitude diseases based on the assumption that they will be able to proliferate indefinitely in culture and to generate any type of cell of human body. However, this vision does not meet clinical reality which, so far, reached only the level of preclinical experimental research. The same purposes can be realized by the use of multi/pluripotent somatic SC but they are also hampered by serious difficulties in practice and till now have attained only partial clinical success. This review summarize what we currently know about SC of the both types (embryonic versus somatic) with aim to define a major theoretical and practical handicaps delaying the stem cell-based therapies in treatment of human diseases. We point not to ethical or legal issues, although in no doubt also concerning SC research, but exclusively to biological difficulties and hazards which are hardly avoided at presence. They include an unstable state of human embryonic SC genome which results in cumulating mutations *in vitro* and disturbing ability

to form tumors *in vivo*. On the other side a limited knowledge about adult SC proliferation kinetics seems to be the main obstacle to achieve unrestricted grow of these cells in culture and thus limits their use in practice. The scientists agree that present achievements are encouraging but future progress will depend on difficult to foresee growing knowledge about basic SC biology.

Key words: stem cells, embryonic, somatic, brain regeneration.

Terapia regeneracyjna nieodwracalnie uszkodzonych tkanek za pomocą przeszczepów komórek macierzystych (KM) skupiła uwagę środowisk medycznych i opinii publicznej z chwilą opracowania metody otrzymywania i długotrwałej hodowli ludzkich komórek wężła zarodkowego blastocysty [48]. Te tzw. zarodkowe (embrionalne) KM (eKM) mogą być hodowane *in vitro* w sposób praktycznie nieograniczony, różniąc się teoretycznie do wszystkich typów komórek somatycznych organizmu. Potwierdza to ich zdolność do tworzenia potworniaków (łagodnych guzów nowotworowych) po przeszczepieniu ich do zwierząt z uszkodzonym układem immunologicznym. Jednakże te same cechy tzn. Nielimitowana proliferacja i różnokierunkowość różnicowania, które stanowią o atrakcyjności eKM jako źródła komórek terapeutycznych niosą ze sobą również duże zagrożenie nowotworowe. Stanowi to ciągle nierozwiązany problem praktyczny w stosowaniu eKM do terapii regeneracyjnej, której próby nie wyszły dotychczas poza fazę eksperymentalnych badań przedklinicznych. Pierwsze linie eKM, wyprowadzone przez autora [48] i do dziś używane w wielu ośrodkach badawczych, okazały się ostatnio również w wysokim procencie zmienione kariotypowo i genetycznie [2] wskazując, że transformacje spowodowane niestabilnością genomu tych komórek [15] zachodzą również w sposób niekontrolowany *in vitro*. Dlatego też coraz więcej zwolenników zyskuje pogląd, że o praktycznym zastosowaniu eKM w klinice będzie można myśleć dopiero po całościowym poznaniu i rozwiązaniu problemu onkogenezy i walki z zagrożeniem nowotworowym.

Prawie jednocześnie z technologią otrzymywania ludzkich eKM pojawiły się doniesienia o możliwościach uzyskiwania szerokiego wachlarza ukierunkowanych tkankowo, a więc idealnych do przeszczepów, somatycznych komórek macierzystych (sKM). Występują one w stosunkowo dużej ilości we wszystkich narządach w czasie rozwoju płodowego, a w bardziej ograniczonej liczbie również w organizmach dojrzałych. Pomimo że przeszczepy hematopoetycznych sKM są od ponad 30 lat z powodzeniem stosowane w klinice do rekonstrukcji uszkodzonego układu krwiotwórczego to dopiero niedawno zwrócono baczniejszą uwagę, że nawet tkanki w normalnych warunkach nieregenerujące lub wykazujące jedynie ograniczoną zdolność do produkcji nowych komórek (np. mózg) mają również endogenne zasoby sKM, które dają się stymulować do podziałów w określonych warunkach *in vivo* oraz izolować i namnażać *in vitro*. Macierzyste komórki somatyczne, jak wykazała dotychczasowa praktyka, nie niosą w sobie zagrożenia nowotworowego, a jedyną cechą ograniczającą szerokie zastosowanie jest ich nie zawsze łatwa dostępność oraz trudności w utrzymaniu długotrwałej proliferacji (linii hodowlanych) *in vitro*. Wydaje się, że z chwilą przezwyciężenia tego impasu, będą one stanowić idealne źródło wykorzystywane w komórkowej terapii regeneracyjnej tkanek.

Niezależnie od różnego stopnia ograniczenia potencjału różnicowania KM na poszczególnych etapach rozwoju osobniczego (*toti-, pluri- lub multi-potencjalne KM*), wszystkie one mają *per definitionem* pewne, wyróżniające je cechy wspólne. Do najbardziej podstawowych należy ich **zdolność do samoodnowy** (*ang. self-renewal*) oparta na występowaniu symetrycznej bądź asymetrycznej kinetyki podziałów komórkowych [41]. Odpowiednikiem funkcjonalnym tej cechy KM jest ich **klonogenność**, która może być obserwowana zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*. Łatwo można sobie wyobrazić, że to właśnie z nią związana jest zdolności KM do rozwojowej organogenezy, jak i terapeutycznej repopulacji (regeneracji) uszkodzonych tkanek (np. krwiotwórczej w przeszczepach szpiku) i narządów.

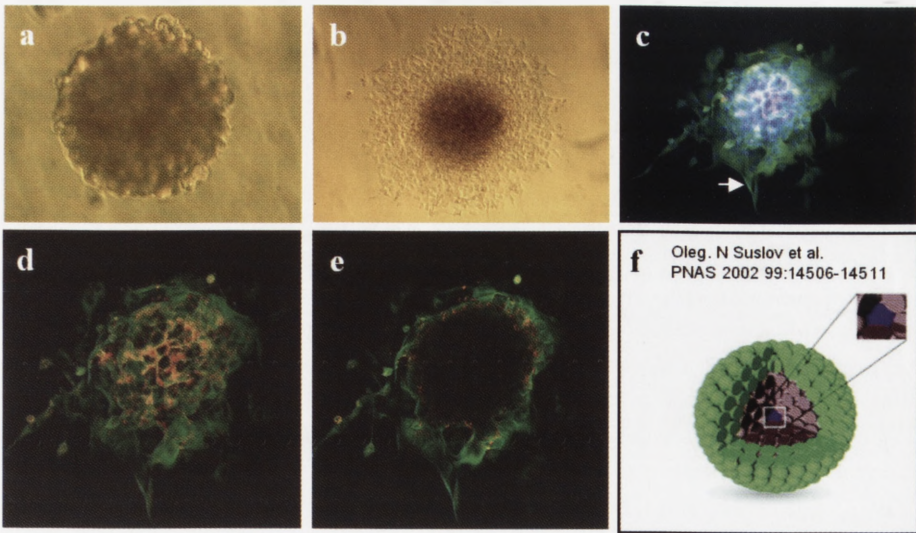
Drugą, ważną cechą KM, równie istotną z punktu widzenia terapeutycznego, lecz stwarzającą duże problemy praktyczne, jest utrzymanie specyficznej i kontrolowanej linii ich różnicowania do określonych fenotypów komórek potomnych (*ang. commitment*). Zrozumienie podstaw molekularnych obu tych procesów określających i determinujących funkcjonalnie KM (samoodtworzenie i ukierunkowanie) znajduje się w stadium początkowym, a kontrowersje dotyczą nawet tego, czy są one rzeczywiście pre-determinowane programem genetycznym, czy też, znajdując się jedynie pod silną presją czynników środowiskowych (epigenetycznych) występujących w rozwijającym się organizmie, mają w zasadzie charakter stochastyczny. Z niepełnej znajomości mechanizmów leżących u podstaw kontroli procesów proliferacji i różnicowania się KM wynikają ciągle nierozwiązane trudności metodyczne i praktyczne, takie jak konieczność współhodowli ludzkich eKM z tzw. komórkami odżywiającymi pochodzenia mysiego (*feeder layer*), słaba powtarzalność wyników osiąganych przez różne, a często nawet te same grupy badawcze, brak metod izolacji czystych populacji KM oraz trudność w uzyskaniu i utrzymaniu określonych ukierunkowanych linii hodowlanych. Nawet w ekspansywnie rosnących hodowlach *in vitro*, niezróżnicowane, samoodnawiające się komórki macierzyste występują jedynie na poziomie kilku procent i ciągle brak jest specyficznych markerów powierzchniowych pozwalających na ich lepszą selekcję, izolację i genotypowanie. Ustalenie podstawowych metod hodowli KM gryzoni, bazujące bardziej na metodzie „prób i błędów” niż na poznaniu istoty tych procesów, zajęło badaczom ponad 20 lat. Niestety, metody te nie zawsze sprawdzają się w przypadku komórek ludzkich.

Somatyczne KM (sKM) w większości tkanek występują w podstawowym stanie tzw. „uśpienia”, zasiedlając swoje naturalne nisze tkankowe w stosunkowo małych ilościach. Jedynie pod wpływem specyficznej stymulacji środowiskowej mogą przechodzić w fazę przyspieszonych podziałów, generując komórki potomne. W warunkach sprzyjających różnicowaniu mogą również, co stanowi duży problem w utrzymaniu stałych linii KM *in vitro*, samorzutnie i nieodwracalnie przechodzić na następne poziomy różnicowania już w kierunku monopotentjalnych, częściowo zróżnicowanych, słabo dzielących się komórek prekursorowych oraz nieproliferujących komórek ostatecznie zróżnicowanych. Z drugiej strony takie częściowo zróżnicowane komórki prekursorowe stanowią najlepszy materiał do przeszczepów. Poznanie mechanizmów kontrolujących zachowanie się sKM w niszach tkankowych będzie prawdopodobnie decydujące w przełamaniu ciągle istniejących trudności w ich ekspansji i pozyskiwania do celów praktycznych.

W chwili obecnej postuluje się dwie główne drogi sygnałowe zaangażowane w utrzymanie proliferacji (samoodnowy) niezróżnicowanych KM *in vitro*, działające zarówno na poziomie komórek embrionalnych, jak i somatycznych. Podstawowymi zewnątrzkomórkowymi ligandami auto- lub parakrynnymi są tu cytokiny: LIF (*leukemia inhibitory factor*) [43, 54] i Wnt (*wingless*) [40]. Schematy przekazywania obu sygnałów w komórkach progenitorowych można znaleźć w internetowych, ogólnodostępnych diagramach (STKE Connections Map ><http://stke.sciencemag.org/cm><), aczkolwiek, szczególnie w odniesieniu do ludzkich KM, poszczególne elementy tych dróg są ciągle modyfikowane i uzupełniane. Badania nad sygnałem LIF/JAK/STAT 1–3 mają dłuższą historię, ponieważ został on zidentyfikowany stosunkowo wcześniej jako niezbędny czynnik promujący proliferację i zapobiegający różnicowaniu się eKM u gryzoni. Dopiero najnowsze badania wykazały, że główną, częściowo komplementarną drogą działającą w ludzkich KM jest sygnał Wnt/ β -katenina [36, 40]. Co więcej, sygnał Wnt/ β -katenina podlega regulacji zarówno poprzez naturalne i zsyntetyzowane specyficzne ligandy [51], jak i pośrednio poprzez inhibicję regulującej negatywnie jego aktywność kinazy GSK3b (inhibitory: BIO – *Tyrian purple indirubin*, Li⁺) oraz pośrednio przez aktywatory sygnału drogi PI3K/AKT. Szczególnie ciekawa jest tu rola fosfatazy PTEN, hamującej sygnał P-AKT, której rola w regulacji proliferacji komórek nowotworowych była znana od dawna [24], natomiast ostatnio postuluje się ją również w kontekście regulacji kinetyki podziałowej KM [41].

W naszych badaniach, prowadzonych na ludzkich neuralnych komórkach macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej (HUCB-NSC) [4], wykazaliśmy wzmocnioną ekspresję szeregu genów kodujących istotne białka obu dróg sygnałowych (dane niepublikowane). Są to geny *lif*, *lifR*, *jak*, *stat* związane z sygnałem inicjowanym przez LIF oraz *wnt*, *frizzled*, *lrp*, *β -catenina*, *cadheryna* i *tcf* charakterystyczne dla sygnału Wnt. Znajdujemy również ekspresję genów białek modulujących negatywnie sygnał Wnt, takich jak GSK-3 β czy PTEN wraz z całą gamą genów kodujących białka regulatorowe i współdziałające czynniki wzrostowe oraz ich receptory. Ciekawe, że część z nich ulega indukcji lub wzmocnieniu w zależności od stanu proliferacji/zróżnicowania hodowli, co wskazuje na możliwość ich regulacji również na poziomie transkrypcji. Wykazaliśmy też, że prowadzenie hodowli w obecności egzogennej LIF, jak i innych mitogenów (EGF, bFGF) zwiększa wyraźnie pulę proliferujących komórek o fenotypie niezróżnicowanym, hamuje ich odpowiedź na czynniki różnicujące (również po przeszczepie) i promuje tworzenie się w hodowli tzw. *neurosfer* – konglomeratów niezróżnicowanych KM, występujących typowo w niekonwencjonalnych hodowlach – liniach progenitorów neuralnych otrzymywanych bezpośrednio z neurogennych rejonów mózgu. Wydaje się, że właśnie te *neurosfer*y mogą stanowić doskonały model badawczy zachowania się neuralnych sKM w swoich naturalnych niszach tkankowych (ryc. 1).

Ciekawa funkcjonalnie jest również zbieżność sygnału stymulującego proliferację KM z sygnałem antyapoptotycznym. Zwolnienie tego bloku w warunkach promujących różnicowanie (np. pod wpływem neuromorfogenów) zwiększa podatność komórek potomnych na selekcję w czasie organogenezy i kształtowania się cytoarchitektury układu nerwowego (tzw. apoptoza rozwojowa). Ta koincydencja sprzyja również niekon-



RYCINA 1. Neurosfery wyselekcjonowane z linii ludzkich neuralnych komórek macierzystych krwi pępowinowej. Hodowane w zdefiniowanym medium pozbawionym surowicy tworzą pływające w toni regularne sfery [a]. Neurosfera charakteryzuje się heterogenną budową [f]. Zewnętrzny płaszcz zróżnicowanych komórek [f, zielony kolor] otacza niezróżnicowane jądro [f; fioletowy kolor] zawierające przynajmniej jedną symetrycznie dzielącą się komórkę macierzystą [f; wstawka] zdolną odtworzyć całą strukturę neurosfery. Pod wpływem surowicy neurosfery osiadają na dnie, a komórki tworzące zewnętrzny płaszcz rozchodzą się [b]. Zewnętrzny płaszcz zbudowany jest głównie z neuronów [c, d, e; zielone barwienie anty- β -tubulina III] oraz w mniejszym stopniu z astrocytów [d, e; czerwone barwienie – antyGFAP]. Wnętrze neurosfery jest negatywne pod względem markerów neuralnych [c; Hoechst (niebieski) – jądra komórkowe, e; przekrój konfokalny] i pozostaje jako nisza komórek macierzystych chroniona przez strukturę płaszcza przed czynnikami różnicującymi

trolowanej proliferacji eKM prowadzącej do nowotworzenia, jak również w sensie pozytywnym, do skuteczności antyapoptotycznych modyfikacji ukierunkowanych komórek prekursorowych przed ich przeszczepem. I tak np. nadekspresja AKT1 *ex vivo* w mezenchymalnych (mKM) komórkach macierzystych zwiększała znacząco osiągnięty stopień repopulacji uszkodzonego mięśnia sercowego [26]. Poza postulowanym przez autorów działaniem cytoprotekcyjnym postępowanie takie może zwiększać samoodnawiającą się pulę proliferujących KM w tkance po przeszczepie, przez co zwiększać ich ilość i migrację w uszkodzonym narządzie.

Poznanie związków między specyficznym dla ludzkich KM sygnałem Wnt/ β -katenina, ekspresją genów regulatorowych, a długotrwałym utrzymywaniem się samoodnowy i proliferacji KM może doprowadzić do gwałtownego postępu w metodach hodowli linii tak zarodkowych, jak i somatycznych KM. Miałoby to duże znaczenie w określeniu nowych standardów hodowli, niezależnych od bliżej niezdefiniowanych, a więc trudnych do kontroli czynników troficznych i wzrostowych obecnych w komórkach odżywczych (*feeder cells*) i surowicach zwierzęcych używanych obecnie. Należy podkreślić, że wprowadzanie obcogatunkowego materiału biologicznego do hodowli ludzkich linii komórkowych zawsze stanowi pewne niebezpieczeństwo, również epidemiologiczne.

Jak już wspomniano, komórki macierzyste można otrzymywać z tkanek znajdujących się na różnych szczeblach rozwoju osobniczego. Bezpośrednio do celów terapeutycznych najbardziej pożądane są dobrze zdefiniowane, stabilne linie ukierunkowanych, proliferujących komórek progenitorowych. Co prawda w eksperymentach zwierzęcych opisywano dobre skutki transplantacji również niezróżnicowanych eKM w modelowych stanach patologicznych (np. w PD) [3]. Jednak w znaczącej części przypadków badacze podkreślają, że różnicowanie się tych komórek *in situ* było niewystarczające, wymykało się spod kontroli, a znaczący odsetek przeszczepów (ok. 20%) kończył się powstawaniem potworniaków (*teratocarcinoma*).

Hodowle dowolnej ilości zróżnicowanych tkankowo i stabilnych genetycznie, standardowych linii KM – czy to wyprowadzonych z pierwotnych linii eKM pochodzących z blastocysty, czy też izolowanych z dostępnych nisz somatycznych komórek dojrzałych, zapewniłyby łatwy dostęp lekarzy do materiału transplantacyjnego. Jednakże, jak wspomniano, utrzymanie ich proliferacji *in vitro*, jak i stabilnego różnicowania *in vivo* stanowi ciągle duży problem. Ponieważ docelowo hodowle takie mają służyć regeneracji nieodwracalnie uszkodzonych narządów u chorych, również problem ich biologicznego bezpieczeństwa jest szczególnie istotny. Stwarza to konieczność wypracowania ogólnie obowiązujących, ściśle zdefiniowanych standardów hodowlanych. Niemniej istotna jest pewność, co do dalszego losu KM po przeszczepie. Liczne badania podstawowe podkreślają zbieżność cech eKM i komórek nowotworowych (niezróżnicowanie, klonogeność, odporność na apoptozę). Istnieje również uderzające podobieństwo szlaków sygnałowych promujących utrzymywanie proliferującej puli KM, jak i onkogenezę. Poza wspomnianym już sygnałem Went/ β -katenina, którego rola w transformacji nowotworowej komórek różnych narządów była wielokrotnie wykazywana [37], również do takich „wspólnych” szlaków można zaliczyć dwa inne sygnały proliferacyjne: Notch i Shh (*Sonic hedgehog*) [45]. Niedojrzałe, pojawiające się przejściowo w ściśle określonym stadium rozwoju osobniczego pluripotencjalne komórki macierzyste węzła zarodkowego blastocysty, stanowiące jedyne źródło eKM i charakteryzujące się wrodzoną zdolnością do tworzenia guzów nowotworowych (*teratocarcinoma*), są w czasie hodowli, jak i po przeszczepie poddane presji zupełnie nowego, sztucznego środowiska. Problem zmian kariotypu tych komórek ich podatność na dodatkowe mutacje nowotworowe, jak również gromadzenie się innych, okresowo „niemych”, niekontrolowanych zmian epigenetycznych, szczególnie ze strony genów imprintowanych [15], jest od dawna dokumentowany i dyskutowany przez badaczy. Powrócił on spektakularnie ostatnio, gdy zespół Petera Andrews wykazał liczne zmiany chromosomalne występujące w standardowych, dostarczanych przez WiCell (linie wyprowadzone przez Thomsona) i rekomendowanych przez NIH liniach ludzkich embrionalnych KM [7]. Zmiany akumulowały się na chromosomach 12 i szczególnie 17q, w których, jak wynika z innych badań, szczególnie często lokalizowane są geny typowe dla KM. Jak do tej pory nie wykazano podobnych zmian w długotrwale hodowanych sKM (np. przez ekspansję *neurosfer*), chociaż na obecnym etapie nie można ich również całkowicie wykluczyć. Jednak długoletnie pozytywne doświadczenia kliniczne nad stosowaniem hematopoetycznych sKM w przeszczepach szpiku spowodowały, że większość podejmowanych prób klinicznych terapii komórkowej jest

przeprowadzana z wykorzystaniem właśnie tych „dojrzałych” sKM. W hodowanej przez nas unikalnej linii neuralnych KM wyselekcjonowanej z komórek występujących w krwi pępowinowej nie stwierdziliśmy do tej pory zmian kariotypu (46 xy) w czasie długotrwałej jej ekspansji. Możliwe, że ontogenetycznie dojrzałe sKM są bardziej odporne na tego typu zmiany. Podstawowym pytaniem pozostaje jednak, na ile stwierdzona niestabilność genetyczna eKM z ich skłonnością do transformacji nowotworowych jest stałym atrybutem tych komórek, a na ile ujawnia się ona jedynie w trakcie hodowli i selekcji *in vitro* podlegając supresji w naturalnym środowisku po przeszczepie. O ile pierwsza możliwość wykluczałaby właściwie możliwość stosowania eKM w klinice (za czym, zdaniem autora, przemawia większość pośrednich i bezpośrednich przesłanek), to druga wymusiłaby jedynie zmiany metod hodowli (głównie skrócenie czasu), stosowania ściślejszych, bezpiecznych standardów hodowlanych [38] i uważnej kontroli jakości przed przeszczepem.

Jeśli chodzi o dotychczasowe pozytywne doświadczenia terapeutyczne z somatycznymi KM, to procedurą ogólnie zaakceptowaną klinicznie, powszechnie stosowaną i uznaną za bezpieczną są wspomniane już transplantacje szpiku kostnego. Jednak należy przypomnieć, że są to przeszczepy bezpośrednie i że ciągle nie udało się otrzymać ekspansji krwiotwórczych KM w długotrwałej hodowli *in vitro*.

Bazując na doświadczeniach hematologów i fenomenologicznych obserwacjach losów przeszczepionych komórek szpikowych w materiale sekcyjnym byłych pacjentów, wydaje się, że szpik kostny może być potencjalnym źródłem również innych niż hematopoetyczne sKM. Zgodnie z tymi obserwacjami, KM szpiku kostnego mogą spontanicznie różnicować się do komórek mięśniowych, kardiomiocytów, komórek endotelialnych różnych narządów, w tym hepatocytów, komórek przewodów żółciowych i innych komórek wątroby, śródbłonka naczyń, nabłonkowych komórek nerek, neuronów i komórek glejowych [33]. Problem możliwości tzw. *transdyferencjacji* (zmiany naturalnego losu komórek progenitorowych określonej linii rozwojowej) lub też „utajonej” *pluripotencjalności* (*transpotency*) niektórych KM występujących w szpiku, krwi czy też w innych niszach sKM, jest ciągle fałszyfikowany doświadczalnie. Do najbardziej znaczących osiągnięć przemawiających za istnieniem takich *pluripotencjalnych* progenitorów wśród sKM należy zaliczyć prace z grupy Catherine Verfaillie [17]. Wykazały one możliwość selekcji z komórek szpiku i dalszej nieograniczonej hodowli *in vitro* tzw. MAPC (*ang. multipotent adult progenitor cells*), różnicujących się do komórek linii należących do 3 różnych listków zarodkowych. Pomimo przedstawienia satysfakcjonujących dowodów doświadczalnych środowisko naukowe wykazuje duży opór przed zaakceptowaniem *transdyferencjacji* jako istotnego zjawiska biologicznego, występującego również w innych niż związane z rozwojem zarodkowym warunkach środowiskowych. Pojawiły się koncepcje „spichrzania” przez szpik kostny sKM obecnych w niewielkich ilościach w krwi obwodowej lub też wyplukiwanych do niej ze swoich naturalnych nisz tkankowych [35]. Trzeba tutaj podkreślić, że ciągle nie ma jasności co do rodowodu ontogenetycznego somatycznych komórek macierzystych rezydujących w różnych tkankach. W ostatnich pracach na gryzoniach przekonująco wykazano, że pojedyncza, klonogenna komórka szpiku kostnego o fenotypie CD34⁺, Lin⁻, c-kit⁺ i Sca⁺ jest zdolna zarówno do restytucji całego układu krwiotwórczego, jak

i do osiedlania („zagnieżdżania”) się w mózgu, dając w przeważającej liczbie komórki mikroglejowe i perycyty, jak również mniej liczne neurony [12].

Z zastrzeżeń podnoszonych w stosunku do licznych obserwacji klonalnego rozrostu i różnicowania do miejscowo występujących fenotypów komórkowych (*transdyferencjacji*) przeszczepionych komórek szpikowych w takich narządach, jak: wątroba, serce czy mózg, najbardziej spektakularne było wykazanie możliwości fuzji tych komórek z komórkami gospodarza [47, 55]. Pomijając kwestię, że nawet taki mechanizm działania KM, jeśli tylko funkcjonalnie skuteczny i prowadzący do zasiedlenia w chorym narządzie metabolicznie kompetentnych komórek hetero-kariotypowych miałby swoją wartość kliniczną, to niewątpliwie nie tłumaczy on dostatecznie wszystkich faktów obserwowanych doświadczalnie. I tak np. we wspomnianych już pracach z grupy Verfaillie obserwowana *in vitro* zmiana typowej ścieżki różnicowania mezenchymalnych progenitorów szpikowych, jak równie dobrze udokumentowana zmiana fenotypu multipotencjalnych komórek izolowanych ze skóry [49] zachodziły pod nieobecność komórek o fenotypie docelowym i nie wykazano w nich wstępowania jąder heterokariotypowych. Podobnie w naszych badaniach zmiana fenotypu komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej zachodziła w warunkach jednorodnej hodowli *in vitro*, a więc bez możliwości wystąpienia fuzji z komórkami neuralnymi*. Również kariotyp tych komórek pozostawał trwale diploidalny. Niektóre wyszukane strategie eksperymentalne zastosowane *in vivo* też wydają się wykluczać możliwość fuzji jako podstawowego mechanizmu nabywania nowych cech po przeszczepie KM i ich miejscowym rozroście klonalnym [21, 28, 30]. Również interesujące są obserwacje poczynione u matek mających męskie potomstwo. Wydaje się, że spotykane w klinice zaost్రzanie się chorób autoimmunologicznych u matek *post-partum* może wynikać z przez-łożyskowej penetracji allogenicznych komórek płodu. Po ich losowym wbudowaniu się w tkanki matki dochodzi do nadreaktywności układu immunologicznego. Opisano przypadek poporodowego zapalenia tarczycy z licznymi „gorącymi” guzkami wykazującymi budowę chimeryczną z obecnością zróżnicowanych, pochodzących od męskiego płodu komórek gruczolowych o kariotypie XY, lecz nigdy XXXY, co wykluczałoby możliwość ich powstania drogą fuzji [44].

Drugą często podnoszoną wątpliwością, co do charakteru obserwowanej *transdyferencjacji* czy też tzw. plastyczności sKM, zachodzącej zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* jest obawa, że komórki te przyjmują jedynie pewne cechy fenotypowe, jednak bez trwałego nabywania cech funkcjonalnych, typowych dla komórek nowego rodzaju. Niemniej istnieją bardzo przekonujące dane eksperymentalne uzyskane na gryzoniach, że przeszczepiane komórki szpikowe mogą w warunkach odpowiedniej presji środowiskowej generować np. funkcjonalnie sprawne komórki wątroby, mózgu czy serca [22, 27, 31]. Niestety nie we wszystkich przypadkach postulowanej *transdyferencjacji*, szczególnie w przypadkach klinicznych, można przedstawić podobne, bezpośrednie dowody funkcjonalne.

Pochodną opisanych doświadczeń nad komórkami szpiku kostnego była wspomniana już selekcja progenitorów neuralnych* z komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej

*komórka neuralna – komórka różnicująca się zarówno do neuronów, jak i gleju.

[4]. Na to, że krew pępowinowa może być bardzo bogatym i bezpiecznym materiałem do izolacji sKM wskazywały doświadczenia hematologów nad stosowaniem jej w regeneracji krwiotwórczej funkcji szpiku kostnego. Również fakt, że krew pępowinową można zaliczyć do tkanek leżących na pograniczu okresu płodowego i dojrzałości tkankowej wydawał się nam obiecujący. Stosując selekcję *in vitro* subfrakcji komórek o fenotypie CD34⁺ otrzymaliśmy populację zawierającą progenitory neuralne mogące w obecności neuromorfofenów różnicować się do podstawowych komórek mózgu o fenotypie neuronów, astrocytów i oligodendrocytów. Co więcej, wykazaliśmy obecność klonogennych KM w niektórych z przeprowadzonych selekcji takich progenitorów. Pozwoliło to na wyprowadzenie stałej, niestransformowanej linii nKM, wykazującej zaskakującą stabilność fenotypową i kariotypową (badania niepublikowane). Obecność progenitorów neuralnych w krwi pępowinowej została również wykazana przez badaczy amerykańskich [11, 39], a możliwość ich selekcji zgodnej z opisaną przez nas procedurą potwierdzona została aktualnie również przez grupę niemiecką [10]. Otrzymana przez nas klonalna linia multipotencjalnych nKM pochodzących z krwi pępowinowej, po wykazaniu przez nią nabywania cech strukturalnych i funkcjonalnych neuronów *in vitro*, jest obecnie testowana w modelach zwierzęcych chorób CUN. Ostatnio grupa amerykańska, pracująca z wykorzystaniem świeżo wyizolowanych i nieselekcjonowanych komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej, opublikowała zbiór prac doświadczalnych wskazujących na duży potencjał regeneracyjny tych komórek po ich przeszczepie w stanach patologicznych OUN u zwierząt [9, 25, 56]. Jednak ciągle niewyjaśnionym problemem jest istota mechanizmu działania tych przeszczepów oraz potwierdzenie repopulacji chorej tkanki przez integrujące się z nią egzogenne nKM. Również należy ustalić właściwy sposób przeszczepu komórek, rodzaj wskazanej cytoprotekcji oraz przeprowadzić długoterminową kontrolę losu przeszczepionych komórek. Dodatkową trudnością jest konieczność prowadzenia badań ludzkich KM w doświadczalnych modelach zwierzęcych, co stwarza warunki wysoce niekorzystne immunologicznie. Istnieją jednak dane o stosunkowo niskiej immunogenności zarówno nKM, jak i ukierunkowanych progenitorów tkankowych [1]. Pomimo to najlepsze wyniki transplantacyjne uzyskano stosując gatunkowo zgodne, zwierzęce komórki do przeszczepów lub bardzo kosztowne mutanty zwierząt-biorców przeszczepu z niewydolnością układu immunologicznego NOD-SCID [46].

Doświadczenia przedkliniczne i kliniczne w terapii komórkowej. Szybki postęp metod hodowli neuralnych KM pochodzenia embrionalnego, płodowego, jak i z dojrzałych tkanek [6] umożliwił pojawienie się licznych prac eksperymentalnych nad regeneracją uszkodzonej tkanki nerwowej. Zdecydowaną większość badań przed- i klinicznych wykonano jednak z użyciem bezpośrednich przeszczepów somatycznych KM pochodzenia szpikowego. Od co najmniej 20 lat prowadzone są badania kliniczne nad przeszczepami tkanek płodowych zawierających prekursor neuronów dopaminergicznych (rdzeń nadnerczy, określone okolice mózgu płodów, a nawet wyselekcjonowane komórki pochodzące z guzów nowotworowych hNT) w leczeniu choroby Parkinsona. W ostatnich latach doszły do nich intensywne badania nad przeszczepami KM hodowanych *in vitro* [16]. W badaniach na gryzoniach przeprowadzono pomyślne

próby zastosowania terapii komórkowej w różnych chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak: parkinsonizm [3, 8], leukodystrofie [32, 53], stwardnienie zanikowe boczne [9] czy też w encefalopatiach poniedokrwiennych i pourazowych [5, 24, 25].

W klinice pierwsze próby leczenia lizosomalnych chorób „spichrzeniowych” przeszczepami allogenicznymi komórek szpikowych podejmowano już przed 20 laty [14]. Przeprowadzono zabiegi na setkach pacjentów z zespołami Huntera, Maroteaux-Lamy, adrenoleukodystrofii, metachromatycznej leukodystrofii, fukozydozy, choroby Gauchera. Jako, że choroby te są nieuleczalne i w krótszym lub dłuższym czasie prowadzą do śmierci, ocena działania terapii jest trudna, a często kontrowersyjna. Jednak w kilku przypadkach potwierdzono częściową rekonstrukcję enzymatyczną i średnie przedłużenie czasu przeżycia chorych. W każdym razie przeszczepy szpikowe nie zmieniały ostatecznie niepomyślnego rokowania u tych chorych [19]. W celu wyjaśnienia miejscowego mechanizmu działania zmodyfikowanych genetycznie KM w modelu choroby Niemann-Picka przeprowadzono eksperymenty na myszach transgenicznym pozbawionych aktywności kwaśnej sflingomielinazy (ASM), której brak jest odpowiedzialny za wystąpienie tej choroby u ludzi. Po domóżdżkowym podaniu mezenchymalnych KM z nadprodukcją ASM wykazano lepszą przeżywalność komórek Purkinjego i zmniejszenie mózgowych złogów sflingomieliny [18]. Badania te można uznać za pierwszą pomyślną próbę rzeczywistej suplementacji komórkowej w „spichrzeniowych” chorobach neurodegeneracyjnych.

Najliczniejsze próby terapii komórkowej były podejmowane w modelach zwierzęcych udarów i urazów mózgu lub rdzenia kręgowego. Obecność nieznaczących ilości transplantowanych komórek wykrywano w uszkodzonej tkance mózgu i rdzenia do 35, a nawet 60 dni po przeszczepie. Natomiast w wielu badaniach podkreślano dysproporcję pomiędzy zaobserwowaną znaczną poprawą funkcjonalną a znikomą ilością przeżywających i różnicujących się neuralnie KM. Wydaje się mało prawdopodobne, aby obserwowana poprawa była związana jedynie z wbudowaniem się komórek dawcy w uszkodzoną sieć neuronalną. Wielu badaczy sugeruje, że są to głównie skutki parakrynnego oddziaływania troficznego lub metabolicznego przeszczepianych komórek [13, 25]. W badaniach Chena i współpracowników [5] wykazano, że w tkance ischemicznej mózgu po przeszczepie wykrywa się zwiększone ilości BDNF i NGF w porównaniu z grupą zwierząt niepoddanych transplantacji. Wykazano również dużą zdolność KM do produkcji takich czynników *in vitro*. Czynniki troficzne i wzrostowe mogłyby stymulować rezerwy regeneracyjne uszkodzonego mózgu, włącznie z pobudzeniem endogennych KM znajdujących się w tkance gospodarza. W czasie badań nad wpływem transplantacji KM na przebieg regeneracji mózgu i rdzenia u gryzoni, zaobserwowano jeszcze jedno bardzo interesujące zjawisko. Wydaje się mianowicie, że KM pochodzenia szpikowego lub z krwi pępowinowej migrują selektywnie do miejsca uszkodzenia różnych narządów, w tym również do mózgu, przechodząc nawet przez nieuszkodzoną barierę krew/mózg. Podjęto, więc próby zidentyfikowania chemokin czynnych w tym procesie [50]. Podobne „zadomawianie” się transplantowanych KM pochodzenia szpikowego obserwowano również w przypadku rewaskularyzacji serca i innych narządów [34]. Trwają intensywne badania nad potwierdzeniem i poznaniem molekularnego podłoża tego terapeutycznie bardzo istotnego zjawiska.

Osobnym zagadnieniem są próby terapii komórkowej w przypadku stwardnienia rozsianego. Ze względu na jego systemowe, autoimmunologiczne podłoże, strategia bezpośredniej suplementacji ognisk demielinizacyjnych progenitorami oligodendrocytów nie wydaje się wystarczająca. Natomiast patologiczna nadreaktywność limfocytów T może zostać stłumiona przez allogeniczne przeszczepy hematopoetycznych KM szpiku, które wywołując długotrwały efekt immunosupresyjny w organizmie biorecy, mogą także wspomagać przeżycie równolegle przeszczepionych oligodendrocytów [29].

Intensywne prace doświadczalne prowadzone są również w celu uzyskania KM do terapii innych narządów, m.in. produkujących insulinę komórek β wysepek trzustki, progenitorów komórek mięśni (tzw. komórek satelitarnych) do zainicjowania regeneracji genetycznie uwarunkowanych zaników mięśni szkieletowych, jak również w regeneracji mięśnia sercowego [20, 42] oraz KM szpiku do regeneracji wątroby [22, oraz Lange – w tym suplementacji]. Wszystkie te badania znajdują się we wczesnej fazie eksperymentalnej i mają stosunkowo krótką historię, a interpretacja uzyskanych wyników nie jest prosta i wymaga bardzo krytycznego podejścia.

PODZIĘKOWANIA

Wszystkim kolegom z mojego Zespołu Neurobiologii Naprawczej ICMDiK PAN, którzy przyczynili się do rozwoju badań nad neuronalnymi komórkami macierzystymi pochodzącymi z krwi pępowinowej, chciałam złożyć jak najserdeczniejsze podziękowania.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AMSTRONG RJE, HARROWER TP, HURELBRINK CB, MCLAUGHIN M, RATCLIFFE EL, TYERS P, RICHARDS A, DUNNETT SB, ROSSER AE, BARKER RA. Porcine neural xenografts in the immunocompetent rat: immune response following grafting of expanded neural precursor cells. *Neuroscience* 2001; **1**: 201–216.
- [2] ANDREWS PW. Response: Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat Biotechnol* 2004; **22**: 371–379.
- [3] BJORKLUND LM, SANCHEZ-PERNAUTE R, CHUNG S, ANDERSSON T, CHEN IY, MCNAUGHT KS, BROWNELL AL, JENKINS BG, WAHLESTEDT C, KIM KS, ISACSON O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; **99**: 2344–2349.
- [4] BUŻAŃSKA L, MACHAJ EK, ZABŁOCKA B, POJDA Z, DOMAŃSKA-JANIK K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2131–2138.
- [5] CHEN J, LI Y, WANG L, LU M, ZHANG X, CHOPP M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 2001; **189**: 49–57.
- [6] CORTI S, LOCATELLI F, STRAZZER S, GUGLIERI M, COMI GP. Neuronal generation from somatic stem cells: current knowledge and perspectives on the treatment of acquired and degenerative CNS disorders. *Current Gene Therapy* 2003; **3**: 247–272.
- [7] DRAPER JS, SMITH K, GOKHALE P, MOORE HD, MALTBY E, JOHNSON J, MEISNER L, ZWAKA TP, THOMSON JA, ANDREWS PW. Recurrent gain of chromosome 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2004; **22**: 53–54.

- [8] DZIEWCZAPOLSKI G, LIE DC, RAY J, GAGE FH, SHULTS CW. Survival and differentiation of adult rat-derived neural progenitor cells transplanted to the striatum of hemiparkinsonian rats. *Exp Neurology* 2003; **183**: 653–664.
- [9] GARBUZOVA-DAVIS S, WILLING AE, ZIGOVA T, SAPORTA S, JUSTEN EB, LANE JC, HUDSON JE, CHEN N, DAVIS CD, SANBERG PR. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; **12**: 255–270.
- [10] GRESCHAT S, ROSENBAUM C, MOERS J, KOEGLER G, WERNET P, MILLER H. Characterisation of human umbilical cord blood stem cells *in vitro* and implantation into rat brain. Abstract on ISN- Meeting; 2003.
- [11] HA Y, CHOI JU, YOON DH, YEON DS., LEE JJ, KIM HO, CHO YE. Neural phenotype expression of cultured human cord blood cells *in vitro*. *NeuroReport* 2001; **12**: 3523–3527.
- [12] HESS DC, ABE T, HILL WD, STUDDARD AM, CAROTHERS J, MASUYA M, FLEMING PA, DRAKE CHJ, OGAWA M. Hematopoietic origin of microglia and perivascular cells in brain. *Exp Neurol* 2004; **186**: 134–144.
- [13] HESS DC, HILL WD, MARTIN-STUDDARD A, CARROLL J, BRAILER J, CAROTHERS J. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 2002; **33**: 1362–1368.
- [14] HOBBS JR, HUGH-JONES K, BARRET AJ, BYROM N, CHAMBERS D, HENRY K, JAMES DC, LUCAS CF, ROGERS TR, BENSON PF, TANSLEY LR, PATRICK AD, MOSSAN J, YOUNG EP. Reversal of clinical features of Hurler's disease and biochemical improvement after treatment by bone-marrow transplantation. *Lancet* 1981; **2**: 709–712.
- [15] HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, HOCHEDLINGER K, RIDEOUT WM, BINISZKIEWICZ D, YANAGIMACHI R, JAENISCH R. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 2001; **293**: 95–97.
- [16] JANOWSKI M, DOMAŃSKA-JANIK K. Perspektywy terapii komórkowej w chorobie Parkinsona. [W] W. Pakszys, B. Glód, P.P. Liberski, A. Klimek, W. Kuliński (red.), Monitorowane klinimetrycznie rozpoznawanie i leczenie choroby Parkinsona. *Medical Communications* 2004; w druku.
- [17] JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORITZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; **418**: 41–49.
- [18] JIN HK, CARTER JE, HUNTLEY GW, SCHUCHMAN EH. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1183–1191.
- [19] KAUFMAN CL, ILDSTAD ST. Leukodystrophy and bone marrow transplantation: role of mixed hematopoietic chimerism. *Neurochem Res* 1999; **24**: 537–549.
- [20] KOCHER AA, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ, TAKUMA S, BURKHOFF D, WANG J, HOMMA S, EDWARDS NM, ITESCU S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodelling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; **7**: 430–436.
- [21] KORBLING M, KATZ RL, KHANNA A, RUIFROK AC, RONDON G, ALBITAR M, CHAMPLIN RE, ESTROV Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; **346**: 738–746.
- [22] LAGASSE E, CONNORS H, AL-DHALIMY M, REITSMA M, DOHSE M, OSBORNE L, WANG X, FINEGOLD M, WEISSMAN IL, GROMPE M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; **6**: 1229–1234.
- [23] LI L, LIU F, ROSS AH. PTEN regulation of Neural Development and CNS Stem Cells. *J Cell Biochem* 2003; **88**: 24–28.
- [24] LI Y, CHEN J, CHEN XG, WANG L, GAUTAM SC, XU YX, KATAKOWSKI M, ZHANG LJ, LU M, JANAKIRAMAN N, CHOPP M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology* (2002); **59**: 514–523.
- [25] LU D, SANBERG PR. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplant* 2002; **11**: 275–281.
- [26] MANGI AA, NOISEUX N, KONG D, HE H, REZVANIA M, ING WALL JS, DZAU VJ. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodelling and restore performance of infarcted hearts. *Nature* 2003; AOP doi: 10.1038/nm912.

- [27] MEZEY E, CHANDROSS K, HARTA G, MAKI R, MCKERCHER S. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science* 2000; **290**: 1779–1782.
- [28] MEZEY E, KEY S, VOGELSNAG G, SZALAYOVA I, LANG GD, CRAIN B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 1364–1369.
- [29] MURARO PA, CASSINI INGONI R, MARTIN R. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: current status and future challenges. *Cur Opin Neurol* 2003; **16**: 299–305
- [30] OKAMOTO R, YAJIIMA T, YAMAZAKI M, KANAI T, MUKAI M, OKAMOTO S, IKEDA Y, HIBI T, INAZAWA J, WATANABE M. Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 2002; **8**: 1011–1017.
- [31] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B, PICKEL J, MCKAY R, NADAL-GINARD B, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**: 701–704.
- [32] PLUCHINO S, QUATTRINI A, BRAMBILLA E, GRITTI A, SALANI G, DINA G, GALLI R, DEL CURRO U, AMADIO S, BERGAMI A, FURLAN R, COMI G, VESCOVI AL, MARTINO G. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003; **422**: 688–694.
- [33] POULSOM R, ALISON MR, FORBES SJ, WRIGHT NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol* 2002; **297**: 441–456.
- [34] RAFII S, LYDEN D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; **9**: 702–712.
- [35] RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells “hide out” in the bone marrow. *Leukemia* 2004; **18**: 29–40.
- [36] REYA T, DUNCAN AW, ALLES L, DOMEN J, SCHERER DC, WILLERT K, HINTZ L, NUSSE R, WELSMAN IL. A role for Wnt signalling in self-renewal of hematopoietic stem cells. *Nature* 2003; **423**: 409–414.
- [37] REYA T, MARRISON SJ, CLARKE ME, WEISSMAN L. Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 2001; **414**: 105–111.
- [38] ROSENBERG RF. The choice of cell lineages during the *in vitro* differentiation of mammalian embryonic stem cells. *J Theoret Biol* 2003; **223**: 387–389.
- [39] SANCHEZ-RAMOS, SONG J, KAMATH SG, ZIGOVA T, WILLING AE, CARDOZO-PELEAZF, STEDEFORD T, CHOPP M, SANBERG PR. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001; **171**: 109–115.
- [40] SATO N, MEIJER L, SKALTSOUNIS L, GREENGARD P, BRIVANLOU AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signalling by a pharmacological GSK-3 specific inhibitor. *Nat Med* 2004; **10**: 55–63.
- [41] SHERLEY JL. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. *Stem Cells* 2002; **20**: 561–572.
- [42] SIMINIAK T, KURPISZ M. Myocardial replacement therapy. *Circulation* 2003; **108**: 1167–1171.
- [43] SMITH AG, HEATH JK, DONALDSON DD, WONG GG, MOREAU J, STAHL M, ROGERS D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; **336**: 688–690.
- [44] SRIVATSA B, SRIVATSA S, JOHNSON KL, SAMURA O, LEE SL, BIANCHI DW. Microchimerism of presumed fetal origin in thyroid specimens from women: a case-control study. *Lancet* 2001; **358**: 2034–2038.
- [45] TAIPALE J, BEACHY PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 2001; **411**: 349–354.
- [46] TAMAKI S, ECKERT K, HE D, SUTTON R, DOSHE M, JAIN G, TUSHINSKI R, REITSMA M, HARRIS B, TSUKAMOTO A, GAGE F, WEISSMAN I, UCHIDA N. Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J Neurosci Res* 2002; **69**: 976–986.
- [47] TERADA N, HAMAZAKI T, OKA M, HOKI M, MASTALERZ DM, NAKANO Y, METER EM, MOREL L, PETERSEN BS, SCOTT EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; **416**: 542–545.
- [48] THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHAL VS, JONES JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145–1147.
- [49] TOMA JG, AKHAVAN M, FERNANDES KJ, BARNABE-HEIDER F, SADIKOT A, KAPLAN DR, MILLER FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biol* 2001; **3**: 778–784.
- [50] WANG L, LI Y, CHEN XJ, GAUTAM SC, ZHANG Z, LU M, CHOPP M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 2002; **7**: 113–117.

- [51] WILLERT K, BROWN JD, DANENBERG E, DUNCAN AW, WEISSMAN IL, REYA T, YATES JR 3rd, NUSSE R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003; **423**: 448–452.
- [52] WILLING AE, LIXIAN J, MILLIKEN M, POULOS S, ZIGOVA T, SONG S, HART C, SANCHEZ-RAMOS J, SANBERG PR. Intravenous versus Intrastriatal Cord Blood Administration in a Rodent Model of Stroke. *J Neurosci Res* 2003; **73**: 296–307.
- [53] WINDREM MS, NUNES MC, RASHBAUM WK, SCHWARTZ TH, GOODMAN RA, MCKHANN G 2nd, ROY NS, GOLDMAN SA. Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* 2004; **10**: 93–97.
- [54] WRIGHT LS, LI J, CALDWELL M, WALLACE K, JOHNSON JA, SVENDSEN CN. Gene expression in human neural stem cells: effect of leukaemia inhibitory factor. *J Neurochem* 2003; **86**: 179–195.
- [55] YING QL, NICHOLS J, EVANS EP, SMITH AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; **416**: 545–548.
- [56] ZIGOVA T, SONG S, WILLING AE, HUDSON JE, NEWMAN MB, SAPORTA S, SANCHEZ-RAMOS J, SANBERG PR. Human Umbilical Cord Blood Cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant* 2002; **11**: 265–274.

Adres autora: ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa
e-mail: kd-j@cmdik.pan.pl

ZARODKOWE KOMÓRKI MACIERZYTE I MOŻLIWOŚCI ICH WYKORZYSTANIA W MEDYCYNIE

EMBRYONIC STEM CELLS – POTENTIAL UTILIZATION IN MEDICINE

Emilian SNARSKI^{1,2}, Wiesław Wiktor JĘDRZEJCZAK¹

¹Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Akademii
Medycznej i ²Szkoła Medycyny Molekularnej, Warszawa.

Streszczenie: Zarodkowe komórki macierzyste (ZKM) są obiecującym przedmiotem badań dla współczesnej nauki. Dzięki nieograniczonemu potencjałowi różnicowania się mogą stać się spełnieniem marzeń współczesnej medycyny dostarczając komórek pozwalających zastąpić dowolną zniszczoną bądź uszkodzoną tkankę. W chwili obecnej kluczowe jest opracowanie technik pozwalających na dowolne sterowanie losem ZKM. W artykule omówione są podstawowe właściwości komórek macierzystych i techniki uzyskiwania ZKM. Ponadto przybliżone są techniki sterowania różnicowaniem ZKM i ich potencjalne zastosowania w medycynie. W ostatnim paragrafie omówiono częściowo aspekty etyczne dotyczące stosowania ZKM w medycynie.

Słowa kluczowe: zarodkowe komórki macierzyste.

Summary: Embryonic stem cells (ESC) are a promising object for research. The potential to differentiate into almost every cell type might be a „dream comes true” for regenerative medicine. This review focuses on discussing the most important characteristics of ESC. The known methods of their derivation are discussed. The prospects of ESC utilization in medicine are reviewed. Moreover some ethical aspects are discussed that influence general acceptance of ESC research.

Key words: embryonic stem cells.

WSTĘP

Marzeniem współczesnej medycyny jest możliwość regeneracji dowolnej chorej części ciała za pomocą odpowiednio dobranego zestawu komórek macierzystych, czyli komórek wyjściowych dla poszczególnych tkanek obecnych w danej części organizmu.

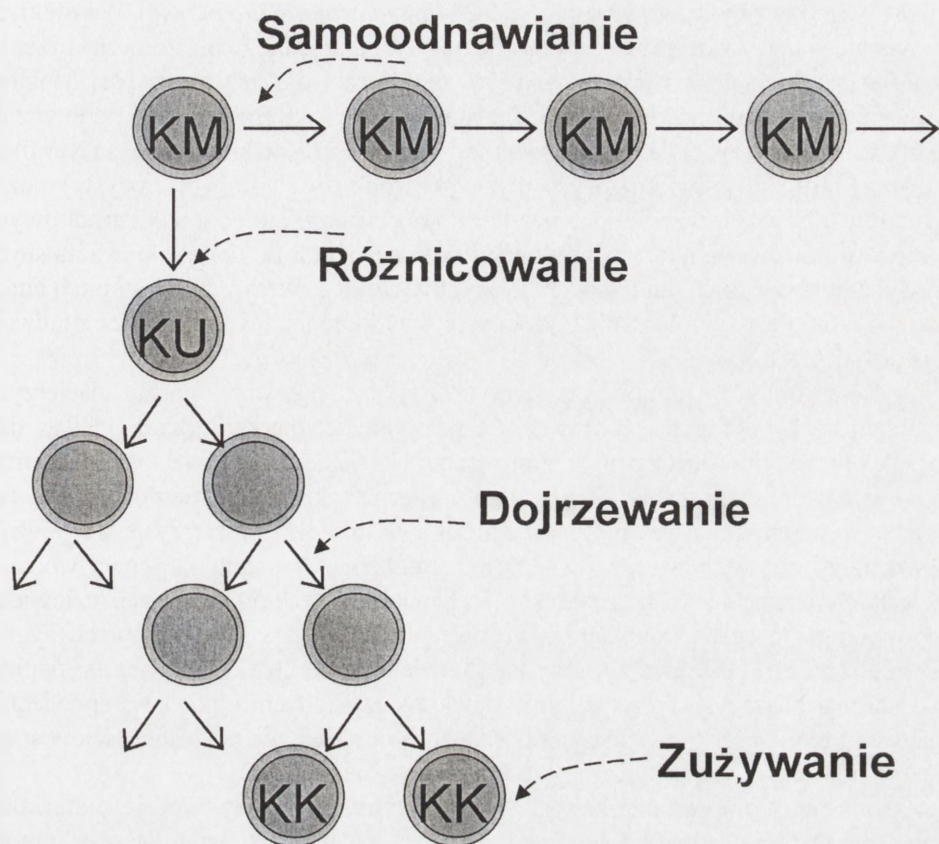
Idealnym rozwiązaniem byłoby rozpoczęcie takiego działania od możliwie niewielkiej liczby dobrze dobranych komórek macierzystych, które po wprowadzeniu do organizmu różnicują się i odnowią uszkodzoną tkankę bądź narząd. Istnieją dwie główne drogi wiodące do takiego celu. Pierwsza to znalezienie źródła bądź źródeł poszczególnych rodzajów komórek w dorosłym organizmie. Takie podejście napotyka przeszkody – często w organizmie takich komórek jest zbyt mało lub nie można ich wydajnie hodować *in vitro*. Ponadto, istota choroby może polegać na uszkodzeniu komórek macierzystych danej tkanki, co uniemożliwia ich bezpośrednie wykorzystanie w celu regeneracyjnym. Druga droga to uzyskanie takich komórek wychodząc z zarodkowych komórek macierzystych (ZKM) – komórek o potencjalnie nieograniczonych możliwościach różnicowania i namnażania.

Artykuł ten poświęcony jest możliwościom wykorzystania w medycynie zarodkowych komórek macierzystych. W pierwszej części podane są podstawowe wiadomości dotyczące wszystkich rodzajów komórek macierzystych. Następnie pokrótce przedstawiona jest historia odkrycia i najważniejsze fakty dotyczące zarodkowych komórek macierzystych. Potem, przedstawiony jest obecny stan wiedzy dotyczącej wytwarzania krwiotwórczych komórek macierzystych z ZKM i możliwe drogi wiodące do wykorzystania w medycynie tak uzyskanych komórek. W ostatniej części przedstawiono etyczne aspekty badań nad ZKM.

KOMÓRKA MACIERZYSTA

Komórkę macierzystą (KM) można zdefiniować za pomocą dwóch cech charakterystycznych: zdolności do samoodnawiania i zdolności do różnicowania się we wszystkie rodzaje komórek, dla których jest to komórka macierzysta. Cechy te muszą być uzupełnione trzecią, która nie jest tak charakterystyczna, ale jest niezbędna, by wykorzystać te komórki w medycynie – jest to zdolność do wytwarzania dużej liczby komórek potomnych. Zdolność do samoodnawiania jest kluczową cechą zapewniającą trwanie komórek macierzystych. Pozwala na wytworzenie wystarczającej liczby komórek potrzebnych, aby pokryć straty związane z zużywaniem dojrzałych komórek i umożliwić odtwarzanie danej tkanki przez cały okres życia organizmu. Komórki macierzyste istnieją w wielu tkankach i zapewniają ich regenerację w wypadku ich ciągłego zużywania (krew, skóra) lub w przypadku urazu (kość). Jednak możliwości różnicowania somatycznych komórek macierzystych są zazwyczaj ograniczone, co ogranicza miejscową odnowę uszkodzonej tkanki do typowej dla danego miejsca w organizmie. Na rycinie 1 przedstawiono schemat różnicowania się i namnażania komórek macierzystych.

Wśród komórek macierzystych, które możemy znaleźć w organizmie na różnych etapach jego rozwoju, istnieje hierarchia – „wszystkie komórki macierzyste są równe, ale pewne są bardziej macierzyste”. W hierarchii komórek macierzystych ze względu na możliwości różnicowania się możemy wyróżnić, co najmniej trzy poziomy. Na najwyższym są pełnopotencjalne KM – zdolne do wytworzenia całego organizmu i



RYCINA 1. Schemat odnawiania się i różnicowania komórek macierzystych

łożyska – taką cechą ma zygota – zapłodniona komórka jajowa oraz jej bezpośrednie potomstwo, czyli blastomery. Na niższym poziomie znajdują się wielopotencjalne (zarodkowe) KM – zdolne do wytworzenia wielu różnych tkanek, ale niezdolne do wytworzenia łożyska, co odróżnia je od zygoty i blastomerów. Najniższy poziom zajmują ograniczone (somatyczne) KM, których możliwości ograniczone są do wytworzenia i odtwarzania jednej tkanki – tej, dla której są macierzyste.

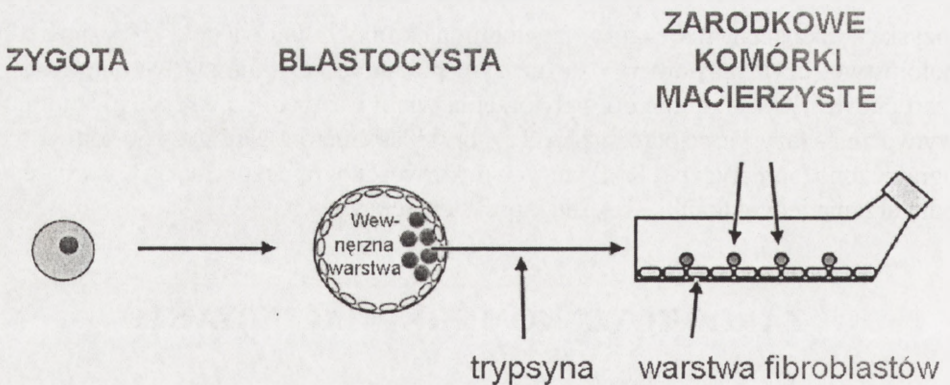
ZARODKOWE KOMÓRKI MACIERZYSTE

To, że możliwa jest ingerencja w embriogenezę, zostało udowodnione po raz pierwszy w Polsce. Andrzej Tarkowski [20], pracując na Uniwersytecie Warszawskim wykazał, że po zmieszaniu komórek dwóch zarodków i ich implantacji do macicy rozwija się

jedna mysz:, tzw. mysz o czworgu rodzicach (ang. *tetraparental mouse*). W kolejnych doświadczeniach wykazał, że wyodrębnienie z zarodka jednego blastomeru i przeniesienie go do macicy innej myszy prowadzi również do rozwoju całej myszy [21]. Możliwe stało się uzyskanie z jednego zarodka nawet kilku odrębnych, ale genetycznie identycznych, myszy. Dwadzieścia lat później niezależnie od siebie Evans i Kaufman [3] oraz Martin [13] stwierdzili, że z mysiego zarodka (w stadium blastocysty) można wyizolować i utrzymać wielopotencjalne komórki nazwane później „zarodkowymi komórkami macierzystymi”. Miały one intrygującą zdolność do różnicowania się do praktycznie wszystkich tkanek pochodzących z zarodka. Wreszcie, w ostatnich latach udało się również wyizolowanie podobnych, wielopotencjalnych komórek z ludzkiej blastocysty [18,22].

Czym są zarodkowe komórki macierzyste? Zygota to pierwsza komórka macierzysta organizmu – wg definicji jest prawdziwie pełnopotencjalną komórką, ponieważ daje początek wszystkim tkankom organizmu łącznie z łożyskiem. Proces ten przebiega przez znane wszystkim stadia do blastocysty, która jest pęcherzykiem o ścianie złożonej z dwóch warstw: zewnętrznej i wewnętrznej. Zarodkowe komórki macierzyste pochodzą z wewnętrznej warstwy blastocysty [13]. Są to komórki macierzyste zdolne do wytworzenia wszystkich rodzajów somatycznych komórek macierzystych organizmu np. człowieka. Jak wspomniano, cechą, która odróżnia je od zapłodnionych komórek jajowych (zygot), jest to, że nie potrafią wytworzyć łożyska. Doświadczalnie ZKM uzyskiwane są poprzez trypsynizację blastocysty i przez dalszą hodowlę tak uzyskanych komórek w odpowiedniej pożywce lub w obecności warstwy fibroblastów, co zapewnia pozostanie ich w stanie nieodróżnicowania (schematycznie przedstawiono to na rycinie 2).

Zarodkowe komórki macierzyste mają istotne cechy czyniące je materiałem przewyższającym somatyczne komórki macierzyste (a zwłaszcza krwiotwórcze komórki macierzyste) pod względem potencjalnych możliwości do praktycznego wykorzystania. Przede wszystkim już obecnie można je stosunkowo łatwo namnażać w hodowli (a więc z jednej lub kilku komórek uzyskiwać wiele), co ciągle nie jest możliwe np. w

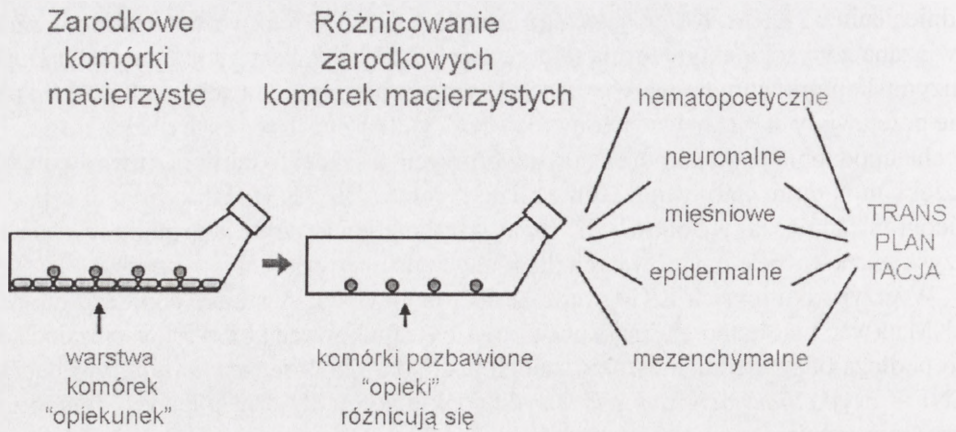


RYCINA 2. Schemat uzyskiwania zarodkowych komórek macierzystych

odniesieniu do KKM. Kolejną ważną cechą ZKM jest ich praktyczna nieśmiertelność związana z wysoką aktywnością telomerazy [12,26]. Dzięki wysokiej ekspresji tego enzymu komórki utrzymywane w hodowli w stanie niezróżnicowanym przez ponad rok nie przejawiały skracania się telomerów, czyli jednej z cech replikacyjnej starości. Ta cecha upodabnia je do komórek nowotworowych, a ściślej to komórki nowotworowe dzięki mutacjom nabywają cech zbliżających je do ZKM. Utrzymywane przez nieograniczony czas w hodowli ZKM mogą być natomiast użyte jako punkt wyjścia do uzyskania komórek macierzystych dla różnych tkanek w dowolnym czasie.

W przypadku mysich ZKM warunki takie typowo zapewnia się poprzez hodowlę ZKM na warstwie komórek „opiekunek”, mysich zarodkowych fibroblastów oraz dodatek do podłoża odpowiednich cytokin, takich jak: LIF – czyli *leukemia inhibitory factor*, CNF – czyli *ciliary neutrophic factor* albo onkostatyny M, utrzymujących komórki w stanie niezróżnicowanym. Niestety, ludzkie ZKM wzrastające w takich warunkach ulegają wspólnie różnicowaniu albo giną po 1–2 tygodniach [14,15,23]. Jednym ze sposobów na utrzymanie ludzkich ZKM w długotrwałej hodowli jest użycie nadsącu z hodowli mysich fibroblastów wzbogaconego białkami przestrzeni pozakomórkowej [27].

Po usunięciu z warunków utrzymujących je w stanie niezróżnicowania ZKM są zmuszone do różnicowania. Mogą się wtedy różnicować do każdego znanego rodzaju komórek somatycznych [2]. Odbywa się to w ten sposób, że w hodowli powstają z jednej ZKM grupy komórek, tzw. ciała zarodkowe (ang. *embryonic bodies*). Są one złożone z mieszaniny różnych somatycznych komórek macierzystych. Typowo w hodowli odtwarzane są wszystkie kierunki, w jakich rozwija się zarodek, tzn. dochodzi do tworzenia komórek z trzech listków zarodkowych, tj. endo-, mezo- i ektodermy. Podstawowe badanie, którego wynik dowodzi, że hodowane komórki to ZKM, polega na wstrzyknięciu badanych komórek podskórnym myszom z niesprawnym układem odpornościowym z powodu ciężkiego zespołu niedoborów odporności, tzw. myszom SCID. Nie są one w stanie odrzucić takich komórek. Jeżeli wstrzyknięto ZKM, to dochodziło do formowania łagodnych guzów typu potworniaków, a więc guzów zawierających komórki różnych tkanek, podobnie jak to ma miejsce w razie wszczepienia w to miejsce normalnego zarodka. Zjawisko to czasami jest interpretowane jako dowód na zdolność ZKM do transformacji nowotworowej. Wymaga to tutaj wyjaśnienia. Transformacja nowotworowa polega na wystąpieniu w komórce mutacji aktywującej protoonkogen oraz mutacji inaktywującej antyonkogen oraz wzbudzeniu telomerazy. Nic takiego nie ma miejsca w badanych ZKM ani komórkach wczesnego zarodka. Komórki te mają telomerazę z racji swojego stanu fizjologicznego, a trudno im w warunkach wstrzyknięcia podskórnego wytworzyć ciążę pozamaciczną, co wymaga wytworzenia łożyska itp. W następstwie ulegają wielokierunkowemu różnicowaniu *in vivo*, podobnie jak podczas tworzenia ciałek zarodkowych *in vitro* i to daje obraz potworniaka, czyli guza z dość przypadkowo rozmieszczonymi komórkami o różnym kierunku różnicowania. Co ciekawe komórki potworniaka zachowują właściwości ZKM – wstrzyknięte do blastocysty różnicują się do różnych tkanek nie zaburzając rozwoju zarodka [10]. Sprawa ta jednak pokazuje, że bezpośrednie stosowanie ZKM w celach leczniczych uszkodzeń określonych tkanek jest potencjalnie niebezpieczne, gdyż ZKM,



RYCINA 3. Schemat uzyskania, namnożenia i wykorzystania do celów medycznych zarodkowych komórek macierzystych

oprócz tworzenia pożądaných komórek, mogą też wytwarzać różne inne, czasami zupełnie niepożądane, np. kość w sercu. Organizm matki jest przed możliwościami ZKM chroniony grubą ścianą macicy, w której zagnieżdża się łożysko. Rozwój ZKM bez tej bariery grozi w najlepszym wypadku ciążą pozamaciczną.

W chwili obecnej brak jednoznacznie określonych warunków hodowli pozwalających na dowolne sterowanie rozwojem ZKM. Takie szczegółowe warunki środowiska muszą zostać dopiero opracowane, by móc wykorzystać ZKM na potrzeby medycyny. Na rycinie 3 przedstawiono schematycznie sposób wykorzystania ZKM w medycynie.

ZARODKOWE I SOMATYCZNE KOMÓRKI MACIERZyste

Dlaczego wykorzystywać zarodkowe komórki macierzyste, kiedy w organizmie istnieje dość znaczna pula somatycznych komórek macierzystych? Wykorzystanie komórek macierzystych obu typów ma swoje plusy i minusy. W przypadku obu populacji komórek zdefiniowanie warunków potrzebnych do uzyskania odpowiedniego różnicowania wymagać będzie jeszcze dużo czasu. Na tym polu komórki zarodkowe mają potencjalną przewagę – już udaje się z nich stosunkowo łatwo, praktycznie w drodze spontanicznego różnicowania, uzyskać pewne tkanki. Mają one też przynajmniej teoretyczny potencjał, by zróżnicować się do każdego typu tkanki. Mogą stosunkowo łatwo być genetycznie manipulowane i mają nieograniczone możliwości namnażania. Komórkom somatycznym brak tych cech – zdolności ich różnicowania, które wydawały się w pewnym okresie nieograniczone, okazały się być w większości artefaktami wynikającymi z fuzji przeszczepianych komórek z komórkami gospodarza. Najnowsze wyniki sugerujące na nowo możliwość różnicowania się komórek somatycznych po

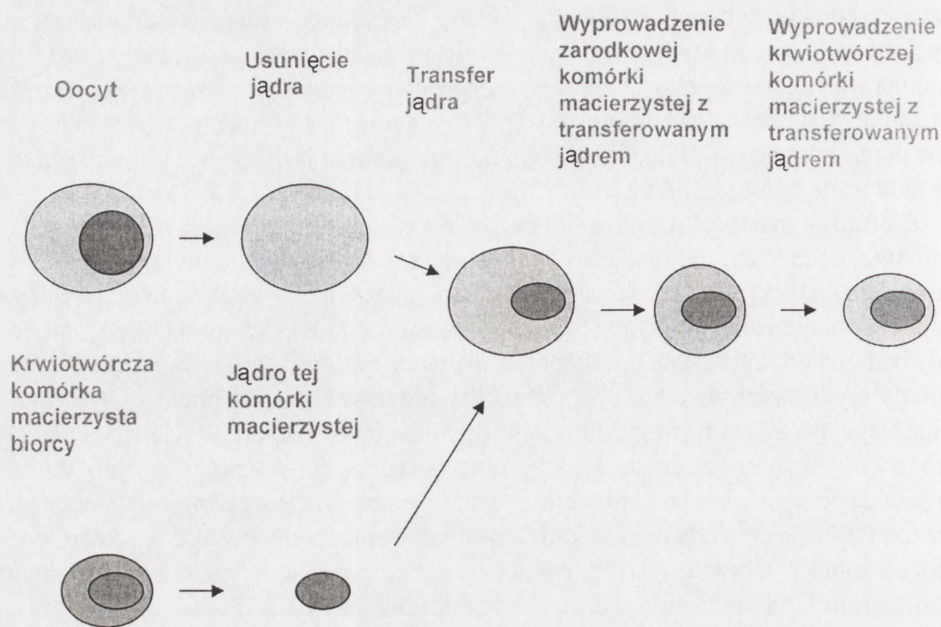
przeszczepieniu są ostro krytykowane [5,26]. Dodatkową wadą jest ograniczony czas życia somatycznych komórek macierzystych związany z niemożliwością odnawiania telomerów. To sprawia, że możliwości wykorzystania stają się ograniczone potrzebą izolacji stosunkowo dużej liczby komórek od dawcy i ograniczoną liczbą podziałów, jakie mogą one przejść w hodowli. Ponadto nie opracowano jeszcze warunków, które pozwalałyby na skuteczne namnożenie SKM *in vitro*.

Z drugiej strony istnieje spora grupa korzyści wynikających z wykorzystania somatycznych komórek macierzystych, a nie ZKM. Pierwszą i chyba najważniejszą korzyścią jest brak etycznych wątpliwości dotyczących wykorzystania tych komórek. Wykorzystanie somatycznych KM nie budzi w chwili obecnej kontrowersji, podczas gdy badania nad zarodkowymi komórkami macierzystymi wywołują gorące debaty na tematy etyki takich działań. Prawne zakazy mogą stać się najskuteczniejszą barierą zapobiegającą badaniu i używaniu ZKM do celów medycznych. W wielu przypadkach można uzyskać somatyczne KM zgodne antygenowo z dawcą – są to komórki przeszczepiane w układzie autogenicznym. Czyni to zbędnymi immunosupresję, czy też modyfikacje genetyczne tych komórek i ułatwia procedury przeszczepowe. Obecnie można sobie wyobrazić tylko uzyskiwanie i przeszczepianie ZKM w układzie allo-genicznym. Ich wykorzystanie w transplantacjach będzie wymagało dobrania antygenowego, modyfikacji fenotypu lub też immunosupresji.

Naturalna zdolność do różnicowania w kierunku tkanki, z jakiej są izolowane, czyni somatyczne KM wygodniejszymi do zastosowania w wielu przypadkach. Spontaniczne różnicowanie komórek macierzystych krwiotwórczych po ich przeszczepieniu zapewnia właściwe krwiotworzenie bez potrzeby jakichkolwiek dodatkowych działań. Powtarzalne uzyskiwanie z ZKM puli tego typu komórek jest dopiero przedmiotem intensywnych badań. Możliwym rozwiązaniem będzie stopniowe różnicowanie ZKM – w pierwszym kroku do komórek endodermy i w następnych do komórek macierzystych krwiotwórczych, które dalej będą spontanicznie różnicować we właściwym im kierunku. W przyszłości prawdopodobne jest wykorzystanie obu typów komórek – w zależności od specyficznych wskazań i efektów klinicznych.

PRZYSZŁOŚĆ WYKORZYSTANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Jakie warunki trzeba spełnić, aby móc wykorzystać zarodkowe komórki macierzyste jako źródło komórek macierzystych o pożądanym cechach? Na to pytanie odpowiada klasyczna wiedza dotycząca przeszczepiania komórek uzyskana zwłaszcza w trakcie zabiegów przeszczepiania szpiku. Pierwsze, to opanować metodę łatwego wytwarzania dużych ilości komórek macierzystych pożądanego typu (np. KKM) z ZKM. Tutaj znajdujemy się w połowie drogi. Umiemy namnażać ZKM, natomiast nie umiemy powtarzalnie wytwarzać z nich dużych ilości żadnego z potrzebnych rodzajów somatycznych komórek macierzystych. Drugim warunkiem jest opanowanie metody



RYCINA 4. Schemat klonowania terapeutycznego

uczynienia ich zgodnymi tkankowo z potencjalnym biorcą. Do tego ostatniego celu można wykorzystać potencjalnie kilka metod, takich jak: przeniesienie jądra komórkowego lub zastąpienie jądra techniką „Knock-in”.

Przeniesienie jądra komórkowego to inaczej klonowanie terapeutyczne. Technika ta polega na wprowadzeniu jądra z dojrzałej somatycznej komórki do pozbawionego jądra oocyta (schematycznie przedstawione na rycinie 4). Powstaje w ten sposób klonowany zarodek. Jeżeli wprowadzi się go do macicy samicy zdolnej do otrzymania potomstwa, to nastąpi jego rozwój. Jednak, jeżeli taki klonowany zarodek będzie poddawany dalej hodowli komórkowej, to rozwinie się on do blastocysty, z której będzie można uzyskać ZKM i wykorzystać je do uzyskania potrzebnego rodzaju somatycznych komórek macierzystych. Metoda opiera się na zdolności cytoplazmy oocyta do przeprogramowania jądra wprowadzanej komórki i uruchomienia w nim bardziej pierwotnych – wcześniejszych funkcji i programów rozwojowych prowadzących do dalszego rozwoju komórki według programu charakterystycznego dla zarodka. Oczywiście możliwe jest to tylko w organizmach, w których jądro pozostaje niezmienione genetycznie w komórkach dawcach. Mogą to być np. komórki z dorosłego gruczołu mlecznego u ssaków – tak jak było to w przypadku owieczki Dolly [24]. Doświadczenie to dało ostateczny dowód na to, że cytoplazma w oocycie dorosłego ssaka jest w stanie przeprogramować w dużym stopniu jądro w jego, praktycznie dowolnej komórce somatycznej. Do cech powstających pod wpływem przeprogramowania zaliczają się między innymi – aktywacja uśpionego chromosomu X u samic i wydłużenie końców telomerów w komórkach klonowanych w ten sposób zarodków. Jednak taka ingerencja

nie jest całkowicie obojętna dla późniejszego wzrostu. Powoduje, bowiem wadliwą regulację ekspresji wielu genów – co zostało zaobserwowane u myszy – i prowadzi do różnorodnych zaburzeń wzrostu [7,8]. Duże znaczenie dla wadliwej regulacji genów po klonowaniu terapeutycznym mają najprawdopodobniej zmiany w „*imprintingu*” – metylacji nici DNA komórek. Wydaje się on być zaburzony szczególnie silnie w komórkach pozostających w dłuższej hodowli. Zjawisko to może mieć krytyczne znaczenie dla możliwości wykorzystania ZKM do transplantacji.

Zarodkowe komórki macierzyste poddają się stosunkowo łatwo klonowaniu terapeutycznemu [16]. Technika ta umożliwiła uzyskanie komórek macierzystych tkankowo zgodnych z biorcą. Niestety, zarodkowe komórki macierzyste nie nadają się bezpośrednio do zabiegów przeniesienia jądra. Procedura ta musi być wykonana na oocytach, które pozbawiane są jądra komórkowego. Tego typu doświadczenia powiodły się już na myszach SCID [17]. Po przeniesieniu jądra z fibroblastu do oocytu uzyskano ZKM. W następnym kroku poddano naprawie gen odpowiedzialny za chorobę. Po czym komórki namnożono, zróżnicowano w kierunku komórek krwiotwórczych i wprowadzono z powrotem do myszy, z której pochodziły. Wynikiem takiej mysiej terapii było częściowe wyleczenie z choroby spowodowanej defektem naprawionego genu. W podobny sposób można byłoby wykonać doświadczenie na komórkach ludzkich. Teoretycznie, aby ta technika znalazła zastosowanie w leczeniu ludzi, musi doprowadzić do powstania autologicznej linii zarodkowych komórek macierzystych, którą będzie można przekształcić w komórki uszkodzonej tkanki. ZKM utrzymywane w długoterminowej hodowli mogłyby zostać przeszczepione dowolnie wiele razy służąc do regeneracji dowolnej ilości tkanek. Wykorzystanie takich komórek będzie miało szczególne znaczenie dla redukcji odrzucania przeszczepu przez biorcę i tym samym redukcji leczenia immuno-supresyjnego, które rutynowo używane jest do zapobiegania tej chorobie.

Drugi potencjalny sposób na wykorzystanie zarodkowych komórek macierzystych w terapii to techniki typu „*Knock in*”. Polegają one na wyłączeniu w tych komórkach – „*knock out*” – genów zgodności tkankowej obecnych w ZKM i wprowadzeniu na ich miejsce genów potencjalnego biorcy – „*knock in*”. Przy sukcesie takiej metody można doprowadzić do zniknięcia problemu braku dawców komórek – albowiem po „*wyzerowaniu*” antygenów zgodności tkankowej mógłby zostać wprowadzony do komórki dowolnie dobrany zestaw genów idealnie dopasowujących ją dla potencjalnego biorcy. Idealnym rozwiązaniem byłaby rekombinacja homologiczna, która polegałaby na zastąpieniu genów dawcy przez geny biorcy – najlepiej tylko w obszarach odpowiedzialnych za charakterystyczne antygeny powierzchniowe komórek.

Obecnie ZKM są przede wszystkim narzędziem wykorzystywanym w pracach naukowych. ZKM można wykorzystać do analizy genetycznej regulacji rozwoju, ponieważ spontanicznie różnicują się do wszystkich tkanek młodego zarodka. Jest to o tyle istotne, że pozwala *in vitro*, bez izolowania komórek z zarodków myszy, analizować na poziomie genetycznym pierwsze szlaki rozwojowe. Ponadto ZKM dość łatwo dają się manipulować genetycznie, co pozwala na analizę efektów delecji, mutacji czy substytucji genów, które normalnie uniemożliwiałyby rozwój zarodka, a tym samym

analizę ich funkcji. Tego typu badania pozwalają poznać lepiej mechanizmy różnicowania się komórek krwiotwórczych, kardiomiocytów, neuronów i innych typów komórek.

Badanie wpływu leków na określone grupy komórek będzie kolejnym istotnym polem zastosowania ZKM w nauce. W jednym z pierwszych doświadczeń w tej dziedzinie uzyskano zróżnicowanie ZKM do różnych klas kardiomiocytów, na których następnie badano działania leków kardiologicznych [6]. Dzięki uzyskaniu przez zróżnicowane ZKM właściwości elektrofizjologicznych charakterystycznych dla różnych rejonów serca można było przeanalizować, jak różne typy komórek reagują na ten sam lek. Oznacza to pojawienie się narzędzia do analizy działania leków na poszczególne typy komórek i możliwości ograniczania wpływu leku tylko do komórek istotnych dla jego działania. Ponadto można *in vitro* uzyskać odpowiedź co do toksyczności leku dla danego typu komórek. Byłoby to istotne zastosowanie w badaniach przedklinicznych umożliwiające na określenie typów komórek charakteryzujących się zwiększoną wrażliwością na dany lek i określenie potencjalnych działań niepożądanych. Idealnym rozwiązaniem byłby rozwój paneli zróżnicowanych komórek pozwalających na określenie równocześnie działań toksycznych dotyczących wielu rodzajów komórek.

ZKM mogą zostać wykorzystane do analizy wpływu leków na różnicowanie się komórek. Spontanicznie różnicujące się ZKM nadają się idealnie do poszukiwania leków, które mogą blokować, czy też promować różnicowanie w jakimś określonym kierunku. Takie badania przeprowadzono już dla środków pobudzających różnicowanie w kierunku komórek neuronalnych [1]. Rozwój na tym polu doprowadzić może do powstania syntetycznych odpowiedników czynników wzrostu, czy też skutecznych leków przeciwnowotworowych.

W chwili obecnej udaje się doprowadzić w sposób kontrolowany do różnicowania ZKM tylko w kierunku kilku tkanek. Nadal nie pojawiło się choćby doniesienie o udanym powtarzalnym różnicowaniu do komórek krwiotwórczych – nadal nauka nie potrafi zamienić wody (ZKM) w wino (KKM). Pomimo braku prawdziwie spektakularnych sukcesów na tym polu wykorzystanie ZKM w medycynie wydaje się raczej kwestią czasu niż możliwości. ZKM niosą nadzieję dla medycyny przyszłości. Dla medycyny regeneracyjnej – wszędzie tam, gdzie wyleczenie jest opóźnione lub niemożliwe z powodu niedoboru somatycznych komórek macierzystych właściwych dla danego miejsca w organizmie. Dla medycyny korekcyjnej: wszędzie tam, gdzie wyleczenie wymaga wprowadzenia trwałego źródła brakującego elementu i tym źródłem mogą stać się zmodyfikowane komórki macierzyste. Dla medycyny transplantacyjnej, ponieważ za pomocą kombinacji różnych komórek macierzystych będzie można wytwarzać poza organizmem niby narządy i wykorzystywać je do przeszczepiania. Choroby dotyczące jednego genu i jednego typu komórek wydają się być najłatwiejszym celem terapii wykorzystującej ZKM. Możemy do nich zaliczyć cukrzycę typu I, jednogenowe defekty komórek macierzystych krwiotwórczych, niewydolność mięśnia serca, niektóre choroby metaboliczne, czy też uszkodzenie hepatocytów. W tego typu chorobach znalezienie wydajnego źródła zdrowych komórek umożliwiłoby stosunkowo prostą terapię. Zarodkowe komórki macierzyste mogą być takim źródłem. Oczywiście samo opracowanie odpowiednich warunków różnicowania pozwalających na uzyskanie

odpowiednich do przeszczepu komórek nie rozwiązuje problemu. Potrzebne są procedury przeszczepiania tych komórek – określenie niezbędnej liczby komórek dla trwałej korekcji defektu, miejsca przeszczepienia czy też sposobu przeszczepienia.

ZKM mają stosunkowo dużą szansę na użycie w terapii cukrzycy typu I. W przypadku tej choroby udowodniono, że przeszczepienie zdrowych komórek wysp połączone z immunosupresją odnosi skutek leczniczy [19]. Podstawowym ograniczeniem zastosowania tej metody jest dostęp do komórek wysp, które można przeszczepić. ZKM po znalezieniu odpowiednich warunków różnicowania do komórek B wysp mogą być praktycznie niewyczerpanym ich źródłem. Cukrzyca jest atrakcyjnym celem, ponieważ komórki typu B są w stanie funkcjonować prawidłowo także po przeszczepieniu do нефизиologicznej lokalizacji, np. pod torebką nerki.

Wyzwania, jakie muszą zostać pokonane na drodze do szerokiego wykorzystania ZKM w medycynie, to ustalenie etycznych norm wykorzystania tych komórek, ustalenie warunków różnicowania do odpowiednich tkanek, uzyskanie odpowiedniej ilości tych komórek, określenie, jakie dokładnie komórki są w stanie skorygować daną chorobę i określenie najlepszego sposobu ich dostarczenia do organizmu oraz znalezienie sposobu na przewyciężenie odrzucania przez układ odpornościowy. Ostatni z tych problemów jest obszarem o największej liczbie niejasności. Nie jest wiadome, jak układ odpornościowy zareaguje na przeszczepiane zarodkowe komórki macierzyste i ich pochodne. Nie wiadomo, czy uda się przewyciężyć odpowiedź odpornościową przy pomocy teoretycznie możliwych genetycznych manipulacji HLA. Prawdopodobnie podatność tkanek pochodzących z ZKM na odrzucanie przez układ odpornościowy będzie zróżnicowana, tak jak to jest w przypadku innych przeszczepianych tkanek. Droga ominięcia problemów z odrzucaniem przeszczepianych tkanek będzie immunosupresja, immunomodulacja, czy też manipulacja genetyczna ZKM. Możliwe jest utworzenie banków komórek podobnych do banków komórek krwiotwórczych pozwalających na dobranie odpowiedniego fenotypu komórek minimalizującego odpowiedź układu odpornościowego. Oczywiście przewagą banków ZKM byłaby praktycznie nieograniczona możliwość odnawiania zasobów komórek. Innym sposobem na uzyskanie tolerancji odpornościowej jest równoczesne przeszczepienie zróżnicowanych ZKM wraz z układem krwiotwórczym. Niestety takie rozwiązanie, chociaż zapewnia tolerancję przeszczepu przez układ odpornościowy pochodzący od komórek dawcy, rodzi problem choroby przeciwko gospodarzowi [11]. Jeszcze jednym sposobem na uzyskanie tolerancji przeszczepów może być rozwinięcie zdolności ZKM do indukowania w organizmie biorcy tolerancji na własne antygeny po przeszczepieniu [4].

ETYCZNE ASPEKTY WYKORZYSTANIA ZARODKOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Od początku prac nad liniami komórkowymi, a później nad komórkami zarodkowymi trwa publiczna debata na temat etyki prac naukowych w tej dziedzinie. Podstawowym problemem jest źródło, z jakiego mają pochodzić ZKM. Istnieje kilka sposobów

uzyskania ludzkich ZKM i żaden nie wymaga wytworzenia ludzkiego zarodka specjalnie w celu uzyskania tych komórek. ZKM mogą być uzyskiwane z co najmniej trzech źródeł. Pierwsze to ludzkie zarodki pozostające po procedurach zapłodnienia *in vitro* – tzw. nadmiarowe zarodki, które zostałyby w innym wypadku zniszczone (*discarded embryos*). Drugim źródłem są ludzkie zarodki, które uległy spontanicznemu poronieniu (*cadaver embryos*). Trzecie źródło to uzyskanie ESC ze sklonowanych komórek somatycznych, do czego niedawno doszło [9].

Przy uzyskaniu ludzkich ZKM pojawia się problem etyczny – podczas ich izolacji z wewnętrznej warstwy zarodka dochodzi do jego zniszczenia. Dlatego jeżeli uznamy moment zapłodnienia za początek życia osobniczego, to takie życie zostanie zniszczone. Należy zwrócić uwagę na fakt, że tak naprawdę nikt z naukowców nie chce doprowadzać do zapłodnienia wyłącznie po to, aby uzyskać zarodki będące dawcami zarodkowych komórek macierzystych. W chwili obecnej takich zapłodnionych embrionów jest wystarczająco dużo w ośrodkach zapłodnień *in vitro*. Ich wytwarzanie wynika z niskiej skuteczności uzyskiwania ciąży przy wykorzystaniu wszczepionych zarodków uzyskanych w laboratorium. Aby prawdopodobieństwo takiego zdarzenia zwiększyć, wytwarza się więcej zarodków i w razie jednego niepowodzenia wszczepia się następne. Jeśli jednak jest powodzenie (a stosunkowo często jest to ciąża mnoga), to pierwotni dawcy komórek wykorzystywanych do ich uzyskania nie są już nimi dłużej zainteresowani. Można takie zarodki albo przechowywać w nieskończoność (ale nie ma chętnych, aby za to płacić), albo zniszczyć. Uzyskanie z nich ZKM może być lepszym etycznie wyborem niż celowe zniszczenie.

Myśląc o regulacjach prawnych badań nad zarodkowymi komórkami macierzystymi należy pamiętać, że nie przyzwalając naukowcom na pracę nad nimi otwiera się pole do nielegalnych badań i równocześnie zamyka możliwość ich kontroli.

LITERATURA

- [1] DING S, WU TY, BRINKER A et al. Synthetic small molecules that control stem cell fate. *PNAS* 2003; **100**: 7632–7637.
- [2] DOETSCHMAN TC, EISTETTER H, KATZ M, SCHMIDT W, KEMLER R. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryo Exp Morphol* 1985; **87**: 27–45.
- [3] EVANS MJ, KAUFMAN MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; **292**: 154–156.
- [4] FANDRICH F, LIN X, CHAI GX et al. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med* 2002; **8**: 171–178.
- [5] HARRIS TG, HERZOG EL, BRUSCIA EM, GROVE JE, VAN ARNAM JS, KRAUSE DS. Lack of fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* 2004; **305**: 90–93.
- [6] HE JQ, MA Y, LEE Y, THOMSON JA, KAMP TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes. *Cir Res* 2003
- [7] HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, HOCHEDLINGE K, RIDEOUT III WM, BINISZKIEWICZ D et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 2001; **293**: 95–97.
- [8] HUMPHERYS D, EGGAN K, AKUTSU H, FRIEDEMANN A, HOCHEDLINGER K, YANAGIMACHI T et al. Abnormal gene expression in cloned mice derived from embryonic stem cell and cumulus cell nuclei. *PNAS* 2002;

- [9] HWANG WS, RYU YJ, PARK JH, PARK ES, LEE EG, KOO JM et al. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; **303**: 1669–1674.
- [10] ILLMENSEE K, MINTZ B. Totipotency and normal differentiation of single teratocarcinoma cells cloned by injection into blastocysts. *PNAS* 1976. **73**: 549–553.
- [11] KAUFMAN DS, HANSON ET, LEWIS RL, AUERBACH R, THOMSON JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**: 10716–10721.
- [12] MANTELL LL, GREIDER CW. Telomerase activity in germline and embryonic cells of *Xenopus*. *EMBO J* 1994; **13**: 3211–3217.
- [13] MARTIN GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 7634–7638.
- [14] PERA MF, COOPER S, MILLS J, PARRINGTON JM. Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cell lines. *Differentiation* 1989; **42**: 10–23.
- [15] REUBINOFF BE, PERA MF, FONG CY, TROUNSON A, BONGSO A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnology* 2000; **18**: 399–404.
- [16] RIDEOUT III WM, EGGAN K, JAENISCH R. Nucleat cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 2001; **293**: 1093–1098.
- [17] RIDEOUT III WM, HOCHEDLINGER K, KYBA M, DALEY GQ, JAENISCH R. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 2002; **303**: 1669–1674.
- [18] SHAMBLOTT M, AXELMAN J, WANG S et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cell. *PNAS* 1998; **95**: 13726–13731.
- [19] SHAPIRO AM, LAKEY JR, RYAN EA, et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; **343**: 230–238
- [20] TARKOWSKI AK. Mouse chimaeras developed from fused eggs. *Naturwissenschaften* 1961; **190**: 857–860.
- [21] TARKOWSKI AK. Inter-specific transfers of eggs between rat and mouse. *J Embryol Exp Morphol* 1962; **10**: 476–495.
- [22] THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS, JONES JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 Nov 6; **282**(5391): 1145–1147.
- [23] THOMSON JA, ODORICO JS. Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends Biotechnol* 2000; **18**: 53–57.
- [24] WILMUT I, SCHNIEKE AE, MCWHIR J, KIND AJ, CAMPBELL KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; **385**: 810–813.
- [25] WRIGHT WE, PIATYSZEK MA, RAINEY WE, BYRD W, SHAY JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996; **18**(2): 173–179.
- [26] VOGEL G. More data but no answers on powers of adult stem cells. *Science* 2004; **305**: 27.
- [27] XU C, INOKUMA MS, DENHAM J, GOLDS K, KUNDU P, GOLD JD, CARPENTER MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 2001. **19**: 971–974.

Adres autora: Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM
02-097 Warszawa, ul. Banacha 1a

PRZEPROGRAMOWANIE GENOMU KOMÓREK SOMATYCZNYCH – ALTERNATYWĄ DLA ZARODKOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (EC)?

REPROGRAMMING OF THE GENOM OF SOMATIC CELLS
AS AN ALTERNATIVE FOR THE USE OF EMBRYONIC STEM CELLS

Kazimierz OSTROWSKI

Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Akademia Medyczna w Warszawie

Streszczenie: Wobec zastrzeżeń etyczno-moralnych dotyczących stosowania w celach terapeutycznych zarodkowych komórek macierzystych (EC) – w wielu laboratoriach rozpoczęto prace mające na celu przeprogramowanie genomu zróżnicowanych komórek somatycznych, takich jak np. fibroblasty skóry. Celem jest uzyskanie w ten sposób komórek o właściwościach komórek EC z ominięciem wszelkich zastrzeżeń o charakterze niemedyceznym. Opis tych prób, niewieńczonych jeszcze powodzeniem zawarty jest w poniższym tekście.

Słowa kluczowe: zarodkowe komórki macierzyste, fibroblasty skóry.

Summary: Because of many ethical and moral problems connected with the use of embryonic stem cells (EC) in medical treatment in some laboratories the research is started on reprogramming of differentiated somatic cells as skin fibroblast. The aim is to obtain the cells similar if not identical with EC. This research is far to be completed but if succesfull – will solve many difficulties and problems.

Keywords: embryonic stem cells, skin fibroblast.

Pomimo licznych debat w gronie naukowców, a także w niektórych parlamentach nie ma szans na uzyskanie jednolitych poglądów wszystkich zainteresowanych co do zgody na prowadzenie badań nad ludzkimi komórkami zarodkowymi. Wchodzą w tę dyskusję sprawy światopoglądowe i religijne z jednej strony, zaś z drugiej – argumenty medyczne o wysokich i uzasadnionych nadziejach, jakie stosowanie zarodkowych komórek macierzystych może wnieść do leczenia niektórych schorzeń. W tej sytuacji żadna dyskusja ani głosowanie nie może i zapewne nie doprowadzi do uzgodnienia poglądów.

Z tego stanu rzeczy zdaje sobie sprawę wielu badaczy zajmujących się badaniem komórek macierzystych. W wielu poważnych laboratoriach, z których kilka wymieniono w tabeli 1, przystąpiono do badań, których celem ostatecznym miałyby być uzyskanie komórek macierzystych przez manipulacje wykonane na komórkach somatycznych, prowadzące do tzw. przeprogramowania genomu. Ideą przewodnią tych badań jest zmiana stanu nici chromatynowych, a w szczególności zlikwidowanie tych zmian, które towarzyszą aktywacji genów. Są to zmiany dostrzegalne w badaniach morfologicznych, a polegające na rozluźnieniu struktury chromatyny w obszarze aktywnych genów.

Likwidacja aktywności genów w komórkach somatycznych ma doprowadzić do ich przekształcenia w komórki macierzyste analogiczne do zarodkowych komórek macierzystych. Celem nie może być zupełna likwidacja aktywacji wszystkich genów. Mamy oczywiście w pamięci fakt, że niektóre geny zarodkowych komórek macierzystych są aktywne, czego dowodem jest obecność białek na powierzchni ich błon komórkowych. Białka te wykorzystywane są jako znaczniki – markery – dla identyfikacji i ew. izolacji komórek macierzystych.

Próby przeprogramowania komórek somatycznych w taki sposób, by ich chromatyna uzyskała strukturę i właściwości zarodkowych komórek macierzystych (EC) są w toku, ale jeszcze nie zostały uwieńczone powodzeniem. Założeniem teoretycznym jest pogląd, że w cytoplazmie EC, a także w cytoplazmie oocytów znajdują się substancje, które mogłyby wpływać na organizację chromatyny, po wprowadzeniu ich do wnętrza zróżnicowanych komórek somatycznych. Jedną z technik stosowaną w celu sprawdzenia tej hipotezy jest doprowadzenie do fuzji komórki somatycznej z EC lub oocytami, z których usunięto materiał genetyczny. Przypuszcza się, że EC zawierają w swej cytoplazmie czynniki powodujące przeprogramowanie komórek somatycznych, podobne do tych, które znajdują się w oocytach. Trudnością techniczną jest mały rozmiar EC, co stwarza trudności w usuwaniu z nich jądra komórkowego. Dlatego brak jest pewności, czy w hybrydzie nie znajduje się prócz cytoplazmy EC także część jej materiału genetycznego. Takie hybrydy po wszczepieniu pacjentowi mogłyby zachować się w sposób niedający się przewidzieć, np. dać początek wzrostowi nowotworowemu.

Ominięto tę trudność w pomysłowy sposób, stwarzając „duże” komórki EC poprzez fuzję par komórek EC. Uzyskano w ten sposób tetraploidalną komórkę EC o dużym jądrze komórkowym. Po fuzji z komórką somatyczną nie dopuszczono do wnikania tego dużego jądra komórkowego do hybrydy, przez dodanie do środowiska hodowlanego inhibitora powodującego zniszczenie cytoszkieletu. Droga wirowania pozbywano się z hybrydów ciężkich podwójnych jąder EC, zaś ich cytoplazma wraz z hipotetycznymi czynnikami przeprogramowania pozostawała w hybrydzie. Autorzy dostrzegli cechy szybkiego przeprogramowania chromatyny.

Innym podejściem jest użycie homogenatu cytoplazmy EC, który wprowadzany jest do izolowanych komórek somatycznych. Uzyskuje się to przez świadome uszkodzenie błony komórkowej toksyną bakteryjną, powodującą porowatość błony komórkowej. Tak spreparowane komórki umieszcza się w środowisku zawierającym homogenat cytoplazmy komórek EC, a po 30 minutach zezwala się na regenerację

blony komórkowej. W tak potraktowanych fibroblastach pochodzących ze skóry „dostrzeżono cechy charakterystyczne dla komórek EC”.

Przeprogramowanie komórek somatycznych przez tworzenie hybryd z komórkami EC ciągle stwarza problemy etyczno-moralne, ponieważ istnieje potrzeba uzyskania komórek EC do doświadczeń. W tej sytuacji powstał inny kierunek badań, a mianowicie poszukiwanie i ew. wyizolowanie czynnika, który zmieniłby stan chromatyny w zróżnicowanych komórkach somatycznych. Nici DNA tych komórek są owinięte dokoła rdzenia zbudowanego z histonów. Struktura ta jest luźniejsza w obszarze aktywnych genów. Usiłowania idą w kierunku rozluźnienia tej struktury na całej długości chromosomów. Ponieważ wiadome jest, że aktywacja genów jest związana z metylacją histonów, próbuje się stwierdzić różnice w metylacji i modyfikacji histonów w komórkach po fuzji z komórkami EC. To samo dotyczy nici DNA, które w procesie aktywacji genów uzyskują lub tracą grupy metylowe. Czynniki powodujące przeprogramowanie genomu poszukiwane są też w cytoplazmie komórek jajowych. Zakładając, że takie czynniki mogą być ewolucyjnie zachowane w przebiegu ewolucji, rozpoczęto doświadczenia z zastosowaniem żabiego skrzeku. Komórki jajowe żab są duże, a uzyskanie dużej ich ilości jest łatwe. Z cytoplazmy komórek jajowych żab już uzyskano czynniki, powodujące rozluźnienie struktury chromatyny w komórkach somatycznych, do których je wstrzyknięto. Najbardziej zaawansowane są badania nad jąderkami przeprogramowanych fibroblastów skóry. Otóż po fuzji z komórkami EC jąderko ulega dezorganizacji, co zapewne powoduje uwolnienie zawartych w nim enzymów, w tym enzymów używanych przez komórki do reperacji uszkodzeń genomu. Po fuzji komórki somatycznej z komórkami EC jąderko ulega dezorganizacji, a po pewnym czasie – odtworzeniu. Udało się wyizolować kompleks białkowy powodujący dezorganizację jąderka. Istnieje uzasadniona hipoteza, że uwolnienie z jąderka niezidentyfikowanych jeszcze czynników jest niezbędne dla procesu przeprogramowania komórki somatycznej.

TABELA 1. Wybrane ośrodki, w których prowadzone są prace nad przeprogramowaniem komórek somatycznych

P. Verma	Monash Inst. of Reproduction , Melbourne
A. Surani	Cancer Res. UK Inst. of Cancer and Developmental Biology in Cambridge
T. Tada	Inst. for Frontier Medical Sciences at Kyoto University
P. Collas	University of Oslo
R. Jaenisch	Whitehead Inst. for Biomedical Research, Cambridge, Mass.
J. Gurdon	Wellcome Trust/Cancer Research UK Institute
N. Kikyo	Stem Cell Institute of the University of Minnesota, Minneapolis

Trudnością w badaniach nad przeprogramowaniem komórek somatycznych jest znalezienie swoistego znacznika, który by o tym zjawisku świadczył. Takim znacznikiem okazały się ludzkie geny *Oct-4* lub *Nanog*, które są aktywowane w komórkach EC i stanowią ich znacznik. Jeżeli jakaś manipulacja doprowadza do aktywacji tych genów, to istnieje silna przesłanka, że doszło do przeprogramowania genomu komórki somatycznej.

W konkluzji należy stwierdzić, że badania nad przeprogramowaniem komórek somatycznych i stworzenie z nich komórek o właściwościach komórek macierzystych nie zostało jak dotąd uwieńczone sukcesem. Nie mniej jednak tą drogą kroczy szereg poważnych ośrodków badawczych, z których niektóre zostały wymienione w tabeli 1.

SZPIK KOSTNY JAKO ŹRÓDŁO KRAŻĄCYCH CXCR4⁺ UKIERUNKOWANYCH TKANKOWO KOMÓREK MACIERZYSTYCH

BONE MARROW AS SOURCE OF CIRCULATING CXCR4⁺ TISSUE COMMITTED STEM CELLS

Magda KUCIA, Jolanta GOŹDZIK, Mariusz Z. RATAJCZAK

Zakład Transplantologii Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego Collegium Medicum
UJ, Kraków-Prokocim

Streszczenie: Wyniki naszych ostatnich badań, w których posłużyliśmy się strategią tzw. izolacji chemoaktywnej do czynnika pochodzenia stromalnego-1 (ang. *Stromal Cell Derived Factor 1*; SDF-1) w połączeniu z techniką PCR w czasie rzeczywistym (*Real Time PCR*; RT-PCR) dowiodły, że w szpiku kostnym występuje populacja komórek CXCR4⁺ wykazujących ekspresję mRNA markerów dla wczesnych ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych (UTKM). W pracy zostaną przedstawione wyniki badań własnych wskazujące, że CXCR4⁺ UTKM: 1) występują w szpiku kostnym młodych osobników, a następnie ich liczba zmniejsza się wraz z wiekiem, 2) należą do frakcji komórek niehematopoetycznych szpiku kostnego o fenotypie Sca-1⁺CD45⁻, 3) wzbogacone są w komórki wykazujące ekspresję embrionalnych/pluripotencjalnych czynników transkrypcyjnych (Oct-4, Nanog oraz Rex-1), 4) ulegają indukowanej stresem lub za pomocą G-CSF mobilizacji do krwi obwodowej, skąd mogą następnie migrować do gradientu SDF-1 uwalnianego przez uszkodzone tkanki, 5) mogą brać udział w regeneracji tkanek/narządów. Biorąc powyższe obserwacje pod uwagę postulujemy, że szpik kostny jest nie tylko źródłem krwiotwórczych komórek macierzystych (KKM), ale również zawiera CXCR4⁺ UTKM. Obecność tych komórek w szpiku kostnym powinna być uwzględniona podczas analizy wyników interpretowanych jako zdolność KKM do transróżnicowania/plastyzacji. Ponieważ, jak wykazaliśmy, populacja CXCR4⁺UTKM wykazuje ekspresję szeregu embrionalnych czynników transkrypcyjnych, może ona zawierać również bardziej prymitywne pluripotencjalne komórki macierzyste (PKM). Fakt, że UTKM w największym odsetku występują w szpiku kostnym młodych osobników, a liczba ich spada w miarę ich starzenia się, może z kolei tłumaczyć, dlaczego procesy regeneracyjne stają się mniej efektywne u osobników starszych.

Summary: Our recent studies, in which we employed chemotactic isolation to an stromal derived factor-1 (SDF-1) gradient combined with real time PCR (RT-PCR) analysis revealed that bone marrow (BM) contains a highly mobile population of CXCR4⁺ cells that express mRNA for various markers of early tissue committed stem cells (TCSC). We found that these CXCR4⁺ TCSC: i) are enriched in BM from young (1–2-month-old) mice and are scarcely detectable in 1-year-old animals, ii) reside in populations of BM-derived non-adherent non-hematopoietic Sca-1⁺CD45⁻ cells, iii) contain cells expressing mRNA for embryonic/pluripotent transcription factors such as Oct-4, Nanog and Rex-1, iv) are released (mobilized) from BM into peripheral blood (PB) during tissue/organ injury and subsequently chemoattracted by an SDF-1 gradient to damaged tissues, and v) finally may play a role in tissue repair/regeneration. Based on this we postulate that the BM is not only a home for hematopoietic stem cells (HSC) but also a „hideout”

for already differentiated non-hematopoietic CXCR4⁺ TCSC and we suggest that their presence in BM tissue should be considered before experimental evidence is interpreted simply as trans-differentiation/plasticity of HSC. Furthermore, expression of embryonic transcription factors in CXCR4⁺ TCSC suggests that this population of cells could also contain more primitive pluripotent stem cells. Finally, our observation that the number of TCSC is the highest in BM of young animals and decreases with age provides a novel insight into aging and may explain why the regeneration process becomes less effective in older individuals.

WSTĘP

Koncepcja transróżnicowania/plastyczności nieembrionalnych komórek macierzystych została ostatnio zakwestionowana [1–3]. Próby powtórzenia badań wykazujących transróżnicowanie macierzystych komórek nerwowych zakończyły się niepowodzeniem [4]. Podobnie wykazano, że krwiotwórcze komórki macierzyste (KKM) znajdujące w tkance mięśniowej są w rzeczywistości komórkami pochodzącymi ze szpiku kostnego [5–7]. Podobnie, prace prowadzone na myszach, którym przeszczepiono KKM znakowane białkiem o zielonej fluorescencji, dowiodły, że zjawisko transróżnicowania KKM występuje niezwykle rzadko, jeśli w ogóle ma miejsce [8–10]. Zaczęto więc szukać przyczyn tłumaczących, dlaczego „błędnie” interpretowano uprzednio wyniki przeprowadzonych badań wykazujące istnienie plastyczności komórek macierzystych.

Jako jedną z przyczyn tłumaczących ewentualne artefakty pokazujące plastyczność nieembrionalnych komórek macierzystych u biorców przeszczepów KKM przyjęto zjawisko fuzji komórek [11–13]. Stwierdzono, bowiem, że KKM dawcy mogą ulegać fuzji z komórkami somatycznymi biorcy. W konsekwencji prowadzi to do pojawienia się komórek posiadających markery różnicowania, co jest błędnie interpretowane jako transróżnicowanie. Innym wytłumaczeniem zjawiska plastyczności mogą być zmiany epigenetyczne, powodowane działaniem czynników zewnętrznych, mających wpływ na ekspresję genów w komórkach eksponowanych na nie. Dane zgromadzone podczas kłowania zwierząt wskazują, że jądro komórkowe wyizolowane ze zróżnicowanej komórki somatycznej może ulec odróżnicowaniu po wszczepieniu do cytoplazmy komórki jajowej [14, 15]. Tak, więc jądro komórki zróżnicowanej może bez wątpienia ulec przeprogramowaniu. Nie można wykluczyć, że podobny efekt „przeprogramowania” występuje w komórkach hodowanych *in vitro*, które poddane są działaniu szeregu czynników stresogennych. Jednak, jak uważamy, najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem zjawiska plastyczności jest fakt, że heterogenne komórki macierzyste ukierunkowane tkankowo mogą heterotropowo występować w różnych tkankach i narządach. W badaniach nad występowaniem heterogennych populacji komórek macierzystych w tkankach obwodowych posłużyliśmy się modelem szpiku kostnego, ponieważ jak wspomniano komórkom tego narządu przypisano niemalże nieograniczoną plastyczność i potencjał do transróżnicowania się.

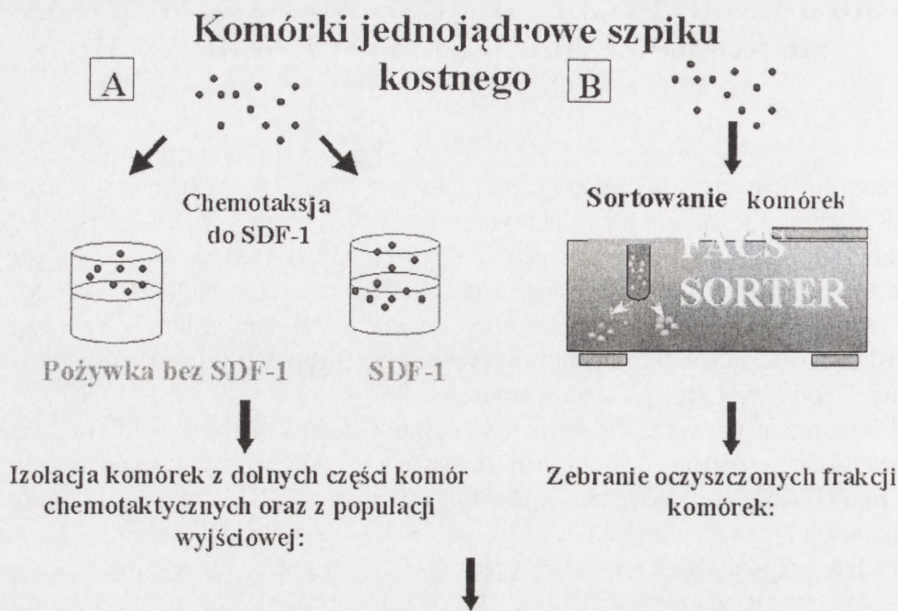
OŚ SDF-1-CXCR4 REGULUJE KRAŻENIE I ZAGNIEŹDŻANIE SIĘ KOMÓREK MACIERZYSTYCH W NISZACH TKANKOWYCH

Szereg poważnych pism naukowych zamieściło w ostatnich latach prace wykazujące, że KKM szpiku kostnego charakteryzuje plastyczność, tzn. możliwość odróżnicowania się w kierunku komórek niehematopoetycznych. Fakt, że w szpiku kostnym mogą znajdować się obok krwiotwórczych komórek macierzystych inne UTKM, nie były jednak brane pod uwagę jako alternatywne wytłumaczenie obserwowanego zjawiska plastyczności. W prezentowanej pracy przedstawione zostaną wyniki badań własnych potwierdzające powyższą hipotezę.

W badaniach naszych założyliśmy, że szpik kostny będący źródłem szeregu chemoatraktantów i czynników wzrostu może stanowić środowisko sprzyjające gromadzeniu się w nim UTKM. W procesie tym ważną rolę odgrywa oś SDF-1 (czynnik pochodzenia stromalnego-1) – receptor CXCR4 [16–18]. SDF-1 wydzielany jest przez komórki podścieliska szpiku kostnego, zaś receptor CXCR4, należący do rodziny receptorów metabotropowych związanych z białkami G, ulega ekspresji zarówno na krwiotwórczych komórkach macierzystych [19–21], jak i UTKM [18, 22, 23]. W ostatnich latach nasz zespół oraz inne grupy badawcze wykazały, że receptor CXCR4 ulega m.in. ekspresji na komórkach zarodkowych [24, 25], mięśniowych komórkach satelitarnych [23], macierzystych komórkach nerwowych [26, 27], wątrobowych komórkach owalnych [22], komórkach macierzystych nabłonka kanalików nerkowych oraz komórkach progenitorowych nabłonka pigmentowego siatkówki [28]. Co ważniejsze, receptor ten jest funkcjonalny na tych komórkach. Z badań naszych wynika m.in., że CXCR4⁺ UTKM odpowiadają w teście chemotaksji na gradient SDF-1 [18, 29].

Wykazano również, że u myszy z *knock-outem* zarówno SDF-1, jak i swojego receptora CXCR4, wiążącego tę chemokinę, dochodzi do znacznego obniżenia liczby KKM w szpiku kostnym i myszy te giną *in utero* [17]. Ponadto należy zaznaczyć, u myszy z *knockoutem* SDF-1 lub CXCR4 obserwuje się jednocześnie defekty w rozwoju mięśnia sercowego, mózgu i dużych naczyń krwionośnych [16, 17, 30, 31]. Uzyskane wyniki sugerują więc, że oś SDF-1-CXCR4 reguluje rozwój wielu tkanek odgrywając kluczową rolę w organogenezie i migracji komórek macierzystych wyżej wymienionych narządów.

Ponieważ SDF-1 może przyciągać na zasadzie gradientu chemotaktycznego CXCR4⁺ KKM, postawiliśmy hipotezę, że szpik kostny może również przyciągać w podobny sposób krążące w krwi obwodowej CXCR4⁺ UTKM. W tym ujęciu szpik kostny jest więc nie tylko „domem” dla CXCR4⁺ KKM, ale również miejscem schronienia dla krążących UTKM CXCR4⁺. Posługując się metodą izolacji chemotaktycznej wykazaliśmy, że CXCR4⁺ UTKM znajdują się faktycznie w szpiku kostnym i odpowiadają na gradient SDF-1 (ryc. 1 panel A) [18, 32]. Z naszych badań wynika również, że do gromadzenia UTKM w szpiku kostnym dochodzi szczególnie podczas fazy szybkiego wzrostu organizmu (u 1–2-miesięcznych myszy, co odpowiada wiekowi kilkunastu lat u człowieka) [18, 33]. Uważamy, że zgromadzone w szpiku UTKM stanowią rezerwową

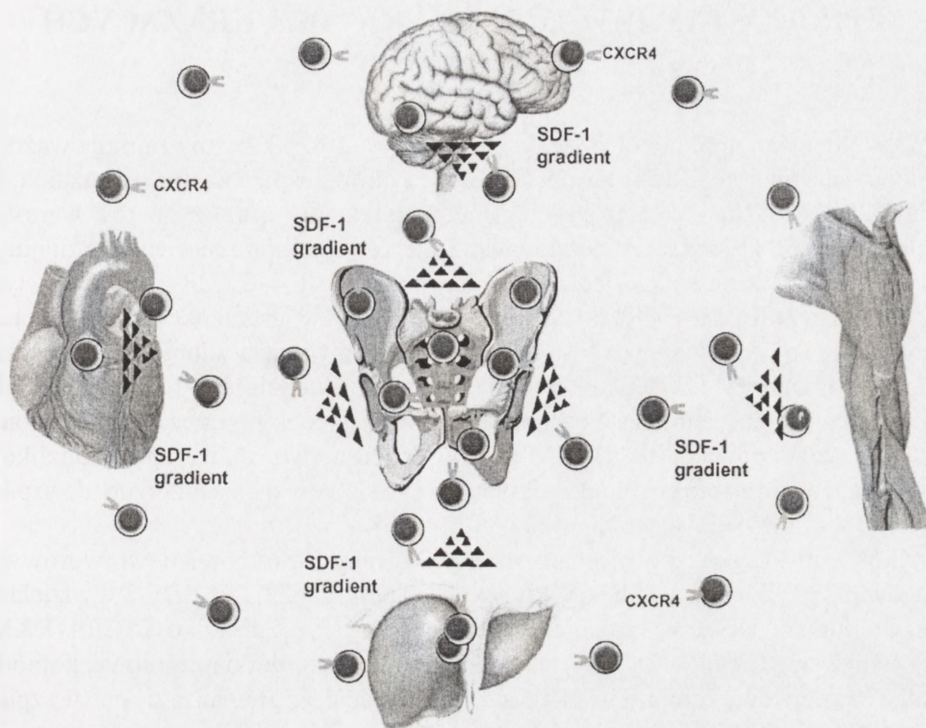


- 1) Analiza RT-PCR w czasie rzeczywistym ekspresji mRNA dla markerów UTKM
- 2) Analiza histochemiczna

RYCINA 1. Różne strategie izolacji UTKM. W dolnych komorach płytek Transwell umieszcza się pożywkę bezsurowiczą z 0,5% BSA (kontrola) lub pożywkę z dodatkiem SDF-1 (200 ng/ml). Świeżo izolowane komórki jednojądrowe szpiku kostnego umieszczane są w górnych komorach. Chemotaksję komórek z górnych komór do gradientu w dolnych komorach prowadzi się przez okres 1–5 godzin (Panel A). Komórki wzbogacone we frakcje komórek macierzystych można również wyseparować za pomocą cytometru przepływowego sprzężonego z urządzeniem sortującym (FACS) (Panel B). Z komórek uzyskanych z komór chemotaktycznych lub wyseparowanych za pomocą cytometru przepływowego izoluje się mRNA i za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Real Time PCR*; RT-PCR) ocenia się ekspresję wczesnych markerów UTKM. Podobnie markery te można oceniać za pomocą analizy histochemicznej

pulę komórek macierzystych, która wykorzystywana jest stopniowo w procesach regeneracji tkanek/narządów.

Założyliśmy, że jedną z właściwości nieembrionalnych, ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych jest ich zdolność do krążenia w ustroju [18, 32]. Uważamy, że UTKM krążą w krwi obwodowej w celu utrzymania w równowadze puli komórek macierzystych w różnych obszarach anatomicznych tej samej tkanki (np. szpiku kostnego lub tkanki mięśniowej) (ryc. 2). Krążące CXCR4⁺ UTKM współzawodniczą jednocześnie o różne nisze tkankowe wydzielające SDF-1. Fakt ten tłumaczy, dlaczego spośród izolowanych komórek mięśni obserwuje się występowanie klonogennych komórek hematopoetycznych i odwrotnie, dlaczego z komórek szpiku możliwa jest hodowla komórek mięśni szkieletowych czy nerwowych. Liczbę krążących w krwi obwodowej CXCR4⁺ UTKM współzawodniczących o nisze tkankowe bogate w SDF-1 można zwiększyć za pomocą tzw. mobilizacji farmakologicznej (np. po podaniu cyklofosfamidu i/lub G-CSF). Liczbę tych komórek we krwi obwodowej zwiększają również czynniki



RYCINA 2. Postulowana przez nas teoria krążenia CXCR4⁺ UTKM w ustroju. Szpik kostny, ze względu na zdolność do wydzielania wielu czynników i chemokin jest miejscem, w którym osiedlają się podczas rozwoju osobniczego nie tylko hematopoetyczne komórki macierzyste, lecz również inne ukierunkowane tkankowo nieembrionalne komórki progenitorowe (UTKM). Tak więc szpik kostny pełni w proponowanym modelu kluczową rolę jako narząd, w którym UTKM gromadzą się podczas rozwoju ontogenetycznego i z którego mogą być mobilizowane do krwi obwodowej w sytuacjach stresu i uszkodzenia narządów. W krwi obwodowej w warunkach zdrowia zawsze krąży niewielka pula UTKM hematopoetycznych, mięśniowych, sercowych, nerwowych czy wątrobowych. Krążące komórki utrzymują w równowadze pulę komórek macierzystych znajdujących się w różnych regionach tej samej tkanki. Podczas uszkodzenia tkanek/narządów lub w trakcie mobilizacji farmakologicznej (np. za pomocą G-CSF, T140) liczba krążących UTKM się zwiększa

uwalniane podczas stresu/uszkodzenia tkanek (zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, uszkodzenie wątroby). Potwierdzeniem tej hipotezy jest fakt, że we frakcji komórek jednojądrowych krwi obwodowej można wykryć ekspresję mRNA dla wczesnych markerów mięśni szkieletowych (Myf-5, MyoD), tkanki nerwowej (GFAP, nestyna) oraz wątroby (α -fetoproteina, CK19) [18].

Badania własne, których wyniki omawiamy w niniejszej pracy, przeprowadzono na populacjach komórek świeżo wyizolowanych ze szpiku kostnego lub krwi obwodowej. Pozwala to na jednoznaczną ocenę zjawiska, które w przypadku analizy komórek poddanych hodowli mogłoby zostać mylnie zinterpretowane jako transróżnicowanie/plastyczność krwiotwórczych komórek macierzystych. Dodatkowo, w badaniach kontrolnych wykazaliśmy, że sama inkubacja izolowanych komórek z SDF-1 nie zmienia ekspresji tkankowo-specyficznych genów [18].

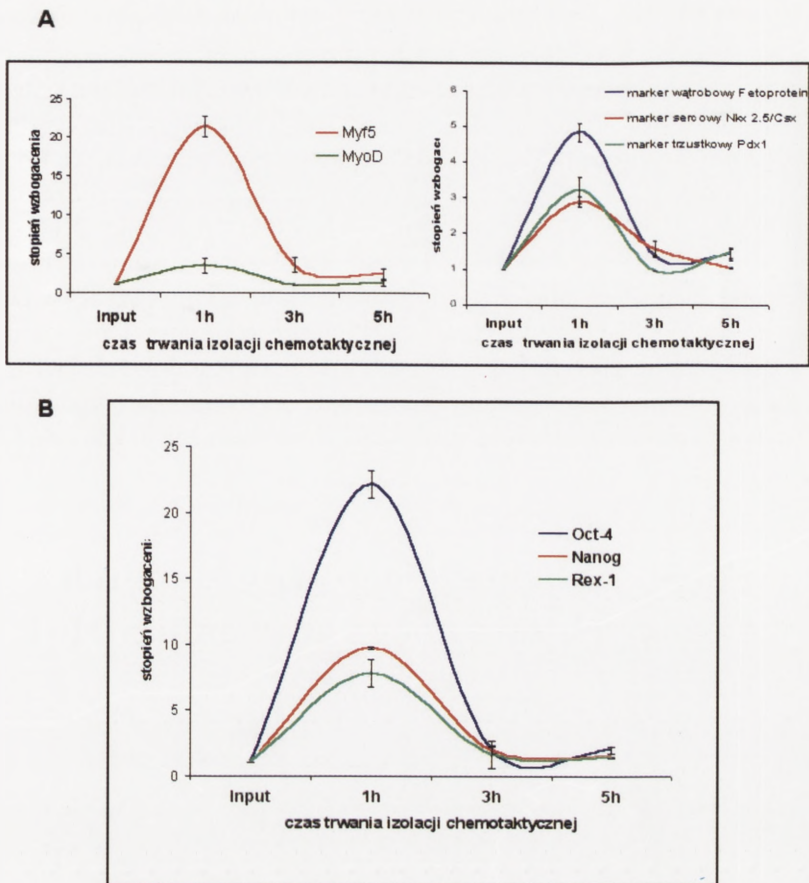
SZPIK KOSTNY JEST „KRYJÓWKĄ” DLA KRAŻĄCYCH CXCR4⁺ UTKM

W proponowanym modelu krążenia UTKM (ryc. 2) szpik kostny zajmuje ważne i eksponowane miejsce. Rozbudowany układ naczyniowy szpiku kostnego oraz fakt, że komórki podścieliska wydzielają szereg chemoatraktantów oraz czynników wzrostowych, powoduje, że krążące, ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste znajdują tutaj sprzyjające warunki do osiedlenia i przeżycia. Oś SDF-1-CXCR4 odgrywa w tym procesie kluczową rolę. Udział osi SDF-1-CXCR4 w gromadzeniu niehematopoetycznych komórek w szpiku kostnym dodatkowo potwierdzają doniesienia wykazujące, iż nowotwory CXCR4⁺ wywodzące się z przedziału UTKM, takie jak: rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, nefroblastoma, hepatoblastoma czy retinoblastoma – pochodzące odpowiednio z UTKM mięśni, tkanki nerwowej, nabłonka kanalików nerkowych, wątroby oraz nabłonka pigmentowego siatkówki dają przerzuty do szpiku kostnego w odpowiedzi na gradient SDF-1 [34–39].

Założyliśmy, że podobny mechanizm obserwowany dla komórek nowotworowych działa w przypadku krążących prawidłowych UTKM [18, 23, 29]. SDF-1 wydzielany przez komórki podścieliska szpiku kostnego może przyciągać nie tylko CXCR4⁺ KKM, ale również inne CXCR4⁺ UTKM, takie jak: satelitarne komórki mięśniowe, komórki owalne czy nerwowe komórki macierzyste, co powoduje, że gromadzą się one w szpiku kostnym. By dowieść słuszności tej hipotezy postanowiliśmy odpowiedzieć na pytanie, czy jeśli odwrócimy gradient SDF-1 posługując się testem izolacji chemotaktycznej, to będziemy w stanie wyseparować UTKM z populacji tzw. komórek jednojądrowych szpiku kostnego (ryc. 1 panel A). Następnie w celu potwierdzenia, że izolowane komórki mają markery UTKM dla mięśni, tkanki nerwowej, wątroby, trzustki czy mięśnia sercowego, posłużyliśmy się techniką RT-PCR. Wyniki przeprowadzonych badań zostały zebrane w tabeli I. Należy podkreślić, że w badanych komórkach, obok markerów wczesnych UTKM stwierdziliśmy również silną ekspresję genów kodujących embrionalne/pluripotencjalne czynniki transkrypcyjne, takie jak: Oct-4, Nanog oraz Rex-1. Ta ostatnia obserwacja sugeruje, że pośród populacji UTKM znajdują się prawdopodobnie również bardziej prymitywne pluripotencjalne komórki macierzyste (PKM). Obecnie w naszym laboratorium prowadzimy badania mające odpowiedzieć na to pytanie.

W ostatnio przeprowadzonych badaniach, w których skróciliśmy czas izolacji chemotaktycznej (ryc. 1 panel A) z 5 do 1 godziny stwierdziliśmy, że UTKM są bardzo mobilną populacją komórek szpiku kostnego. Podczas pierwszej godziny separacji chemotaktycznej izolujemy bowiem ze szpiku kostnego aż ~90% komórek mających ekspresję pluripotencjalnych czynników transkrypcyjnych (Oct-4, Nanog oraz Rex-1) oraz mRNA dla MyoD, CK19 i GFAP (ryc. 3). Przedłużenie czasu izolacji chemotaktycznej powyżej 1 godziny prowadzi zatem do izolacji komórek już bardziej zróżnicowanych.

Aby bliżej poznać fenotyp UTKM, posłużyliśmy się techniką FACS, pozwalającą uzyskać różne populacje komórek szpiku kostnego (ryc. 1 panel B). Z badań wykonanych na oczyszczonych komórkach ludzkiego i mysiego szpiku kostnego wynika, że komórki macierzyste ukierunkowane tkankowo mają odpowiednio fenotyp CXCR4⁺ CD34⁺

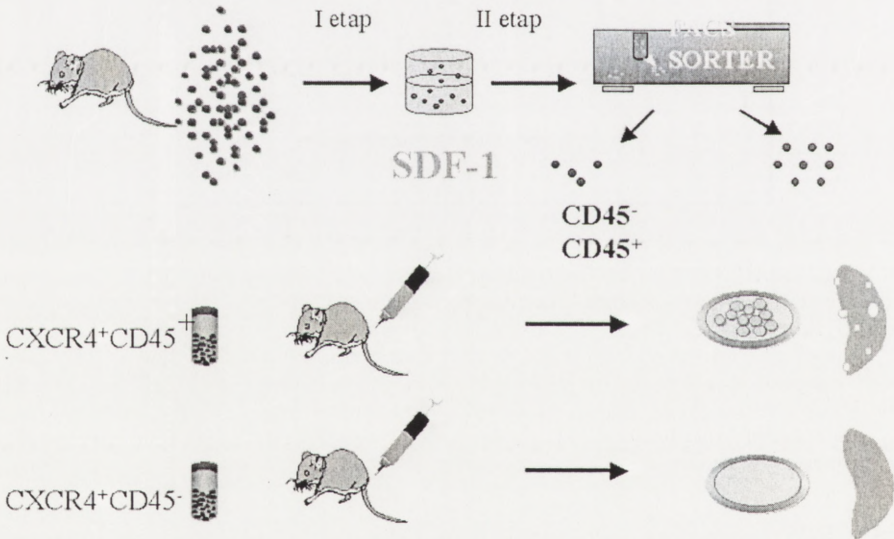


RYCINA 3. CXCR4⁺ UTKM są mobilną populacją komórek jednojądrowych szpiku kostnego. Komórki jednojądrowe szpiku kostnego poddano chemotaksji do gradientu SDF-1 (ryc. 1 panel A) przez okres 1–5 godzin. Uyskane w różnych odstępach czasowych komórki analizowano pod względem ekspresji wczesnych markerów mięśni szkieletowych, mięśnia sercowego, wątroby oraz trzustki (panel A) lub wczesnych markerów pluripotencjalnych komórek macierzystych (Oct-4, Nanog oraz Rex-1) (panel B). Komórki wykazujące ekspresję mRNA dla powyższych markerów odpowiadały szybko (w ciągu 1 godziny) chemotaksją do gradientu SDF-1. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD otrzymane z dwóch niezależnych eksperymentów (n = 12)

AC133⁺ CD45⁻ (człowiek) oraz Sca-1⁺ lin⁻ CD45⁻ (mysz). Obserwacja ta ma ważne znaczenie praktyczne. Wskazuje ona bowiem, że antygeny CD34 i AC133 nie są swoiste wyłącznie dla komórek macierzystych/ukierunkowanych układu krwiotwórczego, ale mogą się również znajdować na innych, tkankowo ukierunkowanych, niehematopoetycznych komórkach macierzystych. Zjawisko to może tłumaczyć, dlaczego w wielu pracach obserwowano zdolności KKM do transróżnicowania się w komórki tkanek niehematopoetycznych [40]. Badania nasze wskazują, że tą niespodziewaną „plastyczność” KKM można wytłumaczyć obecnością heterogennych populacji UTKM w przeszczepianych komórkach traktowanych błędnie jako jednorodna populacja KKM.

Ze względu na to, że zarówno UTKM, jak i krwiotwórcze komórki macierzyste mają ekspresję receptora CXCR4, ważnym zadaniem stało się opracowanie odpowiedniej strategii doświadczalnej pozwalającej oddzielić KKM od UTKM. Jako potencjalny marker rozróżniający obydwie populacje komórek przyjęliśmy antygen pan-hematopoetyczny, jakim jest antygen CD45. Zgodnie z powyższym komórki CXCR4⁺ szpiku kostnego sortowano izolując populacje komórek CD45⁺ (hematopoetyczne) oraz CD45⁻ (nie-hematopoetyczne) (ryc. 4). Stwierdziliśmy, że komórki o fenotypie CXCR4⁺CD45⁻ są znacznie wzbogacone w markery UTKM mięśni szkieletowych, wątroby, nerwowych, mięśnia sercowego i endotelialnych w porównaniu z komórkami CXCR4⁺CD45⁺. Co ważniejsze, mysie UTKM o fenotypie Sca-1⁺CD45⁻ nie tworzyły ani kolonii w hodowlach *in vitro* w metylcelulozie (CFU-GM), ani kolonii śledzionowych (CFU-S) po przeszczepieniu *in vivo* letalnie napromienionym myszom. Zarówno kolonie w metylcelulozie, jak i kolonie śledzionowe tworzone były natomiast przez komórki CXCR4⁺Sca-1⁺CD45⁺ (ryc. 4).

Potencjał hematopoetyczny komórek izolowanych za pomocą gradientu SDF-1



RYCINA 4. Rozdział komórek CXCR4⁺ szpiku kostnego na populację komórek hematopoetycznych (CD45⁺) oraz niehematopoetycznych UTKM (CD45⁻). Z populacji komórek jednojądrowych szpiku kostnego otrzymanych za pomocą gradientu chemotaktycznego SDF-1 (CXCR4⁺) izolowano za pomocą sortera komórkowego komórki CD45⁺ oraz CD45⁻. Stwierdzono, że komórki o fenotypie CXCR4⁺CD45⁻ w przeciwieństwie do CXCR4⁺CD45⁺ tworzą kolonie hematopoetyczne w metylcelulozie oraz 12-dniowe kolonie śledzionowe CFU-S po przeszczepieniu letalnie napromienionym myszom. Dowodzi to, że komórki CXCR4⁺CD45⁻, które wzbogacone są w markery TKM i PKM (ryc. 5), nie posiadają potencjału hematopoetycznego

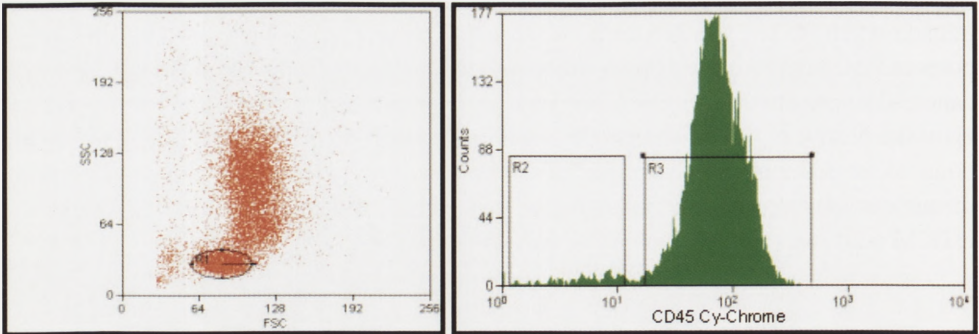
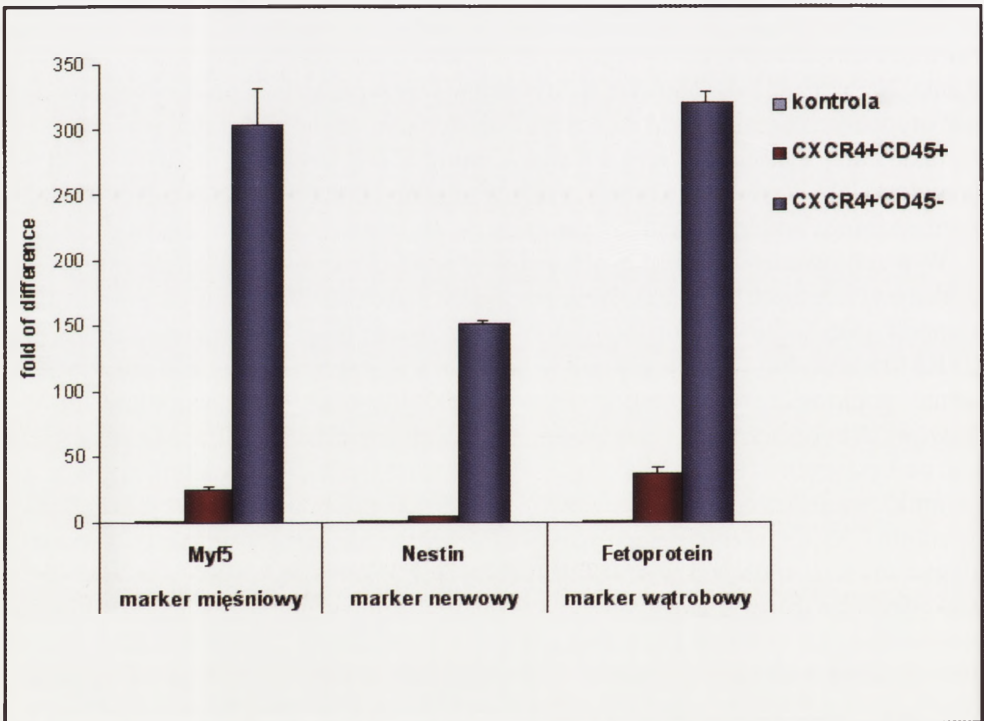
Na podstawie przedstawionych danych można przyjąć, że szpik kostny jest nie tylko „domem” dla KKM, ale również „kryjówką” dla UTKM. Wyniki te tłumaczą, dlaczego możliwa była hodowla komórek mięśniowych [41–43] czy nerwowych [44] lub nawet trzuskowych [45] z populacji komórek jednojądrowych szpiku kostnego izolowanych za pomocą FACS np. jako tzw. populacja boczna (ang. *side population*) [46, 47]. Podsumowując dane te skłaniają do ponownej wnikliwej analizy wyników badań sugerujących występowanie zjawiska plastyczności czy transróżnicowania uzyskiwanych ze szpiku KKM. Uważamy ponadto, że podobnie jak w przypadku szpiku kostnego, heterogenne populacje komórek macierzystych mogą również występować w innych narządach. W gromadzeniu się w nich UTKM odgrywa również istotną rolę oś SDF-1-CXCR4.

UTKM PODOBNIIE JAK KKM KRAŻĄ W KRWI OBWODOWEJ

Jak wspomniano założyliśmy, że jedną z właściwości nieembrionalnych komórek macierzystych jest ich zdolność do krążenia w ustroju, mająca na celu utrzymanie w równowadze puli komórek występujących w różnych obszarach anatomicznych tej samej tkanki. Najbardziej zjawisko to zostało poznane w przypadku krwiotwórczych komórek hematopoetycznych i UTKM śródbłonna naczyń [23, 48–54]. Postawiliśmy hipotezę, że taką samą właściwość mogą posiadać inne UTKM oraz że oś SDF-1-CXCR4 prawdopodobnie odgrywa kluczową rolę w regulacji krążenia tych komórek, jak i ich zagnieżdżaniu w niszach tkankowych.

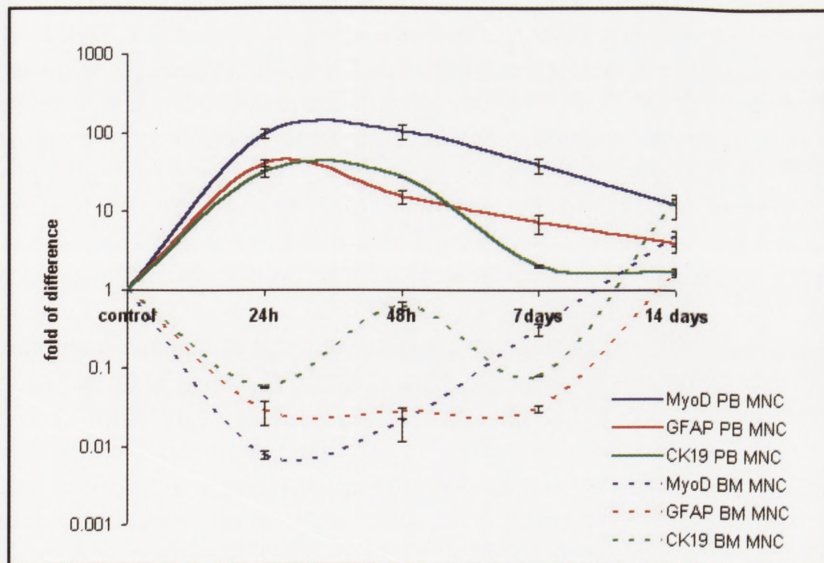
W przeprowadzonych badaniach byliśmy w stanie wykryć ekspresję mRNA dla markerów wczesnych komórek mięśniowych, nerwowych oraz wątrobowych wśród frakcji komórek jednojądrowych uzyskanych z krwi obwodowej [18]. Uważamy, że krążące UTKM mogą odgrywać istotną rolę w procesach regeneracji różnych tkanek. Należy jednak podkreślić, że odsetek krążących UTKM mięśniowych, wątrobowych czy nerwowych był znacznie niższy w porównaniu z wczesnymi komórkami krwiotwórczymi. Liczba krążących UTKM zwiększała się po podaniu czynników mobilizujących, np. czynnika wzrostowego granulocytów (G-CSF) lub niskomolekularnego antagonisty receptora CXCR4, jakim jest peptyd T140 [18]. Stwierdziliśmy także, że UTKM mogą ulegać również mobilizacji w stanach patologii, np. podczas stresu związanego z uszkodzeniem tkanek i narządów (zawał mięśnia sercowego, udar mózgu, toksyczne uszkodzenie wątroby). UTKM krążą również w płodowej krwi obwodowej, czego dowodem jest możliwość wyhodowania z komórek uzyskanych z krwi pępowinowej komórek mięśniowych, nerwowych czy wątrobowych [54]. Uważamy zatem, że krew pępowinowa jest rodzajem „krwi mobilizowanej”, w której można znaleźć UTKM uwolnione z tkanek pod wpływem stresu związanego z porodem.

Ważną rolę w mobilizacji/regulacji krążenia UTKM pełni SDF-1. Jest on wydzielany nie tylko przez komórki podścieliska szpiku kostnego odgrywając istotną rolę w zagnieżdżaniu/retencji KKM w szpiku, lecz również przez komórki fibroblastoidalne serca [55], mięśni szkieletowych [23, 29], wątroby [22], nerki [55] oraz niektóre regiony

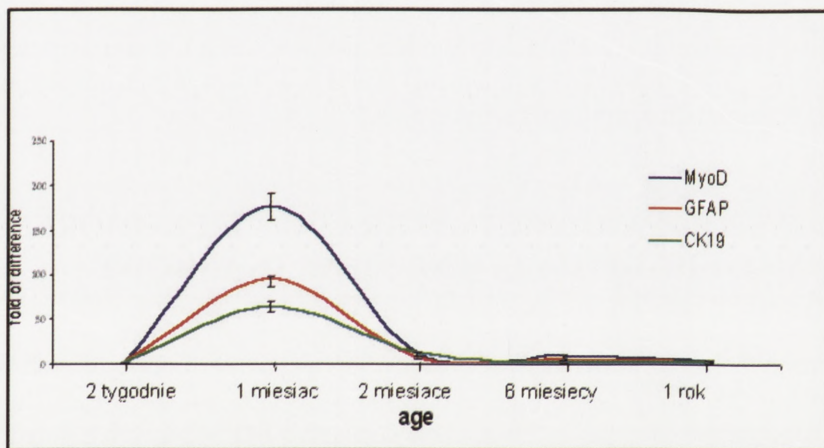
A**B**

RYCINA 5. Populacja mysich komórek CXCR4⁺CD45⁻ w przeciwieństwie do komórek CXCR4⁺CD45⁺ jest silnie wzbogacona w UTKM. Z populacji komórek jednojądrowych szpiku kostnego otrzymanych za pomocą gradientu chemotaktycznego SDF-1 (CXCR4⁺) izolowano następnie komórki CD45⁺ oraz CD45⁻ (Panel A). Analiza RT-PCR w czasie rzeczywistym dowiodła, że ekspresję mRNA dla wczesnych markerów mięśniowych, nerwowych oraz wątrobowych UTKM notuje się w populacji komórek CXCR4⁺CD45⁻. Wyniki przedstawiono jako średnie ±SD otrzymane z trzech niezależnych eksperymentów (n=15)

A



B



RYCINA 6. Panel A – zmiany ekspresji wczesnych markerów mięśniowych, nerwowych oraz wątrobowych w krwi obwodowej i szpiku kostnym u częściowo napromienionych myszy. Od myszy poddanych częściowemu napromienieniu (jedna kończyna) izolowano komórki jednojądrowe krwi obwodowej (na wykresie przedstawione jako linie ciągłe) lub szpiku kostnego (na wykresie przedstawione jako linie przerywane). Ekspresję mRNA wybranych markerów mięśniowych (MyoD), nerwowych (GFAP) oraz wątrobowych (CK19) oceniano za pomocą RT-PCR. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD otrzymane z trzech niezależnych eksperymentów ($n=12$). Panel B – zależne od wieku zmiany ekspresji mRNA dla wczesnych markerów mięśniowych, nerwowych oraz wątrobowych w populacji komórek jednojądrowych szpiku kostnego izolowanych do gradientu SDF-1. Komórki jednojądrowe szpiku kostnego otrzymane po izolacji chemotaktycznej do SDF-1 poddano analizie stopnia ekspresji mRNA dla wczesnych markerów mięśniowych (MyoD), nerwowych (GFAP) oraz wątrobowych (CK19) markerów UTKM. Komórki szpiku izolowano od zwierząt w wieku od 2 tygodni do 1 roku. Porównano ekspresję markerów UTKM pomiędzy taką samą liczbą komórek populacji wyjściowej i komórek po separacji chemotaktycznej za pomocą techniki RT-PCR. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD otrzymane z trzech niezależnych eksperymentów ($n=12$).

ośrodkowego układu nerwowego [27]. Uważamy, że SDF-1 wydzielany przez komórki podścieliska różnych tkanek/narządów może kierować migracją CXCR4⁺ UTKM. Podczas uszkodzenia tkanek, np. niedotlenienia mięśnia sercowego, w toksycznym uszkodzeniu wątroby, czy całkowitym napromienieniu dochodzi do wzrostu sekrecji SDF-1 [18, 56], co wskazuje na potencjalny udział tej chemokiny w chemoatrakcji komórek biorących potencjalny udział w regeneracji. Obecnie zespół nasz prowadzi badania nad identyfikacją innych czynników, które obok SDF-1 są wydzielane przez uszkodzoną tkankę i biorą udział w chemoatrakcji mobilizowanych/krażących UTKM.

By odpowiedzieć na pytanie, czy podczas uszkodzenia tkanek dochodzi faktycznie do mobilizacji UTKM, posłużyliśmy się modelem częściowego napromienienia ciała. Stwierdziliśmy, że u myszy poddanych częściowemu napromienieniu (napromieniona jedna kończyna dolna) obserwuje się wyrzut z nienapromienionych jam szpikowych do krwi obwodowej komórek jednojądrowych mających ekspresję mRNA dla UTKM. Na uwagę zasługuje fakt, że jednocześnie ze wzrostem ekspresji tych markerów w komórkach jednojądrowych krwi obwodowej, obserwuje się spadek ekspresji powyższych markerów pośród komórek jednojądrowych np. w nienapromienionym szpiku drugiej kończyny dolnej (ryc. 6 panel A). Świadczy to o tym, że UTKM opuszczają szpik, który nie otrzymał napromienienia, aby regenerować szpik napromieniony. Obserwując kinetykę tych zmian w czasie stwierdziliśmy, że po 14 dniach po napromienieniu dochodzi do normalizacji powyższych zmian, co przemawia za udziałem mobilizowanych napromieniem UTKM w wyrównywaniu ubytku puli tych komórek w obszarach napromienionego szpiku.

WSPÓŁZAWODNICTWO KRAŻĄCYCH KOMÓREK O SDF-1-POZYTYWNE NISZE TKANKOWE

Zakładamy, że krażące w warunkach fizjologicznych we krwi obwodowej ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste mogą współzawodniczyć o nisze tkankowe znajdujące się w tkankach i narządach (ryc. 2). Nisze takie wydzielają SDF-1, przyciągający krażące UTKM. Zgodnie z powyższym wykazaliśmy, że krażące komórki macierzyste układu krwiotwórczego mogą osiedlać się w tkance mięśniowej, a komórki macierzyste układu mięśniowego mogą pojawić się w szpiku kostnym [23]. Efekt ten ulegał zahamowaniu jeśli i) media warunkowe znad hodowanych fibroblastów szpiku kostnego lub mięśni szkieletowych inkubowaliśmy z przeciwciałem anti-SDF-1, ii) zablokowaliśmy receptor CXCR4 na KKM lub mięśniowych komórkach satelitarnych przeciwciałem anti-CXCR4 lub iii) przed chemotaksją pre-inkubowaliśmy komórki z T140 (antagonistą receptora CXCR4) [23, 37, 38]. Wszystkie te obserwacje dowodzą, że zarówno KKM, jak i mięśniowe komórki satelitarne są przyciągane przez gradient SDF-1.

Uwzględniając wyniki badań wykazujące, że nie tylko KKM i mięśniowe komórki satelitarne, ale również nerwowe, wątrobowe komórki owalne czy UTKM mięśnia sercowego są przyciągane na zasadzie chemotaksji do SDF-1, można przyjąć, że

SDF-1 sam lub w połączeniu z innymi czynnikami wpływa na zagnieżdżanie krążących komórek macierzystych w specyficznych tkankowo niszach. Ponieważ SDF-1 oddziałuje na szereg różnych UTKM, prowadzi to do zagnieżdżania się heterogennych populacji komórek macierzystych w różnych narządach.

SZPIK MŁODYCH MYSZY JEST WZBOGACONY W UTKM

Fakt, że UTKM występują w szpiku kostnym, skłonił nas do dalszej charakterystyki tych komórek. Po pierwsze stwierdziliśmy, że UTKM gromadzą się w szpiku kostnym podczas fazy szybkiego wzrostu organizmu (u 1–2-miesięcznych myszy, co odpowiada wiekowi kilkunastu lat u człowieka) [56]. Zakładamy, że UTKM krążą szczególnie licznie u młodych zwierząt w fazie szybkiego wzrostu, i w okresie tym gromadzą się w niszach szpikowych. Komórki te stanowią, jak uważamy, rezerwową pulę komórek macierzystych dla potencjalnych procesów regeneracyjnych. Liczba tych komórek spada wraz z wiekiem i u około jednorocznej myszy komórki te są słabo wykrywalne (ryc. 6 panel B). Obserwacja ta w pewnym stopniu tłumaczy, dlaczego regeneracja przebiega znacznie słabiej u osobników w wieku podeszłym. Postulujemy, że zależne od wieku wyczerpywanie się puli tych komórek, obok skracania telomerów w dzielących się komórkach macierzystych, tłumaczy procesy starzenia [57–59]. Koncepcja ta wymaga jednak dalszego potwierdzenia w odpowiednich układach doświadczalnych. Przeprowadzona analiza na modelu mysim musi następnie zostać poddana weryfikacji u człowieka.

HETEROGENNE POPULACJE KOMÓREK MACIERZYSTYCH SZPIKU KOSTNEGO – CZY PATRZYMY NA TE SAME KOMÓRKI Z RÓŻNEJ PERSPEKTYWY?

Badania nasze wskazują, że szpik kostny jest nie tylko domem dla komórek macierzystych układu krwiotwórczego, ale również kryjówką dla krążących w ustroju CXCR4⁺ UTKM. Zidentyfikowanie tych komórek w szpiku kostnym zrodziło również pytanie o ich potencjalny związek z innymi komórkami macierzystymi szpiku, np. wielopotencjalnymi komórkami progenitorowymi (ang. *multipotential adult progenitor cells*; MAPC) czy macierzystymi komórkami mezenchymalnymi (ang. *mesenchymal stem cells*; MSC).

Ponieważ, jak wykazaliśmy, ludzkie UTKM występują w populacji komórek szpiku o fenotypie CXCR4⁺ CD34⁺ AC133⁺, wydaje się, że są one odmienne od MAPC i MSC, które to z kolei są wzbogacone we frakcję komórek CXCR4⁺ CD34⁺ [60, 61]. Nie można jednak wykluczyć, że UTKM mogą „zanieczyszczać” hodowle MAPC lub MSC. Fakt ten mógłby tłumaczyć zdolność do wielokierunkowego różnicowania się tych ostatnich, a

co więcej opisywaną zdolność do różnicowania się pochodzących z mezodermy MAPC lub NSC w komórki endodermy (komórki wątroby) lub ektodermy (komórki nerwowe).

Tak więc zakładamy, że UTKM mogą występować od początku pomiędzy hodowanymi/poddawanymi ekspansji komórkami fibroblastoidalnymi szpiku. Komórki fibroblastoidalne, które wydzielają SDF-1, mogą bowiem przyciągać CXCR4⁺ UTKM. Gdy izolujemy fibroblasty wydzielające SDF-1, istnieje duże prawdopodobieństwo, że izolujemy wraz z nimi również UTKM. Ponadto komórki te mogą również przeżywać w bezpośrednim kontakcie z komórkami fibroblastoidalnymi, np. dzięki zjawisku tzw. emperipolezy [62]. Poparciem takiego rozumowania są ostatnio opublikowane prace, wskazujące, że MAPC po przeniesieniu do odpowiedniej pożywki selekcyjnej mogą różnicować się nie tylko w komórki wywodzące się z mezodermalnych MAPC (osteoblasty, komórki mięśni gładkich, chondroblasty czy adipocyty), ale również w kardiomiocyty, komórki nerwowe pochodzenia ektodermalnego, czy nawet hepatocyty, które pochodzą z endodermy [61, 63]. Zjawisko to występuje jednak niezwykle rzadko, co pośrednio sugeruje, że MAPC obok UTKM dla układu kostno-szkieletowego mogą również zawierać UTKM dla kardiomiocytów, komórek nerwowych czy wątrobowych. Warto również nadmienić, że hodowle MAPC zakładane są z komórek szpiku kostnego CD45⁻ oraz GPA-A⁻ na płytkach pokrytych fibronektyną [64, 65]. Opisane przez nas UTKM są również CD45⁻ GPA-A⁻ podobnie jak populacja wyjściowa komórek, z których hoduje się MAPC. Ponadto jak zaobserwowaliśmy, bardzo łatwo przylegają one do fibronektyny, co sugeruje, że UTKM mogą faktycznie izolować się wraz z populacją komórek szpiku, która jest wyjściową populacją komórek w zakładaniu hodowli MAPC. Prawdopodobne jest również, że skład chemiczny pożywki hodowlanej, jak i obecność fibroblastów, które wydzielają SDF-1, mogą sprzyjać przeżyciu UTKM w warunkach takich hodowli *in vitro*. Podsumowując uważamy więc, że to właśnie UTKM obecne w hodowlach MAPC po przeniesieniu do odpowiedniej pożywki różnicującej tworzą kolonie, np. komórek mięśni szkieletowych, komórek nerwowych czy hepatocytów.

Można przyjąć, że analogiczny mechanizm odpowiada za plastyczność czy wielokierunkowe różnicowanie wciąż słabo scharakteryzowanych i nieoczyszczonych na poziomie pojedynczej komórki MSC. Te ostatnie poddaje się ekspansji w podobny sposób jak MAPC [66, 67]. Wydaje się, że jak w przypadku MAPC różnicowanie komórek mezenchymalnych szpiku kostnego w osteoblasty czy chondrocyty można wytłumaczyć obecnością UTKM dla tkanki kostnej lub chrzęstnej zanieczyszczających te hodowle. Poparciem tej ostatniej hipotezy są obserwacje, że UTKM z potencjałem do różnicowania w osteoblasty wykryto w populacji komórek nieadherentnych szpiku kostnego [68, 69]. Opisano również populację krążących szkieletowych komórek macierzystych [70]. Poparciem istnienia takich komórek są również wyniki badań własnych wskazujące, że CXCR4⁺ UTKM są wzbogacone również w komórki posiadające ekspresję mRNA dla wczesnych osteoblastów, chondrocytów oraz adipocytów [33].

Zakładamy, że istnieje duże prawdopodobieństwo, iż opisane różne populacje komórek szpiku kostnego, takie jak np. MSC czy MAPC, są w rzeczywistości UTKM identyfikowanymi w modelach doświadczalnych opartych na długoterminowych hodowlach *in vitro* komórek przylegających szpiku kostnego [18, 53, 71]. Wyjaśnienia

nadal wymaga, czy w szpiku kostnym znajduje się również populacja bardzo wczesnych komórek pluripotencjalnych, z której wywodzić by się mogły te różne populacje UTKM.

CZY SZPIK KOSTNY ZAWIERA POPULACJĘ CXCR4⁺ PLURIPOTENCJALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (PKM), Z KTÓRYCH MOGĄ POTENCJALNIE WYWODZIĆ SIĘ CXCR4⁺ UTKM?

Już w przeszłości postulowano istnienie pluripotencjalnych komórek macierzystych (PKM) w tkance szpikowej [72]. Populacja zidentyfikowanych przez nasz zespół mysich CXCR4⁺ UTKM ma bardzo podobny fenotyp (Sca-1⁺, CD45⁻) z opisanymi ostatnio mysimi PKM. Należy jednak zwrócić uwagę na pewne istotne różnice między opisanymi przez innych i zidentyfikowanymi przez nasz zespół komórkami. Przy zastosowaniu bardzo czułej metody RT-PCR w połączeniu z analizą immunohistochemiczną zaobserwowaliśmy, że świeżo izolowane UTKM ze szpiku kostnego mają ekspresję wybranych wczesnych markerów tkankowych dla mięśni szkieletowych, serca, wątroby, nabłonka [18, 56]. Przeciwnie, opisane PKM do ekspresji tychże genów potrzebują kilku dni hodowli *in vitro*. Co więcej, UTKM w przeciwieństwie do PKM mają ekspresję receptora c-kit [72].

TABELA I. Analiza RT-PCR ekspresji wczesnych genów mięśniowych, nerwowych, wątrobowych, sercowych, trzustkowych oraz embrionalnych/pluripotencjalnych w populacji komórek jednojądrowych szpiku kostnego izolowanych za pomocą gradientu chemotaktycznego SDF-1 (n=6). Dane przedstawiono jako stopień wzrostu ekspresji (średnia ± SD) w porównaniu z ekspresją genów w populacji kontrolnej

Wczesne markery mięśniowe	Myf5 MyoD Myogenin	88,58 ± 7,05 176,66 ± 12,7 153,86 ± 14,6
Wczesne markery nerwowe	GFAP Nestin	93,42 ± 11,3 39,56 ± 6,5
Wczesne markery wątrobowe	α-Fetoprotein CK 19	11,09 ± 3,04 64,22 ± 9,2
Wczesne markery sercowe	Nkx 2,5/Csx GATA-4	24,95 ± 4,3 18,72 ± 5,4
Wczesne markery trzustkowe	Pdx1 Ptf1	3,64 ± 0,1 4,63 ± 0,59
Markery Pluripotencjalnych Komórek Macierzystych (PKM)	Oct-4 Nanog Rex-1	22,14 ± 1,95 9,76 ± 0,06 7,80 ± 0,57

Różnice te nie mogą jednak wykluczyć możliwości, że pośród populacji UTKM można wciąż znaleźć komórki pluripotencjalne, z których będą wywodzić się bardziej zróżnicowane UTKM. W rzeczywistości, w oczyszczonych CXCR4⁺ UTKM wykryliśmy ekspresję mRNA (tab. I) dla wczesnych embrionalnych czynników transkrypcyjnych (Oct-4, Rex-1 oraz Nanog).

Wskazywałoby to, że i) PKM mogą znajdować się w szpiku kostnym jako populacja wyjściowa dla UTKM lub ii) ekspresja mRNA dla wczesnych czynników transkrypcyjnych nie ogranicza się wyłącznie do PKM, ale można ją wykryć również w bardziej zróżnicowanych UTKM [73]. Istnieje więc potencjalna możliwość, że PKM są deponowane w szpiku kostnym na wczesnych etapach rozwoju. Można również przyjąć, że to właśnie PKM a nie „plastyczne” KKM odpowiadałyby np. za wielokierunkowe różnicowanie obserwowane po przeszczepieniu pojedynczej oczyszczonej KKM szpiku kostnego [74]. Obecnie prowadzimy badania próbujące odpowiedzieć na te pytania.

WNIOSKI KOŃCOWE

Badania naszego zespołu wskazują, że szpik kostny młodych osobników zawiera mobilną populację CXCR4⁺ UTKM (oraz PKM?), która zostaje zdeponowana w szpiku kostnym wczesnie podczas rozwoju ontogenetycznego. Komórki te uwalniają się do krwi obwodowej w odpowiedzi na stres i urazy tkankowe i pełnią prawdopodobnie ważną rolę w procesach regeneracji. Liczba tych komórek zmniejsza się z wiekiem, co tłumaczy upośledzenie procesów reperacyjnych w starszym wieku. Opracowanie efektywnych metod izolacji tych komórek i ich ekspansji w hodowlach *in vitro* jest jednak niezbędne, zanim komórki te będą mogły zostać potencjalnie wykorzystane w medycynie regeneracyjnej.

LITERATURA

- [1] LEMISCHKA IA. Few thoughts about the plasticity of stem cells. *Exp Hematol* 2002; **30**: 848–852.
- [2] HOLDEN C, VOGEL G. Stem cells. Plasticity: time for a reappraisal? *Science* 2002; **296**: 2126–2129.
- [3] WAGERS AJ, WIESSMAN IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004; 639–648.
- [4] CASTRO RF, JACKSON KA, GOODELL MA, ROBERTSON CS, LIU H, SHINE HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells *in vivo*. *Science* 2002; **297**: 1299.
- [5] MCKINNEY-FREEMAN SL, JACKSON KA, CAMARGO FD, FERRARI G, MAVILIO F, GOODELL MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 1341–1346.
- [6] GEIGER, H., TRUE, J.M., GRIMES B, CARROLL EJ, FLEISCHMAN RA, Van ZANT G. Analysis of the hematopoietic potential of muscle-derived cells in mice. *Blood* 2002; **100**: 721–723.
- [7] KAWADA H, OGAWA M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood* 2001; **98**: 2008–2013.
- [8] WAGERS AJ, SHERWOOD RI, CHRISTENSEN JL, WEISSMAN IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; **297**: 2256–2259.

- [9] MURRY CE, SOONPAA MH, REINECKE H, NAKAJIMA H, NAKAJIMA, H.O., RUBART, M., PASU-MARTHI, K.B.S., VIRAG JI, BARTELMIZ SH, POPPA V, BRADFORD G, DOWELL JD, WILLIAMS DA, FIELD LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* pub. ahead of print.
- [10] BALSAM LB, WAGERS AJ, CHRISTENSEN JL, KOFIDIS T, WEISSMAN IL, ROBBINS RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* pub. ahead of print.
- [11] JACKSON KA, MI T, GOODELL MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14482–14486.
- [12] TERADA N, HAMAZAKI T, OKA M, HOKI M, MASTALERZ DM, NAKANO Y, MEYER EM, MOREL L, PETERSEN BE, SCOTT EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; **416**: 542–544.
- [13] YING QL, NICHOLS J, EVANS EP, SMITH AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; **416**: 545–548.
- [14] HOCHEDLINGER K, JAENISCH R. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* 2003; **349**: 275–286.
- [15] JAENISCH R, EGGAN K, HUMPHERYS D, RIDEOUT W, HOCHEDLINGER K. Nuclear cloning, stem cells, and genomic reprogramming. *Cloning Stem Cells* 2002; **4**: 389–396.
- [16] MA Q, JONES D, BORGESANI PR, SEGAL RA, NAGASAWA T, KISHIMOTO T, BRONSON RT, SPRINGER TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 9448–9453.
- [17] ZOU Y, KOTTMANN AH, KURODA M, TANIUCHI I, LITTMAN DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; **393**: 595–599.
- [18] RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells „hide out” in the bone marrow. *Leukemia* 2004; **18**: 29–40.
- [19] HIRAYAMA F, YAMAGUCHI M, YANO M, YASUI K, HORIE Y, MATSUMOTO K, NAGAO N, IKEBUCHI K, AZUMA H, IKEDA H, TANI Y. Spontaneous and rapid reexpression of functional CXCR4 by human steady-state peripheral blood CD34+ cells. *Int J Hematol* 2003; **78**: 48–55.
- [20] ROSU-MYLES M, BHATIA M. 2003. SDF-1 enhances the expansion and maintenance of highly purified human hematopoietic progenitors. *Hematol J* 2003; **4**: 137–145.
- [21] PAPAYANNOPOULOU T, PRIESTLEY GV, BONIG H, NAKAMOTO B. The role of G-protein signaling in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood* 2003; **101**: 4739–4747.
- [22] HATCH H, ZHENG D, JORGENSEN ML, PETERSEN BE. SDF-1a/CXCR4: A mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning Stem Cells* 2002; **4**: 339–351.
- [23] RATAJCZAK MZ, MAJKA M, KUCIA M, DRUKALA J, PIETRZKOWSKI Z, PEIPER S, JANOWSKA-WIECZOREK A. Expression of functional CXCR4 by muscle satellite cells and secretion of SDF-1 by muscle-derived fibroblasts is associated with the presence of both muscle progenitors in bone marrow and hematopoietic stem/progenitor cells in muscles. *Stem Cells* 2003; **21**: 363–371.
- [24] ARA T, NAKAMURA Y, EGAWA T, SUGIYAMA T, ABE K, KISHIMOTO T, MATSUI Y, NAGASAWA T. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 5319–5323.
- [25] DOITSIDOU M, REICHMAN-FRIED M, STEBLER J, KÖPRUNNER M, DÖRRRIES J, MEYER D, ES-GUERRA CV, LEUNG, T, RAZ E. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 2002; **111**: 647–659.
- [26] REISS K, MENTLEIN R, SIEVERS J, HARTMANN D. Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience* 2002; **115**: 295–305.
- [27] BAJETTO A, BONAVIA R, BARBERO S, PICCIOLI P, COSTA A, FLORIO T, DSCHETTINI G. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. *J Neurochem* 1999; **73**: 2348–2357.
- [28] CRANE IJ, WALLACE CA, MCKILLOP-SMITH S, FORRESTER JV. CXCR4 receptor expression on human retinal pigment epithelial cells from blood-retina barrier leads to chemokine secretion and migration in response to stromal cell-derived factor 1a. *J Immunol* 2000; **165**: 4372–4378.

- [29] PITUCH-NOWOROLSKA A, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, BAJ-KRZYWORZEKA A, URBANOWICZ B, MALEC E, RATAJCZAK MZ. Circulating CXCR4-positive stem/progenitor cells compete for SDF-1-positive niches in bone marrow, muscle and neural tissues: an alternative hypothesis to stem cells plasticity. *Folia Histochem Cytobiol* 2003; **41**: 13–21.
- [30] TACHIBANA K, HIROTA S, IIZASA H, YOSHIDA H, KAWABATA K, KATAOKA Y, KITAMURA Y, MATSUSHIMA K, YOSHIDA N, NISHIKAWA S, KISHIMOTO T, NAGASAWA T. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998; **393**: 524–525.
- [31] MA Q, JONES D, SPRINGER TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999; **10**: 463–471.
- [32] KUCIA M, RATAJCZAK J, RECA R, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis* 2004; **32**: 52–57.
- [33] RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, RATAJCZAK J. Heterogeneous populations of bone marrow stem cells – are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochem Cytobiol* 2004 (w druku).
- [34] MULLER A, HOMEY B, SOTO H, GE N, CATRON D, BUCHANAN ME, MCCLANAHAN T, MURPHY E, YUAN W, WAGNER SN, BARRERA JL, MOHAR A, VERASTEGUI E, ZLOTNIK A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; **410**: 50–56.
- [35] COOPER CR, CHAY CH, GENDERNALIK JD, LEE HL, BHATIA J, TAICHMAN RS, MCCAULEY LK, KELLER ET, PIENTA KJ. Stromal factors involved in prostate carcinoma metastasis to bone. *Cancer* 2003; **97** (3 Suppl): 739–747.
- [36] ELLIS WJ, PFITZENMAIER J, COLLI J, ARFMAN E, LANGE PH, VESSELLA RL. Detection and isolation of prostate cancer cells from peripheral blood and bone marrow. *Urology* 2003; **61**: 277–281.
- [37] LIBURA J, DRUKALA J, MAJKA M, TOMEASCU O, NAVENOT JM, KUCIA M, MARQUEZ L, PEIPER SC, BARR FG, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. CXCR4-SDF-1 signaling is active in rhabdomyosarcoma cells and regulates locomotion, chemotaxis and adhesion. *Blood* 2002; **100**: 2597–2606.
- [38] JANKOWSKI K, KUCIA M, WYSOCZYNSKI M, RECA R, ZHAO D, TRZYNA E, TRENT J, PEIPER S, ZEMBALA M, RATAJCZAK J, HOUGHTON P, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Both hepatocyte growth factor (HGF) and stromal-derived factor-1 regulate the metastatic behavior of human rhabdomyosarcoma cells, but only HGF enhances their resistance to radiochemotherapy. *Cancer Res* 2003; **63**: 7926–7935.
- [39] GEMINDER H, SAGI-ASSIF O, GOLDBERG L, MESHEL T, RECHAVI G, WITZ IP, BEN-BARUCH A. A possible role for CXCR4 and its ligand the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1 in the development of bone marrow metastasis in neuroblastoma. *J Immunol* 2001; **167**: 4747–4757.
- [40] KORBLING M, KATZ RL, KHANNA A, RUIFROK AC, RONDON G, ALBITAR M, CHAMPLIN R, ESTROV Z. Hepatocyte and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; **346**: 738–746.
- [41] ASAKURA A, SEALE P, GIRGIS-GABARDO A, RUDNICKI MA. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002; **159**: 123–134.
- [42] LABARGE MA, BLAU HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate stem cells to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; **111**: 589–601.
- [43] CORTI S, STRAZZER S, DEL BO R, SALANI S, BOSSOLASCO P, FORTUNATO F, LOCATELLI F, SOLIGO D, MOGGIO M, CISCATO P, PRELLE A, BORSOTTI C, BRESOLIN N, SCARLATO G, COMI GP. A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiates along the myogenic pathway and participates in muscle repair in the mdx dystrophic mouse. *Exp Cell Res* 2002; **277**: 74–85.
- [44] SANCHEZ-RAMOS JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 2002; **69**: 880–893.
- [45] PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N, BOGGS SS, GREENBERGER JS, GOFF JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; **284**: 1168–1170.
- [46] IANUS A, HOLZ GG, THEISE ND, HUSSAIN MA. *In vivo* derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 2003; **111**: 843–850.

- [47] LEE VM, STOFFEL M. Bone marrow: An extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cells? *J Clin Invest* 2003; **111**: 799–801.
- [48] LAPIDOT T, KOLLET O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* 2002; **16**: 1992–2003.
- [49] SHI Q, RAFFI S, WU MH, WIJELATH ES, YU C, ISHIDA A, FUJITA Y, KOTHARI S, MOHLE R, SAUVAGE L.R., MOORE MAS, STORBERF, HAMMOND WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; **92**: 362–367.
- [50] HU Y, DAVISON F, ZHANG Z, XU Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation* 2003; **108**: 3122–3127.
- [51] LIN Y, WEISDORF DJ, SOLOVEY A, HEBBEL RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000; **105**: 71–77.
- [52] CAPLICE NM, BUNCH TJ, STALBOERGER PG, WANG SW, SIMPLER D, MILLER DV, RUSSELL SJ, LITZOW MR, EDWARDS WD. Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4754–4759.
- [53] ORKIN SH, ZON LI. Hematopoiesis and stem cells; plasticity versus developmental heterogeneity. *Nature Immunol* 2002; **3**: 323–328.
- [54] BUZANSKA L, MACHAJ EK, ZABLOCKA B, POJDA Z, DOMANSKA-JANIK K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 2002; **115**: 2131–2138.
- [55] ASKARI AT, UNZEK S, POPOVIC ZB, GOLDMAN CK, FORUDIF, KIEDROWSKI M, ROVNER A, ELLIS SG, THOMAS JD, DICORLETO PE, TOPOL ET, PENN MS. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *The Lancet* 2003; **362**: 697–703.
- [56] KUCIA M, BARAN J, RECA R, MAJKA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK M. Further insights into the so-called plasticity of bone marrow-derived stem cells and the aging process: Tissue committed stem cells (TSCS) are deposited in the bone marrow early during ontogenesis. *The Lancet (przesłane do druku)*.
- [57] Van ZANT G, LIANG Y. The role of stem cells in aging. *Exp Hematol* 2003; **31**: 659–672.
- [58] LIANG Y, Van ZANT G. Genetic control of stem-cell properties and stem cells in aging. *Curr Opin Hematol* 2003; **10**: 195–202.
- [59] MANNING EL, Van ZANT G. Role of telomerase in maintaining hematopoietic stem cell telomere length during replicative stress and aging. *Scientific World Journal* 2001; **1** (1 Suppl 3): 69.
- [60] JIANG Y, VAESSEN B, LENVIK T, BLACKSTAD M, REYES M, VERFAILLIE CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002; **30**: 896–904.
- [61] SCHWARTZ RE, REYES M, KOODIE L, JIANG Y, BLACKSTAD M, LUND T, LENVIK T, JOHNSON S, HU WS, VERFAILLIE CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; **109**: 1291–1302.
- [62] SCHMITT A, DROUIN A, MASSE JM, GUICHARD J, SHAGRAOUI H, CRAMER EM. Polymorphonuclear neutrophil and megakaryocyte mutual involvement in myelofibrosis pathogenesis. *Leuk Lymphoma* 2002; **43**: 719–724.
- [63] SPEES JL, OLSON SD, YLOSTALO J, LYNCH PJ, SMITH J, PERRY A, PEISTER A, WANG MY, PROCKOP DJ. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during *ex vivo* repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 2397–2402.
- [64] MUGURUMA Y, REYES M, NAKAMURA Y, SATO T, MATSUZAWA H, MIYATAKE H, AKATSUKA A, ITOH J, YAHATA T, ANDO K, KATO S, HOTTA T. *In vivo* and *in vitro* differentiation of myocytes from human bone marrow-derived multipotent progenitor cells. *Exp Hematol* 2003; **31**: 1323–1330.
- [65] REYES M, VERFAILLIE CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci* 2001; **938**: 231–233.
- [66] HIRSCHI KK, GOODELL MA. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 2002; **9**: 648–652.
- [67] JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR, REYES M, LENVIK T, LUND T, BLACKSTAD M, DU J, ALDRICH S, LISBERG A, LOW WC, LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; **418**: 41–49.

- [68] OLMSTED-DAVIS EA, GUGALA Z, CAMARGO F, GANNON FH, JACKSON K, KIENSTRA KA, SHINE HD, LINDSEY RW, HIRSCHI KK, GOODELL MA, BRENNER MK, DAVIS AR. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 15877–15882.
- [69] AKUNE T, OHBA S, KAMEKURA S, YAMAGUCHI M, CHUNG UI, KUBOTA N, TERAUCHI Y, HARADA Y, AZUMA Y, NAKAMURA K, KADOWAKI T, KAWAGUCHI H. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 2004; **113**: 846–855.
- [70] KUZNETSOV SA, MANKANI MH, GRONTHOS S, SATOMURA K, BIANCO P, ROBEY PG. Circulating skeletal stem cells. *J Biol Cell* 2001; **153**: 1133–1139.
- [71] BUNTING, KD, HAWLEY RG. Integrative molecular and developmental biology of adult stem cells. *Biol Cell* 2003; **95**: 563–578.
- [72] HOWELL JC, LEE WH, MORRISON P, ZHONG J, YODER MC, SROUR EF. Pluripotent stem cells identified in multiple murine tissues. *Ann NY Acad Sci* 2003; **996**: 158–173.
- [73] PAN GJ, CHANG ZY, SCHOLER HR, PEI D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res* 2002; **12**: 321–329.
- [74] KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGA O, HWANG S, GARDNER R, NEUTZEL S, SHARKIS SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; **105**: 369–377.

Adres autora: Kraków-Prokocim, ul. Wielicka 265

ZASTOSOWANIE AUTOLOGICZNYCH MIOBLASTÓW W USZKODZONYM MIĘŚNIU SERCOWYM U PACJENTÓW PO ZAWALE Z NIEWYDOLNOŚCIĄ KRAŻENIA

APPLICATION OF AUTOLOGOUS MYOBLASTS IN POST-
INFARCTION HEART OF PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR
INSUFFICIENCY

Maciej KURPISZ¹, Tomasz SIMINIAK²

¹Institut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu, ²Oddział Kardiologii Szpitala
Wojewódzkiego w Poznaniu

Streszczenie: Choroby układu sercowo-naczyniowego mają szeroki zasięg społeczny, są pierwszą przyczyną zgonów chorych spośród wszystkich grup. Natomiast leczenie samego zawału, pomimo istotnego postępu w tej dziedzinie, jest daleko niezadowolające. Z powodu braku wystarczająco intensywnego mechanizmu auto-regeneracji mięśnia sercowego, leczenie zawału, zwłaszcza odległego w czasie, jest w zasadzie tylko objawowe i nie zapobiega niekorzystnemu przemodelowaniu organu prowadzącemu do niewydolności krążenia lub wręcz zgonu. Zastosowanie inżynierii tkankowej stało się jedną z nielicznych metod regeneracji nieodwracalnie uszkodzonego rejonu miokardium po zawałe. W intensywnych badaniach przedklinicznych na myszach, szczurach, królikach, owcach wykazano niewątpliwie pozytywny wpływ komórek macierzystych na poprawę kurczliwości mięśnia sercowego oraz jego podstawowych parametrów hemodynamicznych, pochodzących z mięśniowego rezerwuaru tkankowego lub ze szpiku kostnego. Podkreśla się jednak niepełną kompatybilność pomiędzy endogennymi kardiomiocytami biorcy a ektopowo przeniesionymi komórkami dawcy. Często implantowane do serca komórki pochodzą od tego samego osobnika, jednak ich elektrofizjologiczne przewodzenie bodźców i ekspresja niektórych genów są poniżej oczekiwań. Pomimo to beneficja (poprawa kurczliwości serca i jego frakcji wyrzutowej) jest ewidentna i statystycznie znamienne. W pierwszych badaniach fazy klinicznej (w tym w badaniach własnych) z zastosowaniem mioblastów wykazano bezpieczeństwo podawania prekursorowych komórek mięśniowych przy okazji zabiegu pomostowania aortalno-wieńcowego oraz przy podaniu przeszczepnym, jak również zaobserwowano u pacjentów poprawę frakcji wyrzutowej, po ok. 3–4 mies. od zabiegu. Nie zauważono żadnych istotnych skutków ubocznych podawania autologicznych mioblastów, co stanowi czynnik zachęcający do wprowadzenia badań klinicznych fazy II.

Słowa kluczowe: mioblasty, inżynieria tkankowa, zawał serca.

Summary: Cardiovascular diseases belong to the community illness of the developed world. It is number one reason of the death among the all groups of patients. Treatment of the heart infarction despite of the progress in this field is still unsatisfactory. Evolutionary, it was omitted a mechanism for self regeneration of heart while the late infarction disease is only treated symptomatically what dose not prevent a heart remodeling leading to circulatory insufficiency (or death). Application of cell engineering was one of the few methods available for regeneration of irreversibly damaged myocardium. Intensive pre-clinical studies on mice, rats, rabbits, sheep have shown a positive effect of stem cells on improvement of heart contractility and its basic hemodynamic parameters. Applied stem cells mostly originated from muscle tissue reservoir or bone marrow. It is emphasized not full compatibility between endogenous cardiomyocytes and ectopic donor cells. Frequently implanted autologous stem cells to the heart do not induce any adverse reactions, however their electrophysiological coupling and expression of some genes are below the expected values. Despite of these effects, the beneficial features of stem cell application are evident and statistically significant (improvement of heart contractility and ejection fraction). In the clinical Phase I studies (also in own experiments) with application of myoblasts it was indicated safety and feasibility of implementation of human autologous myoblasts administered at the opportunity of coronary artery bypass grafting or by percutaneous delivery. It was further observed improvement of the ejection fraction in patients after 3–4 month after myoblast administration. There were no noted serious side effects of the procedure of myoblast delivery which is encouraging element for start of the Phase II clinical trial.

Key words: myoblasts, tissue engineering, post-infarction heart.

1. EPIDEMIOLOGIA CHORÓB MIĘŚNIA SERCOWEGO

W Polsce można założyć wystąpienie ok. 100 000 przypadków zawału mięśnia sercowego rocznie. Prawie połowa z nich nie kończy się pomyślnym zejściem procesu chorobowego, zaś większość osób przejawia mniej lub bardziej nasiloną niewydolność krążenia. Aby uzyskać szerszy kontekst epidemiologiczny, warto jest przytoczyć badania sytuujące się w literaturze międzynarodowej jako obserwacje z Framingham [7]. Okres obserwacyjny chorób serca, w latach 1950–1969, przyjęto za wartość referencyjną 1,0. Autorzy tych badań (po poprawce statystycznej uwzględniającej częstość zachorowań związanych z wiekiem) stwierdzili, że częstość zachorowań spadła do współczynnika 0,87 w latach siedemdziesiątych, 0,87 w latach osiemdziesiątych, lecz następnie ujawniono tendencję wzrostową do 0,93 w latach dziewięćdziesiątych. Należy także zaznaczyć, że choroba serca jest jednym z najczęstszych powodów hospitalizacji w krajach rozwiniętych. Także w Europie, duża proporcja wszystkich przyjęć związanych z wystąpieniem stanu ostrego ma związek ze schorzeniami mięśnia sercowego [11]. Badania wykonane na dobrze zdefiniowanych subpopulacjach europejskich dowiodły, że choroba tętnic wieńcowych jest przyczyną 52% zaburzeń pracy serca u pacjentów poniżej 75 roku życia.

2. UZASADNIENIE DLA INŻYNIERII KOMÓRKOWEJ W CHOROBY MIĘŚNIA SERCOWEGO

Typowy scenariusz takiej choroby przedstawia się następująco. Zamknięcie światła tętnicy wieńcowej powoduje zawał serca, a w miejscu uszkodzenia wytwarza się łącznotkankowa blizna (ze względu na ograniczone możliwości autoregeneracji). W miejscu włóknistej blizny pozawałowej oraz przyległych segmentach miokardium tworzy się ściana ściana (zwłaszcza widoczna w zawałach lewej komory) i dochodzi do niekorzystnej przebudowy mięśnia sercowego, która bardzo często może dać początek tętniakowi, desynchronizacji pracy serca, wreszcie pęknięciu w szczególnie niekorzystnie zmienionym regionie narządu. Przy atrofizacji (spowodowanej niedokrwieniem) rejonu miokardium objętego zawałem degeneracja kardiomiocytów jest nieuchronna i często nieodwracalna. Mechanizmy autoregeneracji mięśnia sercowego są słabe i nie wydaje się realistyczne oczekiwanie na zwiększoną aktywność wymiany komórek ze strony pierwotnych kardiomiocytów, których pula rezerwowa jest dość uboga. Prewencja przeciwważowa obejmuje często ogólne zmiany w stylu życia, diecie (metabolizm tłuszczowo-węglowodanowy), a oddziały ratownicze i przystosowane do interwencji w stanie ostrym zawału mogą dokonać przerwania zatoru w tętnicy wieńcowej bądź wprowadzenia stentu w miejsce zwężenia naczynia krwionośnego. Odbudowa mięśnia sercowego w odległym czasie po dokonaniu się zawału była jak dotąd uważana za niemożliwą. Jednak w ostatnich kilku latach postępy tzw. inżynierii tkankowej (komórkowej) umożliwiły interwencję medyczną nawet na terenie nieodwracalnie uszkodzonego mięśnia sercowego.

W dotychczasowych próbach przedklinicznych (z użyciem modelowych zwierząt doświadczalnych) dokonano prób inżynierii tkankowej z użyciem różnych typów komórek, włączając w to: totipotencjalne komórki macierzyste (najczęściej pochodzące ze szpiku kostnego) [5], także kardiomiocyty płodowe lub ewentualnie pobrane od osobników dorosłych, tzw. dawców syngenicznych (tzn. osobników wywodzących się z tego samego szczepu wsobnego, tj. jednorodnych genetycznie) [8]. Było oczywistym faktem, że poszukiwano kandydatów wywodzących się z linii komórek mięśniowych [12], ponieważ główna uwaga badaczy zwrócona była w kierunku uzupełnienia potencjału kurczliwego mięśnia sercowego poprzez repopulację komórek w miejscu nieodwracalnie uszkodzonego miokardium. Syngeniczne lub autologiczne (w przypadku osobników ludzkich) mioblasty, należące do rezerwuaru komórek prekursorowych (ang. *committed precursor cells*) mięśni szkieletowych, ale mogące potencjalnie zastąpić funkcjonowanie mięśni gładkich lub pośrodku się sytuującej tkanki mięśnia sercowego, znalazły szczególne zastosowanie w szeregu badań przedklinicznych [19]. Wreszcie, należące do tego samego dermatomiotomu fibroblasty, mogą nabywać w ko-kulturach właściwości mioblastów [4], co znalazło również swoje zastosowanie w przypadku dawców komórek syngenicznych lub autologicznych. Udana próba transfekcji łańcuchów miozynowych były zachętą ze strony komplementarnej terapii genowej, dodatkowo przybliżającej pożądaną fenotyp komórkowy, wynikający ze zdeteminowanej

ekspresji genu. Przy potwierdzeniu określonych możliwości technicznych, w warunkach zwierząt doświadczalnych, nieuchronnie dojść musiało do pre-selekcji takiego modelu komórkowego, który mógłby się sprawdzić w pierwszych badaniach fazy klinicznej inżynierii tkankowej.

Wybór komórek macierzystych do celów regeneracji mięśnia sercowego u człowieka był pochodną następujących kryteriów. Najbardziej prawidłowe wydawało się użycie komórek autologicznych, aby wykluczyć dodatkowy, niekorzystny wpływ układu odpornościowego na przeszczep komórkowy, to zaś eliminowało wykorzystanie do tego celu pierwotnych komórek zarodkowych (chyba że uzyskiwano by je drogą klonowania). Także wszystkie pozostałe komórki macierzyste (somatyczne totipotencjalne bądź pochodzące z rezerwuarów tkankowych), poza pierwotnymi zarodkowymi, nie niosły za sobą możliwości karcynogenności. Dostępność komórek szpikowych czy prekursorów tkankowych również nie budziła wątpliwości, jakkolwiek namnażanie *in vitro* niektórych typów komórek z rezerwuaru tkankowego nie jest łatwe i nadal napotyka trudności techniczne. Komitety Bioetyczne w znakomitej większości opowiedziały się za wykorzystaniem macierzystych komórek somatycznych bądź to pochodzenia własnego lub od innych osobników. Pierwsze przetoczenia komórek tkankowych o ograniczonej totipotencjalności do pozawałowego mięśnia sercowego (mioblasty, k. satelitowe) wykonano w Paryżu [9] oraz w Poznaniu [15]. Poza wykazaniem bezpieczeństwa wyżej wymienionych zabiegów natrafiono na identyczne przeszkody, które wykryto w badaniach przedklinicznych.

3. BADANIA PRZEDKLINICZNE NA ZWIERZĘTACH

Jak wspomniano powyżej, jednymi z pierwszych obserwacji była próba podania jakichkolwiek komórek w pobliże blizny pozawałowej, celem zapobieżenia niekorzystnemu przemodelowaniu mięśnia sercowego. W tym celu podawano fibroblasty zarówno pochodzenia tkankowego, jak i pochodzące ze szpiku kostnego od osobnika-dawcy. Ten schemat imitował podanie allogeniczne u ludzi, jednak odbywał się w warunkach tego samego szczepu zwierzęcego (syngonii), tak więc nie powodował odrzutu. W modelu szczurzym, izolowane fibroblasty transfekowano konstrukcją genową zawierającą MyoD uzyskując (z bardzo wysoką wydajnością) komórki o fenotypie (potwierdzonym morfologicznie, immunohistochemicznie i biochemicznie) podobnym do komórek mięśniowych [10]. Poprzez sąsiedztwo nastąpiło upodobnienie się (transdyferencjacja?) fibroblastów w kierunku komórek mięśniowych, a ekspresji ulegały białka miozyny i embrionalnej szkieletowej miozyny. Poprawa hemodynamiczna mięśnia sercowego w tych przypadkach najprawdopodobniej następowała dzięki wzmocnieniu ściany lewej komory. Dalsze wyniki już z zastosowaniem komórek pochodzących z rezerwuaru tkankowego (*committed precursor cells*), tzw. mioblastów lub komórek satelitowych wywołały dalszy entuzjazm badaczy dowodzących poprawy kurczliwości pozawałowego mięśnia sercowego (model szczurzy) i poprawy właściwości hemodynamicznych [19].

Wykazano także, że mioblasty, przypominające miocyty (albo nawet kardiomiocyty) wykazywały sposób ułożenia podobny do kardiomiocytów endogennych. Poprawa wydolności serca w porównaniu z grupą kontrolną (bez interwencji komórkowej) wynikała ze zmniejszenia obszaru blizny, mniejszego jej ścienienia i wolniejszego poszerzania jam serca. Następnie wykonano badania histologiczne i immunohistochemiczne z przeszczepionych mioblastów do rejonu blizny pozawałowej. Wykazano, że mioblasty wzrastają w warunkach *in situ* w postaci interkalujących dysków i wykazują pozytywny odczyn na miogeninę. Jakkolwiek jednak w strefie, do której wstrzykiwano komórki pochodzące z rezerwuaru mięśni szkieletowych i mięśnia sercowego, stwierdzano występowanie wysp komórkowych, przypominających kardiomiocyty nie uzyskano definitywnych dowodów na transróżnicowanie mioblastów. Podobne wyniki uzyskano w badaniach prowadzonych z użyciem mioblastów przez grupę Atkinsa i wsp. [1] w układzie modelowym z użyciem królika, jednak stosowanie tych zwierząt do celów regeneracji pozawałowego mięśnia sercowego może być zawodne, ze względu na niezwykle szybkie wytwarzanie się krążenia obocznego u tych zwierząt.

Ostatnio notuje się przeniesienie badań na większe zwierzęta doświadczalne, u których kinetyka pozawałowa (np. zawał serca odległy w czasie), jak i budowa mięśnia sercowego są bardziej podobne do ludzkich. Takie badania są obecnie przeprowadzane na świnia (Podesser B. – Uniwersytet w Wiedniu, wiadomość ustna) oraz na owcach [3]. Badania te pokazują dalszą ewolucję naszych poglądów (wobec) na temat przyczyny poprawy hemodynamicznej i funkcjonalnej mięśnia sercowego wskazując na mało swoiste tło poprawy kurczliwości pozawałowego mięśnia sercowego w przypadku stosowanych fibroblastów (poprawa czynności serca diastolicznego) wobec mioblastów (poprawa efektu głównie systolicznego, a także diastolicznego). Planowane przez Menasche i wsp. na owcy badania w zawale odległym z pewnością dostarczą nowych danych na temat zachowania się mioblastów w zawale odległym.

Wykonane dotąd badania przedkliniczne wskazują na istotne utrudnienia w kooperacji komórek pozyskiwanych z miejsc ektopowych (mioblasty z mięśni szkieletowych) z komórkami narządu biorczego (kardiomiocyty). Można jednak zanotować niewątpliwie korzystne cechy transplantowanych komórek w postaci: formowania się mięśniowo-pochodnych wysp komórkowych w miejscu atroficznych kardiomiocytów, prawidłowe ułożenie się komórek obu typów (*alignment*), indukcję angiogenezy (formowanie się pęczków naczyńowych) przez komórki transplantowane, poprawę czynności systolicznej serca oraz ograniczenie niekorzystnej przebudowy mięśnia sercowego. Niestety mioblasty nie są rozwiązaniem optymalnym [13], ponieważ istnieją pewne różnice strukturalne pomiędzy wywodzącymi się z nich miocytami a kardiomiocytami. Dojrzałe miocyty nie tworzą między sobą połączeń typu połączenia szczelinowego (*gap junction*), które służą w mięśniu sercowym jako kanały komunikacyjne między przylegającymi do siebie kardiomiocytami i wraz z połączeniami typu przylegającego tworzą wstawkę w miokardium. Wymienione typy komórek mięśniowych różnią się również fenotypem posiadanych receptorów dihydropirydynowych, które odpowiadają za przewodzenie impulsów elektrycznych przez błonę komórkową i ich przemianę na energię kinetyczną skurczu. Powyższe cechy sprawiają, że mięśnie szkieletowe różnią

się od mięśnia sercowego właściwościami elektrofizjologicznymi. Doświadczenia *in vitro* wykazują, że mioblasty mają zdolność do ekspresji N-kadheryny i konneksyny 43 – białek budulcowych odpowiedzialnych za tworzenie połączeń szczelinowych – jednak zdolność ta zanika w miarę przekształcania się komórek satelitowych w miocyty. Mimo że przeszczepiane mioblasty prawdopodobnie nie tworzą *in vivo* połączeń z kardiomiocytami, w warunkach *in vitro* mają taką zdolność i połączenia te są w pełni funkcjonalne, a wynikiem ich jest synchroniczny skurcz obu typów komórek.

Do ważniejszego nurtu badań przedklinicznych należą badania porównawcze efektywności implantacji różnego typu komórek do pozawałowego mięśnia sercowego. Do badań tych posłużyły zwierzęta średniej wielkości, tj. białe króliki nowozelandzkie. Przede wszystkim potwierdzono wcześniejsze przesłanki, że fibroblasty skórne nie odgrywały roli przy dodanej wartości skurczu (indeks regionalnej kurczliwości serca systolicznego), natomiast bezwzględnie poprawa skurczu obserwowana była po implantacji mioblastów [4]. Dużo bardziej ciekawy okazał się cykl doświadczeń z użyciem mioblastów wobec komórek prekursorowych szpiku kostnego (o fenotypie CD34), zwłaszcza że w pilotowych badaniach klinicznych podnosi się obecnie większą korzyść przeszczepiania komórek macierzystych szpiku w zawale świeżym (2–10 dni po zawale), zaś mioblastów w zawale odległym w czasie (tj. po 3 mies.). W badaniach przedklinicznych na królikach (2 tygodnie po zawale) przeszczepiano równolegle oba typy komórek w różnych podgrupach i nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy nimi i w stosunku do grupy kontrolnej. Jednak oba analizowane parametry, tj. zmiana uderzenia serca w skurczu oraz skracanie serca (w skurczu) były wyższe po zastosowaniu mioblastów [20]. Ponadto podane do serca mioblasty formowały tzw. miotuby, a komórki wykazywały ekspresję wolnych i szybkich łańcuchów miozynowych, natomiast komórki szpiku kostnego wykazywały zróżnicowanie w kierunku fenotypu miogennego, włącznie z pozytywnym barwieniem na desminę i aktyne sarkomerową.

4. BADANIA WŁASNE Z UŻYCIEM AUTOLOGICZNYCH MIOBLASTÓW

Wyosobniono dwie grupy pacjentów do badania fazy I klinicznej dla oceny bezpieczeństwa podania autologicznych mioblastów:

A) przez wstrzyknięcie do okolicy blizny pozawałowej przy okazji operacji pomostowania aortalno-wieńcowego oraz

B) podając mioblasty przezskórnie posługując się zestawem cewników i wewnątrznaczyniową ultrasonografią (w obu przypadkach grupy liczyły po 10 pacjentów).

W obu analizowanych podgrupach punktami granicznymi były: ocena bezpieczeństwa i drogi podania komórek oraz ocena tzw. frakcji wyrzutowej (podstawowego parametru hemodynamicznego serca świadczącego o stanie funkcjonalnym narządu) po 6 mies. od podania komórek. Kryteriami włączenia pacjentów grupy A były:

- udokumentowany zawał serca,

- kwalifikacja do wykonania pomostowania aortalno-wieńcowego,
- akinezja lub dyskinezja co najmniej 3 segmentów lewej komory serca,
- brak żywotnych komórek w uszkodzonych segmentach, w ocenie echokardiograficznej po wykonanym teście dobutaminowym,
- uzyskana zgoda pacjenta wg zasad ustalonych przez Komisję Bioetyczną.

Kryteriami wyłączenia były:

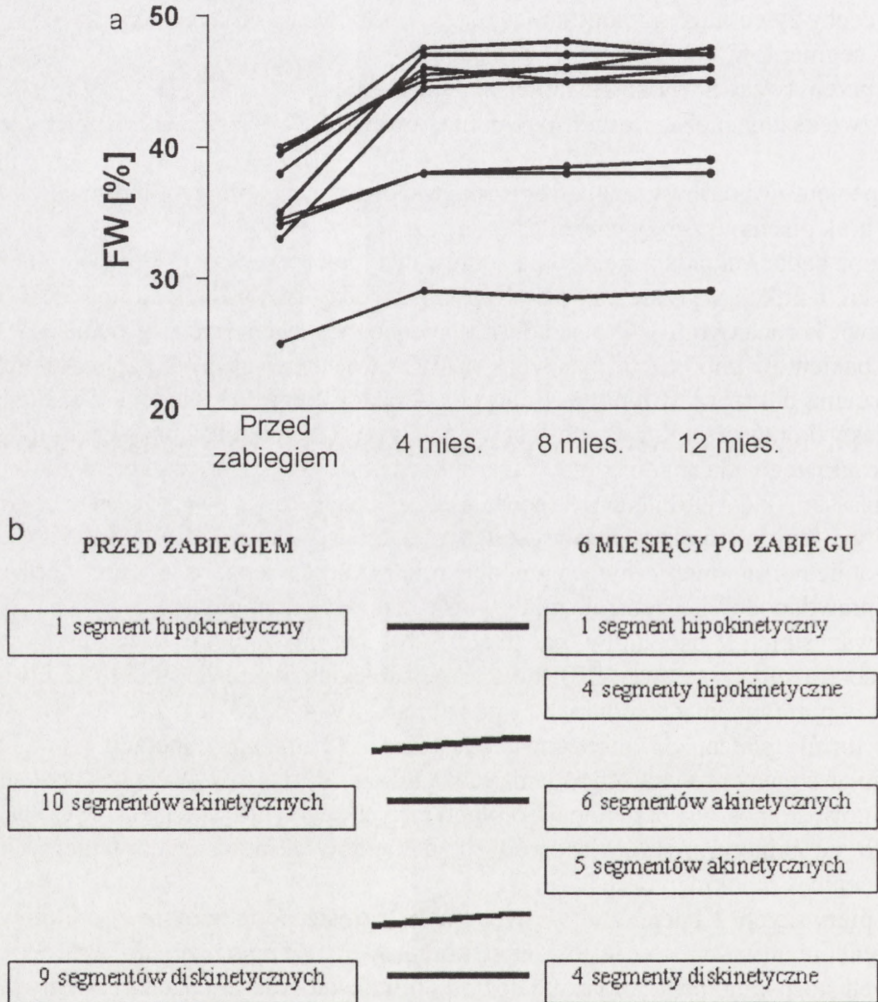
- frakcja wyrzutowa poniżej 25%,
- wiek powyżej 65 roku życia,
- 2 lub więcej epizodów zamknięcia naczynia wieńcowego,
- cechy żywotnego miokardium w obrębie akinetycznych/dyskinetycznych segmentów,
- przebyty zawał w okresie mniejszym niż 3 mies.,
- zwiększone niebezpieczeństwo pomostowania (CABG) w wyniku przebytych u pacjentów udarów mózgu, względnie współistniejącej niewydolności nerek,
- brak pisemnej zgody pacjenta.

Grupa badana składała się z 10 pacjentów, w tym 9 mężczyzn [17], w wieku od 51 do 56 lat, z frakcją wyrzutową przed CABG pomiędzy 25 a 40% (średnio 35,6%). Na podstawie koronarografii u 6 pacjentów postawiono rozpoznanie choroby dwóch naczyń, a u 4 pacjentów chorobę trójnaczyńową. Wśród badanej grupy 2 pacjentów miało rozpoznaną cukrzycę II typu, a 4 chorych – nadciśnienie. U każdego z pacjentów mioblasty (komórki satelitowe) zostały wyizolowane z materiału biopsyjnego, z mięśnia czworogłowego uda i namnożone w warunkach *in vitro* [13]. Wstrzyknięto zawiesiny z mioblastami (kilka lub kilkanaście podań wzdłuż blizny pozawałowej). Jeden z pacjentów zmarł w 7-dniowym okresie po wykonanym zabiegu, w wyniku świeżego zawału w pierwotnie normokinetycznym segmencie mięśnia sercowego, przez co stwierdzono, że najprawdopodobniej zgon nie miał związku z podaniem mioblastów.

U wszystkich 9 pacjentów, badanych 3–6 mies. po zabiegu, wykazano wzrost wartości frakcji wyrzutowej (EF), która przed zabiegiem wynosiła średnio 35,2% (25–40%), w porównaniu ze średnio 42% po zabiegu (29–47%). Wartość ta utrzymywała się w formie plateau do obserwowanego okresu 12 mies. po operacji [18]. Także analizując zmiany w wynikach badania echokardiograficznego, wykazano u wszystkich pacjentów, że spośród uprzednio 9 dyskinezyjnych segmentów mięśnia lewej komory 5 stało się akinetycznymi, a spośród 10 segmentów akinetycznych 4 uległy przekształceniu w hipokinetyczne.

U pierwszych 2 pacjentów we wczesnym okresie pooperacyjnym odnotowano wystąpienie utrwalonego częstoskurczu komorowego. Z tego względu, u następnych chorych stosowano profilaktycznie dożylną infuzję amiodaronu na 24 godziny przed oraz w ciągu pierwszych 24 godzin po zabiegu. Następnie prowadzono doustne podawanie amiodaronu przez następne 2 miesiące. W zasadzie po 2 miesiącach od operacji tylko 2 pacjentów otrzymywało doustny amiodaron, którego podawanie zakończono w trakcie kolejnego miesiąca.

W grupie B pacjentów do przezskórnego podania mioblastów (grupa pacjentów o podobnych kryteriach włączenia i wyłączenia jak grupa A) zastosowano system cewników infuzyjnych (IntraLume, TransVascular Inc.) pod kontrolą ultrasonografii wewnątrznaczyniowej (IVUS), podając przez żyłę wieńcową autologiczne mioblasty do nieodwracalnie uszkodzonego segmentu pozawałowego po raz pierwszy w świecie [16]. Wprowadzenie to poprzedzały próby przedkliniczne na mięśniu sercowym świni. Po ok. 3 mies. obserwacji u pierwszych pacjentów zauważono również poprawę w



analizowanej frakcji wyrzutowej. W tym przypadku nie była ona spowodowana dodatkową perfuzją a jedynie działaniem samych mioblastów.

Regeneracja mięśnia sercowego przy pomocy inżynierii komórkowej może nieść za sobą rewolucyjny postęp w zaopatrzeniu uszkodzonego serca, w tym jego rejuwenalizację, może też spowodować znaczne ograniczenie transplantacji narządowej [6]. Rozważnie dobrane komórki macierzyste lub progenitorowe z rezerwuaru tkankowego mogą okazać się niezwykle pomocne w poszczególnych typach choroby narządowej [2], a ta era dopiero się zaczyna w związku z zapoczątkowaniem pierwszych badań II fazy klinicznej. Niektórzy porównują przełom z zastosowaniem komórek macierzystych z implikacjami medycznymi związanymi z odkryciem DNA.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ATKINS BZ, LEWIS CW, KRAUS WE, HUTCHESON KA, GLOWER DD, TAYLOR DA. Intracardiac transplantation of skeletal myoblasts yields two populations of striated cells in situ. *Ann Thorac Surg* 1999; **67**: 124–129.
- [2] FISZER D, ROZWADOWSKA N, KURPISZ M. Komórki macierzyste: perspektywy zastosowań klinicznych. *Medycyna Wet* 2003; **59**: 751–754.
- [3] HAGEGE AA, VILQUIN JT, BRUNEVAL P, MENASCHE P. Regeneration of the myocardium: a new role in the treatment of ischemic heart disease? *Hypertension* 2001; **38**: 1413–1415.
- [4] HUTCHESON KA, ATKINS BZ, HUEMAN MT, HOPKINS MB, GLOWER DD, TAYLOR DA. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant* 2000; **9**: 359–368.
- [5] KLUG MG, SOONPAA MH, KOH GY, FIELD LJ. Genetically selected cardiomyocyte from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; **98**: 216–224.
- [6] KURPISZ M, SUZUKI K, SMOLEŃSKI RT, SŁOMIŃSKA EM, MURTUZA B, SIMINIĄK T. Transplantacja komórek w leczeniu chorób serca. *Kardiologia Pol* 2003; **59**: II-26–II-31.
- [7] LEVY D, KENCHAI H S, LARSON MG, BENJAMIN EJ, KUPKA MJ, HO KK, MURABITO JM, VASAN RS. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002; **347**: 1397–1402.
- [8] LI RK, MICKLE DA, WEISEL RD, ZHANG J, MOHABEER MK. *In vivo* survival and function of transplanted rat cardiomyocytes. *Circ Res* 1996; **78**: 283–288.
- [9] MENASCHE P, HAGEGE AA, SCORSIN M, POUZET B, DESNOS M, DUBOC D, SCHWARTZ K, VILQUIN JT, MAROLLEAU JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; **357**: 279–280.
- [10] MURRY CE, KAY MA, BARTOSEK T, HAUSCHKA SD, SCHWARTZ SM. Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with MyoD. *J Clin Invest* 1996; **98**: 2209–2227.
- [11] PARAMESHWAR J, POOLE-WILSON PA, SUTTON GC. Heart failure in a district general hospital. *J Roy Coll Phys* 1992; **26**: 139–142.
- [12] ROBINSON SW, CHO PW, LEVITSKY HI, OLSON JL, HRUBAN RH, ACKER MA, KESSLER PD. Arterial delivery of genetically labelled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. *Cell Transplant* 1996; **5**: 77–91.
- [13] ROZWADOWSKA N, FISZER D, SIMINIĄK T, KALAWSKI R, KURPISZ M. Przeszczepy komórkowe i terapia genowa. Nowe metody leczenia pozawałowej niewydolności krążenia. *Pol Przegl Kardiol* 2002; **4**: 325–329.
- [14] ROZWADOWSKA N, FISZER D, SIMINIĄK T, KALAWSKI R, KURPISZ M. Evaluation of *in vitro* culture of human myoblasts for tissue autotransplants to the post-infarcted heart. *Pol Heart J* 2002; **57**: 233–237.
- [15] SIMINIĄK T, KALAWSKI R, KURPISZ M. Myoblast transplantation in the treatment of postinfarction myocardial contractility impairment – a case report. *Pol Heart J* 2002; **56**: 131–133.
- [16] SIMINIĄK T, FISZER D, JERZYKOWSKA O, GRYGIELSKA B, KAŁMUCKI P, KURPISZ M. Percutaneous autologous myoblast transplantation in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment – report on two cases. *Pol Heart J* 2003; **59**: 492–496.

- [17] SIMINIAK T, KALAWSKI R, FISZER D, JERZYKOWSKA O, RZEŹNICZAK J, ROZWADOWSKA N, KAŁMUCKI P, KURPISZ M. Przeszczep autologicznych mioblastów szkieletowych w leczeniu pozawałowych zaburzeń kurczliwości mięśnia sercowego – obserwacje 3-miesięczne. *Kardiol Pol* 2004; **60**: I-71–I-76.
- [18] SIMINIAK T, KALAWSKI R, FISZER D, JERZYKOWSKA O, RZEŹNICZAK J, ROZWADOWSKA N, KURPISZ M. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury. Phase I clinical study 12 months follow up. *Am Heart J* 2004, in press.
- [19] TAYLOR DA, ATKINS BZ, HUNGSPREUGS P, JONES TR, REEDY MC, HUTCHESON KA, GLOWER DD, KRAUS WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; **4**: 929–933.
- [20] THOMPSON RB, EMANI SM, DAVIS BH, VAN DEN BOS EJ, MORIMOTO Y, CRAIG D, GLOWER D, TAYLOR DA. Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation* 2003; **108** Suppl 1: II264–271.

*Adres autora: ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań,
e-mail: kurpimac@man.poznan.pl*

MORALNE KONTROWERSJE WOKÓŁ BADAŃ NAD KOMÓRKAMI MACIERZYSTYMI

THE MORAL CONTROVERSIES CONCERNING STEM CELL RESEARCH

Barbara CHYROWICZ

Wydział Filozofii KUL

Streszczenie: Wyhodowanie w roku 1998 pierwotnych komórek macierzystych człowieka z jednej strony stworzyło szansę na opracowanie terapii nieuleczalnych dotąd chorób, z drugiej zaś wywołało po raz kolejny falę sporów na temat dopuszczalności badań na ludzkich zarodkach. Okazało się bowiem, że jakkolwiek możliwe jest również uzyskanie komórek macierzystych tkanek, to badanie komórek macierzystych zarodka wydaje się być bardziej obiecujące. Te ostatnie można otrzymać z wężła zarodkowego zarodka w stadium blastocysty doprowadzając tym samym do jej zniszczenia. Mielibyśmy w ten sposób do czynienia z planowym niszczeniem życia zarodków, aby osiągać spodziewane cele terapeutyczne. Procedura taka jest nie do przyjęcia dla tych, którzy uznają, że zarodek posiada już status normatywny wykluczający jego niszczenie. Zwolennicy prowadzenia badań zwracają natomiast uwagę na znaczną liczbę zarodków pozostających po programie *in vitro*, które zostaną i tak zniszczone, nawet jeśli nie wykorzystana się ich do badań. Nie widzą oni nadto powodów, by przyznawać zarodkowi prawo do życia na równi z prawem do życia już urodzonych ludzi. Próbą kompromisowego rozwiązania jest badanie już wyprowadzonych z zarodków linii komórkowych połączone z ustalaniem daty oznaczającej kres niszczenia samych zarodków. Podczas gdy zwolennicy badań uznają je za zbyt konserwatywne, w opinii przeciwników jest zbyt liberalne, ponieważ stanowi formę współdziałania w złu.

Słowa kluczowe: zarodek, zarodkowe komórki macierzyste, badania naukowe, ocena etyczna.

Summary: On the one hand, isolation of human stem cells in laboratory conditions in 1998 opened an opportunity to elaborate a therapy for incurable diseases, yet on the other one it triggered a wave of controversy over admissibility of research on human embryos. It turned out that although it is also possible to derive stem cells from adult tissues, the research on embryo stem cells seems to be more promising. The latter type of cells can be derived from inner cell masses of a blastocyst and thus result in the destruction of the blastocyst. This kind of action involves planned destruction of the lives of embryos for the supposed therapeutic purpose. Such a procedure is unacceptable to those who are in favour of the normative status of human embryos and thus exclude their destruction. Proponents of the research in question point in turn to a vast number of embryos that are by-products of the IVF project and will be put to destruction at any rate, even if they are not used for scientific purposes. Moreover, those who advocate this view do not see a reason why the embryo should be granted the right to life in the way born

human beings are granted it. The attempt at a compromise solution involves acceptance of research done on the already derived embryonic stem cell lines, and setting the precise date by which the destruction of embryos will have been stopped. While proponents of the research in question find it too conservative, its opponents consider it even too liberal and involving a form of cooperation in evil.

Key words: embryo, embryonic stem cells, research, moral appraisal.

MORALNE KONTROWERSJE WOKÓŁ BADAŃ NAD KOMÓRKAMI MACIERZYSTYMI

Spektakularne osiągnięcia w naukach biologicznych notowane od drugiej połowy minionego wieku są przedmiotem dyskusji prowadzonej nie tylko wśród specjalistów z zakresu embriologii, genetyki czy biotechnologii. Ponieważ osiągnięcia te nie polegają jedynie na coraz głębszym rozpoznawaniu funkcjonowania organizmów – z oczywistych względów najbardziej interesuje nas wiedza na temat własnego gatunku – lecz stanowią również wstęp do różnorodnych, często moralnie kontrowersyjnych praktyk, do debaty nad osiągnięciami współczesnej biologii włączają się humaniści, prawnicy, a także politycy. W gronie naukowców reprezentującym tak merytorycznie i metodologicznie odmienne dyscypliny dyskutowaliśmy i nadal dyskutujemy między innymi nad dopuszczalnością genetycznego modyfikowania organizmów, dostępnością testów genetycznych, technikami wspomaganey reprodukcji, ewentualnym klonowaniem człowieka. Ostatnio tematem numer jeden prowadzonych debat jest możliwość pozyskiwania pierwotnych komórek zarodkowych, czyli komórek macierzystych z zarodków. Debata ta wyraźnie spolaryzowała opinie: obok zdecydowanych zwolenników prowadzenia badań nad tego rodzaju komórkami głos w dyskusji zabierają również zdecydowani przeciwnicy uzyskiwania ich z ludzkich zarodków. Kością niezgody jest tutaj – podobnie jak w wielu poprzednich debatach – możliwość uznania bądź nie normatywnego statusu ludzkiego zarodka. Jeśli komuś nieobce są dyskusje, prowadzone na terenie bioetyki – etyki stosowanej próbującej sprostać problemom moralnym niesionym przez postęp współczesnej biomedycyny, zauważył zapewne, że nowe osiągnięcia w naukach szczegółowych nie idą tutaj w parze z mnożeniem problemów natury moralnej. Na dobrą sprawę są to od lat wciąż te same kwestie moralne dyskutowane w kontekście nowych osiągnięć w biomedycynie.

Problem uzyskiwania i wykorzystywania pierwotnych komórek zarodkowych, któremu będziemy się chcieli bliżej przyjrzeć w niniejszym artykule, był już przedmiotem wypowiedzi prezydentów i rządów. W słynnym już oświadczeniu z 9 sierpnia 2001 roku, prezydent Stanów Zjednoczonych George W. Bush przedstawił stanowisko swojej administracji odnośnie finansowania z funduszy federalnych (a więc z pieniędzy podatników) badań nad komórkami macierzystymi pozyskiwanymi z ludzkich zarodków. Swoją wypowiedź Bush zaczyna od tego, że zarodki takie już istnieją – pokaźna ich liczba pozostaje po próbach zapłodnienia *in vitro*. Komórki macierzyste, które można z nich uzyskać, będą mogły – wedle prognoz naukowców – być wykorzystywane w opracowaniu terapii nieuleczalnych dotąd chorób, takich

jak np. choroba Parkinsona i choroba Alzheimera. Komórki takie można uzyskiwać również od dorosłych osobników, ale badania nad komórkami macierzystymi pozyskiwanymi z zarodków uznane są za bardziej obiecujące. Ponieważ jednak ich uzyskiwanie wiąże się z niszczeniem zarodków, badania te wywołują poważny problem natury etycznej. Prezydent Bush podnosi w związku z tym dwie, fundamentalne w jego przekonaniu kwestie: (1) czy poddane kriokonserwacji ludzkie zarodki są życiem ludzkich istot i w związku z tym czymś wartościowym, co podlega ochronie, (2) jeśli zarodki i tak wcześniej czy później będą zniszczone, to czy ich istnienie nie może posłużyć większemu dobru, badaniom, które mogłyby uratować i poprawić jakość życia innych istot [2 s. 9–11]. Przywołuję tutaj dylematy, na jakie wskazał prezydent Bush, ponieważ mimo iż od wydania oświadczenia minęło już pięć lat, debata nie jest ostatecznie zakończona, a wątpliwości przytaczane przez Busha powtarzają się w trakcie wszystkich międzynarodowych i krajowych debat nad wykorzystaniem komórek macierzystych, również w tej prowadzonej od ubiegłego roku w naszym kraju.

Bush deklaruje się w swoim oświadczeniu jako zdecydowany zwolennik naukowego postępu i równocześnie jako człowiek wierzący, zatroskany o przestrzeganie respektu należnego ludzkiemu życiu. Mając na uwadze ambiwalentny charakter badań, stwierdza ostatecznie, że federalne fundusze należy przeznaczyć na badania na już istniejących (sponsorowanych dotąd przez prywatne fundusze) ponad 60 zróżnicowanych liniach komórkowych, otrzymanych ze zniszczonych uprzednio zarodków. W ten sposób można by kontynuować obiecujące projekty nie podejmując dramatycznych decyzji o życiu i śmierci [2 s. 13]. Podobne rozwiązanie problemu badań nad zarodkowymi komórkami macierzystymi przewidywał wstępny projekt Unii Europejskiej. Chociaż rozwiązanie takie wydaje się kompromisowe, nie zadowala żadnej ze stron zarysowanego wyżej sporu. Dla jednych jest zbyt liberalne, ponieważ dopuszcza pośrednie korzystanie ze zniszczonych zarodków otwierając drogę dalszym badaniom, dla drugich zbyt restryktywne, ponieważ nie pozwala na wyprowadzanie z zarodków nowych linii komórkowych, a już istniejące mogą się okazać niewystarczające do prowadzenia badań. W niniejszym artykule będziemy chcieli się bliżej przyjrzeć racjom podawanym tak „za”, jak i „przeciw” prowadzeniu kontrowersyjnych badań.

PROPONOWANE OGRANICZENIA

Żywo zainteresowani postępem badań nad zarodkowymi komórkami macierzystymi naukowcy nie lekceważyli i nie lekceważą moralnych niepokojów zgłaszanych pod adresem prowadzenia tego rodzaju projektów badawczych. Jeszcze zanim prezydent Bush wygłosił cytowane we wstępie orędzie, w którym ograniczył finansowanie dyskusowanych badań do już wyprowadzonych z ludzkich zarodków linii komórkowych, komisja etyczna powołana przez firmę *Geron* (1998 r.) przedstawiła

szereg warunków, których winno się w tych badaniach przestrzegać. Stwierdzały one, co następuje:

- (1) Blastocysta (stadium rozwojowe, w którym pobiera się komórki zarodkowe) musi być traktowana z respektem należnym ludzkiej tkance embrionalnej.
- (2) Kobieta względnie małżeństwo, które jest dawcą blastocysty uzyskanej w programie *in vitro*, musi wyrazić pełną i świadomą zgodę na wykorzystanie blastocysty do badań i wyprowadzenie z niej linii komórkowych.
- (3) Badania nie mogą obejmować klonowania reprodukcyjnego ani tworzenia chimer.
- (4) Uzyskiwanie i rozwój warstwy pożywki koniecznej do wzrostu pierwotnych komórek zarodkowych *in vitro* nie może naruszać norm przyjmowanych w badaniach na ludziach lub zwierzętach.
- (5) Wszystkie badania muszą być prowadzone z poszanowaniem zasad ogólnej sprawiedliwości.
- (6) Badania muszą być dodatkowo (oprócz kontroli w obrębie prowadzącej je instytucji) zaaprobowane przez niezależną komisję etyczną [9 s. 31–36].

Powyższe warunki, które w intencji komisji etycznej firmy *Geron* miały być wstępem do publicznej debaty, dotyczą zasadniczo dwóch istotnych kwestii: moralnego statusu blastocysty oraz zgody dawców na wykorzystania blastocyst do badań. Problem sprawiedliwego korzystania z wyników badań jest wtórny w tym sensie, że zakłada dopuszczalność samych badań. Zakaz klonowania reprodukcyjnego i tworzenia chimer oparty jest na normie nakazującej szacunek dla ludzkiego życia, a więc nawiązuje do postawionego w pierwszym warunku problemu moralnego statusu wczesnych faz rozwojowych człowieka. Nie ulega wątpliwości, że przedmiotem gorących sporów wśród etyków jest właśnie ów pierwszy warunek. Pozostałych nikt nie podważa, dyskutuje się co najwyżej sposób, w jaki warunki te miałyby być respektowane (np. procedurę wyrażania zgody przez dawców na wykorzystanie blastocyst). Problem normatywnego statusu zarodka powrócił również w cytowanym już oświadczeniu prezydenta Busha, wydanym dwa lata po próbie „skodyfikowania” moralnych niepokojów przez firmę *Geron*. Problem ten powraca zresztą do bioetycznych debat już ponad dwadzieścia lat – dokładnie od rozpoczęcia prób zapłodnienia pozaustrojowego.

PROPONOWANE ROZWIĄZANIA

Zdecydowanie „tak”

Zwolennicy prowadzenia badań na macierzystych komórkach zarodkowych którzy nie widzą żadnych racji, by uznawać normatywny status ludzkiego zarodka, nie widzą też powodów do moralnego niepokoju w prowadzeniu badań. Przeciw możliwości uznania normatywnego statusu zarodka przemawiają ich zdaniem dwie kwestie:

- (1) trudności z jednoznacznym określeniem, że człowiek po urodzeniu i przed urodzeniem to jeden i ten sam organizm przywoływane też często jako tzw. problem ujednostkowania zarodka,
- (2) brak wykształconych struktur nerwowych, które są podstawą rozumności i wolności człowieka.

Pierwsza trudność miałyby być powodowana totipotencjalnością komórek wczesnego zarodka oraz możliwością pojawienia się bliźniąt monozygotycznych, druga wspomnianym brakiem struktur nerwowych, które warunkują ekspresję właściwej dla człowieka rozumności. Ostatecznie proponuje się mówić o personifikacji (osobowym charakterze) zarodka dopiero około czternastego dnia po poczęciu [11 s. 191, 14 s. 29]. Powstanie bliźniąt monozygotycznych jest już wtedy wykluczone, a w rozwijającym się zarodku pojawia się smuga pierwotna – początek układu nerwowego. Ponieważ system nerwowy człowieka jest podstawą rozumności warunkującą szczególną rolę człowieka wśród istot żyjących, na tym etapie rozwoju mielibyśmy już obowiązek traktowania zarodka w sposób szczególny. Do tego czasu prowadzenie badań na zarodkach, w tym także pozyskiwania z nich komórek macierzystych, jest dopuszczalne. Nie brak też stanowisk, zgodnie z którymi moment personifikacji należy przesunąć na późniejsze okresy rozwojowe, np. na trzeci trymestr ciąży [18]. W kontekście sporu o prowadzenie badań nad macierzystymi komórkami zarodka interesują nas jednak wcześniejsze stany rozwojowe. Perspektywy sukcesu miałyby aż nadto tłumaczyć ich prowadzenie. Należy oczywiście respektować zgodę dawców i zadbać o stosowne prawo regulujące procedury badawcze, a także mieć na uwadze troskę o respektowanie ewentualnych patentów i w przyszłości zadbać o sprawiedliwy dostęp pacjentów do wyników badań. Ograniczeniu podlegają tutaj zasadniczo procedury badawcze, a nie badania jako takie.

Niezdecydowanie ...

Dla autorów, którzy normatywnego statusu zarodka nie rozumieją jako sytuacji czarno-białej, hasłem wywoławczym w dyskusji na temat statusu zarodka jest „potencjalność” bądź „partycypacja”. Sprawę osobowego statusu zarodka uznaje się tutaj za wątpliwą [7, 8 s.55–74, 24 s. 107–124]. Określenie zarodka mianem „potencjalnej osoby” oznacza najczęściej, że zarodek status osoby posiada potencjalnie, to znaczy, że może, aczkolwiek nie musi się nią stać. Osoba ludzka jest istotą, która posiada zdolność do ekspresji charakterystycznych dla gatunku cech (świadomości, myślenia, języka). Ludzki zarodek nie ma jeszcze tych zdolności, brak mu również psychofizjologicznej struktury, która stanowi podstawę ich ekspresji, ma natomiast potencjalność rozwinięcia ich w przyszłości [20 s. 1–2]. Potencjalność tę winniśmy brać pod uwagę, kiedy podejmujemy działania ryzykowne dla jego istnienia, fakt możliwości rozwinięcia określonych cech w przyszłości nie może być jednak powodem, dla którego będziemy przyznawali zarodkowi takie same prawa jak już urodzonym ludziom. Podobnie z faktu, że Jimmy Carter w roku 1930 (mając 6 lat) był już potencjalnym prezydentem USA, nie wynika, że miał prawo do kierowania armią [6 s. 145].

Uznanie osobowej potencjalności zarodka zdaniem jednych nie może stanowić żadnej podstawy, by w sposób szczególny chronić jego życie [25 s. 193], inni twierdzą, że ludzki zarodek zasługuje wprawdzie na szczególny respekt, ponieważ jest „ludzki”, ale można usprawiedliwić posłuszenie się nimi w badaniach [27 s. 390–396]), jeszcze inni broniąc osobowej potencjalności podkreślają absolutny respekt dla zarodka od momentu uformowania się zygoty [8 s. 68–70]. Ze względu na swoje przyporządkowanie do realizacji idealnego wzorca osoby zarodek miałby uczestniczyć w jej moralnej godności pozostając pod ochroną prawa osoby do życia [24 s. 107–124]. Autorzy wykluczający wykorzystanie zarodków do badań podkreślają również w swoich opiniach element „niepewności”. Trudno z pewnością orzec czy zarodek jest, czy też nie jest osobowym bytem, a jeśli tak, to lepiej przyjąć w działaniu strategię, która domniemywa jego osobowy charakter [12 s. 50–52].

Ci, którzy bądź powątpiewają w możliwość uznania normatywnego statusu zarodka, bądź uważają, że lepiej skorzystać z innych sposobów uzyskiwania komórek zarodkowych, proponują, by zamiast prowadzić niekończące się spory na temat dalece kontrowersyjnych projektów, kontynuować badania na już wyprowadzonych z zarodków liniach komórkowych. Taka była kompromisowa decyzja prezydenta Busha, taką też propozycję zawierał projekt Unii Europejskiej; zawierał, ponieważ ostatecznie został w takim brzmieniu odrzucony. Prowadzenie badań na już wyprowadzonych liniach komórkowych też nie jest pozbawione kontrowersji zważywszy na sposób, w jaki zostały uzyskane. Niezdecydowani nie wykluczają też w sposób kategoriyczny wykorzystywania zarodków do badań. Istniejące wątpliwości dotyczące statusu zarodka są tutaj – w ich przekonaniu – usprawiedliwiane perspektywą dobroczynnych skutków, co podkreślam, ponieważ ta umiejscowiona przeze mnie „w środku” grupa dyskutantów nie twierdzi, że niszczenie zarodków jest bezproblemowe, podkreśla jednak, że jeśli los zarodków i tak jest przesądzony, to ich wykorzystywanie do badań trudno uznać za karygodne.

Zdecydowanie „nie”

Opinia „*absolutnie nie*” jest równoznaczna z uznaniem, że ludzki zarodek to już ludzkie życie, chociaż na bardzo wczesnym etapie rozwoju. Ponieważ życie ludzkie podlega ochronie z racji posiadania osobowego statum, ochronie podlega również życie ludzkich zarodków. Zwolennicy tego stano-wiska odpowiadając na zarzuty swoich adwersarzy zwracają uwagę na to, że totipotentne komórki wczesnego zarodka pozostają między sobą we wzajemnych relacjach, a każda z nich zajmuje w rozwijającym się zarodku określone miejsce [26 s. 58–61, 22 s. 173]. Istnieje zatem racja {Wydaje się zatem słuszne,}, aby uznać, że już na tym etapie rozwoju mamy do czynienia z rozwijającym się organizmem, a nie grupą luźno połączonych ze sobą, totipotencjalnych komórek. Zarodek podlega wprawdzie w trakcie rozwoju nieustannym zmianom, tym jednak, co pozostaje stabilne, jest jego szlak rozwoju¹. Prowadzi on poprzez różne stany, które są właściwe wszystkim osobnikom należącym do danego gatunku. Zarodek nie jest dorosłym człowiekiem podobnie jak żołądź, w którym rozpoczęły się procesy wegetacji, nie jest jeszcze dębem. Jest tym samym,

¹Przypisy na końcu artykułu.

choć nie takim samym organizmem. Wynikałoby stąd, iż można przyjąć, że zarodek i przychodzące na świat dziecko to jedno i to samo ludzkie istnienie. Krytykę traktowania zarodka w kategoriach ujednostkowionego organizmu wytrzymuje również taka interpretacja monozygotycznego bliźniactwa, która powstanie bliźniąt tłumaczy destrukcją pierwotnego indywiduum i powstaniem w jego miejsce dwóch nowych organizmów, bądź wyłonieniem się z pierwotnego zarodka kolejnego organizmu, który od tego momentu rozpoczyna własny cykl życiowy.

Uzależnienie osobowego statusu zarodka od rozwoju i funkcjonowania układu nerwowego (mózgu) sprowokowane zostało w dużej mierze przyjęciem definicji śmierci mózgowej. Ponieważ pojęcie śmierci mózgowej uznane zostało za śmierć człowieka, moment rozpoczęcia funkcjonowania układu nerwowego zaczęto analogicznie łączyć z uznaniem początku istnienia indywidualnego ludzkiego organizmu (mającego z tego tytułu osobowy status). Jakkolwiek śmierć mózgu (dokładnie pnia mózgu) powoduje zerwanie wewnętrznej jedności żyjącego organizmu, zarodek znajduje się w innej sytuacji. W trakcie morfogenezy zaobserwować można wysoce dynamiczny proces stopniowej organizacji ciała, w tym także systemu nerwowego i struktur mózgowych kierowany wewnętrzną zasadą zapisaną w genomie. Jako taka, zasada ta poprzedza w swej aktywności aktywność mózgu, trudno więc pojawienie się struktur mózgowych uznać za nową jakość, są one raczej „wpisane” w ciąg rozwojowych przemian [1 s. 148, 23 s. 175].

Jeśli nie można wykluczyć, że zarodek stanowi już organizm ludzki w początkowym okresie rozwoju, to możliwość „poświęcenia” istnienia zarodków na rzecz opracowania dobroczynnych terapii w ogóle nie wchodzi w grę, oznacza bowiem poświęcenie życia jednych dla ratowania drugich. Możliwość prowadzenia badań na już uzyskanych z zarodków linii komórkowych jest traktowana z dużą rezerwą. Najbardziej radykalni wskazują tutaj na orzeczenia Trybunału Norymberskiego, który wykluczył korzystanie z wyników badań uzyskanych w sposób moralnie niegodziwy.

PROBLEM POŚWIĘCENIA „ŻYCIA ZA ŻYCIE”

Istnieją wprawdzie autorzy, którzy nie widzą powodów, by odrzucać tworzenie zarodków wprost dla badań [21 s. 122–128], zdaniem większości jednak, w badaniach należy raczej wykorzystywać już istniejące zarodki, pozostałe po programie *in vitro*. Ich los jest przesądzony, ponieważ jeśli nie zostaną implantowane, zostaną zniszczone. Wydaje się zatem, że lepiej jeśli zostaną wykorzystane do badań niż poddane destrukcji. Powyższe dywagacje mógłby ktoś krótko skwitować: nad czym się tu w ogóle zastanawiać, skoro zarodki i tak będą zniszczone. Na dobrą sprawę pozostaje nam jedynie wybór tego, w jaki sposób zostaną zniszczone. Autorzy reprezentujący stanowisko, zgodnie z którym zarodek posiada normatywny status osoby, też nie znajdują tutaj zadowalającego rozwiązania. Proponowane rozwiązanie w postaci adopcji zarodków nie rozwiązuje problemu. Trudno sobie wyobrazić, że do punktów prowadzących program *in vitro* zaczną się masowo zgłaszać kobiety gotowe do implantacji zarodków. Jeśli zatem nawet jakiejś liczbie z nich stworzy się szansę

rozwoju, problem pozostanie. Ponadto nie mogąc zapewnić rozwoju wszystkim trzeba będzie najprawdopodobniej opracować jakieś kryteria selekcji. Jakie? Nawet zakładając najbardziej optymistyczny scenariusz, zgodnie z którym każdy z zamrożonych zarodków znajdzie potencjalnych rodziców, nie unikniemy problemów związanych z selekcją. Czy kobieta zgodzi się na implantację zdając sobie sprawę, że zarodek może być obciążony genetycznymi bądź strukturalnymi wadami? Czy korzystając z diagnostyki prenatalnej – zrozumiałej w takiej sytuacji – będzie chciała urodzić poważnie chore dziecko, jeśli prawo pozwala jej w takiej sytuacji na aborcję? A jeśli nie adopcja, to czy istnieje jakieś inne godziwe rozwiązanie problemu?

Dobroczyzna perspektywa

Mając na względzie przesądzony los zarodków, szereg autorów jest zdania, że „lepiej zrobić coś niż nic”, logicznie rzecz biorąc jest bowiem lepiej czynić coś dobrego, niż nie czynić żadnego dobra. Jeśli opracowanie terapii przy pomocy komórek macierzystych zarodka może się okazać zbawienne, lepiej posłużyć się w tym celu zarodkami niż je wprost ziszczyć [10 s. 169]. I nie chodzi bynajmniej o to, że zarodek nie stanowi żadnej wartości, ale o to, czy wobec zaistnienia szczególnych warunków i dla najlepiej rozumianych społecznych racji, nie można usprawiedliwić jego niszczenia. Powszechnie uznajemy, że powinniśmy się starać o ulżenie innym w bólu, troska o chorych i cierpiących jest jednym z podstawowych społecznych obowiązków. Wziąwszy pod uwagę liczbę osób cierpiących na choroby, których terapia mogłaby być opracowana przy wykorzystaniu komórek macierzystych zarodka, niektórzy z autorów powołują się w tym miejscu na „imperatyw współczucia”. Nie może być poważniejszej racji dla usprawiedliwienia poświęcenia jednego z członków ludzkiej rodziny dla dobra innych, jak uwolnienie mniej więcej połowy światowej populacji od nieuleczalnych dotąd chorób [13 s. 152–155]. Problem jednak w tym, czy możliwe jest pogodzenie respektu dla normatywnego statusu zarodka z wykorzystywaniem go do badań? Czy deklarowanie respektu dla zarodków nie wyklucza ich destrukcji?

Na pytanie to padają zasadniczo dwie różne odpowiedzi. Zgodnie z pierwszą, zarodkom nie można odebrać życia bez odpowiednio ważnej racji. Tą odpowiednio ważną racją mogą być badania naukowe, jeśli dodatkowo zostaną spełnione cztery warunki:

- (1) cel prowadzonych badań może być zrealizowany tylko przy użyciu zarodków,
- (2) do badań można wykorzystywać zarodki tylko do czternastego dnia po poczęciu z uwagi na wspomniany już problem ujednostkowania zarodka,
- (3) naukowcy powinni unikać traktowania zarodka jako rodzaju własności, wykluczone jest zatem handlowanie zarodkami,
- (4) zdając sobie sprawę, że niszczenie zarodków musi być usprawiedliwione proporcjonalną racją, naukowcy winni wykorzystywać do badań tylko taką liczbę zarodków, która jest konieczna do osiągnięcia celu badawczego, a pozostały po badaniach materiał biologiczny traktować podobnie, jak traktuje się pozostałe po badaniach ludzkie szczątki.

Wymienione warunki miałyby godzić uznawanie szczególnego statusu ludzkiego zarodka z jego intencjonalnym niszczeniem [16 s. 16–23].

Niegodziwość środków

Druga odpowiedź na pytanie o możliwość poświęcenia ludzkich zarodków dla szczytnych celów opracowania dobroczynnych terapii, zdecydowanie wyklucza, jak możemy się już domyślać, jakoby ich normatywny status można było pogodzić z wykorzystywaniem ich do badań. Przedstawiciele takiego stanowiska podkreślają, że w działaniu ważna jest nie tylko perspektywa celów, lecz również perspektywa środków, ważne jest nie tylko to, co uda się nam osiągnąć, ale również w jaki sposób to osiągamy. Nie istnieje absolutny nakaz uczynienia wszystkiego, co tylko możliwe, by uchronić przyszłe pokolenia od przewidywanych przez nas zagrożeń, tymczasem zwolennicy badań na komórkach macierzystych zarodka próbują wręcz dowieść winę tym, którzy się im dzisiaj sprzeciwiają, winę za rezygnację z pomocy tym, którzy przyjdą po nas. To prawda, że winniśmy mieć na uwadze troskę o psychofizyczną kondycję przyszłego pokolenia, ci jednak, którzy już zaistnieli – na razie jako zarodki – są nie mniej, a nawet bardziej realni niż ci, którzy będą żyli w przyszłości. Nie można niszczyć teraźniejszości w trosce o przyszłość [15 s. 14–15]. Próbując odpowiedzieć na pytanie co począć z magazynowanymi, poddanymi kriokonserwacji zarodkami, można by się zatem cofnąć do momentu, w którym zdecydowaliśmy się na ich tworzenie i przechowywanie. Jest to bowiem problem, który mamy niejako „na własne życzenie”, nie zostaliśmy przed nim postawieni jak lekarz, który nie mogąc ratować wszystkich, musi wybrać tych, którym udostępni ratującą życie terapię. Problem ten sami stworzyliśmy. Może więc należałoby się zastanowić nad rezygnacją z problemotwórczych działań? Nawet jeśli, nie zmienia to faktu, że jakiejś odpowiedzi na pytanie o to, co zrobić z już zamrożonymi zarodkami udzielić trzeba. Kiedy uznamy, że normatywny status zarodka wyklucza posłużenie się nim w charakterze środka do celu, podobnie jak wykluczamy przedmiotowe traktowanie każdego urodzonego już człowieka, wówczas jedynym wyjściem wydaje się pozwolenie zarodkom na obumarcie. Byłoby to analogiczne rozwiązanie w stosunku do sytuacji, w których nie jesteśmy w stanie uratować życia pacjenta, z tą jednak różnicą, że śmiertelnej choroby pacjenta nie wywołaliśmy i nie ponosimy za nią żadnej odpowiedzialności, życie zarodków zostało natomiast przez nas zapoczątkowane. Zapłodnienie *in vitro* zawsze oznacza ryzyko zniszczenia zarodków, nawet jeśli nie jest kierowane wprost taką intencją.

PRÓBY ROZWIĄZANIA PROBLEMU

Z uwagi na opisane wyżej kontrowersje część autorów jest zdania, że lepiej skoncentrować badania na komórkach macierzystych tkanek. Innym proponowanym tu rozwiązaniem jest prowadzenie badań na już wyprowadzonych z komórek macierzystych zarodka liniach komórkowych. Takie mniej więcej rozwiązanie zaproponował prezydent Bush w swoim oświadczeniu cytowanym we wstępie do niniejszego artykułu. Wydawałoby się, że dla obrońców normatywnego statusu zarodka jest to stanowisko do przyjęcia, tymczasem wywołało ono wiele głosów krytycznych. Czy można zatem uznać kompromis w postaci ograniczenia badań do już wyprowadzonych z zarodków linii komórkowych za moralnie dopuszczalny?

Badania na liniach komórkowych i problem współdziałania w złu

W głosach krytycznych wobec proponowanego kompromisu pojawiła się najpierw obawa o to, że akceptacja badań na już wyprowadzonych liniach komórkowych oznacza pośrednio wyrażenie zgody na dalsze ich pozyskiwanie z zarodków, ponieważ istniejące już linie komórkowe nie wystarczą do osiągnięcia zamierzonych celów badawczych. Gdyby nawet miało nie dojść do takiej sytuacji, nie można zapominać, że linie komórkowe wyprowadzone zostały kosztem zabijania istot ludzkich w stadium zarodkowym. Zdaniem niektórych, nie powinniśmy stąd uczestniczyć w takim procederze, bez względu na to jak szlachetnym celom miałyby on służyć [19 s. 101–105]. Możliwy jest również taki scenariusz wydarzeń, w którym ci, którzy prowadzą badania na wyprowadzonych z zarodków liniach komórkowych, nie mieliby nic wspólnego z ich niszczeniem. Dopuszczone do badań linie komórkowe zostałyby nadto wyprowadzone przed określoną datą (przewiduje to oświadczenie Busha, przewidywał również odrzucony projekt Unii Europejskiej), która oznacza kres niszczenia zarodków². Linie komórkowe są pluripotentne, a więc badania na nich nie są niszczeniem życia ludzkich istot. Czy w takiej sytuacji można badania usprawiedliwić?

Postawiony problem znów nie jest nowy, stanowi uszczegółowienie bardziej ogólnego pytania, a mianowicie o to, czy można korzystać z wyników badań, które zostały uzyskane w moralnie naganny sposób? Na pytanie to znów – niestety – nie pada jedna tylko odpowiedź. Zdecydowani przeciwnicy uznają takie badania za niegodziwe, ponieważ:

- (1) działanie takie oznacza obiektywne współdziałanie w złu,
- (2) jest próbą uzyskania korzyści ze zła popełnionego przez innych.

W jaki sposób tłumaczą swoje stanowisko? Nie dysponowalibyśmy liniami komórkowymi, gdyby uprzednio nie zniszczono ludzkiego życia. Oczywiście jest stąd, że ktoś, kto uczestniczył w obu etapach badań: pozyskiwania komórek z ludzkich zarodków i prowadzeniu badań na wyprowadzonych z nich liniach komórkowych, ma ewidentny udział w złu [5 s. 151]. A jeśli ktoś nie uczestniczył w pierwszym etapie badań? Wtedy prawdopodobnie wie lub powinien wiedzieć, jakie jest pochodzenie materiału badawczego. Jeśli wie, *implicite* miałby godzić się na sposób jego otrzymywania. Prowadzenie badań na liniach komórkowych otrzymanych z zarodków porównywane jest tutaj do korzystania z wyników eksperymentów prowadzonych przez nazistów w trakcie II wojny światowej i jako takie uznane za moralnie nieusprawiedliwione, tym bardziej że z badań czerpane są wymierne korzyści [17 s. 43–47]. Cóż na to drugie z zapowiedzianych stanowisk?

Jego zwolennicy starają się przede wszystkim odpowiedzieć na pytanie o to, czy prowadzenie badań na liniach komórkowych jest współdziałaniem w złu. Odpowiedzialność, jaką ponosimy za współdziałanie, zależy od rodzaju naszej kooperacji w działaniu drugich. O współdziałaniu nie można mówić w przypadku czynu, który stanowi już zamkniętą przeszłość, współdziałanie zakłada bowiem jakiś aktualny związek pomiędzy działaniami dwóch podmiotów. Związek ten może mieć charakter formalny lub materialny – stosownie do tego będziemy mówili o formalnym i materialnym

współdziałaniu w złu. Współdziałanie jest formalne, jeśli uczestniczenie w moralnie złym akcie jest przez współdziałającego bezpośrednio zamierzone. W diskutowanym problemie z współdziałaniem takim mielibyśmy do czynienia wówczas, gdyby naukowiec prowadzący badania na liniach komórkowych pochodzących z komórek macierzystych zarodka wszedł w swoisty układ z naukowcem dostarczającym mu materiału do badań. Układ taki oznaczać mógłby np. import linii komórkowych do badań, albo wykonywanie linii komórkowych dostarczanych przez prywatne laboratoria nieobarczone państwowymi restrykcjami (to też rodzaj „importu”). Jakkolwiek „importerzy” mogliby się tłumaczyć, że sami nie podejmują moralnie kontrowersyjnych działań, nie zmienia to faktu, że akceptują nie tylko import, lecz również ich pozyskiwanie. Gdyby jednak ustalić i na dodatek surowo przestrzegać (co może się okazać nader skomplikowane) określonej daty w przeszłości, po której zaprzestano niszczenia zarodków w celu uzyskiwania żądanych linii komórkowych, sytuacja byłaby nieco inna: badacz nie współdziałalby w złu, korzystałby jedynie z niegodziwie uzyskanych wyników badań. Nie można by mu też wprost zarzucić, że prowadzenie badań na liniach komórkowych jest równoznaczne z akceptacją sposobu, w jaki zostały otrzymane. Może tak być, ale nie musi. Wiedza o tym, jak zostały otrzymane linie komórkowe, nie generuje sama z siebie akceptacji niszczenia zarodków. Nawet gdyby badacz akceptował sposób, w jaki zarodki zostały otrzymane, ponieważ rzecz działa się w przeszłości i została zamknięta w tym sensie, że zaniechano niszczenia zarodków, zanim badacz zaczął realizować swój projekt, nie można by mu zarzucić formalnego współdziałania w złu [3 s. 37–38].

Materialny współdziałal w złu pojawia się wówczas, gdy współdziałający materialnie w spełnianiu czynu nie miał intencji jego spełnienia. Materialny współdziałal w złu może być bezpośredni bądź pośredni. Jeśli – jak wspomnieliśmy wyżej – dalsze niszczenie zarodków zostałyby już zdecydowanie wykluczone, to prowadzenie badań na liniach komórkowych nie może na pewno oznaczać bezpośredniego, materialnego współdziałania z niszczeniem zarodków, ponieważ pierwsze w sekwencji działań już się nie dokonuje. Współdziałanie takie miałoby miejsce, gdyby proceder niszczenia zarodków trwał nadal. Linie komórkowe wyprowadzone ze zniszczonych zarodków są ich biologiczną kontynuacją, nie są już jednak żywymi organizmami, lecz jedynie uzyskanym z nich materiałem biologicznym. Czy przy postawionym wyżej warunku zaprzestania niszczenia zarodków można mówić o pośrednim, materialnym współdziałaniu w złu? Gdyby uznać, że linie komórkowe są kontynuacją życia zarodków, wówczas tak; biorąc pod uwagę, że życie zarodków zostało już zakończone, nie można by mówić o tego rodzaju udziale. Bez względu jednak na to, które z powyższych rozwiązań przyjmujemy, samo pośrednie materialne współdziałanie w złu nie wystarczy do tego, by uznać że działanie jest niegodziwie moralnie. Czysto fizyczna ciągłość nie wystarcza do identyfikowania aktu niszczenia zarodków z prowadzeniem badań na liniach komórkowych [3 s. 39–40]. Ostatecznie zatem, prowadzenie badań na wyprowadzonych z zarodków liniach komórkowych można by próbować usprawiedliwiać, z zastrzeżeniem jednak, że niszczenie zarodków w celach badawczych jest już tylko historią.

Możliwość korzystania z wyników badań

Jeśli wykluczy się element współdziałania, pozostaje jedynie delikatna kwestia korzystania z niegodziwie uzyskanych wyników badań. Nie pierwszy raz stajemy przed takim problemem i nie jest dla nas tajemnicą, że mimo niegdyś wyrażanych sprzeciwów, z wyników niegodziwie uzyskanych badań ludzkość korzysta. To oczywiście nie jest argument. Jakie argumenty można tutaj przedstawić? Wyprowadzone już linie komórkowe nie są życiem ludzkich istot. Gdyby prowadzenie badań polegające na wykorzystywaniu istniejących już linii komórkowych połączyć ze zdecydowanym sprzeciwem wobec dalszego niszczenia ludzkich istnień w stadium zarodkowym, wówczas można by się zastanawiać nad ich moralną dopuszczalnością. Wyrażając taką właśnie opinię, pragnę zwrócić uwagę na dwie kwestie. Po pierwsze, gdyby (co wydaje się wątpliwe, aczkolwiek nie niemożliwe) rzeczywiście została przyjęta jakaś data, począwszy od której absolutnie nie wykorzystujemy zarodków do badań, należałoby to, w moim przekonaniu, potraktować pozytywnie. Okazuje się bowiem, że każda epoka ma swoje problemy z naruszaniem wartości ludzkiego życia, z którymi musi się jakoś uporać. W dalekiej przeszłości zrezygnowano z tortur, potem zaczęto dyskutować na temat dopuszczalności kary śmierci, wprowadzono konwencje wojenne, nieustannie trwają spory o aborcję. Możliwość uzyskiwania z zarodków komórek macierzystych na nowo przywołała spór o normatywny status ludzkiego zarodka. Efekty tych debat najczęściej nie zadowalają w pełni żadnej ze stron, ale już samo ich prowadzenie jest dowodem na to, że pozostajemy wrażliwi na wartość ludzkiego życia, mimo iż mamy wątpliwości co do jego normatywnego statusu. Gdyby Unia Europejska zrezygnowała całkowicie z prowadzenia badań na zarodkach (w niektórych krajach Unii badania takie są prowadzone w tej chwili bez większych ograniczeń), wówczas stanowiłoby to jakąś formę przyznania się do błędu. Jak wynika z prowadzonych analiz, szereg naukowców prowadzi dzisiaj te badania bez moralnych skrupułów, wspierani przez etyków, przekonani, że nie oznaczają one niszczenia ludzkiego życia. Z tego właśnie powodu porównywanie ich do nazistów nie wydaje mi się właściwe. Myślę też, że tego rodzaju oskarżenia wcale nie skłaniają oskarżanych do zaprzestania badań i utrudniają rzeczową dyskusję. Po wtóre, analizowany problem nie jest jedynym przykładem możliwości akceptowania skutków przy zdecydowanym sprzeciwie wobec sposobów, dzięki którym te skutki się pojawiły. Można się zdecydowanie sprzeciwiać klonowaniu reprodukcyjnemu, co w niczym nie zmienia faktu, że jeśli dzięki tej metodzie urodzi się dziecko, będzie ono zasługiwać na taki sam szacunek jak każde inne, nie będziemy mu też wypominać, ile ludzkich istnień postradało życie, żeby mogło się urodzić.

W praktyce zarysowane wyżej stanowisko może się okazać trudne do zrealizowania. Naukowiec będzie musiał bowiem najpierw zbadać źródło pochodzenia linii komórkowych, a dopiero potem je same. Zbadanie źródła pochodzenia materiału badawczego będzie konieczne, jeśli chcemy wykluczyć kooperację typu: „ty niszczysz zarodki, ja badam już tylko komórki”. Taka kooperacja oznacza bez wątpienia współdziałanie w zło. Jak długo zatem niszczenie zarodków jest dopuszczalne, prowadzenie badań na wyprowadzonych z nich liniach komórkowych jest w tym sensie współdziałaniem w zło, że stanowi pośrednią przyczynę ich niszczenia.

Na zakończenie warto jeszcze zwrócić uwagę najpierw na przytaczane w analizowanej debacie racje, które – chociaż nie mają nic wspólnego z oceną natury moralnej – bywają w niej przytaczane na równi z argumentami natury etycznej.

„Bądźmy realistami” – apelują bardzo często zwolennicy badań na ludzkich zarodkach. Nie jesteśmy w stanie zatrzymać naukowego postępu ani powstrzymać ciekawości naukowców. Badania takie są od lat prowadzone i zapewne prowadzone będą nadal. Jestem zdecydowanie za realizmem! Równie zdecydowanie odrzucam jednak wyciąganie wniosków natury normatywnej z zastanego etosu. Realizm skłania mnie do przypuszczenia, że kontrowersyjne badania będą nadal prowadzone. Zdecydowane protesty, które pojawiają się w momencie nowych odkryć i zastosowań medycyny, najpierw tracą na intensywności, potem cichną, a po czasie mało kto się sprzeciwia. Opinia społeczna przyzwyczajają się z czasem do tego, co ją na początku tak gorąco oburzało, w niczym nie zmienia to jednak natury oprotostowywanych działań. Z samego faktu prowadzenia badań nie można wnioskować ani o ich dopuszczalności, ani o niedopuszczalności. Nie widzę stąd powodów, by pod naciskiem opinii publicznej należało zmieniać zdanie. Zwolennicy badań na komórkach macierzystych zarodka zwykli powtarzać, że sukces w opracowaniu terapii sprawi, że ich przeciwnicy zamilkną. Być może niektórzy zamilkną, jestem jednak zdania, że podobnie jak etos, tak skuteczność działań nie decyduje jeszcze o ich moralnej dopuszczalności, a prawdopodobieństwo sukcesu może być równie wysokie jak prawdopodobieństwo porażki.

Naiwnie byłoby sądzić, że debata na temat badań na zarodkach wolna jest od politycznych nacisków. Świadczy o tym już sam fakt, że staje się ona przedmiotem społecznych debat, a ostateczne decyzje włączenia się danego kraju w programy badawcze podejmowane są na szczeblu administracyjnym. Pluralistyczne społeczeństwo będzie z konieczności podzielone w swoich poglądach na najbardziej kontrowersyjne kwestie, w tym także na tę dyskutowaną w niniejszym artykule, co nie zmienia faktu, że naukowcy i politycy dążyć będą do jakiegoś konsensu, ponieważ bez niego niepodobna przedstawić coś, co zyskało już sobie miano „krajowej polityki badań na komórkach macierzystych” [28 s. 1424]. Najbardziej wyraźnym elementem tej polityki jest problem finansowania dyskutowanych badań z państwowych funduszy. Taki też jest charakter dyskusji na ten temat prowadzonej od lat w Stanach Zjednoczonych [22 s. 217–225, 21 s. 119–124]. Nie przedstawiam tutaj historii amerykańskiej debaty, znacznie bardziej interesuje mnie bowiem charakter dyskusji prowadzonej w Polsce. Została ona zainicjowana przez Ministra Nauki i Informatyzacji, prof. Michała Kleibera, poszczególne jej etapy dostępne są na stronie internetowej tegoż mini-sterstwa³. Nie dyskutowano w jej trakcie problemu finansowania tego rodzaju badań w Polsce, bo Polski na tego rodzaju badania po prostu nie stać. Wstąpienie Polski do Unii Europejskiej wiąże się jednak z jakimś współfinansowaniem takich badań i uczestniczeniem w nich polskich naukowców. Wyrażano stąd obawy, że jeśli Polska nie wyrazi zgody na prowadzenie badań na zarodkowych komórkach macierzystych, polscy naukowcy biorący udział w międzynarodowych projektach finansowanych przez inne państwa staną wobec moralnie dwuznacznej sytuacji. Staniemy się nadto „samotną wyspą” wśród państw

prowadzących badania. Skutkiem tego ostatniego może być albo brak możliwości korzystania z pomyślnie zakończonych wyników badań, albo też korzystanie z nich za bardzo wysoką cenę. Nie można tego wykluczyć. Nie można też jednak uzależniać ocen moralnych od interesów politycznych państwa. Dodajmy jeszcze, że zgodnie z obowiązującym aktualnie w Polsce prawem, nie mamy żadnych regulacji dotyczących prowadzenia programu *in vitro*. Brak tego prawa połączony z naciskami na dopuszczenie badań na zarodkach wroży w naszym kraju dyskutowanej w niniejszym artykule debacie jeszcze długą i burzliwą przyszłość.

PRZYPISY

¹Nie podkreślam mocno faktu genetycznej tożsamości, ponieważ jeśli mamy do czynienia z jednym i tym samym – chociaż na skutek zmian rozwojowych nie takim samym – organizmem, to fakt genetycznej tożsamości jest oczywisty. Genetyczną tożsamość z zarodkiem wykazuje również pobrany od dorosłego osobnika materiał genetyczny, a po śmierci również zwłoki osobnika, którym nikt z tego tytułu nie przypisuje osobowego statusu.

²Nie podejmuję szerszej dyskusji nad decyzją Busha. Prezydent był krytykowany najpierw za to, że ze swoim oświadczeniem poczekał do czasu, aż wyprowadzono dostatecznie dużo linii komórkowych, a następnie za doprowadzenie do moralnie dwuznacznej sytuacji, w której prywatne laboratoria nadal prowadzą badania na zarodkach, a państwowe korzystają z ich wyników zachowując „czyste ręce”. Por. C.A. Cleaver, *Stem Cell Policy and the Culture of Death*, “The National Catholic Bioethics Quarterly”, Spring, 2(2002), nr 1, s. 27–33.

³www.kbn.gov.pl/komorki_macierzyste/index.html

LITERATURA

- [1] BREUER C. *Person von Anfang an? Der Mensch aus der Retorte und die Frage nach dem Beginn des menschlichen Lebens*, Paderborn - München - Wien - Zürich, Ferdinand Schöningh 1995.
- [2] BUSH GW. *On Stem Cell Research*, W: M. Ruse, C.A. Pynes (red.), *The Stem Cell Controversy. Debating the Issues*, New York, Prometheus Books 2003: 9–13.
- [3] CATALDO PJ. A Cooperation Analysis of Embryonic Stem Cell Research. *The National Catholic Bioethics Quarterly* 2002; 1: 35–41.
- [4] CLEAVER CA. *Stem Cell Policy and the Culture of Death*. *The National Catholic Bioethics Quarterly* 2002; 1: 27–33.
- [5] DOERFLINGER RM. The Ethics of Funding Embryonic Stem Cell Research: A Catholic Viewpoint. *Kennedy Institute of Ethics Journal* 1999; 2: 137–150.
- [6] FEINBERG J. 1984. Potentiality, Development, and Rights. W: *The Problem of Abortion*. Belmont, CA, Wadsworth Publishing Company 1984:145–150.
- [7] FORD NM. *Kiedy powstałem. Problem początku jednostki ludzkiej w historii, filozofii i w nauce*. tłum. W.J. Popowski. Warszawa, Wydawnictwo Naukowe PWN 1995.
- [8] FORD NM. *The Prenatal Person. Ethics from Conception to Birth*. Oxford, Blackwell Publishing 2002.
- [9] GERON ETHICS ADVISORY BOARD. *Research with Human Embryonic Stem Cells: Ethical Consideration*. *Hastings Center Report* 1999; 2: 31–36.

- [10] S J. The Ethical Use of Human Embryonic Stem Cells in Research and Therapy. W: J. Burley, J. Harris (red.) *A Companion to Genethics*. Oxford, Blackwell Publishing 2002: 158–174.
- [11] KUHSE H, SINGER P. Individuals, Humans, and Persons: The Issue of Moral Status. W: P. Singer *Unsanctifying Human Life. Essays on Ethics*. Oxford, Blackwell Publishers 2002: 188–198.
- [12] LOCKHART T. Moral Uncertainty and its Consequences. New York - Oxford, Oxford University Press 2002.
- [13] MCGEE G, CAPLAN A. The Ethics and Politics of Small Sacrifices in Stem Cell Research. *Kennedy Institute of Ethics Journal* 1999; 2: 151–158.
- [14] McMAHAN J. The Ethics of Killing. Problems at the Margins of Life. Oxford, Oxford University Press 2002.
- [15] MEILAENDER G. The Point of a Ban Or, How to Think about Stem Cell Research. *Hastings Center Report* 2001; 1: 9–16.
- [16] MEYER MJ, NELSON LJ. Respecting What We Destroy. Reflections on Human Embryo Research. *Hastings Center Report* 2001; 31, 1: 16–23.
- [17] MORACZEWSKI AS. May One Benefit from the Evil Deeds of Others. *The National Catholic Bioethics Quarterly* 2002; 1: 43–47.
- [18] MOROWITZ HJ, TREFIL JS. Jak powstaje człowiek. Nauka i spór o aborcję. tłum. B. Szacka. PIW, Warszawa, 1995.
- [19] NOVAK M. The Stem Cell Slide: Be Alert to the Beginning of Evil. W: M. Ruse, C.A. Pynes (red.) *The Stem Cell Controversy. Debating the Issues*. New York, Prometheus Books 2003: 101–105.
- [20] REICHLIN M. The Argument from Potential: A Reappraisal. *Bioethics* 1997; 11: 1–23.
- [21] ROBERTSON JA. Ethics and Policy in Embryonic Stem Cell Research. *Kennedy Institute of Ethics Journal* 1999; 2: 109–136.
- [22] RYAN KJ. The Politics and Ethics of Human Embryo and Stem Cell Research. W: M. Ruse, C.A. Pynes (red.) *The Stem Cell Controversy. Debating the Issues*. New York, Prometheus Books 2003: 213–225.
- [23] SERRA A, COLOMBO R. Identity and the Status of the Human Embryo: the Contribution of Biology. W: J. D. Vial Correa, E. Sgreccia (red.), *Identity and Statute of Human Embryo. Proceedings of Third Assembly of the Pontifical Academy for Life (Vatican City, February 14–16, 1997)* Watykan, Libreria Editrice Vaticana 1997: 128–177.
- [24] ŚLIPKO T. Granice życia. Dylematy współczesnej bioetyki. Kraków, Wydawnictwo WAM 1994.
- [25] TOOLEY M. Abortion and Infanticide. Oxford, Clarendon Press 1983.
- [26] VIAL CORREA JD. Embrion ludzki jako organizm i jako ktoś spośród nas. tłum. D. Chabrajska W: E. Sgreccia, T. Styczeń, C. Ritter (red.) *Medycyna i Prawo: Za czy przeciw życiu?* Lublin, RW KUL 1999: 56–68.
- [27] WARNOCK M. Experimentation on human embryos and fetuses. W: H. Kuhse, P. Singer (red), *A Companion to Bioethics*. Oxford, Blackwells Publishers 1998: 390–396.
- [28] YOUNG FE. A Time for Restraint. *Science* 2000; 287, 5457: 1424.

Adres autora: Al. Raclawickie 14, 20-950 Lublin

TRZY STANOWISKA W SPRAWIE KLONOWANIA LUDZKICH ZARODKÓW

Jacek HOŁÓWKA

Instytut Filozofii Uniwersytetu Warszawskiego

Autorzy książki (wśród nich i ja) na temat dopuszczalności eksperymentów na ludzkich zarodkach [1] wyróżnili trzy stanowiska dotyczące dopuszczalności takich badań: stanowisko prohibicyjne, stanowisko permissywne i stanowisko regulatywne. Każde ze stanowisk można szczegółowo scharakteryzować przez przytoczenie głoszonych przez nie przekonań oraz wypływających z tych przekonań zaleceń. Komentarze filozoficzne do tych trzech stanowisk zostały we wspomnianej książce dość ograniczone, by możliwie bezstronnie przedstawić rozmaite stanowiska, bez podejmowania ich oceny. Takie podejście ma swoje zalety, ale może też być mylące. Może sugerować, że wszystkie trzy stanowiska są równie wiarygodne. Postaram się tu pokazać, że tak nie jest, i że tylko stanowisko regulatywne zasługuje na uznanie, podczas gdy dwa pozostałe są przesadnie radykalne i obciążone poważnymi wadami.

STANOWISKO PROHIBICYJNE

Prohibicjoniści chętnie charakteryzują swe stanowisko przez odwołanie do następujących tez:

1. Eksperymenty na ludzkich zarodkach naruszają bieg naturalnych procesów w przyrodzie.
2. Przeprowadzane są przez wykonywanie odrażających moralnie czynów - jak nakłuwanie, ćwiartowanie, zabijanie.
3. Nasilają ludzka arogancję i nieodpowiedzialność.

Z tych przekonań prohibicjoniści wyprowadzają wnioski normatywne:

4. Zarodki powinny być traktowane jak ludzie, ponieważ są jednostkami ludzkimi,
5. a nawet gdyby nie były, mają ludzką godność.
6. Komórki macierzyste mogą być pobierane z krwi pępowinowej, ze szpiku lub mięśni.

7. Klonowanie terapeutyczne i reprodukcyjne są niedopuszczalne.
8. Zarodkom i płodom przysługują prawa człowieka.

Teza (1) opiera się na niejasnym pojęciu „naturalnych procesów zachodzących w przyrodzie”. Przede wszystkim można uważać, że wszystkie wydarzenia, dające się opisać przez odwołanie do praw przyrody, mają charakter „naturalny”. W tym sensie naturalne są np. loty na Księżyc, bo wiadomo, przy użyciu, jakich środków technicznych taki lot jest wykonalny i są to środki, którymi pewne instytucje realnie dysponują. Zarówno sukces, jak i niepowodzenie takich misji dadzą się wyjaśnić przez odwołanie do praw przyrodniczych. Naturalne są też operacje na otwartym sercu, bo choć wiążą się z poważnym ryzykiem i mogą być przeprowadzane tylko przez wybitne ośrodki medyczne, znaczna liczba wykonywanych tam zabiegów kończy się sukcesem. Również w tym przypadku zarówno sukces, jak i niepowodzenie dadzą się wyjaśnić przez odwołanie do praw przyrody. Jest oczywiste, że w tym sensie terminu „naturalny” – eksperymenty na embrionach pozostają naturalne, ponieważ ich przebieg jest zgodny z prawami przyrody, a sukces bądź niepowodzenie dadzą się wyjaśnić przez odwołanie do praw przyrody.

W innym sensie można mówić, że eksperymenty na embrionach są „nienaturalne”, mając na myśli to, że nie występują one w świecie przyrodniczym, jeśli nie ma w nim człowieka. Mając na myśli właśnie ten sens „naturalności”, odróżnia się naturę i kulturę, twierdząc ewentualnie ponadto, że są to dziedziny rozłączne i natura ma z jakiegoś powodu prymat nad kulturą. Z tego odróżnienia wynika np., że naturalne jest gwizdanie, bo gwizdże i kos, i człowiek, natomiast nienaturalne jest mówienie, bo mówią tylko ludzie i nie ma w przyrodzie innych zwierząt komunikujących się pełnymi zdaniem. Przy tym rozumieniu „naturalności” twierdzenie, że „eksperymenty na embrionach naruszają bieg naturalnych procesów w przyrodzie” nie ma większego sensu, bo każde działanie człowieka z konieczności narusza bieg wydarzeń w przyrodzie. Jeśli naturalny jest tylko świat bez człowieka, to każdy świat z człowiekiem jest *a fortiori* nienaturalny. Wnioski płynące z takich założeń są zdecydowanie niewiarygodne, narzucają fetyszyzujący pogląd na przyrodę i domagają się zezwierżenia człowieka. Trudno podobne postulaty traktować poważnie, w szczególności, gdy nie są one jawnie głoszone, a jedynie insynuowane.

Wreszcie trzecie rozumienie „naturalności” utożsamia to, co naturalne, z tym, co „nadnaturalne” i każe podporządkować bieg wydarzeń obserwowanych w przyrodzie nakazom religijnym, związanym z jakimś wyobrażonym światem nadprzyrodzonym. Zwolennicy Tomasza z Akwinu głoszą np. pogląd, że Bóg ustanowił dwa rodzaje praw. Jedne prawa ogłoszone zostały gatunkowi ludzkiemu w Dekalogu, inne wpisane zostały w przyrodę i zadaniem ludzkiego umysłu jest odkryć te ukryte prawa. Te wpisane prawa Tomiści nazywają „prawami naturalnymi”, ale ich pochodzenie wyraźnie dowodzi, że mają na myśli prawa boskie, czyli nienaturalne, ale nadprzyrodzone i niezwykle, prawa manifestujące się (skądinąd niejasno, bo czekające na odkrycie) w przebiegu wydarzeń przyrodniczych, niesłużące jednak jakimkolwiek celom przyrodniczym, tylko zbawieniu. Przy takim rozumieniu naturalności przeprowadzanie eksperymentów na embrionach można by uznać za nienaturalne, o ile można by stwierdzić, że są niezgodne z wpisanymi w przyrodę prawami nadprzyrodzonymi. Taki

argument jest jednak mało przekonujący i źle sformułowany. Jest mało przekonujący, ponieważ metoda ustalania praw nadprzyrodzonych jest nadzwyczaj wątpliwa i zmienna. Jest źle sformułowany, ponieważ próbuje prezentować dość niepewne wizje wydarzeń nadprzyrodzonych jako prawa przyrody.

Teza (2) głosi, że eksperymenty na embrionach wykonywane są przez dokonanie odrażających moralnie czynów, takich jak: nakłuwanie, ćwiartowanie, zabijanie itp. Teza ta zakłada to, co ma udowodnić, czyli obciążona jest błędem *petitio principii*. Jej zwolennicy chcą wykazać, że embrionów nie wolno zabijać, jednak zamiast dowodzić tej tezy, zakładają jej prawdziwość i używają emocjonalnego języka, w którym o śmierci grupy komórek mówi się tak, jakby była to śmierć człowieka. Istotnie, gdyby embriony były żywymi, czującymi istotami, to nakłuwanie ich, ćwiartowanie i zabijanie byłoby odrażające moralnie. Jeśli jednak embriony żyją, ale nie są obdarzone czuciem, to nie ma powodu twierdzić, że dokonywane na nich fizyczne manipulacje są odrażające moralnie. Jeśli potrzebna tu jest analogia, to wystarczy stwierdzić, że pobieranie krwi do badań laboratoryjnych wiąże się z nakłuwaniem i rozdzielaniem pobranej porcji komórek do kilku próbek, a kończy działaniami, podczas których żywe erytrocyty zostają pozbawione życia. Słusznie jednak nikt nie protestuje przeciw takim procedurom.

Prohibicjoniści głoszą też (3), że „eksperymenty nasilają ludzką arogancję i nieodpowiedzialność”, ponieważ poddają manipulacji grupy komórek, z których mogłaby się rozwinąć jednostka ludzka. Zastrzeżenie to ma dwie wersje – surowo potępiającą i wyrażającą niepokój. W pierwszej wersji eksperymentatorów oskarża się o to, że dokonują zbrodni, ponieważ poświęcają: „życie za życie”. Hasło to ma demaskować styl myślenia badaczy, którzy usprawiedliwiają swoje działanie wskazując na korzyści, jakie płyną z użycia tkanek embrionalnych w leczeniu pacjentów cierpiących na degenerujące schorzenia. Tymczasem – zdaniem prohibicjonisty – nawet gdyby w grę wchodziło nie tylko zdrowie pacjenta, ale jego życie, takie eksperymenty byłyby niedopuszczalne. Życie pacjenta byłoby wtedy ratowane kosztem życia embrionu. Lansując ten pogląd prohibicjonista utożsamia pozbawienie życia embrionu z sytuacją, w której jeden człowiek zostaje zabity po to, by inny mógł żyć. Takiego utożsamienia nie można jednak zaakceptować w rozważaniach filozoficznych. Życie ludzkie ma istotnie wielką wartość i nie wolno bez specjalnego uzasadnienia poświęcać jednego człowieka dla ratowania drugiego. Znamy wszakże sytuacje, w których takie specjalne uzasadnienie jest przytaczane. Podczas wojny, w sytuacji bezpośredniego zagrożenia jeden żołnierz rzuca się na granat, by uratować innych. Poświęca życie dla życia, lecz nie jest za to potępiany, lecz uznany za bohatera. Inny żołnierz jest wysłany przez swego dowódcę do walki w warunkach, w których ma znikomą szansę przetrwania. Żołnierz musi się poświęcić dla swego oddziału i, chętnie lub nie, oddaje swe życie za życie innych. Tego też się nie potępia, tylko uznaje za czyn patriotyczny. Hasło „życie za życie” nie ma więc bezwzględnej mocy odstraszałającej. Ważniejsza jest jednak inna sprawa. W istocie, poświęcenie życia embrionu dla uratowania życia lub zdrowia w pełni rozwiniętego człowieka – wszystko jedno dziecka czy dorosłego – nie jest poświęceniem jednego życia ludzkiego dla innego życia ludzkiego, tylko poświęceniem życia embrionu dla człowieka. Argument „życie za życie” nie wolno zatem używać, zanim nie zostanie wykazane, że embrion jest człowiekiem. Argumentowanie w

odwrotnym kierunku obarczone jest wspomnianym już błędem *petitio principii*, i zakłada to, co powinno udowodnić. Nie wolno uznać rozumowania: „Zabijanie zarodków w celach terapeutycznych jest poświęcaniem życia za życie. A ponieważ jest to niedopuszczalne poświęcenie, to musimy uznać embriony za ludzi”. Jest to przypadek wprowadzania wątpliwej definicji z nieuzasadnionej normy.

W wersji wyrażającej tylko niepokój, a nie potępienie, nie twierdzi się, że embrion jest człowiekiem, tylko że zawiera ludzkie tkanki, którymi nie wolno swobodnie dysponować. Argumentuje się, że użycie tkanki pochodzącej z jednego organizmu dla podtrzymania życia lub zdrowia innego organizmu, jest w obrębie gatunku ludzkiego niedopuszczalne. Pogląd ten popierają często spotykane emocje. Jeden z antycznych mitów mówi o Prokne, która zabiła syna i dała go zjeść jego ojcu, Tereusowi, by pomścić gwałt dokonany na swej siostrze. Postępowanie Prokne wydaje się okrutne i niedopuszczalne, ale to czyn Tereusa postrzega się jako ohydny i hańbiący. Co więcej, silniejszą repulsję od wieków budzi to, że Tereus zjadł swego syna, niż to, że zgwałcił siostrę żony, uwięził ją i odciął jej język. Kanibalizm wydaje się odrażającą zbrodnią i złamaniem szczególnie silnego tabu. Osoby mocno odczuwające ten zakaz protestują, zatem także przeciw transplantacji organów, przeszczepom skóry i przetaczaniu krwi. Dla nich tkanka ludzka jest nie mniej święta niż ludzkie życie i to jej domniemane uświęcenie racjonalizują i wyrażają w twierdzeniu, że jeśli pozwala się na wykorzystanie tkanki ludzkiej do celów terapeutycznych, to człowiek zaczyna być instrumentalizowany i jest postrzegany jako potencjalne źródło deficytowych surowców. Tak rodzi się rzekomo zdżiczenie obyczajów i lekceważenie dla ludzkiego życia. Jednak podobny związek przyczynowy nie został w żaden sposób ustalony i nie wydaje się prawdą, by transplantacje, przeszczepy skóry i przetaczanie krwi istotnie nasilały ludzką arogancję i nieodpowiedzialność. Nie ma, zatem powodu przypuszczać, że taki efekt będzie wywołany przez eksperymenty na embrionach i wykorzystanie ich tkanki.

Pogląd, że eksperymenty na embrionach ludzkich wzmagają arogancję i nieodpowiedzialność bywa wzmacniany dwoma dodatkowymi argumentami: argumentem z potencjalności i argumentem równi pochyłej.

Argument z potencjalności głosi, że zarodek ludzki nie jest wprawdzie aktualnie człowiekiem, ale jest potencjalnym człowiekiem i zasługuje na takie traktowanie, które nie naruszy praw i interesów człowieka, który się z zarodka rozwinie. Jest to argument słuszny, gdy jest formułowany warunkowo: jeśli z zarodka ma się rozwinąć człowiek, to zarodek powinien być traktowany tak, by ów człowiek nie ucierpiał. Podobny warunkowy związek jest źródłem norm w wielu innych sytuacjach. Jeśli chcemy, żeby zboże gęsto wyrosło, to nie możemy pozwolić, by kto chce, chodził po zasianym polu. Nawet, jeśli nie widać pierwszych liści i nasiona leżą pod powierzchnią ziemi, nie wolno ich niszczyć. Podobnie jest w rybołówstwie. Gdy ryby złożą ikrę, nie wolno wlewać ścieków do zbiornika. Nawet, jeśli ścieki nie powodują widocznego uszkodzenia ikry, mogą spowodować jej zatrucie, i albo z jajeczek nie wyklują się żadne nowe ryby, albo wiele będzie uszkodzonych. Norma z potencjalności jest wiążąca, jeśli spośród wielu potencjalności obiektu, jedna została z góry wybrana jako jedyna dopuszczalna. Z nasion może wyrosnąć zboże i tylko na tym nam zależy, z ikry mogą powstać tylko ryby (albo nic) i zależy nam na tym, by powstały ryby. Warunek ten nie jest spełniony

w przypadku ludzkich zarodków. Mają one więcej niż jedną potencjalność. Mogą się rozwinąć w ludzką jednostkę, ale mogą też rozwinąć się w linię komórek macierzystych i oba cele mamy prawo uznać za wartościowe. Tym bardziej, że nie obowiązuje zasada bezwzględnej ochrony każdego ludzkiego zarodka. Ponad 20% zarodków opuszcza ciało kobiety podczas krwawienia menstrualnego i kobieta często nawet nie zdaje sobie z tego sprawy. W takich przypadkach nie obowiązuje zasada ratowania każdego z tych zarodków. Zatem od nas zależy, czy nadamy jakiemuś zarodkowi status potencjalnej jednostki ludzkiej, czy status materiału służącego do generowania komórek macierzystych, czy nie nadamy mu żadnego statusu. Czyli zarodki mają więcej niż jedną potencjalność. Argument z potencjalności dowodzi, zatem jedynie, że powinniśmy odpowiednio dbać o te zarodki, którym już nadano status przyszłych jednostek ludzkich. Nie możemy natomiast mówić o tym, że status ten powinniśmy nadać wszystkim zarodkom i nie możemy stwarzać nakazu bezwzględnego.

Argument równi pochyłej głosi, że jeśli eksperymenty na embrionach są niewielkim złem lub wcale nie są złem, to trudno je odróżnić od zdecydowanie gorszego postępowania, jakim byłoby np. zabicie płodu. Zatem, kto akceptuje eksperymenty na zarodkach, ten, być może, zaakceptowałby także zabójstwo płodu. Kto akceptuje klonowanie terapeutyczne, ten zaakceptowałby, być może, klonowanie reprodukcyjne. Kto godzi się na selekcję embrionów w procedurze zapłodnienia *in vitro*, ten, być może, zaakceptowałby eksterminację jednostek „niepełnowartościowych”. Łatwo spostrzec, że istotną rolę w tych rozumowaniach odgrywa zwrot: „być może”. Oczywiście nie wolno go opuścić. Prohibicjoniści nie twierdzą przecież, że każdy, kto akceptuje małe zło, sankcjonuje tym samym dokonanie większego zła. To byłoby bezzasadne pomówienie. Mówią, co innego: „sprawca ma taką tendencję”, „nie potrafi się oprzeć”, „może nie dostrzegać różnicy”, „staje się mniej wrażliwy i skrupulatny”, „popada w arogancję i nieodpowiedzialność”. Takie przypuszczenia mogą być słuszne, ale mogą też być błędne. Jeśli pozwoli się jakiejś firmie, by nie płaciła ubezpieczenia za swoich pracowników, to można zasadnie podejrzewać, że inne firmy zrobią to samo. Tu równia pochyła działa. Jeśli chłopcy grający w piłkę stłuką szybę i nie spotka ich za to żadna przykra konsekwencja, to można się spodziewać, że nadal będą grać nieostrożnie. Tu równia pochyła też działa. Dlaczego? Ponieważ firmy nie lubią płacić należności i ustępują tylko wtedy, gdy muszą, i ponieważ chłopcy lubią grać w piłkę i rezygnują z tego tylko wtedy, gdy muszą. Nie możemy czegoś analogicznego powiedzieć o eksperymentatorach. Nie jest prawdą, że mają oni niepoohamowane pragnienie zabijania bezbronnych istot, i powściągają je tylko wtedy, gdy muszą. Nie jest prawdą, że ten, kto zajmuje się klonowaniem terapeutycznym, traktuje swoją pracę jako ograniczenie i marzy jedynie o tym, by sklonować Golema lub Franksteina. Zwrot „być może” bezprawnie otrzymuje w interpretacji prohibicjonistów sens: „z wielkim prawdopodobieństwem”. Z drugiej strony równie nieusprawiedliwione byłoby nadanie mu sensu „z małym prawdopodobieństwem”. Prawdopodobieństwo jest takie, jakie jest, i nie należy nic zgadywać na jego temat, tylko trzeba je ustalać. Jeśli zgoda na klonowanie terapeutyczne z dużym prawdopodobieństwem wywoła zgodę na klonowanie reprodukcyjne, to istotnie wypowiadając zgodę na to pierwsze, pośrednio wypowiada się zgodę na to drugie. Póki jednak taki związek nie został ustalony, zakazywanie pierwszego, ponieważ drugie jest

niedopuszczalne, jest nadużyciem władzy lub rozumu. Przecież nie pozwalamy, by policjant, który nas zatrzymał, gdy jechaliśmy 10 km ponad dozwoloną szybkość, wypisał nam mandat za jazdę 50 km ponad dozwoloną szybkość, na podstawie prohibicyjnego argumentu, że kto trochę łamie prawo, ten „już się dopuścił” lub „ponosi odpowiedzialność” za poważne łamanie prawa. Argument równi pochyłej działa, kiedy działa, tzn. kiedy opierając się na empirycznych danych można stwierdzić, że jakies postępowanie wywołuje lawinowe zjawisko naśladownictwa, rozpasania, destrukcji lub nieodpowiedzialności. Bez takiego empirycznego założenia dobrze opartego na faktach, argument ten nie jest źródłem wiążących norm.

Trzy omówione tezy mają przede wszystkim charakter opisowy i bywają używane jako uzasadnienie dla czterech kolejnych tez, zawierających wyraźniejszą treść normatywną.

Teza (4) mówi, że „zarodki powinny być traktowane jak ludzie, ponieważ są jednostkami ludzkimi”. Istotnie, gdyby zarodki były ludźmi, trzeba by je traktować jak ludzi. Jednak nic więcej w tym twierdzeniu nie zasługuje na zaufanie. Nie wiadomo, w jaki sposób można by ustalić, że embriion jest człowiekiem. Trzy wyliczone wyżej tezy nie podtrzymują takiego wniosku. Prohibicjoniści często utrzymują, że trzeba wybrać jakiś moment począwszy, od którego zaczyna się życie człowieka, i że najlepszym momentem jest połączenie dwóch gamet w zygotę. Jest to nieakceptowalne uproszczenie. Nie mamy powodu przyjmować, że człowiek zaczyna swe życie w jednym określonym momencie. Za początek życia organicznego można istotnie przyjąć połączenie dwóch gamet w zygotę, ale i to tylko pod warunkiem, że gameta nie będzie się dzielić na kilka osobników o wspólnym DNA. Dla osobników bliźniaczych trzeba za początek ich życia organicznego przyjąć moment ostatniego podziału, dającego ciągle w efekcie komórki totipotencjalne. Za początek życia fizjologicznego trzeba by uznać moment, w którym kształtujące się organy nowego organizmu zaczynają pełnić charakterystyczne dla siebie i wzajem służebne funkcje. Za początek życia sensorycznego, czyli czującego trzeba by uznać moment, w którym komórki nerwowe łączą się w jeden system i zaczynają reagować jako całość na bodźce docierające do organizmu. Początek życia psychicznego datuje się od momentu, w którym stany zewnętrzne wobec systemu nerwowego zaczynają być w nim jakoś reprezentowane. Wreszcie za początek życia zasadniczo niezależnego od organizmu matki trzeba uznać moment urodzenia. Który z tych momentów jest najważniejszy? To pytanie nie ma sensu i nie można na nie podać żadnej wiarygodnej odpowiedzi. Coś jest ważne, gdy wiadomo, pod jakim względem jest ważne. Gdy ktoś pyta o ważność, nie mówiąc, w jakim sensie ją rozumie, wszczynają chaotyczną polemikę, której nie można rozsądnie zakończyć.

Niektórzy z prohibicjonistów akceptują to zastrzeżenie i oferując pozorne ustępstwo twierdzą, że (5) „nawet gdyby embriiony nie były ludźmi, to już teraz mają ludzką godność”. Godność ta bierze się rzekomo stąd, że embriion będzie w przyszłości człowiekiem. Ale jeśli jest prawdą, że embriion dopiero będzie człowiekiem, to dlaczego nie mielibyśmy przyjąć, że dopiero, gdy będzie człowiekiem, będzie miał ludzką godność? Twierdzenie o przyszłej godności – zachodzi zanim się pojawi – jest bezpodstawne. Równie dobrze można by mówić, że poczwarka już dziś jest piękna, bo wykluje się z niej piękny motyl. Można twierdzić jedynie, że embriion od początku ma ludzką godność,

ponieważ od początku ma jakieś cechy nadające mu ten status. Np. godność nadaje mu to, że jest żywy i posiada DNA. Ale gdybyśmy nawet na to się zgodzili, to moglibyśmy, co najwyżej powiedzieć, że embrion ma dziś godność embrionu, a nie godność człowieka. Embrion ludzki nie jest przecież niczym innym, jak zbiorem słabo zróżnicowanych komórek ludzkich. Gdyby te komórki miały mieć status i godność człowieka, to musielibyśmy zapytać, w jaki sposób zjawisko to zachodzi tylko w obrębie gatunku ludzkiego, a nie w obrębie innych gatunków. Nie twierdzimy przecież, że embrion szympansa ma godność szympansa, zanim stanie się szympansem. Choć żyje i ma DNA szympansa. Nie twierdzimy, że jajo orła ma godność orła, zanim stanie się orłem. Choć żyje i ma DNA orła. Nie ma, zatem powodu robić wyjątku dla człowieka. Powinniśmy raczej zdać sobie jasno sprawę z tego, co naprawdę myślimy o embrionach szympanсів i zapłodnionych jajach orłów. Ceniemy je, ponieważ zależy nam na tym, by z embrionu powstał szympanś lub orzeł. Z żadnego innego powodu. W odniesieniu do wszystkich gatunków uzasadnienie przebiega zawsze w tym samym kierunku: „ponieważ coś cenimy, to coś ma wartość”. Nie rozumujemy w przeciwnym kierunku: „ponieważ coś ma wartość, to my to cenimy”. Podobnie, zatem, wolno nam powiedzieć, że jeśli cenimy sobie jakiś ludzki embrion, wiążąc z nim nadzieję, że stanie się człowiekiem, to ten embrion ma wartość. Nie ma natomiast podstaw do konwersji: „ludzki embrion ma wartość związaną z jedną potencjalnością i dlatego powinniśmy przypisywać mu godność”. Taka zachęta byłaby niezrozumiałym fetyszyzowaniem ludzkich komórek. Jeśli widzimy w embrionie przyszłe tkanki, które mogą być wykorzystane do celów naukowych lub terapeutycznych, to nie mamy powodu dostrzegać w nich ludzkiej godności. I odwrotnie. Jeśli widzimy w jakimś embrionie przyszłego człowieka, jeśli chcemy, by embrion ten stał się płodem, noworodkiem, urodzonym dzieckiem, a później dorosłym człowiekiem, to musimy embrion chronić i przygotowywać go do przyszłych funkcji. Nawet wtedy jednak nie powinniśmy przypisywać mu na wyrost godności, charakterystycznie związanych z jego przyszłymi fazami życia.

Czy (6) „komórki macierzyste mogą być pobierane z krwi pępowinowej, ze szpiku lub mięśni”? To nie problem filozoficzny, tylko medyczny. Jeśli prohibicjonista uważa, że nie należy generować komórek macierzystych z tkanki embrionalnej, ponieważ można je uzyskać bezpośrednio z organizmu dorosłych ludzi, to wyraża pożyteczną propozycję. Warto ją przyjąć *ceteris paribus*, by uniknąć sporów o embriony. Jeśli jednak jest prawdą, że komórki macierzyste występują w dorosłym organizmie w zbyt niewielkiej liczbie lub są zbyt trudne do wyodrębnienia, to taka propozycja uchylecia sporu staje się bezwartościowa.

W świetle powyższych zastrzeżeń tezy (7) i (8) należy uznać za niedostatecznie uzasadnione. Podstawą zbiorczej negatywnej oceny klonowania terapeutycznego i reprodukcyjnego jest w stanowisku prohibicjonistów teza o godności embrionów. Ich zdaniem embriony są naturalne i nienaruszalne, więc nie należy ani dokonywać manipulacji genetycznych na gametach (klonowanie reprodukcyjne), ani przekształcać embrionów w tkanki (klonowanie terapeutyczne). Starłem się pokazać, że sens określenia „naturalny” jest niejasny, a zatem nie tylko embriony powstające z jajeczka i plemnika, ale także embriony powstające z jajeczka i jądra komórkowego, pobranego z komórki niebędącej gametą, można uznać za naturalne. Wskazywałem też, że nie

obowiązuje ogólny nakaz wybierania rozwiązań naturalnych i odrzucania nienaturalnych. Nie ma też podstaw do traktowania embrionów ludzkich jako bezwzględnie nienaruszalnych. Uzasadniona wydaje się tylko teza, że nie wolno robić w stosunku do embrionu tego, co pociągnie za sobą następstwa niekorzystne dla człowieka, który powstanie z tego embrionu, jeśli istotnie z tego embrionu rozwinie się człowiek. Nie obowiązuje natomiast ani zakaz dokonywania manipulacji na embrionach, ani nakaz przekształcenia każdego embrionu we w pełni rozwiniętego człowieka. Prohibicjonizm, który w każdej z tych kwestii ma odwrotne zdanie, nie wydaje się racjonalnym stanowiskiem.

STANOWISKO PERMISYWNE

Permisywiści chętnie charakteryzują swe stanowisko przez odwołanie do następujących tez:

1. Eksperymenty na zarodkach nie wymagają żadnego nadzoru, ponieważ nie mogą wiązać się ze złamaniem norm moralnych dotyczących człowieka.
2. Narzucanie naukowcom poglądów moralnych, których oni nie uznają, byłoby praktyką niespotykaną w innych zawodach.
3. Postępu nie da się zatrzymać.
4. Poddawanie procedur naukowych wymaganiom tradycyjnej moralności nie da się pogodzić z naukowym etosem i swobodą badań.

Z tych przekonań permisywiści wyprowadzają wnioski normatywne:

5. Eksperymenty na zarodkach mogą być prowadzone bez jakiegokolwiek regulacji.
6. Konieczne jest stworzenie dobrze wyposażonych banków tkanek i organów.
7. Rodzice mają prawo wymagać od medycyny, by im pomogła wyprodukować wymarzone dzieci.
8. W niektórych przypadkach dzieciobójstwo jest dopuszczalne.
9. Dorosłe osoby mają prawo decydować, jak ich gamety zostaną użyte.

Teza (1) głosi, że „eksperymenty na zarodkach nie wymagają żadnego nadzoru, ponieważ nie mogą wiązać się ze złamaniem norm moralnych dotyczących człowieka”. Znajduję tu dwa uproszczenia. Zgadzam się, że należy uznać, iż eksperymenty na zarodkach nie podlegają tym samym normom, co eksperymenty na ludziach. Ludzi, na przykład, należy pytać o zgodę na udział w eksperymencie, natomiast embrionów pytać nie można. Jednak nieumiejętne traktowanie embrionów, które rozwiną się w człowieka, może wywołać poważne uszkodzenia morfologiczne lub deficyt sprawności u przyszłego człowieka, a to znaczy, wbrew tezie (1), że eksperymenty na embrionach łączą się z pewnymi normami dotyczącymi człowieka. Po drugie, ten, kto uznaje, że eksperymenty na embrionach są dopuszczalne, nie jest bynajmniej zobowiązany do uznania, że eksperymenty te mogą być prowadzone bez żadnego nadzoru. Embriony pobierane do badań pochodzą od kobiet, które mogą być narażone na wykorzystywanie lub traktowane w sposób naruszający ich zdrowie, przez instytucje przeprowadzające eksperymenty. Ponadto nie wolno dopuścić do pojawienia się ludzkich embrionów na wolnym rynku,

ani do tego, by instytucje zajmujące się eksperymentami mogły wyprodukować klony terapeutyczne lub reprodukcyjne bez wiedzy i zgody dawców materiału genetycznego. Zatem klonowanie ludzkiego materiału genetycznego powinno podlegać licencjonowaniu i ścisłemu nadzorowi sprawowanemu przez profesjonalne organizacje krajowe i międzynarodowe.

Nie jest prawdą, że (2) „narzucanie naukowcom poglądów moralnych, których oni nie uznają, jest praktyką niespotykaną w innych zawodach”. Odwrotnie, wobec wielu grup zawodowych formułuje się specyficzne moralne wymagania i są one ujęte w kodeksach etyki zawodowej. To prawda, że najczęściej twórcami tych kodeksów są korporacje zawodowe, a nie ich klienci lub otwarte społeczeństwo, jednak każda organizacja zawodowa bierze pod uwagę oczekiwania społeczne i społeczne oceny. Dlatego nie byłoby czymś niespotykanym, gdyby domagano się od badaczy prowadzących eksperymenty na ludzkich embrionach, aby postępowali zgodnie z jakimiś zasadami mającymi zastosowanie tylko w ich zawodzie. Musimy, zatem przyjąć, że nie ma podstaw, by z góry wykluczyć możliwość narzucania naukowcom pewnych wymagań moralnych, których oni nie akceptują, jeśli opinia publiczna uznaje te wymagania za niepomijalne. Tego typu ingerencja w sposób wykonywania pracy zawodowej musi być oczywiście czymś wyjątkowym. Wolno, bowiem narzucać takie zasady tylko pod warunkiem, że zostały one dobrze uzasadnione, że sami naukowcy nie godzą się ich przyjąć i gdy ten opór postrzega się jako tendencyjne zaślepienie. Nie jest to sytuacja z góry wykluczona. Np. pewne wymagania kieruje się pod adresem lekarzy lub zawodowych polityków, których część niechętnie godzi się uznać, że nie wolno im pobierać dodatkowych opłat od swoich klientów. Zasada, że żądanie takich opłat jest niedopuszczalne, wydaje się dobrze uzasadniona, ponieważ w żadnym innym zawodzie społecznego zaufania pobierania takich opłat nie akceptujemy i ponieważ wymaganie takich opłat przez lekarzy lub przez polityków traktuje się jako przejaw ich zaślepienia moralnego.

Permisywiści mają rację, że (3) „postępu nie da się zatrzymać”, a przynajmniej, że jest to trudne i nieopłacalne. Ta zasada nie działa jednak bezwzględnie na korzyść ich stanowiska, nie jest, bowiem oczywiste, że swobodne i niekontrolowane prowadzenie badań na embrionach trzeba uznać za postęp.

W znacznej mierze słuszne jest przekonanie, że (4) „poddawanie procedur naukowych wymaganiom tradycyjnej moralności nie da się pogodzić z naukowym etosem i swobodą badań”. Istotnie, nauka ma prawo gorszyć i ma prawo domagać się zmiany postaw moralnych. Nowe teorie z zakresu nauk społecznych, psychologii i medycyny wielokrotnie zmieniały dominujące poglądy moralne. Przez wiele wieków potępienie lichwy uzasadniane było moralnymi argumentami, co wstrzymywało koncentrację kapitału i hamowało rozwój ekonomiczny. Nowe teorie zmieniły tę postawę. Odejście od parytetu złota i wprowadzenie banknotów niemających oparcia w kruszcu przez jakiś czas piętnowano jako oszustwo. Nowe teorie zmieniły te postawę. Przywileje cechowe i paternalizm rodzinny uważano przez wiele wieków za fundament życia gospodarczego i rodzinnego. Prawa mniejszości i kobiet do dziś są ograniczane przez osoby, dla których męska dominacja jest moralną prerogatywą. Nowe teorie zmieniły i tę postawę. Nauka broni tezy, że alkoholizm jest chorobą, a nie tylko występkiem obyczajowym, że pewne osoby nie nadają się na rodziców, choć trudno im zabronić posiadania dzieci, że agresja

pełni także pozytywną funkcję, i że dzieci wychowywane zbyt troskliwie źle sobie radzą w życiu. Są to wszystko poglądy niezgodne z obiegową moralnością. Gdy słyszymy, zatem od naukowców, że badania nad embrionami mogą doprowadzić do odkrycia skutecznych metod terapii, powinniśmy im ufać i nie przeciwstawiać temu pogładowi w sposób nieustępliwy, w myśl zasady, że ze względów moralnych życie embrionów jest nienaruszalne. Z drugiej strony, rezygnacja z tradycyjnych poglądów w tej sprawie nie musi prowadzić do przyjęcia stanowiska permisywnego, w szczególności, jeśli staje się ono podstawą dla formułowania wątpliwych zaleceń normatywnych, że „wszystko wolno”.

Permisywiści uważają, że (5) „eksperymenty na zarodkach mogą być prowadzone bez jakiegokolwiek regulacji”. Jest to teza zdecydowanie niebezpieczna, a nadto oparta na tezach (1) i (2), które powinniśmy uznać za niewiarygodne. Eksperymenty prowadzone bez regulacji i nadzoru mogą powodować nadużycia i prowokować zachowania mające destrukcyjne i nieodwracalne skutki. Gdyby jakieś laboratorium podjęło się klonowania reprodukcyjnego, nie znajdując wcześniej nikogo, kto przyjąłby na siebie funkcje rodzicielskie wobec sklonowanych dzieci, uprawnienia tych dzieci zostałyby w niedopuszczalny sposób naruszone. Gdyby jakieś inne laboratorium spostrzegło w trakcie procedury klonowania reprodukcyjnego, że stworzony organizm ludzki będzie znacznie uszkodzony, decyzja o przerwaniu jego życia byłaby moralnie usprawiedliwiona. Jest to, co prawda, niepokojąca moralnie konsekwencja, ale trudno ją podważyć. Jednak teoretyczna słuszność tej decyzji nie uprawnia żadnego laboratorium do tego, by mogło ono powoływać do życia, a następnie uśmiercać liczne klony, w poszukiwaniu jakiegoś idealnego typu. Od pewnego momentu, trudnego do ustalenia, byłoby to instrumentalne traktowanie jednostek ludzkich, wywołujące słuszny sprzeciw moralny. Wreszcie, laboratoria działające bez nadzoru mogłyby próbować wytwarzać chimery międzygatunkowe lub monstrualnie zdeformowane ludzkie jednostki dla siebie tylko znanych celów. Mówiąc krótko, tak jak urodzenie każdego dziecka jest publicznie rejestrowanym zdarzeniem i następnie los dziecka podlega nadzorowi ze strony wielu instytucji publicznych, podobnie los jednostek, które ewentualnie mogłyby być w przyszłości sklonowane, musi być chroniony i poddany publicznemu nadzorowi. Z podobnych względów nie należy też godzić się na klonowanie terapeutyczne bez nadzoru. Laboratoria, które podejmą się produkowania komórek macierzystych, powinny działać w sposób nienaganny pod względem naukowym. Wyniki ich badań muszą być wiarygodne. Wytworzone tkanki powinny być poprawnie i zgodnie z prawdą opisane, a ich przydatność terapeutyczna powinna być ustalona w sposób bezstronny, niebudzący teoretycznych ani praktycznych wątpliwości. Może są to trudne wymagania, ale ich spełnienie jest możliwe. Nie należy, zatem z nich rezygnować, jeśli jest się przekonany, że po ich spełnieniu wykorzystanie komórek macierzystych otwiera przed medycyną szerokie możliwości niesienia pomocy chorym.

Permisywiści mają rację, że potrzebne jest (6) „stworzenie dobrze wyposażonych banków tkanek i organów”. Może nie po to, by łatwiej prowadzić eksperymenty bez żadnego nadzoru, ale po to, by zapewnić nowym technikom wyższą skuteczność i pełniejszą społeczną akceptację. Jeśli terapie oparte na komórkach macierzystych okażą się bardzo kosztowną techniką medyczną, to obawy moralne związane z jej

wykorzystaniem będą wzmocnione przez poczucie, że klonowanie terapeutyczne jest elitarną procedurą dostępną jedynie dla garstki ludzi bogatych. Poczucie wykluczenia wzmaga z reguły tendencję do obwiniania sprawców nierównego traktowania o bezduszność i tendencję do manipulowania innymi. Dobrze by było unikać tych konsekwencji.

Dwie następne tezy (7) i (8) wiążą się z trudnymi problemami moralnymi. Permisywiści formułują postulat, że rodzice mają prawo wybrać, jakie będą mieli dzieci. Wolno im, zatem produkować „*design children*”, czyli dążyć do tego, by z ich materiału genetycznego (7) medycyna pomogła im wyprodukować „wymarzone dzieci”, a w przypadku, gdy dość wcześnie okaże się, że rozwijające się zarodki nie spełniają pokładanych w nich wymagań, wolno je zlikwidować. Permisywiści mogą nawet postulować, by noworodki, niespełniające morfologicznych i funkcjonalnych oczekiwań rodziców były eliminowane, czyli (8), „w niektórych przypadkach dzieciobójstwo jest dopuszczalne”. Te żądania permisywistów budzą silne protesty moralne.

Od Arystotelesa do Adama Smitha przeważał pogląd, że dzieci są własnością rodziców, a w szczególności ojca. Jednak od kilku wieków współczucie i szacunek dla jednostki ludzkiej nie pozwalają nikomu zabijać, dręczyć lub sprzedawać w niewolę. Dziś nie wolno nawet narzucać dzieciom własnych poglądów, dysponować ich umiejętnościami i czasem, wynajmować ich do pracy. Takie poglądy dominują przynajmniej na Półkuli Północnej. Jednak w wielu tradycyjnych kulturach reszty świata dzieci do dziś nie mają żadnych uprawnień, a tylko obowiązek posłuszeństwa wobec rodziców. Nie przyznaje się im żadnej autonomii, a co za tym idzie, pojawia się pogląd, że dzieci są wymienialne. Jeśli jedno zachoruje i umrze, można mieć następne, które wchodzi w funkcje i role poprzedniego. Z tego stylu myślenia wyrasta pogląd, że dzieci muszą spełniać żądania rodziców, a także, że powinny zaspokajać kierowane pod ich adresem ambicje. Myśl, że rodzice mają prawo do posiadania „markowych” dzieci, niejako „skrojonych na miarę”, nie ma, zatem źródeł liberalnych – jak się często sądzi – lecz raczej konserwatywne. To prawda, że konserwatyści z zasady nie formułują swych oczekiwań w wyraźnym postulatcie. Nie mówią, że niechciane dzieci należy eliminować, by na ich miejsce wprowadzić dzieci spełniające pełniej ich marzenia, tylko po prostu zaniedbują swe rozczarowujące dzieci i koncentrują swą troskę na faworytach. Ponadto konserwatyzm dość silnie koreluje z postawą prohibicyjną. W indywidualnych przypadkach trudno, więc przewidzieć, kto może stać się rzecznikiem programu „*design children*” i kto ewentualnie godziłby się na dzieciobójstwo.

Bez wątplenia dzieciobójstwo jest moralnie niedopuszczalne i otoczenie dziecka opieką jest obowiązkiem *prima facie*. Zdarza się jednak, że obowiązek ten wpada w kolizję z innymi obowiązkami, w szczególności z poczuciem, że powinno się swemu dziecku zapewnić szczęśliwe życie. Porzucenie dziecka i skazanie go na zaniedbanie wywołuje u pewnych osób większe poczucie winy niż myśl, że mogłoby ono zostać pozbawione życia. Zabójstwo z litości uznawane jest przez niektóre z osób szczególnie udręczonych trudnościami codziennego życia za mniejsze zło niż skazanie własnego dziecka na lata biedy, upokorzeń i desperackiej walki o przetrwanie. Jeśli ogarnięta takimi wątpliwościami matka lub ojciec dopuszczają się dzieciobójstwa, to, choć łamią prawo i wyraźną normę moralną, zasługuje na jakiś rodzaj zrozumienia i uznanie okoliczności łagodzących. Od

tej postawy różni się jednak inna, tylko pozornie ją przypominająca. W dwudziestym pierwszym wieku wychowanie dzieci stało się kosztowne, absorbujące i długotrwałe. Jeśli rodzice zamierzają serio zająć się swymi dziećmi, to coraz częściej chcą wykonać to zadanie w sposób komfortowy, efektywny i zgodny z własnymi ambicjami życiowymi. Wiedzą, że dziecko, które nie będzie spełniać ich oczekiwań, stanie się dla nich ciężarem, podejrzewają, że nie będą potrafili zataić przed nim swego rozczarowania. Jeśli więc dziecko ma im utrudnić karierę – co wydaje się nieuniknione – to niech się przynajmniej podoba. Żądają, zatem, by dziecko spełniało z góry nałożone mu wymagania. Niech będzie ładne, mądre, ambitne, odważne i zdrowe. Ciche w domu, grzeczne w szkole i pierwsze w sporcie. Tak właśnie myślący rodzice chcą mieć „*design children*”. Znow są to raczej konserwatyści niż liberałowie.

Te tendencje muszą wywoływać niepokój. Jeśli rodzice będą ustalać genetyczne determinanty uzdolnień u swych dzieci, to w większości kultur chłopcy będą preferowani kosztem dziewcząt, dzieci silne i duże kosztem słabych i mniejszych, osobnicy bezwzględni i wytrwali kosztem refleksyjnych i wrażliwych. Tu pojawia się problem analogiczny do opisywanego w teorii gier, tzw. dylematu więźnia. W interesie społecznym leży to, by pewni rodzice mieli dzieci słabe, drobne, wrażliwe i refleksyjne. Społeczeństwo składające się z ludzi zróżnicowanych jest ciekawsze i zdolne do pielęgnowania bardziej zróżnicowanych ideałów niż społeczeństwo składające się tylko z przebojowych, doskonale funkcjonujących przywódców. W interesie każdej rodziny leży jednak to, by jej dzieci były silne, potężne, gruboskórne i ślepo dążące do celu, a dzieci innych rodzin zajmowały się wyższymi wartościami. Społeczeństwo nie powinno ułatwiać przedsiębiorczym rodzicom prowadzenia ich dzieci do sukcesu. Nie wydaje się, więc dopuszczalne, by rodzice mogli otrzymać prawo do uzyskania od laboratorium medycznych „dzieci na zamówienie”. Zupełnie inną sprawą jest dokonywanie selekcji ze względu na potencjalne uszkodzenia genetyczne w procesie reprodukcji *in vitro*. To jest dopuszczalne. Wolno unikać powołania do życia dzieci z trwałymi ubytkami sprawności, dzieci niezdolnych do normalnego życia. Niedopuszczalne jest, co innego – by medycyna zajęła się osobną hodowlą jednostek, z podwyższoną zdolnością do usuwania innych w cień. Gdyby ponadto, permisywista uznał, że program „*desing children*” może zawierać klauzulę dopuszczającą uśmiercanie noworodków niespełniających wymagań specyfikacji, to postawę tę trzeba by zdecydowanie potępić i uznać za ślepotę moralną.

Ostatnia teza (9), że „dorosłe osoby mają prawo decydować, jak ich gamety zostaną użyte” narzuca nietrafny sposób dyskusowania o zarodkach. Gamety nie są taką częścią ludzkiego ciała, jak większość organów. Po pierwsze, pochodzą najczęściej od dwu jednostek, a nie od jednej. Po drugie, w jednej ze swych potencjalności, są wczesnym stanem przyszłego człowieka. Nie powinniśmy, zatem wybierać drogi, w której gamety są traktowane tak, jakby były czyjąś własnością. Lepiej przyjąć, że gamety mają specjalny status, że ten status powinien być dokładnie określony, i dopiero w oparciu o ten status orzekać, czy „dorosłe osoby mają prawo decydować, jak ich gamety zostaną użyte”.

Podsumowując, niedopuszczalne jest dzieciobójstwo i prowadzenie polityki eugenicznej w celu realizowania programu „*design children*”. A idąc dalej, powinniśmy uznać, że społeczeństwo w żaden sposób nie powinno ułatwiać ambitnym rodzicom hodowania dzieci przesadnie ekspansywnych i dominujących. Co prawda, zwolennikami tych

praktyk są raczej konserwatyści, a nie liberałowie i swe preferencje maskują głosząc raczej poglądy prohibicyjne, a nie permisywne, ale program dopasowywania dzieci do własnych ideałów eugenicznych mieści się w programie permisywistów, a nie prohibicjonistów i obciąża konto tych pierwszych. Jednak najbardziej niepokojące w postawie permisywistów są proponowane przez nich rozwiązania instytucjonalne, które lekceważą autonomię ludzkich jednostek i poddają je niedopuszczalnym manipulacjom. Permisywisci domagają się wolności eksperymentowania dla wszystkich i tym samym otwierają drogę do produkowania krzyżówek międzygatunkowych, eksperymentów na płodach i dzieciach, a także klonowania reprodukcyjnego, prowadzonego w celu wytworzenia znacznej liczby identycznych jednostek, zgodnie z najbardziej maniackimi wizjami z powieści *science fiction*. Np. permisywista nie ma podstaw do wykluczenia hodowli podludzi, pełniących funkcje niewolników lub całej armii identycznych, szczególnie agresywnych żołnierzy.

STANOWISKO REGULATYWNE

Regulatywiści chętnie charakteryzują swe stanowisko przez odwołanie do następujących tez:

1. Dyskusje na temat eksperymentów na zarodkach ludzkich prowadzone są w języku emocjonalnym i obraźliwym.
2. Nikt nie ma rozstrzygających argumentów w tym sporze.
3. Pluralizm stanowisk moralnych jest faktem niekwestionowanym.

Z tych przekonań zwolennicy stanowiska regulatywnego wyprowadzają rozmaite wnioski normatywne, poszukując rozwiązań kompromisowych. Może ono, na przykład, obejmować następujące tezy:

4. Należy zaakceptować badania na ludzkich zarodkach, lecz nie na płodach, przypisując im jednym i drugim „status specjalny”, ale odrębny.
5. Klonowanie terapeutyczne powinno być dozwolone, ale przeprowadzane tylko w licencjonowanych ośrodkach naukowych i/lub medycznych.
6. Klonowanie reprodukcyjne powinno być w zasadzie zabronione, ale należy je dopuścić w wyjątkowych przypadkach.
7. Jeśli użycie wyposażenia protetycznego jest niepraktyczne, wykorzystanie obcej tkanki lub organów nie powinno budzić zastrzeżeń moralnych.
8. Prawa człowieka nie wiążą się z cechami genetycznymi, ale z ludzkim odczuwaniem i planami życiowymi.

Regulatywiści stwierdzają oczywisty fakt – spory o dopuszczalność eksperymentów na ludzkich zarodkach prowadzone są często (1) w „języku emocjonalnym i obraźliwym”. W prasowych dyskusjach i w ustnych polemikach zwolennicy badań oskarżani są o mordowanie istnień ludzkich – przeciwnicy o beztroskie lekceważenie dobra chorych. Zarzuty te nie opisują, rzecz jasna, intencji osób, przeciw którym są kierowane. Prohibicjonista rozumie, że biolodzy, prowadzący eksperymenty na zarodkach, nie mają intencji dokonywania zabójstw. Oskarża ich raczej o to, że nieświadomie, czy

mimochodem – zabijają ludzkie istoty, odmawiając przyjęcia tego faktu do wiadomości. W rzeczywistości to złagodzone oskarżenie nie ma jednak sensu, ponieważ przypisuje biologom zupełnie nieprawdopodobne stany umysłu. W złagodzonej formie zarzut głosi, że biolog nie jest w stanie pojąć, czym jest zabójstwo, albo nie umie odróżnić człowieka od nieczłowieka. Tak grube oskarżenia nie dadzą się pogodzić z powszechnie uznawaną inteligencją i uczciwością obwinianych, mają, więc charakter jawnie demagogiczny.

Niewiele lepiej brzmią zarzuty kierowane pod adresem prohibicjonistów, jeśli się ich oskarża o to, że są niewrażliwi na los osób ciężko chorych, świadomie wstrzymują postęp badań, popadają w obskurantyzm i ulegają nieracjonalnym przesądom. Choć taka postawa nie jest całkiem wykluczona, gdyż prohibicjoniści stanowią z reguły grupę społeczną mniej ceniącą osiągnięcia naukowe i charakteryzującą się niższym poziomem wykształcenia, niż permisywiści, z pewnością część prohibicjonistów ma szeroką wiedzę na temat społecznej użyteczności badań naukowych. Mimo to są oni autentycznie przerażeni perspektywą hodowania zarodków jedynie w tym celu, by ich tkanki zostały wykorzystane do leczenia ludzi chorych. Jeśli permisywista uzna ten pogląd za moralnie błędny, to i tak powinien pamiętać, że jest to pogląd moralny, z którym należałoby polemizować, bez oskarżeń o niewrażliwość i tendencyjność.

W pełni racjonalna dyskusja etyczna jest zawsze trudna. Między prohibicjonistą i permisywistą wydaje się wprost niemożliwa. W tym sporze obie strony znają argumenty swych oponentów i uważają je za krańcowo błędne lub nieprzekonujące. Jest tak, ponieważ w sprawie dopuszczalności eksperymentów na zarodkach w istocie (2) „nie ma rozstrzygających argumentów”. Ta sytuacja nie powinna nas dziwić. Możliwość wykorzystania ludzkich zarodków do produkcji komórek macierzystych nie była w przeszłości znana, a dziś jednym kojarzy się z instrumentalizacją ludzkiego ciała, a innym ze szlachetnym działaniem na rzecz chorych. I nic na to nie można poradzić, że to samo zachowanie jednym kojarzy się w jeden sposób, a innym inaczej. Skąd tak wielka różnica? Ponieważ obie tendencje skojarzeniowe wspierane są przez silne tabu – obowiązek pomocy chorym i szacunek dla ludzkiego życia. A jednocześnie zakres występowania tych postaw nie jest w kulturze jasno określony i żadna z tych postaw nie poddaje się łatwo modyfikacji pod wpływem racjonalnych argumentów. Maria Ossowska wspominała o zdziwieniu, jakiemu uległ pewien mieszkaniec Afryki, gdy mu powiedziano o śmierci kilku milionów żołnierzy podczas Pierwszej Wojny Światowej i gdy dodano, że ich ciała po prostu zakopano, nie poddając żadnemu procesowi utrwalenia, choćby przez zjedzenie. Europejskie poczucie wyższości wobec tego typu zdziwienia ma dość liche podstawy. Nie powinno nas oburzać, że pewne plemiona przechowują ludzkie szczątki w sakiewce wypełnionej tłuszczem i używają jej zawartości jako rytualnej lub leczniczej maści, ani to, że w pewnych kulturach istnieje zwyczaj noszenia w naszyjniku zębów zmarłego, jeśli był wysoko cenioną postacią. W ten sposób obce kultury okazują szacunek zmarłym i nie przeciwstawiają tego szacunku ewentualnej wartości utylitarnej ich szczątków. W Europie, szczególnie po Drugiej Wojnie Światowej, myśli się zupełnie inaczej. Grozę budzi przypomnienie o wykorzystaniu ludzkich włosów do produkcji poduszek, skóry do wytwarzania abażurów lub kości jako rączki do grzebienia. Utylitarne użycie zwłok jest dla nas świętokradztwem. Co jednak dzieje się z ludzkimi szczątkami, gdy zostaną zakopane w ziemi, lub gdy się je spopieli, a popiół

rozsypie we wskazanym zawczasu przez zmarłego miejscu? Czy ich los jest lepszy? Czy to nie jest świętokradztwo?

Prohibicjoniści mają tendencję do ulegania przeciwnym reakcjom wobec przedmiotów biologicznie bardzo do siebie podobnych. Dzielą świat na mityczne kategorie, z których każda otoczona jest nimbem innych skojarzeń i innych uczuć, mimo swego zewnętrznego podobieństwa. Prohibicjonista uważa, że ludy Afryki są niepodobne do Europejczyków i dlatego zachowują się inaczej. Zwłoki wroga są czymś innym niż zwłoki sojusznika i dlatego obowiązek pochówku ma w obu przypadkach inny charakter. Tkanki używane w przeszczepach są czymś innym niż komórki macierzyste. Złożenie zwłok do poświęconej ziemi nie ma nic wspólnego z tym, w jakim będą one stanie po kilku tygodniach. Odrębne symbole, którymi się posługujemy myśląc o ludzkim ciele, o tkankach embrionalnych i o narządach, pozwalają nam stworzyć odrębne kategorie rzeczy i następnie każdej z tych kategorii przypisać inny rodzaj nienaruszalności czy nawet ograniczonej świętości. Te reakcje przybierają czasami charakter trudny do zrozumienia, nawet w kategoriach symbolicznych. Dobrym przykładem ambiwalentnych uczuć w sytuacji głęboko otoczonej symboliką, jest następujący epizod. Kobieta karmiąca niemowlę piersią zostawia odcignięte mleko w lodówce. Jej mąż przez nieuwagę mleko wypija. Groza, jaką w przeciętnym mężczyźnie budzi ta pomyłka, daje się wytłumaczyć tylko jako relikwyt myślenia całkiem magicznego. Jak pisała Mary Douglas [2], poczucie czystości fizycznej, metafizycznej i moralnej łączy się ze ścisłym przestrzeganiem arbitralnie ustanowionych kategorii. Złamanie tych kategorii prowadzi do poczucia winy i przekonania o naruszeniu tabu, grożącym kataklizmem.

Dla regulatywisty postawa prohibicjonisty nacechowana jest podobnym atawizmem. Jednak takie postrzeganie prohibicjonisty, choć dobrze uzasadnione, nie może być podstawą dla potępienia jego postawy. Wolno być atawistą. Uleganie tabu jest postawą nieracjonalną, ale społecznie dopuszczalną. W sprawie eksperymentów na embrionach nie ma, więc rozstrzygających argumentów. Z drugiej strony permissywiści chcą całkowicie oczyścić nasze myślenie z mitów, symboli, poczucia tabu i poczucia świętości. Jest to postawa nieodzowna w nauce, ale niechętnie poprzestajemy na niej w życiu osobistym i społecznym. Chcemy uznawać pewne rzeczy za święte i pewne zachowania za bluźniercze. Spór dotyczy, więc nie tego, jakie postawy są dopuszczalne, tylko tego, przy jakiej okazji mamy prawo je demonstrować. Każdy ma prawo do jakiejś świętości, ale dlaczego przedmiotem świętym i nienaruszalnym ma być ludzki zarodek albo mleko kobiety? Proste reakcje fizjologiczne nie mogą tu służyć jako wystarczające uzasadnienie. Niestety lepszych argumentów też nie ma. Regulatywista musi, zatem stwierdzić, że nie widać szans na pogodzenie stanowisk prohibicjonisty i permissywisty. Aby zachować własną racjonalność, regulatywista musi oba te stanowiska ignorować, podkreślając, co najwyżej, że ich żądania są niebezpiecznie wysokie, a zdolność obrony głoszonych przekonań żenująco ograniczona.

Zatem, choć prohibicjoniści i permissywiści mogą pozostać przy swoim zdaniu i zbierać sobie zwolenników, nie wolno pozwolić, by swe poglądy narzucali innym metodami administracyjnymi. Trzeba mieć na uwadze, że choćby prohibicjonista akceptował przetaczanie krwi i transplantacje, to w każdej chwili może się wycofać z tej zgody, jeśli tylko dostrzeże, że jest ona nie do pogodzenia z ogólnie głoszoną przez

niego zasadą, że ludzkie tkanki są święte i nienaruszalne. Takim ludziom nie można powierzyć ani losu innych jednostek, ani przyszłości nauki. Podobnie nie można zabronić permisywistom, by popularyzowali ideę „dzieci na zamówienie”. Wolno im domagać się, by nauka dążyła do poprawy biologicznej sprawności przyszłych pokoleń i wolno im zabiegać o to, by ich własne dzieci były możliwie najbardziej bliskie wymarzonego przez nich ideału. Nie należy natomiast pozwolić, by instytucje medyczne były wykorzystane do produkcji rasy „supermenów”, lub by ktokolwiek mógł zabijać dzieci niespełniające wygórowanych ambicji ich rodziców. Powinniśmy wyraźnie widzieć, że racjonalna dyskusja na temat eksperymentów na zarodkach musi być prowadzona bez udziału prohibicjonistów i permisywistów. Ich stanowisko jest nieprzejednane i ma na celu agitację na rzecz wybranych rozwiązań, a nie dążenie do znalezienia rozwiązania najbardziej przekonującego i najlepiej uzasadnionego.

Na szczęście między tymi dwoma skrajnymi poglądami można znaleźć wiele miejsc pośrednich. Dobrze, więc z góry założyć i usprawiedliwić pluralizm poglądów (3) na temat dopuszczalnego traktowania zarodków, pozwalając, by każda propozycja umiarkowana, którą zechcą zaproponować regulatywiści, miała szansę obrony.

Jako założenie wstępne, stanowiące konsekwencję odrzucenia poglądu prohibicyjnego, należy uznać (4), że „badania na ludzkich zarodkach są dopuszczalne” pod warunkiem, że służą jakimś wartościowym celom. Jak starałem się pokazać, zarodków nie wolno traktować jako przedmiotów, mających tylko tę wartość, jaką się wykażą w stosunku do osób, które nimi dysponują. Z drugiej strony, zarodki nie są też człowiekiem w sensie implikującym prawa człowieka i nie mają osobniczej autonomii. Należy, zatem przypisać zarodkom „status specjalny”, różny od statusu człowieka i różny od zbioru ludzkich komórek, pozbawionych totipotencjalności. Pogląd ten zbiega się z powszechnie występującymi przekonaniem. Pamiętajmy, że zarodkom nie nadaje się imion, nie wykupuje polisy na życie i nie urządza pogrzebu, gdy umrą. Z drugiej strony nie godzimy się, by zarodki mogły ulec „kommodyfikacji”, czyli, by wolno było przekształcać je w towar objęty prawem własności z klauzulą przekazywalności na mocy odpowiednich porozumień handlowych. Wydaje się, że każda propozycja odejścia od tych wstępnych założeń wymaga jasnego uzasadnienia.

Gdy przyjmimy specjalny status zarodków, to konsekwentnie możemy uznać, że (5) „klonowanie terapeutyczne powinno być dozwolone, choć powinno być przeprowadzane tylko w licencjonowanych ośrodkach naukowych i/lub medycznych”. Linie komórek macierzystych i tkanki pochodzenia embrionalnego muszą być odpowiednio przechowywane i traktowane, by nie utraciły swych potencjalnie wysokich właściwości terapeutycznych. Ich biologiczną użyteczność potrafią określić tylko wyspecjalizowane instytucje, których standardy pracy nie mogą budzić najmniejszych wątpliwości. Tak jak dobór zarodków do implantacji podlegać musi bardzo surowej kontroli, by zminimalizować ryzyko wytworzenia uszkodzeń w płodzie, podobnie należy zadbać, aby tkanki ludzkie, używane w terapii były najwyższej jakości, dającej szansę pełnego powodzenia terapeutycznego. Trzeba z góry zapobiec możliwości wykształcenia się „szarego” rynku usług z zakresu klonowania terapeutycznego, by zapewnić skuteczną ochronę interesom osób poddawanych terapii i interesom osób, będących dawcami

zarodków. Dobrze nadzorowane klonowanie terapeutyczne nie powinno budzić żadnych zastrzeżeń.

Natomiast (6) klonowanie reprodukcyjne powinno być zabronione. Przeciw tej zasadzie przemawia fakt, że przez wieki poczęcie i urodzenie dziecka było osobistą sprawą rodziców i decyzja o posiadaniu dziecka nie podlegała żadnej kontroli społecznej. To prawda. Ten stan rzeczy nie był może rozwiązaniem optymalnym z punktu widzenia potomstwa, ponieważ wiele dzieci pozostawiano po urodzeniu bez należytej opieki, jednak nie do pomyślenia były jakiegokolwiek ograniczenia w tym zakresie. Nie istnieją kryteria medyczne, policyjne, psychiatryczne ani filozoficzne mogące jednoznacznie orzec, że pewne jednostki nie nadają się na rodziców. Permisywiści nie mają jednak prawa do uznania tej powszechnej tolerancji dla posiadania dzieci przez każdego za objaw społecznej akceptacji dla wszelkich metod reprodukcji, w tym dla klonowania. Te przypadki nie są analogiczne. W przypadku dzieci poczętych i rodzących się w tradycyjny sposób, występuje silna presja społeczna, nakazująca troskę o potomstwo. Ponadto, zarówno fizjologiczne procesy występujące podczas ciąży, jak i emocjonalne zmiany indukowane przez ciężarną kobietę u mężczyzny, który jest sprawcą ciąży, mają tendencje do wytworzenia u rodziców trwałej postawy opiekuńczej. Takie zjawiska nie będą występować w przypadku eksperymentalnie prowadzonej ciąży, na zamówienie osób zlecających wyprodukowanie ludzkich klonów. Można się też obawiać, że zezwolenie na klonowanie doprowadziłoby do rozmaitych – wspomnianych już wyżej – nadużyć, takich jak wyprodukowanie kopii jakiejś osoby bez jej wiedzy i zgody, wyprodukowanie chimer międzygatunkowych lub jednostek obciążonych dysfunkcjami. Żaden instytut badawczy, i żadne laboratorium nie nadają się na rodziców, zatem klonowanie reprodukcyjne powinno pozostać zabronione.

Można jednak rozważać sytuację, analogiczną do omawianych przez Jan Joerdena [3], skłaniającą do przyjęcia pewnych wyjątków od ogólnego zakazu klonowania reprodukcyjnego. Wyobraźmy sobie rodzinę – ojca, matkę i dziecko – która jedzie samochodem. Samochód wpada w poślizg. W wypadku ginie ojciec i syn. Kobieta nie chce po raz drugi wyjść za mąż, ale nie chce też być samotna. Była ze swoją rodziną bardzo szczęśliwa. Prosi, więc, by z organizmu jej dziecka pobrać komórki, które posłużą do stworzenia klonu. Trudno znaleźć moralnie uzasadnione dla odmowy takiej prośbie. Poddanie się tabuistycznej grozie wywoływanej rzekomym „kazirodztwem” czy „wynaturzeniem” nie może tu posłużyć jak argument. Wyobraźmy sobie inny przypadek, określane jako „*human pharming*”. Pewna społeczność została ogarnięta niezwykle niebezpieczną epidemią, czymś w rodzaju SARS. Większość chorych umiera, ale jeden z chorych jest w stanie pokonać chorobę, ponieważ jego organizm wytwarza odpowiednie przeciwciała. Nie znaleziono nikogo innego o takiej zdolności. Chory zostaje zaproszony na badania do jakiegoś wybitnego instytutu immunologii za granicą. Podczas lądowania samolot się rozbija i chory ginie. Jego nadzwyczajne właściwości immunologiczne zginą razem z nim, jeśli nie pobierzemy komórek z jego ciała, by stworzyć klon, który z jakimś prawdopodobieństwem będzie w stanie wytwarzać podobne przeciwciała. Znowu nie widać dobrego uzasadnienia dla rezygnacji z tej formy klonowania reprodukcyjnego.

Trzeba przyznać, że podobne przypadki albo nie zdarzają się wcale, albo zachodzą bardzo rzadko. To jednak nie zmienia przekonania regulatywisty, że zakaz klonowania

reprodukcyjnego ma charakter konsekwencjalistyczny, a nie deontologiczny. To znaczy, że podstawą zakazu jest nasze przekonanie, iż następstwa klonowania reprodukcyjnego są bardzo niebezpieczne i nieprzewidywalne, a nie prawo moralnie ślepe na konsekwencje. Gdy zatem widzimy, że zachodzi sytuacja, w której rezygnacja z klonowania powoduje bardziej szkodliwe skutki niż podporządkowanie się ogólnemu zakazowi, mamy prawo uznać, że ogólna norma powinna być w tym konkretnym przypadku uchylona. Zakaz klonowania nie jest bezwzględnym imperatywem, którego złamanie jest czynem moralnie niedopuszczalnym; to norma hipotetyczna, której przestrzeganie jest uzasadnione przez wzgląd na konsekwencje.

Można zatem ogólnie stwierdzić, że (7) „jeśli użycie wyposażenia protetycznego jest niepraktyczne, wykorzystanie obcej tkanki lub organów nie powinno budzić zastrzeżeń moralnych”. Protezy są niekontrowersyjne. Jeśli jednak nie można ich zastosować, to powinniśmy się nauczyć, że wykorzystanie organów innych osób lub tkanek pochodzących od jednostek biologicznych o specjalnym statusie, takich jak zarodki, jest wprawdzie instrumentalnym traktowaniem ludzkiego ciała, ale jest zarazem okazywaniem szacunku temu ciału przez przedłużanie jego istnienia w innej formie. Inaczej mówiąc, zakaz instrumentalnego traktowania ludzkiego materiału biologicznego jest słuszny tylko z pewnymi ograniczeniami. Nie wolno świadomej jednostki traktować w sposób niezgodny z jej celami i wyznawanymi przez nią wartościami. Nie wolno także jednostek biologicznych o specjalnym statusie traktować bezceremonialnie i wykorzystywać ich do trywialnych celów. Nie wolno na przykład – jak to napisał jeden ze szczególnie demagogicznych prohibicjonistów – „podawać pasztetu z ludzkich embrionów”, nawet, jeśli permissywiści – jak to ów autor sugerował – nie mają nic przeciw takiej praktyce. Wolno natomiast użyć ludzkich organów od osób żywych i zmarłych za ich aktualną lub *respective*, uprzednią zgodą, i wolno korzystać z tkanek, które choć mają ludzkie pochodzenie, nigdy nie stanowiły części ludzkiej jednostki, zdolnej do odczuwania swych stanów, robienia planów i decydowania o sobie.

Jeśli uznajemy te twierdzenia, to powinniśmy wziąć na siebie odpowiedzialność za swe skojarzenia emocjonalne i symboliczne. Nie powinniśmy określać statusu moralnego jednostki z ludzkim materiałem biologicznym na podstawie jej wyposażenia genetycznego, ponieważ przy tym założeniu każdy zbiór komórek z ludzkimi genami będziemy musieli traktować jako ludzką osobę. Takie stanowisko nie tylko jest paradoksalne, ale fetyszyzuje ludzkie tkanki i ujawnia niezrozumiałą tendencję do magicznego myślenia. Lepiej, więc przyjąć pogląd, iż (8), „prawa człowieka nie wiążą się z cechami genetycznymi, ale z ludzkim odczuwaniem i planami życiowymi”. Człowiekiem jest ten, kto czuje i reaguje, jak człowiek, a nie ten, kto wygląda jak człowiek lub jakiś jego fragment.

Szczegółowa treść propozycji regulatywnych nie ma istotnego znaczenia dla filozofii. Regulatywizm nie jest stanowiskiem dogmatycznym i agitującym, ale stanowiskiem nastawionym na minimalizowanie konfliktów wartości. Regulatywizm nie ma przepisu na skonstruowanie uniwersalnego kompromisu. Zamiast tego wyraża nadzieję, że kompromis taki jest osiągalny i wyraża gotowość rozważenia nowych szczegółowych propozycji. Jest też otwarty na nowe argumenty. Gdyby na przykład, udało się wykazać, że światem rządzi Bóg, gdyby nadto pokazano dowód, że Bóg jest nieomylną instancją moralną, i gdyby przytoczono autentyczną, niebudzącą wątpliwości wypowiedź Boga,

w której zakazuje on klonowania, regulacjonista musiałby zaakceptować taki ciąg argumentów i przejść na stanowisko bliskie prohibicjonizmowi. Gdyby odwrotnie, permisywista wykazał, że Bóg życzy sobie maksymalnego doskonalenia gatunku ludzkiego, że zachęca nas byśmy niekiedy – jak Abraham, skazali na śmierć syna i każde dziecko zabijali, jeśli po urodzeniu okaże się niepełnosprawne i nie ma lepszego DNA niż rodzice, regulacjonista przystałby na program produkowania „*design children*” i zbliżył się do pozycji permisywisty. Filozoficznie ciekawa i merytorycznie wiążąca dyskusja na temat eksperymentu na embrionach może się toczyć tylko w gronie regulatywistów.

LITERATURA

- [1] SOLTER D. et al. Embryo Research in Pluralistic Europe. 2003 Berlin: Springer Verlag.
- [2] DOUGLAS M. Purity and Danger. 1966 Hammondsworth: Penguin Books
- [3] JOERDEN JC. Menschenleben. Ethische Grnd- und Grenzfragen des Medizinrechts. 2003 Sitz Stuttgart: Franz Steiner Verlag.

SZPIKOWE KOMÓRKI MACIERZYTE – IDENTYFIKACJA I ZASTOSOWANIE KLINICZNE*

BONE MARROW STEM CELLS – IDENTIFICATION AND CLINICAL APPLICATION

Dorota DŁUBEK¹, Wojciech WITKIEWICZ², Andrzej LANGE^{1,3}

¹Laboratorium Immunologii Klinicznej, Zakład Immunologii Klinicznej, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, ²Wojewódzki Szpital Specjalistyczny oraz ³Dolnośląskie Centrum Transplantacji Komórkowych z Krajowym Bankiem Dawców Szpiku we Wrocławiu

Streszczenie: Przeszczepianie hematopoetycznych komórek macierzystych jest rutynowo stosowane jako ratująca życie procedura kliniczna w leczeniu rozrostowych chorób hematologicznych i niedoborów wrodzonych. Hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC) są prototypem komórek macierzystych użytecznych w praktyce klinicznej. W szpiku oprócz HSC znajdują się komórki pochodzenia mezenchymalnego, mogące różnicować się w komórki przypominające fibroblasty. Nasze badania wskazują, że wzbogacenie szpiku w komórki o fenotypie: CD34-CD45-CD73+, CD34-CD45-CD90+, CD34-CD45-CD105+ jest związane z liczbą kolonii CFU-F. Populacja komórek szpiku opracowana w celu oczyszczenia komórek jednojądrowych zawierała komórki spełniające kryteria MSC. Uprzednio wykazano, że komórki szpiku podane do niedokrwionych kończyn mogą przynieść poprawę krążenia. Nasze doświadczenia oparte na obserwacji 10 leczonych w ten sposób pacjentów potwierdzają w pełni założenie, że populacja komórek szpiku wywiera pozytywny wpływ na angiogenezę w niedokrwionych kończynach. Pozostaje otwartą kwestią, czy tkankowo specyficzne komórki macierzyste wywodzą się pluripotencjalnych prekursorów, jakimi mogą być komórki MSC czy też rezydują w szpiku.

Słowa kluczowe: szpikowe komórki macierzyste, macierzyste komórki mezenchymalne, CFU-F, choroba niedokrwienna kończyn.

Summary: Hematopoietic stem cells transplantation belongs to the routine clinical activity as a life saving procedure in several hematological malignancies and inborn errors. HSC are also a prototype of stem cells that are applicable in clinical practice. In the marrow in addition to HSC reside cells of mesenchymal origin which may differentiate into fibroblast-like cells. Our own study showed that phenotype of cells, which enrichment is associated with the number of CFU-F, is as follows: CD34-CD45-CD73+, CD34-CD45-CD90+, CD34-CD45-CD105+. Population of marrow cells processed for enrichment for mononuclear cells contained cells meeting the criteria of MSC. It has been already

*Praca była finansowa przez KBN w ramach grantu nr PBZ-KBN-083/PO5/2002.

shown that marrow cells injected into ischemic legs may bring an improvement of circulation. Our experience based on 10 treated and observed cases fully supports the notion on positive effect of marrow cell population on angiogenesis in ischemic legs. It is still open question which cells give a rise to tissue specific stem cells whether they originate from pluripotent precursors with MSC as a candidate or from tissue orientated stem cells residing in marrow.

Key words: bone marrow stem cells, mesenchymal stem cells, CFU-F, ischemic legs.

Wiadomo, że komórki macierzyste izolowane z ludzkich embrionów (ESC – *Embryonic Stem Cell*) dzięki swojej plastyczności mogą różnicować się w mięsień, skórę, kość, tkankę nerwową i inne tkanki [22, 28, 37]. Zastąpienie chorej tkanki lub jej ubytku przeszczepem wyprowadzonym z ESC mogłoby być wykorzystane w leczeniu pacjentów cierpiących z powodu chorób nieuleczalnych bez transplantacji. Wykorzystanie ESC budzi wątpliwości natury etycznej i proceduralnej, co hamuje ich badanie i w konsekwencji uniemożliwia praktyczne ich wykorzystanie [27, 34]. Alternatywą dla komórek ESC są komórki macierzyste izolowane z tkanek osób dorosłych. Prototypem zastosowania w leczeniu człowieka komórek macierzystych był przeszczep komórek hematopoetycznych zawartych w szpiku. Pierwotne komórki macierzyste szpiku (HSC – *Hematopoietic Stem Cell*) mają zdolność różnicowania we wszystkie komórki krwi i są odpowiedzialne za utrzymanie hematopoezy przez cały okres życia organizmu. Pierwszy przeszczep szpiku wykonano w 1939 roku, aczkolwiek dopiero postęp w badaniu antygenów zgodności tkankowej i zastosowanie immunosupresji doprowadziło do rzeczywistego, klinicznego wykorzystania tego typu przeszczepu. W ciągu ostatnich kilku lat zaobserwowano zjawisko tzw. plastyczności (lub transróżnicowania) HSC, tzn. możliwości różnicowania w komórki niehematopoetyczne [6, 12, 24, 14]. Wiele ludzkich tkanek zawiera populacje komórek macierzystych mających zdolność do odnawiania się, która związana jest z urazem, chorobą czy wiekiem. Komórki te znajdują się zarówno w tkance, którą odnawiają, jak również w innych tkankach służących jako rezerwuuar komórek macierzystych. Chociaż szpik kostny jest głównym źródłem macierzystych komórek hematopoetycznych (HSC) odnawiających krążącą krew, to można te komórki spotkać w innych tkankach. Dojrzały szpik kostny oprócz komórek hematopoetycznych zawiera również adherentne komórki podścieliska o pochodzeniu niehematopoetycznym, które razem z macierzą międzykomórkową tworzą mikrośrodowisko szpiku kostnego (podścielisko). Składnikami komórkowymi podścieliska są komórki endotelialne, makrofagi, komórki tłuszczowe, fibroblasty, komórki prekursorowe odpowiedzialne za osteogenezę. W szpiku kostnym znajdują się dodatkowo progenitorowe komórki mezenchymalne (MSC) biorące udział w regeneracji tkanek mezenchymalnych, takich jak: m.in. kości, chrząstki, mięśnie, ścięgna czy podścielisko. Szereg przeprowadzonych badań sugeruje, że HSC potrafią osiedlać się w odległych narządach i różnicować się w komórki mięśniowe [4, 32], centralnego układu nerwowego [3], nabłonka płuc i jelit [15, 9, 2], hepatocyty [10, 38] i komórki śródbłonka naczyń mięśnia sercowego [25, 17]. Przyjmuje się, że osiedlanie w odległych narządach i przemiana w inny rodzaj komórek w znacznym stopniu umożliwiona jest dzięki zdolności HSC do opuszczania szpiku i krążenia wraz krwią po całym organizmie. Obecnie nie są jeszcze znane mechanizmy regulujące zjawisko plastyczności komórek

macierzystych, szczególnie że przyjmuje się alternatywnie obecność zarówno w szpiku, jak i narządach komórek macierzystych zdefiniowanych ze względu ich drogi dalszego różnicowania się. Uwalniane ze szpiku lub rezydujące już w narządzie mogą zapoczątkować odnowę uszkodzonej tkanki [26]. Zaobserwowano, że osiedlanie się i plastycznych HSC lub już tkankowo zdefiniowanych prekursorów jest znacznie zwiększona w przypadku uszkodzenia tkanki lub narządu [20]. Ilość HSC osiedlających się w nieuszkodzonej tkance i ulegających plastyczności jest niewielka, a w niektórych modelach doświadczalnych nawet nieobserwowalna [13, 29]. Prawdopodobnie, czynniki wzrostu czy cytokiny wydzielane w miejscu uszkodzenia zwiększają zdolność HSC do osiedlania się i plastyczności. Spekuluje się, że zjawisko to stanowić może jeden z elementów naturalnego mechanizmu odbudowy uszkodzonej tkanki. Rozpoczęte badania nad plastycznością komórek macierzystych szpiku doprowadziły do opisanie mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC – *Mesenchymal Stem Cell*), które prawdopodobnie zachowują plastyczność zbliżoną do komórek ESC [7, 31, 11, 23, 33]. MSC w odróżnieniu od HSC nie mają na powierzchni antygenów CD45 i CD34 [18, 30, 16, 1]. Istnieją doniesienia, że komórki o fenotypie szpikowych niehematopoetycznych komórek pnia mogą również znajdować się w krwi obwodowej i pępowinowej [5, 35, 39, 8].

W prowadzonych badaniach wykorzystaliśmy fakt, że progenitory o potencjale regenerującym uszkodzone tkanki znajdują się w szpiku kostnym i właściwość tę można zastosować klinicznie przy próbach regeneracji naczyń u pacjentów z krytycznym, przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych w przebiegu miażdżycy zarostowej tętnic ze zmianami w odcinku udowo-podkolanowym. Pacjenci kwalifikowani do przeszczepu musieli spełniać następujące warunki:

- (i) wskaźnik $ABI < 0,5$,
- (ii) ból w spoczynku i/lub owrzodzenia troficzne,
- (iii) wyczerpane możliwości leczenia chirurgicznego i zachowawczego.

Nasze wstępne badania kliniczne wskazują, że populacja komórek jednojądrowych szpiku kostnego może indukować angiogenezę i poprawiać unaczynienie w niedokrwienych kończynach dolnych [36].

Operacyjnie pobierano około 600 ml krwi szpikowej, z której próbkę wykorzystywano do dalszych badań. Ta reprezentatywna dla przeszczepianego materiału próbka została opisana pod względem morfologicznym, fenotypowym i genetycznym. Wyjściowa populacja szpiku zawierała średnio 40% komórek jednojądrowych i 60% granulocytów, 0,6% komórek CD34+ i 10% komórek CD34-CD45-. Technika *Real Time PCR* badano obecność transkryptów dla VEGF i dla par (receptor-ligand) genów dla SDF-1- CXCR4, CX3CL – CX3CR1. Całość preparatu poddano oczyszczaniu na separatorze komór-kowym COBE Spectra 6,0 z ręcznym sterowaniem parametrami separacji, kierując się wartościami hematokrytu populacji oczyszczonej z docelową wartością od 4 do 5%. Z doświadczenia wiemy, że tego typu warunki separacji związane są z optymalnym pozyskiwaniem komórek jednojądrowych obejmujących populacje (opisane parametrami FSC i SSC) małych komórek bez ziarnistości oraz dużych komórek, ale z niskim SSC. W wyniku separacji otrzymywano ok. 50 ml zawiesiny komórek zubożonych w granulocyty do średnio 40%. Z tak pozyskanego

preparatu pobierano minimum 50×10^8 komórek i poddawano je szczegółowemu opisowi fenotypowemu z uwzględnieniem markerów identyfikujących komórki krwiotwórcze i MSC oraz opisowi genetycznemu (VEGF i pary genów SDF-1 - CXCR4, CX3CL - CX3CR1). Ponadto badano ilość komórek o potencjale klonogennym dającym początek koloniom CFU-F (*colony forming unit-fibroblast*), będącym również markerem obecności MSC. Podstawą fenotypowego opisu MSC było założenie, że komórki te nie mają na swojej powierzchni antygenów charakterystycznych dla komórek hematopoetycznych (CD34 i CD45), stwierdza się natomiast obecność antygenu CD90 (Thy-1) oraz białek błonowych SH2, SH3 i SH4, których obecność nie jest stwierdzana na prekursorach hematopoetycznych. W badaniach komórek mezenchymalnych, wykonywanych metodami trójkolorowej cytometrii przepływowej wykorzystuje się, oprócz przeciwciał anti-CD34 i anti-CD45, przeciwciała anti-CD73, anti-CD90 i anti-105. Antygeny CD73 i CD105 są rozpoznawane odpowiednio przez przeciwciała anti SH3 i SH4 (CD73) oraz anti SH2 (CD105).

Oczyszczona za pomocą COBE Spectra 6.0 populacja komórek, kwalifikująca się do celów transplantacyjnych, zawierała komórki CD34 i komórki spełniające fenotypowe kryteria MSC: CD45-CD34-, CD45-CD34-CD105+, CD45-CD34-CD90+ i CD45-CD34-CD73+.

Czynnikiem ograniczającym i ukierunkowującym różnicowanie się komórek do CFU-F jako markera obecności MSC było medium faworyzujące wzrost CFU-F. W hodowli z medium dla MSC było średnio 20 kolonii/ 10^6 komórek w preparatach po separacji przy użyciu COBE Spectra 6.0, podczas gdy pełna populacja komórek szpikowych dawała około 8 razy mniej kolonii/ 10^6 komórek. Porównanie siły ekspresji transkryptów dla VEGF i dla par ligand/receptor (SDF-1 - CXCR4, CX3CL - CX3CR1) wykazało, że materiał po separacji zawiera co najmniej taką samą liczbę transkryptów jak wyjściowy szpik.

W celu wzbogacenia populacji komórek w komórki mezenchymalne wykonano negatywną selekcję komórek, wykorzystując firmowy koktajl przeciwciał (glikoforyna A, CD3, CD14, CD19, CD66b, CD38), który po połączeniu z komórkami reagował krzyżowo z krwinkami czerwonymi tworząc rozety (*RosetteSep Mesenchymal Stem Cell Enrichment Cocktail, StemCell Technology, Canada*), które łatwo można było usunąć przez wirowanie w gradiencie gęstości. Populacja oczekiwanych komórek (wzbogacone MSC), nietworząca rozet umiejscawiała się w interfacie pomiędzy osoczem a medium do wirowania w gradiencie gęstości. Dzięki izolacji wyeliminowano z zawiesiny komórkowej komórki znajdujące się na wyższych etapach różnicowania, które mogą nosić na sobie markery MSC. Stwierdziliśmy, że udział komórek spełniających fenotypowe kryteria MSC wzrósł średnio 9 razy, przy czym dla poszczególnych subpopulacji komórek mezenchymalnych wzrost wyniósł odpowiednio (i) 5 razy dla komórek CD45-CD34-, (ii) 11 razy dla CD45-CD34-CD105+, (iii) 10 razy dla CD45-CD34-CD90+ i (iv) 8 razy dla komórek CD45-CD34-CD73+.

Liczba kolonii CFU-F/ 10^6 rosnących z populacji komórek wzbogaconych w MSC wzrosła średnio 4 razy w porównaniu z preparatem po separacji na COBE Spectra 6.0.

Prowadząc w medium promującym wzrost MSC długoterminowe hodowle komórek wzbogaconych w MSC otrzymywaliśmy, po 7–8 tygodniach (3–4 pasażę), populację komórek o ponad dwukrotnie większej komórkowości, zawierającą średnio 30% komórek nie wykazujących ekspresji markerów hematopoetycznych CD45 i CD34 oraz będących fenotypowo czystą populacją komórek mezenchymalnych (CD90+, CD73+ i CD105+).

Na podstawie programu klinicznego przedstawiliśmy koncepcję zastosowania komórek macierzystych w leczeniu człowieka. Nie wiemy, czy prymitywne, rzeczywiście plastyczne komórki macierzyste doprowadzają do odnowy tkanki czy też zdefiniowane tkankowo córki, tym nie mniej można wyizolować z organizmu dorosłego człowieka szpikowe populacje komórkowe, które podane do uszkodzonego narządu dają początek odnowie. Badania nad komórkami macierzystymi, poza hematopoetycznymi, weszły w istotną dla chorych i nauki fazę kliniczną.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BADDOO M, HILL K, WILKINSON R, GAUPP D, HUGHES C, KOPEN GC, PHINNEY DG. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 2003; **89**(6): 1235–1249.
- [2] BRITTAN M, HUNT T, JEFFERY R, POULSOM R, FORBES SJ, HODIVALA-DILKE K, GOLDMAN J, ALISON MR, WRIGHT NA. Bone marrow derivation of pericyptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut* 2002; **50**(6): 752–757.
- [3] COGLE CR, YACHNIS AT, LAYWELL ED, ZANDER DS, WINGARD JR, STEINDLER DA, SCOTT EW. Bone marrow transdifferentiation in brain after transplantation: a retrospective study. *Lancet* 2004; **363**(9419): 1432–1437.
- [4] DE BARI C, DELL'ACCIO F, VANDENABEELE F, VERMEESCH JR, RAYMACKERS JM, LUYTEN FP. Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003; **160**(6): 909–918.
- [5] ERICES A, CONGET P, MINGUELL JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; **109**(1): 235–242.
- [6] FANG B, SHI M, LIAO L, YANG S, LIU Y, ZHAO RC. Multiorgan engraftment and multilineage differentiation by human fetal bone marrow Flk1+/CD31-/CD34- Progenitors. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; **12**(6): 603–613.
- [7] FUKUDA K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering. *Artif Organs* 2001; **25**: 187–193.
- [8] GANG EJ, JEONG JA, HONG SH, HWANG SH, KIM SW, YANG IH, AHN C, HAN H, KIM H. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004; **22**(4): 617–624.
- [9] GEHLING UM, ERGUN S, SCHUMACHER U, WAGENER C, PANTEL K, OTTE M, SCHUCH G, SCHAFFHAUSEN P, MENDE T, KILIC N, KLUGE K, SCHAFFER B, HOSSFELD DK, FIEDLER W. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; **95**(10): 3106–3112.
- [10] GROMPE M. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. *Semin Liver Dis* 2003; **23**(4): 363–372.
- [11] HACEIN-BEY-ABINA S, LE DEIST F, CARLIER F, BOUNEAUD C, HUE C, DE VILLARTAY JP, THRASHER AJ, WULFFRAAT N, SORENSEN R, DUPUIS-GIROD S, FISCHER A, DAVIES EG, KUIS W, LEIVA L, CAVAZZANA-CALVO M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by *ex vivo* gene therapy. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1185–1193.
- [12] HERZOG EL, CHAI L, KRAUSE DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; **102**(10): 3483–3493.
- [13] HORWITZ EM. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res* 2003; **34**(6): 600–606.

- [14] HUTTMANN A, LI CL, DUHRSEN U. Bone marrow-derived stem cells and „plasticity”. *Ann Hematol* 2003; **82**(10): 599–604.
- [15] IMAI K, KOBAYASHI M, WANG J, OHIRO Y, HAMADA J, CHO Y, IMAMURA M, MUSASHI M, KONDO T, HOSOKAWA M, ASAKA M. Selective transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells: a role in homing of progenitor cells. *Blood* 1999; **93**(1): 149–156.
- [16] IN «T ANKER PS, NOORT WA, SCHERJON SA, KLEIJBURG-VAN DER KEUR C, KRUISSELBRINK AB, VAN BEZOOIJEN RL, BEEKHUIZEN W, WILLEMZE R, KANHAI HH, FIBBE WE. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003; **88**(8): 845–852.
- [17] JACKSON KA, MAJKA SM, WANG H, POCIUS J, HARTLEY CJ, MAJESKY MW, ENTMAN ML, MICHAEL LH, HIRSCHI KK, GOODELL MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; **107**(11): 1395–1402.
- [18] JONES EA, KINSEY SE, ENGLISH A, JONES RA, STRASZYNSKI L, MEREDITH DM, MARKHAM AF, JACK A, EMERY P, MCGONAGLE D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 2002; **46**(12): 3349–3360.
- [19] KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, KALKA-MOLL WM, SILVER M, KEARNEY M, LI T, ISNER JM, ASAHARA T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**(7): 3422–3427.
- [20] LARGAESPADA DA, VERFAILLIE CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; **418**: 689341–689349.
- [21] MUOHARA T, IKEDA H, DUAN J, SHINTANI S, SASAKI K, EGUCHI H, ONITSUKA I, MATSUI K, IMAIZUMI T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; **105**(11): 1527–1536.
- [22] ODORICO JS, KAUFMAN DS, THOMSON JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; **19**:3 193–204.
- [23] QU_PETERSEN Z, DEASY B, JANKOWSKI R, IKEZAWA M, CUMMINS J, PRUCHNIC R, MYTINGER J, CAO B, GATES C, WERNIG A, HUARD J. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002; **157**(5): 851–864.
- [24] QUESENBERRY P, COLVIN G, LAMBERT JF, ABEDI M, CERNY J, DOONER M, MOORE B, MCAULIFFE C, DEMERS D, GREER D, PARENT A, BADIIVAS E, LUM L, FALANGA V. Marrow stem cell potential within a continuum. *Ann NY Acad Sci* 2003; **996**: 209–221.
- [25] RAFII S, MEEUS S, DIAS S, HATTORI K, HEISSIG B, SHMELKOV S, RAFII D, LYDEN D. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2002; **13**(1): 61–67.
- [26] RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells «hide out» in the bone marrow. *Leukemia* 2004; **18**(1): 29–40.
- [27] ROBERTSON JA. Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. *Nat Rev Genet* 2001; **1**: 74–78.
- [28] SATO M, NAKANO T. Embryonic stem cell. *Intern Med* 2001; **3**: 195–200.
- [29] SHIH CC, DIGIUSTO D, MAMELAK A, LEBON T, FORMAN SJ. Hematopoietic potential of neural stem cells: plasticity versus heterogeneity. *Leuk Lymphoma* 2002; **43**(12): 2263–2268.
- [30] SUVA D, GARAVAGLIA G, MENETREY J, CHAPUIS B, HOFFMEYER P, BERNHEIM L, KINDLER V. Non-hematopoietic human bone marrow contains long-lasting, pluripotential mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2004;**198**(1): 110–118.
- [31] TOCCI A, FORTE L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. *Hematol J* 2003; **4**(2): 92–96.
- [32] TORRENTE Y, BELICCHI M, SAMPAOLESI M, PISATI F, MEREGALLI M, D'ANTONA G, TONLORENZI R, PORRETTI L, GAVINA M, MAMCHAOUI K, PELLEGRINO MA, FURLING D, MOULY V, BUTLER-BROWNE GS, BOTTINELLI R, COSSU G, BRESOLIN N. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004;**114**(2): 182–195.
- [33] TORRENTE Y, D'ANGELO MG, LI Z, DEL BOR R, CORTI S, MERICKSKAY M, DELISO A, FASSATI A, PAULIN D, COMI GP, SCARLATO G, BRESOLIN N. Transplacental injection of somite-derived cells in mdx mouse embryos for the correction of dystrophin deficiency. *Hum Mol Genet* 2000; **9**: 1843–1852.
- [34] TREPAGNIER DM. Human embryonic stem cell research: implications from an ethical and legal standpoint. *J La*

- State Med Soc* 2000; **152**: 12616–12624.
- [35] WANG JF, WANG LJ, WU YF, XIANG Y, XIE CG, JIA BB, HARRINGTON J, MCNIECE IK. Mesenchymal stem/progenitor cells in human umbilical cord blood as support for ex vivo expansion of CD34(+) hematopoietic stem cells and for chondrogenic differentiation. *Haematologica* 2004; **89**(7): 837–844.
- [36] LANGE A, WITKIEWICZ W, DLUBEK D, MASLOWSKI L, DRABCZAK-SKRZYPEK D, JASKULA E, SZYMCZAK B, DUDA D, LANGE J. A bone marrow population containing both hematopoietic and mesenchymal stem cells constitutively expressing genes pairs for: SDF1-CXCR4, CX3CL-CXCR1 and for VEGF improves vascularization when implanted to ischemic legs. *Blood* 2004; Dec (suppl): 000–000.
- [37] WOBUS AM, GUAN K, YANG HT, BOHELER KR. Embryonic stem cells as a model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation. *Methods Mol Biol* 2002; **185**: 127–756.
- [38] ZHANG Y, BAI XF, HUANG CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003; **9**(2): 201–204.
- [39] ZVAIFLER NJ, MARINOVA-MUTAFCHIEVA L, ADAMS G, EDWARDS CJ, MOSS J, BURGER JA, MAINI RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; **2**(6): 477–488.

Adres: prof. dr hab. Andrzej Lange
Laboratorium Immunologii Klinicznej, Zakład Immunologii Klinicznej,
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN,
ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław

**DYSKUSJA UCZESTNIKÓW KONFERENCJI:
„KOMÓRKI MACIERZYSTE – WYZWANIA
BIOMEDYCZNE, KONTROWERSJE ETYCZNE I PRAWNE” –
WARSZAWA, 22 KWIECZNIA 2004 ROKU**

Prof. Zbigniew Czernicki: Proszę państwa, mam zaszczyt poprowadzić drugą część Konferencji, w której, oprócz przedstawienia stanowiska etyków, bardzo ważną część będzie stanowić dyskusja. Chciałbym, abyśmy początek naszej dyskusji poświęcili dwóm problemom: prawnemu i etycznemu. Nie ma już niestety z nami pani profesor Zielińskiej, ale jest pan doktor Konstanty Radziwiłł, który jest Prezesem Naczelnej Rady Lekarskiej. Pani prof. E. Zielińska powoływała się na dwa akty prawne: prawo powszechne i prawo ujęte przez naszą korporację, w postaci Kodeksu Etyki Lekarskiej. Tak się składa, że większość prac prowadzonych na komórkach macierzystych jest wykorzystywana przez lekarzy. Chciałem, jeśli można, prosić pana Prezesa o przedstawienie stanowiska kogoś, kto razem z panem doktorem Umiastowskim tworzył tę nową wersję Kodeksu Etyki Lekarskiej.

Dr Konstanty Radziwiłł: Panowie Profesorowie, Szanowni Państwo! Dziękuję za zaproszenie na dzisiejszą sesję. Jest ona pasjonująca. I myślę, że to bardzo dobrze, że się odbywa. Oprócz tego, że jestem Prezesem Naczelnej Rady Lekarskiej, to jestem lekarzem rodzinnym, a ponadto, tak się złożyło, że skończyłem również studia podyplomowe z bioetyki. Tak, że mam tytuł do tego, aby zabierać głos na ten temat. Nie ukrywam, że jestem jednym z tych, którzy tworzyli nowelizację ostatniej wersji Kodeksu Etyki Lekarskiej, a dodatkowo jestem przewodniczącym Komitetu Etycznego Stałego Komitetu Lekarzy Europejskich, organizacji wszystkich lekarzy w Unii Europejskiej. Proszę Państwa, dobrze, że ten temat jest w tej chwili dyskutowany w Polsce, również dlatego że tak naprawdę, kiedy słuchaliśmy wypowiedzi, zwłaszcza z pierwszej części, przed przerwą – to można powiedzieć jedną rzecz: co jest istotnym problemem, to kontrowersje wokół komórek macierzystych pobieranych z zarodków. Jak tu już kilka osób powiedziało, komórki macierzyste nieembrionalne nie budzą żadnych wątpliwości i właściwie nie ma specjalnie o czym rozmawiać poza tym, że jest to fascynujący problem medyczny i naukowy. Jest to prawdopodobnie ogromna szansa dla ludzkości. Co do tego nie ma wątpliwości. Ale jeśli powrócić do tego, co rzeczywiście jest problemem, to jest to niewątpliwie problem komórek pobieranych z zarodków. Pan profesor Hołówka przytaczał bardzo barwne przykłady, jak to się odbywa. W międzyczasie przyszedł mi do głowy taki może bardziej prostszy niż podany przez prof. Kotarbińskiego przykład. Mamy do czynienia z tym prawie na co dzień. Przyjeżdża

gdzieś autobus, który właśnie za chwilę odjedzie z przystanku. My jesteśmy po drugiej stronie wypielegnowanego trawnika. Jak się zachowują ludzie w tej sytuacji? Otóż ogromna większość ludzi biegnie na ukos przez ten trawnik, co widać w postaci wydeptanych ścieżek. I tylko nieliczne jednostki są w stanie poświęcić się w taki sposób, żeby nie zdążyć na ten autobus, nie przebiegając przez trawnik. Ja myślę, że to dobrze, że doniesieniom naukowym w tym obszarze jednak towarzyszy refleksja etyczna. To jest niezwykle ważne, ponieważ w ten sposób lokujemy się w tej nielicznej, ale bardziej honorowej, albo godnej grupie tych, którzy są w stanie poświęcić ten jeden autobus i nie przebiec przez trawnik, nie niszcząc go. Ja myślę jednak, mimo tych wszystkich dywagacji o prohibicyjnych, permissyjnych i regulatywnych sposobach podejścia do sprawy, że problem ten sprowadza się do tego, o czym mówiła siostra profesor Chyrowicz, to znaczy, kiedy zaczyna się życie człowieka. Od momentu, kiedy się ono zaczyna, należy mu się odpowiedni szacunek. Oczywiście, prawa człowieka w różnych etapach życia, są różne. Nie ma, co do tego wątpliwości. Pan profesor Hołowka wspominał o prawie do wyboru prezydenta. Ludzie poniżej 18-tego roku życia nie posiadają takiego prawa. I jest wiele innych praw, które różnicują ludzi, np. ubezwłasnowolnionych. Oni też nie mają tego prawa, ale za to mają inne. Ludzie, którzy skończyli 16 lat, mają specjalne uprawnienia, bo ich trzeba zapytać o zgodę przy wykonywaniu eksperymentu, a ludzi młodszych trzeba zapytać, jeśli są do tego zdolni itd. Problem początku życia ludzkiego jest problem i biologów i medyków i etyków i prawników, ale w sumie jest to kwestia zasobów wiedzy, która dawniej była uboższa, a teraz jest bardziej skomplikowana. Wiemy bardzo dużo na ten temat i zaczynamy się zastanawiać, czym jest jedna komórka, a święty Tomasz się nad tym nie zastanawiał, bo jego wyobrażenia z dzisiejszego punktu widzenia były zupełnie fałszywe. Ale my to już wszystko wiemy (*już*) i w związku z tym, chyba jednak trzeba się zastanawiać na przykład, od kiedy się zaczęło moje życie. Moje życie zaczęło się od poczęcia. A gdyby wśród nas siedział człowiek, który jest klonem, nie w rozumieniu pana profesora Jędrzejczaka, który mówił, że wszyscy jesteśmy klonami naszych zygot, ale taki klon z filmu *science fiction*, to on oczywiście też byłby człowiekiem. Kiedy jego życie się zaczyna? Myślę, że zonglowanie pojęciem poczęcia nie jest tutaj stosowne. Bo to nie jest tak, że poczęcie jest istotą początku życia człowieka, początek jego życia jest w momencie powstania zygoty. I myślę, że żaden inny sąd nie jest możliwy. Natomiast jest kwestia przyznania określonych statusów istotom ludzkim, na określonych etapach ich rozwoju. Ja myślę, że traktowanie nas wyłącznie w kategoriach klonów naszych komórek zygotycznych i posługiwanie się kategorią godności tak, jak to usłyszeliśmy przed chwilą, że ta godność może być przydzielana, lub odbierana, to jest chyba jakieś nieporozumienie. Pewnie część z państwa przeczytała książkę Francisa Fukuyamy „Koniec człowieka”. To właśnie trąci takim końcem człowieka. Bo może jest tak, że rzeczywiście dożyliśmy końca człowieka, ale ja w każdym razie wierzę, że nie. Nie będąc specjalistą w dziedzinie, która tu była prezentowana, od strony naukowej, nie mam jednak żadnych wątpliwości, że są drogi, którymi ten trawnik można obejść dookoła. Zresztą już prezentacje, których dzisiaj wysłuchaliśmy, gdzie mówiono o znacznie większych szansach wykorzystywania komórek macierzystych, nie pochodzących z zarodków, i o zagrożeniach, które wiążą się z ewentualnym wykorzystaniem

komórek macierzystych pochodzących z zarodków, np. nowotworzenie, mutacje – to wszystko sugeruje, że być może jest jakaś inna droga. Pojawia się również kwestia substancji, które mogą pomóc komórce przekształcić się w taką, która przypomina komórkę pochodzącą z zarodka. Być może w przyszłości, substancje te będzie można pobierać nie z komórek zarodkowych, ale na przykład syntetyzować. Także to są drogi, które widać już dzisiaj. Myślę, więc, że nie można uznać, że droga prezentowana przez pana profesora Hołówkę jest najprostsza i jedyna. Ona może jest najprostsza dla popularnych dzienników, dla wszystkich, ale dla specjalistów wcale nie jest taka prosta. Było zresztą wyraźnie widoczne na tabelach, które pokazywała pani profesor Domańska-Janik: ile jest zagrożeń ze strony komórek pochodzących z zarodków, a ile jest ze strony komórek już mniej zdolnych do różnicowania się w wielu kierunkach. Widać wyraźnie, że ta sprawa wymaga regulacji. Ale jako lekarz muszę jednak odnieść się do tego, do czego zostałem zobowiązany, to znaczy do prawa. Prawo, i to nie tylko Kodeks Etyki Lekarskiej, bo ci z państwa, którzy słuchali pani profesor Eleonory Zielińskiej, wiedzą, że to także Kodeks Karny i Ustawa o zawodzie lekarza. W przypadku uznania, że zarodkowi przysługują prawa dziecka poczętego, jak mówi polskie prawo, zakazuje się przeprowadzania eksperymentu badawczego na tej grupie istot ludzkich. Kodeks Etyki Lekarskiej dokładnie koresponduje z tymi przepisami. Przypomnę, że art. 26 ust. 3 Ustawy o zawodzie lekarza, art. 157a Kodeksu Karnego, art. 27 Kodeksu Karnego, to są przepisy, które zakazują tego typu praktyk. I to jest nie tylko kwestia etyki, ale również prawa. Jeżeli chodzi o klonowanie, to jest to rzeczywiście wprost zapisane tylko w Kodeksie Etyki Lekarskiej, ale przy założeniu, że dzieckiem poczętym człowiek staje się nie tylko w wyniku poczęcia, ale w wyniku klonowania – a ja broniłbym takiej tezy, bo nie widzę tu specjalnie żadnej różnicy, zwłaszcza że definicji poczęcia w Ustawie nie ma, tylko ona jest intuicyjna – wobec tego wydaje mi się, że po prostu takie same prawa wynikające z Kodeksu Karnego, z Ustawy o zawodzie lekarza i z Kodeksu Etyki Lekarskiej, przysługują zarówno, ewentualnie wyprodukowanym klonom ludzkim, jak i tym zarodkom, które są w sposób mniej, czy bardziej naturalny poczęte, w tradycyjnym rozumieniu tego słowa.

Proszę Państwa! Jeżeli chodzi o transplantacje, to proszę zwrócić uwagę, jak wiele jest dyskusji, dotyczących momentu, w którym można pobrać narząd do transplantacji. Kiedy można uznać człowieka za zmarłego, jakie są definicje, kryteria śmierci pnia mózgu. Minister Zdrowia musi wydać drogą zarządzenia, po odpowiednich konsultacjach ze specjalistami, przepisy (czy kryteria), kiedy można uznać człowieka za zmarłego. Dyskusja na ten temat ciągle się toczy. Czy wystarczy ta regulacja, którą mamy w Polsce, tzn. domniemana zgoda? Proszę zwrócić uwagę, że to dotyczy osób zmarłych, których śmierć w opinii wszystkich specjalistów, jest nieodwracalna. Proszę zwrócić uwagę, jak specjalnej regulacji wymaga pobieranie, na przykład szpiku, szczególnie komórek szpiku z krwi, po wcześniejszym przygotowaniu, w przypadku dziecka. To jest prawnie zaakceptowane, większość akceptuje tę sytuację, mimo że są też głosy, że przekracza to naturalne prawo rodziców do tego, żeby decydować o tym niewiadomym, odległym ryzyku swojego dziecka. Ale to uznaliśmy. A tutaj przechodzimy wstecz po linii życia człowieka, do momentu, kiedy zarodek nie ma po prostu żadnych

praw, nikt nie wyraża zgody, a jego najwyższa wartość, to znaczy życie – jest zagrożone. A właściwie nawet niezagrożone, lecz ewidentnie unicestwiane. Myślę, że w związku z tym, tak jak dopracowaliśmy się pewnego *consensusu* w przypadku transplantacji, śmierci pnia mózgu, pobierania szpiku od dzieci, to tak samo chyba, ze względu na dobro sprawy i możliwość prowadzenia dalszych badań i pewne zaszczości, konieczne są regulacje takie, jakie istnieją np. w Niemczech albo Stanach Zjednoczonych. Szczególnie powołuję się na przykład niemiecki, tzn., że można wykorzystać te linie komórkowe, które już zostały utworzone. I tutaj, pani profesor Zielińska wspomniała, że jest to ograniczone czasem. To jest bardzo istotne. Otóż mówi się o już istniejących liniach komórkowych. Nie można importować do Niemiec linii komórkowych, które zostaną wytworzone po wejściu w życie tej ustawy. To też jest bardzo istotne. Myślę, że to nie jest hipokryzja, to jest po prostu stwierdzenie faktu. Te linie – kilkadziesiąt na świecie – istnieją, i z nich powinno się czerpać komórki, i te komórki można wykorzystać, moim zdaniem, bezpiecznie. Sądzę, że poszukując dróg wyjścia z tego trudnego tematu, to jest właściwie jedyny sposób, żeby znaleźć jakiś kompromis, nie zatracając tego, co jest pryncypiami, a z drugiej strony nie tracąc szans, które stwarza nowoczesna medycyna.

Prof. Mariusz Ratajczak: Jestem sprowokowany do tego pytania, to jest pytanie do pana doktora i do pani profesor z KUL-u. Podjął pan bardzo ważny aspekt dawców narządów. I wydaje mi się, że i prawo i Kościół mówi, że w pewnym momencie, jeżeli u człowieka nie działa ośrodkowy układ nerwowy, (jego funkcja jest wyłączona), można tego człowieka odłączyć od respiratora, czyli właściwie równie dobrze można by było go zabić i poćwiartować, i narządy wykorzystać w transplantacji. Mam pytanie, czy kilkanaście komórek, gdzie nie ma jeszcze ośrodkowego układu nerwowego można rzeczywiście definiować jako człowieka. Ponieważ, jeżeli przyjmiemy to samo kryterium, że istota bez ośrodkowego układu nerwowego i jego funkcji nie jest człowiekiem, możemy uważać – i Kościół to sankcjonuje – tego pacjenta, jako dawcę narządów. Jak zatem potraktować zarodek, który w ogóle jeszcze nie ma wykształconego ośrodkowego układu nerwowego?

Siostra Profesor Barbara Chyrowicz: Raz jeszcze wracam do tego, że dla mnie to, czy mam do czynienia z istotą ludzką, czy nie, jest pytaniem skierowanym do biologa. Po prostu. Dalej pada pytanie o Kościół. Oczywiście, Kościół się zgadza i przyjmuje kryterium śmierci pnia mózgu, ale pod warunkiem, że kryterium śmierci pnia mózgu pozwala mi traktować człowieka, nawet podłączonego do respiratora, już nie jako żywego. Jakkolwiek dwie istotne funkcje działają, ale są one właściwie pracą maszyny. Człowiek nie żyje, ale zarodek żyje. I oczywiście, że zarodek nie ma jeszcze wykształconego systemu nerwowego i długo go jeszcze nie będzie miał, natomiast on jest w „możności”. I w taki sposób mówię tu – w „możności” do wykształcenia systemu nerwowego, i w miarę jak się będzie rozwijał, będzie go miał. Oczywiście, są ludzie, którzy się urodzili, a zupełnie nie mają możliwości ekspresji rozumności, ponieważ ich system nerwowy jest poważnie uszkodzony. Ja wiem, że to nie jest taka sama analogia. Tutaj pan profesor wspomniał o śmierci mózgowej: istotne jest to, że w przypadku, kiedy nastąpiła śmierć pnia mózgu, człowiek nie żyje, natomiast zarodek – żyje.

Panie profesorze, by tu sięgnąć do kategorii teologicznej – dusza nie umiera. Ja mam wrażenie, że gdybyśmy do tej dyskusji chcieli włączyć element duszy, to wejdziemy na płaszczyznę metafizyczną, a nie wiem, czy to jest dobry poziom dyskusji. Gdy mówię, że zarodek żyje, to nie odwołuję się w tej chwili do duszy, tylko do tego, że zachodzą istotne dla funkcjonowania tego zarodka procesy życiowe, a czy on ma duszę, czy nie, to jest dla mnie inna kwestia. Natomiast, jeśli nastąpiła śmierć pnia mózgu, to człowiek może być uznany za istotę, która już nie żyje. Tu jest różnica.

Dr Konstanty Radziwiłł: Oczywiście różnica jest zasadnicza. Prawo pozwala pobierać narządy od człowieka zmarłego wtedy, kiedy spełnione są kryteria śmierci pnia mózgu. Do zarodka tych kryteriów nie można zastosować. I to jest odpowiedź na to pytanie. To wynika z przesłanek etycznych, ale prawo mówi o śmierci pnia mózgu, a takich kryteriów zarodek nie spełnia.

Dr Leonora Bużańska: Chciałam powiedzieć dwa słowa na temat linii komórkowych, o których pan doktor wspomniał pod koniec swojej wypowiedzi. Otóż te linie komórkowe, które już istnieją, embrionalne linie komórkowe, zarodkowe, jak wiemy w tej chwili, nie wszystkie są równoważnościowe i nie wszystkie są do końca dobre do prowadzenia tzw. badań podstawowych, w związku z ich niestabilnością genetyczną i epigenetyczną. Dlatego jeśli decydujemy się na prowadzenie badań z embrionalnymi komórkami macierzystymi, musimy zdawać sobie sprawę z tego, że konieczne jest wykorzystanie tzw. zarodków nadliczbowych bądź otrzymywanie nowych drogą klonowania terapeutycznego. Tak, więc przy założeniu, że badania nad zarodkowymi komórkami macierzystymi będą prowadzone, nie ma ucieczki od problemu otrzymywania innych zarodkowych linii komórkowych. Warto, więc zwrócić baczniejszą uwagę właśnie na te alternatywne źródła komórek macierzystych, które naprawdę są bardzo obiecujące.

Prof. Jerzy Nowak: Proszę Państwa! Przysłuchując się tej dyskusji, widzę pewną analogię do dyskusji, która się toczyła przed 30 laty i była jeszcze bardziej emocjonalna – na temat możliwości wykorzystania inżynierii genetycznej. Wówczas słynny był apel Noblistów amerykańskich, aby zakazać wszelkich doświadczeń na rekombinacyjnym DNA. Dopóki rekombinacyjny DNA nie zaistniał w praktyce medycznej, dopóty były głosy sprzeciwu. W tej chwili nie ma takich głosów. Wiadomo, że wszyscy, czy wielu chorych na cukrzycę korzysta z insuliny rekombinacyjnej, prawie 8 milionów ludzi zostało już zaszczepionych rekombinacyjną szczepionką WZWB. Przewiduję, że za kilka lub kilkanaście lat, jeżeli firma Roche będzie sprzedawała nie tylko erythropoetynę, ale powiedzmy sztuczną krew, sztuczne tkanki, to wówczas ta dyskusja przycichnie. Badania nad komórkami zarodkowymi zostały zdominowane przez koncerny farmaceutyczne. Pojedynczy naukowcy będą się bawili komórkami zarodkowymi, tak jak w tej chwili się bawimy, czy badamy metodami genetyki molekularnej. Natomiast tę całą śmietankę zgramą koncerny i wtedy, to nie będzie problem, czy linia komórkowa pochodzi z linii już istniejących czy z zarodka, który otrzymano wyłącznie w tym celu.

Prof. Krystyna Domańska-Janik: Mnie się wydaje, że jednak jest słuszne to, że postępu wiedzy nie można zahamować w sposób nakazowy. Natomiast, również z tego normatywnego, konsensusowego stanowiska, przedstawionego przez profesora Hołówkę, kategoryzacji tych różnych postaw w stosunku do problemu wynika, że dość ważnym elementem jest wykazanie konieczności, wykazanie niezbędności kontrowersyjnego

postępowania. I dlatego mnie się wydaje, że tu jest bardzo istotny punkt, który powinno się w dyskusji podnosić. Że jednak pewne gremia w jakiś sposób promują, troszeczkę na wyrost, użyteczność macierzystych komórek embrionalnych, używanych do celów terapeutycznych. Powtórzę to, co powiedziała moja koleżanka z Zakładu: w tej chwili wiadomo, że z istniejących, wyprowadzonych przez Thomsona 6 lat temu linii, około połowa jest kariotypowo zmieniona. Z doświadczeń na zwierzętach wynika, że wrodzoną cechą embrionalnej komórki macierzystej jest jej onkogenność. To jest prawda. Możemy przytoczyć materiały źródłowe na ten temat. Jeżeli przyjmujemy, że zakres użyteczności zarodkowych komórek macierzystych jest ograniczony, wtedy wypracowanie takiego satysfakcjonującego stanowiska jest w jakiś sposób jednostronne, a argumenty za zaakceptowaniem wszelkich kontrowersji, od kiedy jest to istota ludzka, a od kiedy przestaje być istotą ludzką, przestają być takie istotne. A wydaje mi się, że maksymalny wysiłek jest wkładany w to, żeby znaleźć niekontrowersyjne rozwiązanie, żeby osiągnąć wszelkie cele, które są stawiane przed komórkami macierzystymi w sposób niekontrowersyjny, przy wykorzystaniu cech somatycznych komórek macierzystych – i wydaje mi się, że naprawdę medycyna i biotechnologia są na bardzo zaawansowanej drodze do tego celu. Pan doktor Radziwiłł wspominał o oddziaływaniu na komórki somatyczne w ten sposób, żeby one przyjęły cechy komórek macierzystych. Takie substancje są już znane. Są to substancje, które ukierunkowują rozwój czy – raczej – kinetykę asymetrycznych podziałów, typową dla komórek somatycznych, czyli tym samym stwarzają teoretyczne podstawy do uzyskania nieograniczonego mnożenia się komórek z puli komórek somatycznych. Czyli to jest proste wyjście z dylematu.

Prof. Waldemar Olszewski: Jako lekarze, biolodzy jesteśmy realistami. Wydaje mi się, że nasze rozważanie, zarówno indywidualne, jak i zbiorowe musimy zacząć od jakiegoś punktu wyjścia. Dlaczego powiedziałem jesteśmy realistami? Bowiem wiemy, iż badania nad ludzkimi komórkami embrionalnymi są na świecie prowadzone i tego procesu się nie zatrzyma. Badania nad klonowaniem człowieka są prowadzone i tego procesu także się nie zatrzyma. Tym „*drivem*” procesu jest ciekawość i pasja naukowa. Jest to inherentna cecha ludzka. I druga sprawa, to miłość każdego człowieka do następnego pokolenia, do swoich dzieci. Tej siły instynktu nie zatrzyma się. W Ameryce przeprowadzono badania ankietowe. Statystyka wykazała, iż 12% ludzi opowiedziało się za tym, że chcą mieć klonowane dzieci, ponieważ nie mogą mieć własnych drogą naturalną. Do czego zmierzam? Nie jesteśmy w stanie jako biolodzy i lekarze przewidzieć i ocenić moralnych, etycznych i prawnych konsekwencji tego, co się już dzisiaj dzieje. Oczekiwalibyśmy od specjalistów, których przed chwilą wymieniłem, a więc prawników, etyków czy socjologów tego, by określili nam pewne drogi moralno-etyczne, jak się zachowywać nie tylko obecnie, ale i w ramach tego co przyjdzie. Wydaje mi się, iż trzeba tu zastosować metodę, którą stosują bankowcy. Nazywają to „*future*”. Inwestują na okres 10–20 lat do przodu i obliczają statystycznie, co za 20 lat będzie się działo w danej inwestycji i ile na tym zarobią, czy też ewentualnie stracą. Fakt jest faktem. Zaczynamy nasze rozważania od tego, że klonowanie już się stało, i jak uniknąć nadużyć. Prosimy prawników o określenie, co będzie nadużyciem. Oczywiście muszą oni myśleć futurystycznie. Co będzie nadużyciem, co nie będzie nadużyciem, tak, żebyśmy mieli w przyszłości pewien margines ruchów. Nie zamykamy oczu na to, co w tej chwili jest faktem, co się już stało.

Prof. Tadeusz Tolloczko: Jestem chirurgiem i nie posiadam zawodowych kompetencji w sprawie zastosowania embrionalnych komórek macierzystych do celów terapeutycznych. Nasuwają się jednak uwagi natury ogólnej. Jest rzeczą oczywistą, że ujawniających się w biologii problemów moralnych drogą głosowania się nie rozwiąże i tą drogą do prawdy się nie dojdzie. Pragmatyzm nie może jednak stanowić podstawy zasad moralnych. Nie można manipulować też pojęciami. Jeśli wykonujemy coś, co przynosi określone, różnorakie profity, to uczciwie i jasno należy powiedzieć, że robimy to tylko dlatego, że jest z wielu względów opłacalne, pomimo niezgodności z zasadami moralnymi. Tak konieczny w praktyce kompromis z kolei, to w rzeczywistości zgoda na mniej lub bardziej niemoralne rozwiązania. Kryteria moralne są niezmiennie i nie można ich dopasowywać i zmieniać ich definicji w zależności od pragmatycznej potrzeby. Największym błędem byłoby stwarzanie pozorów moralnego postępowania poprzez manipulację kryteriami i pojęciem moralności. Uczciwym należy być również wobec samego siebie i być świadomym, że wykonując pewne badania przekraczam zasady moralne w celu uzyskania określonych pragmatycznych korzyści.

Pan Profesor Hołówka wymienił 4 możliwe stanowiska w odniesieniu do prowadzonych badań eksperymentalnych. Stanowisko regulacyjne jest moim zdaniem jednak stanowiskiem permissywnym. Sprowadza się ono do tego, że pewne procedury raz mogą, a raz nie mogą być wykonywane. Raz mogę w większym, a raz w mniejszym zakresie. Najpierw będę mógł tylko w ośrodkach akademickich – potem w wojewódzkich – potem powiatowych – i w końcu w prywatnych gabinetach. Wszystko zależy będzie od pozamerytorycznej siły i umiejętności zorganizowania odpowiedniego lobby, a nie od kryteriów moralnych. Lobby oparte na korzyściach materialnych w praktyce zawsze posiada największą siłę przebicia.

Rozważając wszystkie argumenty „za” i „przeciw”, potwierdza się przekonanie, że nauka wie, czym jest, ale nie wie, czym być powinna. Niewątpliwie od wynalazku koła i ognia nie ma odwrotu i co zostało raz odkryte nie może zostać „zakryte”. Mamy na to historyczne dowody. Przytoczę tu jednak myśl Elliota, że „mądrość została zagubiona w wiedzy”.

Najbardziej jednak niepokoi mnie fakt, że prawo powszechne, będące zwykle wyrazem kompromisu, ustalane jest przez ludzi niemających do tego żadnych moralnych kwalifikacji. Sami siebie przecież nawzajem oceniają jako barbarzyńców i złodziei. Dlatego np. aborcja może być przed wyborami niemożliwa, a po wyborach wskazana.

Zakończę stwierdzeniem, że prawda i moralność nie zrobiły tyle dobrego, ile złego uczyniły ich pozory. Tak, więc co dawniej było niemoralne, współcześnie może być uznawane za pożądane. Dużo łatwiej jest zmienić definicję prawdy i moralności, niż być im posłusznym. Dlatego pozory moralnego postępowania są powszechnie akceptowane i wielu osobom to całkowicie wystarcza, bo się po prostu opłaca...

Prof. Mariusz Ratajczak: Jeszcze jedna uwaga, bo to nie zostało do końca powiedziane. Trzeba w sposób właściwy zrozumieć, że w innych kręgach kulturowych, w innych religiach (a nie jesteśmy jedyną i dominującą religią) obowiązują inne reguły. Np. mahometanie nie widzą tu żadnego problemu. Dotyczy to także buddyzmu, judaizmu i szeregu wyznań protestanckich. Wszystkie te religie dopuszczają w tej chwili

klonowanie terapeutyczne. I dlatego nie uciekniemy przed tym. To się w tej chwili na świecie dzieje. Dzieje się to już w Azji, o czym świetnie wiemy, a zatem wcześniej, czy później pojawią się pacjenci leczeni tą formą terapii. Proszę państwa, np. w Stanach Zjednoczonych sytuacja jest w tej chwili bardzo niezdrowa. Bo nie można używać pieniędzy federalnych na te badania, ale można używać prywatne. Jaki jest wniosek? Firmy w tej chwili składają patenty. A w przyszłości uniwersytety będą płacić za te patenty *lege artis*. I to trzeba jasno powiedzieć. To, co Bush zrobił, jest bardzo nieetyczne, ponieważ w ten sposób firmy uzyskują patenty, za które kiedyś trzeba będzie w klinikach płacić.

Prof. Andrzej Trzebski: Zbyt idealistyczny wydaje się pogląd pana profesora Olszewskiego, że badania na ludzkich komórkach zarodkowych podejmowane są tylko, dlatego, że uczonych popycha do nich ciekawość badawcza. Gdyby to była wyłącznie ciekawość uczonego, to nie byłyby one tak niebezpieczne. Niebezpieczeństwo polega na tym, że za badaniami takimi kryją się ogromne potencjalne zyski firm. Międzynarodowy przemysł farmaceutyczny takich możliwości zysku nigdy nie przeoczy. On te rzeczy będzie robił, a jeżeli nie, to będzie patentował metody badań, żeby inni nie mogli ich robić jako konkurencja. Ten problem istnieje nie tylko w odniesieniu do zarodkowych komórek macierzystych. Biznes i komercja deformują ideę nauki jako poszukiwania prawdy. Celem staje się zysk, a nie prawda naukowa. I to jest groźne. Regulacje i zastrzeżenia, formułowane w sposób prawny, podlegają na naszych oczach erozji i ciśnieniu silniejszemu, niż religie i ideologie. Jest to dążenie do zysku. I jeżeli są jakieś ograniczenia, np. administracji, to dotyczą one wyłącznie badań finansowanych z funduszy federalnych (publicznych). W istocie ograniczenia te sprzyjają firmom prywatnym, bo usuwają im z drogi groźnego kontrahenta, jakim są uniwersytety i instytuty publiczne, z ich świetną kadrą najlepszych uczonych. Zarobi na tych ograniczeniach wielki biznes farmaceutyczny.

W krajach Unii Europejskiej podnosi się ten aspekt problemu i argumentuje, że jeżeli my będziemy zakazywać takich badań, to zrobią je Azjaci, Koreańczycy czy Amerykanie, a my będziemy kiedyś im płacić za praktyczne efekty ich badań robionych bez skrupułów etycznych.

W naszych czasach szczególnie ostro zarysowuje się linia podziału i konfliktu w naukach medycznych: z jednej strony bezinteresowne dążenie do prawdy, z drugiej – brutalna zasada: zysk uświęca środki.

Prof. Maciej Kurpisz: Ponieważ pracuję od dawna w dwóch ryzykownych dziedzinach, to znacząco w dziedzinie wspomaganego rozrodu i w badaniach nad komórkami macierzystymi, mam taką ogólną uwagę, żebyśmy przedwcześnie nie wyłączały naszych umysłów, nie wchodząc na niektóre drogi poznania, ponieważ jest to niebezpieczne, i ponieważ w ten sposób nie osiągniemy żadnego rozwiązania problemu. Dzisiaj w Europie na drodze wspomaganego rozrodu przychodzi na świat od 1 do 2% ludzi. To jest liczba, która nie jest liczbą marginalną ani bagatelną. To jest liczba, która zabezpiecza procesy demograficzne tego kontynentu. Ja dla państwa mam jeszcze kilka takich wiadomości, na przykład, że problem azoospermii, czyli problem braku plemników w ludzkim ejakulacie, sięga 20% populacji. Jeżeli będziemy ortodoksyjnie posługiwali się Deklaracją Helsińską, że zupełnie nie mamy ingerować w komórki

rozrodzcie, to nie rozwiążemy tego problemu. I w końcu będziemy się prokreować sztucznie w zakresie 20%. Czy to państwu odpowiada? Druga rzecz, klonowanie reprodukcyjne jest dzisiaj przedstawiane w bardzo krzywym zwierciadle. Zwracam państwu uwagę, że ostatnio ukazało się kilka artykułów, opisujących, że z komórek pochodzenia embrionalnego produkuje się plemniki w całości. Co prawda nie mają witki, ale są haploidalnymi plemnikami. Jeżeli zatrzymamy nasz proces poznania na tym etapie, to się okaże, że nie będziemy mogli zapewnić niektórym osobom, które z takich czy innych względów cywilizacyjnych będą niepłodne, własnego potomstwa. Natomiast, jeżeli będziemy badać choćby przez rok, czy dwa te komórki ES na organizmach zwierzęcych, a później na komórkach naczelnych, (zwracam uwagę, że do naczelnych zaliczamy nie tylko ludzi, ale i inne ssaki człękoksształtne), na których możemy dokonać pewnych eksperymentów, to wówczas okaże się, że nauka sama sobie odpowie i rozwiąże problem braku plemnika w ejakulacie. Ale jeżeli zrezygnujemy z tych badań za wcześnie, to w ogóle nie odpowiemy na to pytanie. Ale może odpowie za nas kto inny. W związku z tym, ja uważam, ażeby nie rezygnować ze swojego modelu badawczego, a swojego systemu dociekania nie włączać za wcześnie w obręb ideologii, ponieważ widać wyraźnie, że nauka stawia pytania i po pewnym czasie na nie odpowiada i to w bardzo piękny sposób. I jeżeli zrezygnujemy z tego elementu, który jest inherentny dla istoty ludzkiej, to wyłączymy się sami z postępu cywilizacyjnego.

Prof. Zbigniew Czernicki: Ja myślę, że jeśli chodzi o nasze stosunki demograficzne, to nasz przyrost naturalny zabezpiecza bardziej imigracja z krajów muzułmańskich niż prokreacja we wspomaganym rozrodzie.

Prof. Wiktor W. Jędrzejczak: Ja chciałem kontynuować wątek, który zaczął pan profesor Kurpisz. Jest to wątek, który tak naprawdę dotyczy poglądów moralnych, z punktu widzenia moralności nauki. Otóż, w chwili obecnej sytuacja jest taka, że nie wiemy, która metodologia rozwiąże, który problem medyczny. Ostatecznie działalność naukowa kończy się tym, że opracowuje się metodę, która na podstawie badań zostaje metodą z wyboru. I ta metoda zostaje wybrana w oparciu o obiektywne kryteria naukowe. Można domniemywać na podstawie dotychczasowego rozwoju, że szereg chorób, o których wspomniano, zostanie wyleczonych przy pomocy jakiegoś rodzaju komórek macierzystych. Czy będą to metody z wykorzystaniem somatycznych komórek macierzystych, czy metody z wykorzystaniem komórek zarodkowych, tego nie jesteśmy w stanie obecnie określić. Jednakże, jeśli jest tak, że nie możemy tego określić, to musimy sobie też uświadomić, że może się okazać, że rozwój badań nad komórkami somatycznymi nie doprowadzi do rozwoju żadnej skutecznej metody. I wtedy, jeżeli obecnie zablokuje się badania nad komórkami zarodkowymi, które to badania – antycypuję – umożliwią znalezienie rozwiązania problemu, to osoby, które tego dokonały, będą miały krew na rękach. Inaczej mówiąc, będą odpowiedzialne za śmierć tych wszystkich ludzi, którzy w tym czasie, kiedy opóźniano rozwój tej metody leczniczej, zginęli z powodu braku możliwości leczenia. Trzeba zdawać sobie z tego sprawę – takie są konsekwencje. I takie są także konsekwencje słynnego apelu w sprawie DNA. Za ten apel zapłaciło życiem tysiące ludzi, bo spowodował on wieloletnie opóźnienia w rozwoju technik rekombinowanego DNA i następnie w dostarczeniu leków ratujących życie, gdyż w tej chwili przy użyciu tej technologii produkuje się kilkaset leków. Nie

jest powiedziane, że rozwój technologii medycznych, opartych na komórkach macierzystych zarodkowych doprowadzi do wypracowania praktycznej metody leczniczej. Ale to musi zostać ocenione przy zastosowaniu kryteriów naukowych. Nie wyrokuję, która droga jest słuszna, natomiast przeraża mnie wygłaszanie zdecydowanych wniosków bez odpowiedniej wiedzy. Akceptuję zadawanie pytań bez posiadania wiedzy, ale nie udzielanie odpowiedzi. A teraz na temat innego wątku tej dyskusji, jakim jest kwestia zarodka jako istoty ludzkiej. Owszem, zarodek jest potencjalnym człowiekiem, tak jak plemnik i komórka jajowa są potencjalnymi składowymi człowieka. Życie nie powstaje za dotknięciem czarodziejskiej różdżki. Jest plemnik, jest komórka jajowa, jest potem zygota, jest zarodek, jest płód. Może powinniśmy też zacząć mówić o prawach plemnika do zapłodnienia komórki jajowej i odwrotnie. Przecież jego istnienie nie ma innego celu. Jeśli plemnik zapłodni komórkę jajową, to jego genom będzie współtworzył człowieka. Zarodek będzie człowiekiem, jeżeli zostanie wszczepiony do jamy macicy hormonalnie przygotowanej kobiety i z tego, tylko pod tym warunkiem powstanie człowiek, który zostanie urodzony. Jeżeli ten fakt nie zostanie dokonany, to zarodek nie będzie miał żadnych szans, żeby kiedykolwiek człowiekiem zostać, po prostu dlatego, że jedyne co czeka ten zestaw komórek, to śmierć. Zarodek nie ma innego wyboru. I ma tylko tę drogę do wyegzekwowania możliwości zostania człowiekiem, poprzez wszczepienie do jamy macicy. Nie jest znany nikomu inny sposób przejścia od tego etapu do drugiego. Życie jest kontynuacją i każdy następny etap jest uwarunkowany zajściem etapu poprzedniego. Tutaj jest jeszcze jedna kwestia. Nawet przy założeniu, że zabijamy – w cudzysłowie – ten zarodek, pobierając zarodkowe komórki macierzyste, trzeba wspomnieć, że wielokrotnie podejmujemy decyzje na niekorzyść najwyższej wartości innych ludzi, jaką jest życie. Wystaliśmy nasze wojska do Iraku, pan prezydent Bush też wysłał wojska do Iraku. Jaki on miał szacunek dla życia tych żołnierzy? Czy on miał ten szacunek? Przecież to była decyzja o odebraniu niektórym z tych żołnierzy najwyższej wartości, jaką jest ich życie. Tam przecież już kilkuset zginęło. My, jako społeczeństwo poświęcamy życie jednych ludzi dla życia innych. Podam przykład: oto jest pojemnik z ciekłym azotem, gdzie jest 500, czy 1000 zarodków w stadium pojedynczych komórek, a obok leży kilkumiesięczne dziecko. I wybucha pożar. I teraz jest pytanie do państwa, kogo państwo będą ratować? Czy to jedno kilkumiesięczne dziecko, czy te tysiąc zarodków, czyli, jak niektórzy twierdzą „kilkudniowych” dzieci, w tym pojemniku z ciekłym azotem? Myślę, że państwo muszą sobie odpowiedzieć na to pytanie. Ja będę ratował to dziecko kilkumiesięczne. To są zagadnienia, które musimy rozstrzygnąć i ja myślę, że nauka, to nie jest coś takiego, co można regulować na zasadzie zakazu i w tym sensie nie zgodzę się z niektórymi przedmówcami. Wydaje mi się, że stanowisko pana profesora Hołówki jest słuszne. To nie jest tak, że ten rodzaj eksperymentowania nie wymaga uregulowań. On wymaga pewnych uregulowań, wymaga pewnych ograniczeń, żeby było wiadomo, skąd te zarodki są pobierane. Cała ta sfera musi być poddana pewnej kontroli, ponieważ jest to potencjalnie również sfera kryminogenna.

Prof. Przemysław Janik: Ja myślę, że problem nie tkwi w tym, czy się będzie robić badania nad ustalonymi liniami komórek embrionalnych, problemem jest tworzenie

nowych linii bez pewności, że takie postępowanie przyniesie korzystne efekty terapeutyczne. Bez tej pewności należałoby się wstrzymać z tworzeniem zapasów embrionalnych komórek stemowych, a także z badaniami klinicznymi. I tu mamy przykład z wykorzystaniem broni jądrowej, a mianowicie ciągle się pracuje nad materiałami rozszczepialnymi, natomiast bomba jądrowa była na szczęście tylko raz użyta. Wskazuje to jak istotny i mocny jest zakaz używania tego rodzaju broni. Natomiast, jeżeli podczas pracy nad uprzednio już uzyskanymi komórkami zarodkowymi, dojdzie się do tego, że one są wspaniałe i uzyska się ogólną aprobatę – to nie widzę przeszkód w ich użyciu. Jeżeli natomiast rzecz ma się sprowadzać tylko do produkowania tych linii komórkowych, to mogę przypuszczać, że kryje się za tym interes firm biotechnologicznych.

Prof. Zbigniew Czernicki: Wydaje się, że naszą dyskusję na tematy etyczne i prawne można w tym momencie zakończyć. Jak widać, są jednak tak podzielone stanowiska i tak podzielone zdania, że dyskusja będzie się toczyć dalej – i bardzo dobrze. Uważam, że zgadzamy się, co do tego, że są pytania wymagające odpowiedzi i że nie ma odpowiedzi jednoznacznych. Każdy ma swoje racje. Są pewne regulacje prawne, co do których mamy poczucie, że nie są doskonałe. Wymagają dodatkowych przepisów lub ich nowelizacji. Na pewno nie wszystko zostało zakończone. Na pewno bardzo ważne jest, żeby ci, którzy pracują nad tymi zagadnieniami, zdawali sobie sprawę, że takie problemy są. Trzeba mieć nadzieję, że motorem będzie ciekawość wiedzy, ciekawość poznania, a nie duży zysk, bo takie niebezpieczeństwo – bardzo poważne – istnieje. Słyszeliśmy o przenoszeniu wielu z tych badań do Azji, ze względu na to, że tam nie ma zakazów prawnych, a jest wystarczająca baza finansowa. Czytałem o problemach przekupywania uczonych, którzy przenoszą się tam z ośrodków zachodnich, gdyż mają stworzone dobre warunki. Na pewno aspekt finansowy jest tutaj niebagatelny. Oby nie dominował nad resztą problemów.

Oczywiście nie rozstrzygniemy wszystkich problemów związanych z merytoryczną częścią przedstawianych zagadnień, mieliśmy ich tu cały wachlarz. Poruszony był problem immunologii. Wiemy, jaki skomplikowany jest proces w doborze szpiku, a jak się to ma do przeszczepianych mioblastów. Na pewno tu się pojawia wiele problemów. Chciałbym, abyśmy pamiętając o tym, że czas jednak płynie, nie pozostali z ważnymi pytaniami, ciekawością niezaspokojoną. Jeśli można, chciałem zapytać pana profesora Kurpisa, jak jest ze stroną immunologiczną przeszczepów mioblastów?

Prof. Maciej Kurpisz: Mamy tutaj dwa problemy, jeśli chodzi o mioblasty: przeszczepy allogeniczne i autologiczne, czyli pochodzące od tego samego osobnika. My stoimy na stanowisku, że przeszczepy autologiczne byłyby najbardziej wskazane, gdyż powodują najmniej komplikacji. Jednakże trzeba sobie zdać sprawę, że nie jest możliwe we wszystkich przypadkach, żeby te mioblasty namnożyć u danego człowieka. Nie wiemy jeszcze dlaczego. To jest zakres kilkunastu procent, może więcej. Trzeba powiedzieć, że prób klinicznych nie ma na świecie dużo, może około stu. W niektórych przypadkach nie da się z rezerwuaru tkankowego tych komórek uzyskać, a w związku z tym niestety pozostaje nadal sprawa allogenicznego przeszczepu mioblastów. Zwłaszcza w sytuacji dystrofii mięśniowych, gdybyśmy rozszerzyli to pytanie. Problem

dystrofii mięśniowych jest szczególnie interesujący. Niemniej można też podać przewrotny sposób zaradzenia temu, ponieważ komórki szpikowe o charakterze miogennym zasiedlają mięśnie i w związku z tym, chociaż w niedużym procencie, można by sobie poradzić poprzez transfekcje dystrofiny i sprowokowanie kolonizacji w mięśniach. Takie próby w tej chwili są podejmowane. W przypadku wszystkich prób klinicznych fazy I na świecie, dotyczących mioblastów mięśnia sercowego, mioblastów allogenicznym się nie stosuje, ze względu na zbyt daleko idące komplikacje. Nam zależy w tej chwili na odpowiedzeniu sobie przede wszystkim na pytanie o racjonalność tej procedury. W związku z tym nie chcemy prowokować jakichkolwiek skutków ubocznych. Także wszystkie próby kliniczne robione na świecie do tej pory, pomimo pewnego procentu osobników, u których nie daje się zmoltiplikować mioblastów, nie są stosowane przeszczepy allogeniczne. Natomiast, jeżeli chodzi o dystrofię, są one stosowane. Profesor Olszewski mówił o potencjalnych mechanizmach apoptozy komórek Langerhansa. Stosuje się napromieniowanie, stosuje się rozmaite blokady przy pomocy surowic, ażeby te mioblasty tam funkcjonowały. Jednym z lepszych strategicznych osiągnięć, dotyczących mioblastów, jest transfekcja genami insuliny i próby wykorzystania ich jako *messengerów* w leczeniu cukrzycy. To jest bardzo interesująca droga, ale będzie obciążona prawdopodobnie tym samym co poprzednio, że kilkanaście procent osobników nie będzie mogło skorzystać z tej możliwości; ale zakres autoregulacji jest bardzo dobry i mioblasty jako takie, jednak posiadają pewną możliwość ochronienia się przed immunologicznym atakiem. Upřednio stwierdzono, że niektóre komórki szpiku są bardziej neutralne w stosunku do odpowiedzi immunologicznej niż inne. Tego jeszcze do końca nie rozumiemy, ale tak jest. W związku z tym podnosi się też rolę mioblastów, jako *messengera* genetycznego dla leczenia innych chorób metabolicznych. I to jest też interesująca możliwość, o której w ogóle do tej pory nie wspomniano.

Prof. Waldemar Olszewski: Chciałem zwrócić uwagę na jedną niezwykle ważną sprawę, a mianowicie, iż w immunologii, zwłaszcza transplantacyjnej, utarło się mówić jedynie o antygenach transplantacyjnych klasy pierwszej, drugiej itd. biorących udział w odrzucaniu przeszczepów allogenicznych. Natomiast nowa wiedza wskazuje, że istnieje również szereg innych układów receptywnych, rozpoznawczych, powodujących reakcję komórek zwanych odpornościowymi. Dla przykładu: w obecnej chwili badamy tzw. *innate immunity* (wrodzoną odporność), a więc natychmiastowe reagowanie na wszystko, co obce, np. wzór białkowy drobnoustrojów lub też własne struktury białkowe znajdujące się poza miejscem, w którym zostały skonstruowane. Dzięki temu mechanizmowi jest usuwane *debris* własnych komórek, podobnie jak i starzejące się lub apoptotyczne, czy też zmutowane komórki itd. Tu ostrzeżenie dla przeszczepiających komórki macierzyste. W tym przypadku należy wziąć pod uwagę tzw. wczesny brak funkcji przeszczepu wynikający nie tylko z jego allogeniczności, ale również z faktu, iż komórka macierzysta nie będzie w stanie zintegrować się z tkanką, do której została wszczepiona i rozpocząć współpracę z komórkami zrębu. Zadziała tu mechanizm zabezpieczający naszą integrację tkankową. Nie mamy jeszcze właściwego słownictwa do opisanego tego procesu. Wiemy, iż on działa. Wskazują na to fakty, natomiast nie mamy wiedzy na poziomie molekularnym. Pokazywałem na wstępie swojego wystąpienia

rękę, na której nie wyrosnie wątroba z wszczepionej pod skórę palca komórki macierzystej. To jest coś, co musimy rozumieć, aby nie uważać, iż wyizolowaną z hodowli komórkę macierzystą wszczepimy do tej czy innej tkanki, znajdzie ona tam swą niszę i wyda komórki potomne różnicujące się w kierunku np. hepatocytów czy melanocytów. Może kiedyś to nastąpi, ale najpierw musimy opanować mechanizmy wrodzonej odporności polegające na natychmiastowym rozpoznaniu, iż przeszczepiona komórka nie pasuje do danej tkanki i będzie usunięta. Tak więc w nowoczesnej części immunologii transplantologicznej musimy rozwijać badania dotyczące mechanizmów wybiegających poza te regulowane przez MHC (*major histocompatibility complex*) i to jest fascynująca sprawa. Termin immunologia jest określeniem roboczym, w dawnym rozumieniu dotyczącym reakcji ustroju na obce (*non-self*). Dziś wiemy, iż immunologia to nauka o procesach regulacyjnych gwarantujących integralność komórki w kontekście jej środowiska. W tym kierunku powinny być prowadzone badania. Jest to konieczne, aby nie myśleć, iż przeszczepimy komórkę macierzystą różnicującą się w tym czy innym kierunku, tu czy tam i wszystko będzie OK. Niestety, tak nie jest. Obserwujemy to, kiedy dokonujemy przeszczepu.

Prof. Zbigniew Czernicki: To, co chciałbym, żeby zostało skomentowane, padło w referacie pani profesor Domańskiej – sprawa głównych zastrzeżeń wobec komórek zarodkowych – sprawa nowotworzenia. Ten problem wystąpił tylko w tym doniesieniu. Chciałem zapytać, czy ktoś z państwa chciałby to skomentować?

Prof. Mariusz Ratajczak: Może to jedno: związek komórek macierzystych z nowotworami. W tej chwili już wiemy, i jest coraz więcej dowodów na to, że wszystkie nowotwory wywodzą się z komórek macierzystych. Tak naprawdę, to w nabłonku oskrzelowym nie komórka, która się złuszcza, tylko komórka macierzysta, która tam się znajduje, tworzy nowotwór. I prawdopodobnie te same mechanizmy, które zawiadują krążeniem komórek, biorą również udział w powstawaniu przerzutów. Czy istnieje tutaj jakieś ryzyko? Ja myślę, że przede wszystkim musimy badać komórki embrionalne, musimy mieć to narzędzie, żeby to ryzyko ocenić. Wciąż nie wiemy, jakiego rodzaju badania są prowadzone w firmach, albo w niektórych krajach, takich jak Chiny czy Korea, gdzie dostęp do informacji ciągle jest dość trudny. Żeby na to pytanie odpowiedzieć, musimy mieć to narzędzie, musimy mieć te komórki, ich nowe linie, nie te, które już zmutowały w hodowlach, tylko nowe, i badać, jak one się będą zachowywały. Potencjalne niebezpieczeństwo nowotworzenia istnieje. Klonowanie terapeutyczne powinno być najpierw opracowane bardzo dokładnie na modelu zwierzęcym, a dopiero potem przeniesione na model ludzki, ale my musimy w tym kierunku już intensywnie działać.

Prof. Krystyna Domańska-Janik: Mnie się wydaje, że te problemy można bardzo dobrze rozwiązywać na modelach zwierzęcych. Pamiętam wypowiedź pana profesora Tarkowskiego, którego pan profesor również przywoływał i który od lat pracuje nad tymi zagadnieniami i najpewniej ma doświadczenie nieporównywalne z moim. Powiedział on w czasie debaty w KBN, że absolutnie nie widzi żadnego powodu, żeby zmieniać zakres swoich zainteresowań. Jego program badań komórek macierzystych, które bada u gryzoni, żeby odpowiedzieć na pytania podstawowe, będzie dłuższy niż przewidywany okres jego życia. Być może komórka nowotworowa jest bardzo blisko związana z komórką macierzystą i być może jest to jeden problem do rozwiązania.

Kiedy poznamy mechanizm i procesy onkogenezy, mechanizmy walki z nowotworem, być może będzie to dobry moment do zastosowania komórek embrionalnych, ale na razie, w moim przekonaniu, być może krótszą i szybszą drogą jest opanowanie sposobu regulacji wzrostu, kinetyki komórki somatycznej.

Prof. Przemysław Janik: Ja właściwie nie wiem, do kogo skierować to pytanie, ale wydaje mi się, że to będzie pytanie do pana profesora Ratajczaka. Czy istnieje typowe barwienie immunohistochemiczne dla komórki szpiku, która różnicowałaby się w kierunku neurogennym i równocześnie jeszcze w jakimś innym? Innymi słowy, czy jedna komórka posiada dwie czy więcej różnych możliwości?

Prof. Mariusz Ratajczak: Dziękuję za to pytanie. To, że w szpiku kostnym mogą występować nie tylko komórki hematopoetyczne macierzyste, to nie jest tylko koncepcja, my mamy na to dowód. Ale o tym się mówi od 150 lat. Conheim kiedyś uważał, że w szpiku mogą być nie tylko komórki hematopoetyczne, ale i inne. W tej chwili mamy na to dowód i możemy takie komórki, które mają markery wczesnych komórek mięśniowych, nerwowych, wątrobowych oddzielić od komórek hematopoetycznych. W tych komórkach stwierdzamy ekspresję bardzo wczesnych czynników transkrypcyjnych, takich jak: NANog, Rex 1, CZO, OX4, które wskazują, że mogą być tam również komórki pluripotencjalne, szczególnie u młodych osobników. Oczywiście, jeśli nawet te komórki istnieją, trudno sobie w tej chwili wyobrazić, że będziemy dysponowali taką techniką, aby je namnożyć w ilości odpowiedniej do terapii. Na istnienie komórki pluripotencjalnej może wskazywać błędnie zinterpretowane doświadczenie Sharkisa, który opublikował w 2001 r pracę w *Cell*, wykazując, że wyselekcjonowana w taki dość sofistyczny sposób komórka ze szpiku, którą nazywał wówczas hematopoetyczną, różnicowała się w różne linie komórkowe po przeszczepie. To, co on prawdopodobnie zrobił, to przy tej metodzie selekcjonowania komórek mógł przeszczepić właśnie komórkę pluripotencjalną, nie hematopoetyczną. Wiemy, co może potwierdzić pan profesor Jędrzejczak, że na przykład po przeszczepach, (a jest to szczególnie dobrze widoczne w modelu zwierzęcym), że zachodzi tzw. wczesna odnowa krwiotworzenia i późna odnowa krwiotworzenia. Komórki, które biorą udział we wczesnej odnowie, są bardzo dobrze scharakteryzowane, natomiast o tych, które biorą udział w późnej odnowie, wiemy znacznie mniej. Te komórki nie mają w ogóle ochrony przed napromienieniem. Myszy, którym się te komórki przeszczepi, giną, ale w pewnym momencie, po kilku miesiącach „zaskakują”. Może to właśnie jest proces zapoczątkowany przez komórkę pluripotencjalną i ja myślę, że nasz zespół ma pośredni dowód na to, że taka komórka może istnieć. Natomiast, na ile będzie można klinicznie wykorzystać tę komórkę i czy stanie się ona alternatywą dla komórki embrionalnej – trudno powiedzieć. I dlatego, wracając do tego, co powiedział pan prof. Jędrzejczak, musimy iść w dwóch kierunkach. Bo może się okazać, że rzeczywiście będziemy w stanie takie komórki pluripotencjalne izolować i namnażać, albo wystąpi hemodyferencjacja, o której mówiłem, przez enzymy modyfikujące DNA, występujące w komórce jajowej; jeżeli ją oczyścimy, sklonujemy i po mikroiniekcji do komórki dojrzałej enzymy te będą w stanie DNA różnicować. Równoległe jednak nie możemy zamykać sobie drogi prowadzącej przez komórki embrionalne. Ja się absolutnie podpisuję pod tym, co pan profesor powiedział. Bo jeżeli ten proces będzie hamowany, to bierzemy na siebie odpowiedzialność za tych

wszystkich ludzi, których w przyszłości być może będzie można uratować, jeżeli się okaże, że ta strategia była właściwa.

Prof. Przemysław Janik: Chodzi o oznaczanie immunohistochemiczne. Nazwijmy to dwukolorowe. Czy jest tak, że jedna komórka pokazuje czerwone i niebieskie, czy czerwony i zielony?

Prof. Mariusz Ratajczak: Sytuacja jest taka, że ta komórka musi mieć najpierw *messenger* RNA, zanim będzie miała białko. Czyli ta najwcześniejsza komórka będzie miała ekspresję *messenger* RNA, zanim się pojawi białko. Nie spotykamy komórek, które by miały dwa różne białka, ale wydaje się nam, że opracowaliśmy w tej chwili specjalną technikę RTPCR z pojedynczej komórki. Komórki te mogą mieć kilka różnych *messengers*, ale trudno powiedzieć, co to znaczy. Bo czasami może być tak, że nam się wydaje, że ten jeden czynnik transkrypcyjny, który uważamy za marker komórki nerwowej, występuje wyłącznie w komórce macierzystej nerwowej. A potem się okazuje, że pełni też inne role, w innych komórkach macierzystych. Ale to właśnie badanie, na poziomie RTPCR pojedynczej komórki odpowie nam, czy rzeczywiście mamy do czynienia z komórką pluripotencjalną.

Prof. Wiktor W. Jędrzejczak: Chciałem wrócić do kontrowersji dotyczącej nowotworzenia. Dotyczy to komórek macierzystych zarodkowych, które rzekomo ulegają tak masowo transformacji nowotworowej. To nie jest prawda. Otóż choroba nowotworowa i transformacja nowotworowa jest nieodłączną cechą życia. To jest po prostu błąd życia. Transformacji nowotworowej nie podlegają takie komórki, jak erytrocyty, ponieważ nie mają do tego technicznych możliwości. Natomiast wszystkie komórki macierzyste zarówno zarodkowe, jak i somatyczne mogą podlegać transformacji nowotworowej. One w każdym z nas są. Możemy sobie odpowiedzieć, jakie jest ryzyko, że zachorujemy na nowotwór wywodzący się z zarodkowych komórek macierzystych, a jakie jest ryzyko, że zachorujemy na nowotwór wywodzący się z innych komórek macierzystych. Otóż na to odpowiada pan profesor Atoński, który prowadzi Krajowy Rejestr Nowotworów. W tych statystykach jest dość dokładnie policzona liczba potworniaków, czyli nowotworów powstających na etapie zarodkowych komórek macierzystych, jakie w Polsce występują. I to jest liczba bardzo niewielka. *Gros* nowotworów wywodzi się z innych komórek naszego ciała, innych komórek macierzystych, komórek somatycznych, i to generalnie jest problemem. Jest faktem stwierdzonym w badaniach na zwierzętach, że jeżeli zwierzęciu wszczepi się podskórną zarodkową komórkę macierzystą to wyrośnie potworniak. Potworniak to jest taki guz, w którym pojawiają się komórki różnych tkanek, na przykład włosy na przemiędzy kośćmi. Ale wbrew pozorom to wcale nie musi świadczyć o zdolności tych komórek do nowotworzenia. To świadczy jedynie o zdolności tych komórek do wielokierunkowego różnicowania. Trudno, żeby pod skórą wytworzyły one normalne dziecko, i to w dodatku nie będąc zdolne do wytworzenia łożyska. Gdyby miały tę zdolność, to spowodowałyby powstanie ciąży pozamacicznej. Od początku lat siedemdziesiątych wiadomo, że jeśli w nietypowe miejsce wszczepimy komórki najzwyklejszego zarodka, nie żadne zarodkowe komórki macierzyste, tylko komórki bezpośrednio pobrane z zarodka, to też rozwinie się potworniak. To jest zdolność normalnych komórek zarodkowych, które

mają zachowaną zarówno zdolność do samoodnawiania, jak i do wielokierunkowego różnicowania. Natomiast tej zdolności nie mają normalne somatyczne komórki macierzyste. I jeżeli ktoś z takich komórek wyprowadza stale proliferującą linię komórkową, tzw. ustaloną linię komórkową, to znaczy, że doprowadzono do transformacji nowotworowej w obrębie tej linii. Jestem przekonany, że linia komórkowa, która została wyprowadzona z krwi pępowinowej, to tak naprawdę też jest linia nowotworowa. Inaczej mówiąc, ona wprawdzie ma wiele cech komórek prawidłowych, tzn. nie ma zaburzeń chromosomalnych, ale wiadomo, że gdyby to była linia komórek całkowicie prawidłowych, to by tej linii nie było, ponieważ nie z każdej jednostki krwi pępowinowej można taką linię wyprowadzić. Jeżeli udało się to zrobić w odniesieniu do jednej jednostki krwi pępowinowej, to tam zaistniało jakieś unikalne zjawisko genetyczne, które spowodowało, że te komórki akurat zachowują się inaczej. Istnieją, choć nie jest ich wiele tzw. normalne linie komórkowe, które są dostępne w ATCC, ale oczywiście, jeśli się dokładniej te linie zbada, to znajdzie się w nich zmiany genetyczne, może nie tak duże, żeby powstawały widoczne aberracje chromosomalne. Wiadomo, że aby zmiana genetyczna spowodowała aberrację chromosomalną, musi obejmować setki genów, a nie jeden, czy dwa. A zmiana jednego genu już do zachorowania na nowotwór wystarczy. I jeszcze jedno, porozumiewajmy się w jednym języku. Jeśli mówimy po polsku, to mówmy o komórkach macierzystych, a jeśli po angielsku to o *stem cells*, ale nie odwrotnie.

Prof. Krystyna Domańska-Janik: Mnie się wydaje, że jeżeli jakieś zjawisko zaobserwowaliśmy w ciągu dwóch lat jeden raz, to niekoniecznie musi to być anomalią. Może to być zjawisko wywodzące się z czegoś, co niekoniecznie musi się kojarzyć z aberracją, tylko nie potrafimy zdefiniować warunków koniecznych do wywołania tego zjawiska. Na pewno pan profesor ten problem zna, bo w *Nature* był wysunięty taki argument przy okazji dyskusowania o podobnych sprawach, że jeżeli kolizja góry lodowej ze statkiem, czy uderzenie meteorytu w Ziemię, które powoduje katastrofę jest bardzo rzadkim zjawiskiem, to znaczy, że dinozaury powinny do tej pory żyć na Ziemi. My rzeczywiście uzyskaliśmy tę linię komórkową, która, jak dotychczas, jest unikalna. Mamy nadzieję, że uda nam się ją zdefiniować na tyle, żeby ten eksperyment powtórzyć. Natomiast, co do zagrożenia nowotworami, które ze sobą niosą komórki embrionalne: właściwie komórka embrionalna, o czym mówił pan profesor Ratajczak, jest to komórka *in vitro*, wyizolowana ze swojego naturalnego środowiska. W rozwoju ontogenetycznym te komórki, które mogą dać początek komórkom embrionalnym, występują bardzo krótko; są w fazie szalenie krótkiej i przejściowej. Czyli ten argument, że prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworu z komórki somatycznej jest większe niż z komórki, która jest pramatką komórek zarodkowych, niekoniecznie musi być trafny. Ostatnio jest na przykład dyskutowana hipoteza fenotypu mutatorowego. Być może właśnie ta komórka, która jest ontogenetycznie gotowa do tego, aby dać początek linii komórek embrionalnych, ma taki bardzo niestabilny, wrodzony genotyp, który sprawia, że te komórki są szalenie podatne na nowotworzenie, co powoduje powstanie guzów zarodkowych. Testem linii komórki embrionalnej, jest jej zdolność do tworzenia

potworniaków, czyli jest to cecha wrodzona w tego rodzaju komórce. A taki test w stosunku do komórek somatycznych zawodzi.

Prof. Zbigniew Czernicki: Myślę, że nie zakończymy dyskusji tak łatwo. Po prostu ta gałąź nauki znajduje się na takim etapie, że pytań jest bardzo dużo. Trzeba trochę poczekać. Zobaczymy, co będzie dalej. Wielu mówców odwoływało się do tego, że zobaczymy, co nastąpi. I różne przedstawiano perspektywy. W każdym razie chciałem gorąco państwu podziękować. Państwo bardzo dzielnie przetrwali wiele godzin, ale myślę, że było warto. Przedstawiono nam obecny stan działań na tym polu i ich filozofię oraz stronę prawną i etyczną. Nie mogę obiecać, że będziemy powtarzać te konferencje regularnie, ale w każdym razie mogę obiecać, że Instytut jest zawsze otwarty. I zawsze, panie profesorze, jeżeli padnie propozycja podobnego spotkania, będzie chętnie przyjęta.

Chcę przypomnieć ponadto wszystkim mówcom, że planujemy wydanie w całości wszystkich wypowiedzi, łącznie z dyskusją, która została zarejestrowana. Proszę, aby państwo w jak najszybszym czasie przekazali nam tekst swoich wypowiedzi.

Jeszcze raz bardzo gorąco wszystkim państwu dziękuję, a panu profesorowi Trzebskiemu za propozycję zorganizowania konferencji. Była po prostu bardzo potrzebna. Dziękuję bardzo.

Prof. Andrzej Trzebski: Dziękuję panu profesorowi, jako gospodarzowi. Będę pobudzał do organizowania podobnych spotkań w przyszłości.

Wskazówki przygotowania rysunków i streszczeń do publikacji w PBK

Dostarczane na dyskietkach teksty powinny być napisane w Wordzie, wersja 6,0 lub wcześniejsza. Jeśli w tekst zostały wstawione rysunki, powinny one zostać umieszczone osobno na dyskietce. Powinny to być albo mapy bitowe (TIF, JPG), albo pliki z Corela, wersja 9,0 lub wcześniejsza. Każda wersja Worda lub Corela pozwala na zachowanie pracy w formacie wersji wcześniejszej. Rysunki, schematy, zdjęcia i wykresy w podpisach i w powołaniach w tekście powinny nosić nazwę rycina (Ryc.) i być numerowane kolejno. Na zdjęciach konieczne jest umieszczanie podziałki wskazującej powiększenie obiektów, a nie podawanie powiększeń w podpisach, gdyż zdjęcia ulegają zmniejszeniu do formatu B₅.

Prosimy Autorów o podawanie adresów e-mail, o ile je mają.

Cennik dla Autorów w 2004 r.

	odbitki prac			barwne ryciny	str. druku (ponad 15)
Liczba odbitek	50	100	200	1 szt.	1 str.
Cena zł	100,00	120,00	150,00	400,00	50,00

Zamówienie na odbitki musi być złożone wraz z przesłaną korektą pracy

Warunki prenumeraty kwartalnika PBK

Prenumerata roczna

Redakcja przyjmuje opłatę prenumeraty za rok 2005 pod adresem:

FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl

na konto: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,

IV O/Warszawa 20124010531111000004409533.

Cena prenumeraty rocznika

na rok 2005

dla instytucji (bibliotek) wynosi

150 zł

dla odbiorców indywidualnych

50 zł

Subscription orders for POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI for 2005

should be placed at local press distributors or directly at Editorial Board of

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI, Marymoncka str. 99, 01-813 Warszawa /Poland,

tel. 8340 344, fax. 8340 470, email: jkawiak@cmkp.edu.pl:

On account: FUNDACJA BIOLOGII KOMÓRKI I BIOLOGII MOLEKULARNEJ,

ul. Marymoncka 99, 01-813 Warszawa; Bank Polska Kasa Opieki S. A.,

IV O/Warszawa, No 20124010531111000004409533.

Price per year 25 dollars USA or 21 euro.

INFORMACJE DLA AUTORÓW

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI drukują artykuły przeglądowe z zakresu najnowszych osiągnięć biologii komórki, niepublikowane dotąd w innych wydawnictwach. Autorzy odpowiadają za ścisłość podawanych informacji. Obowiązuje terminologia zgodna z polskim mianownictwem biochemicznym, histologicznym, anatomicznym i embriologicznym. Artykuły drukowane w POSTĘPACH BIOLOGII KOMÓRKI nie mogą być bez zgody redakcji publikowane w innych periodykach. Prosimy Autorów o nadsyłanie prac bezpośrednio do Redaktorów odpowiedniej specjalności (adresy na 2 str. okładki), a do Redakcji w Warszawie tylko te artykuły, które nie odpowiadają żadnej z wymienionych specjalności.

POSTĘPY BIOLOGII KOMÓRKI zamieszczają

1) artykuły przeglądowe nie przekraczające 15 stron druku i do 100 pozycji bibliograficznych koniecznie z ostatnich 5 lat (natomiast wcześniejsze prace mogą być pracami przeglądowymi); 2) doniesienia z ostatniej chwili na 3–5 stronach druku z kilkoma pozycjami bibliograficznymi z ostatniego roku (licząc od daty wysłania do redakcji); 3) listy do redakcji (do 1 strony maszynopisu).

Tekst pracy i załączniki należy przysyłać w dwóch egzemplarzach. Maszynopis powinien być pisany jednostronnie na papierze formatu A4 w układzie normalnym 1800 znaków na stronie z podwójnym odstępem. Ostateczna wersja tekstu i rysunki (wskazówki s.) powinna być przysłana na dyskietce 3,5" jako plik (file) Windows lub ASCII. Pierwsza strona nienumerowana przeznaczona dla redakcji winna zawierać: imiona, nazwiska, tytuły naukowe autorów i adresy: w pracy, domowy wraz z telefonem i e-mail, tytuł pracy w języku polskim i angielskim oraz liczbę stron maszynopisu, liczbę tabel i rycin. Na pierwszej (numerowanej) stronie należy podać kolejno tytuł pracy w języku polskim i angielskim, imiona (w pełnym brzmieniu) i nazwiska autorów, nazwę zakładu naukowego, nazwisko i adres autora prowadzącego korespondencję, informację o dofinansowaniu pracy oraz skrót tytułu (do 40 znaków). Następną stroną powinna zawierać w języku polskim i angielskim streszczenie (do 1 str.) oraz słowa kluczowe 3 do 10 słów zgodnych z terminami w *Medical Subject Headings (Index Medicus)*, o ile są tam zawarte. W tytule i streszczeniu można stosować jedynie powszechnie przyjęte skróty, np. DNA. Tekst artykułu należy rozpocząć od nowej strony. W tekście nie zamieszczać tabel, schematów lub rycin, a jedynie zaznaczyć ołówkiem na marginesie ich lokalizację (np. tab. 1, ryc. 1 itp.). Dla przejrzystości tekst można podzielić na tytułowane i numerowane rozdziały oraz podrozdziały. Od nowej strony należy podać spis literatury. Skróty nazw czasopism podawać należy według *Index Medicus* (listy czasopism publikowane są corocznie w numerze styczniowym). Powołanie w tekście następuje przez podanie kolejnego numeru pozycji w spisie literatury w nawiasie kwadratowym (np. [5]). Spis literatury należy zestawiać alfabetycznie według następującego wzoru:

[1] HNILICA LS, McLURE ME, SPELTZBERG TC. Histone biosynthesis and the cell cycle. [w] Philips MP, Schwartz E [red.] Histone and Nucleohistones. London, New York: Philips, Plenum Press 1977: 60–64.

[2] SACHSENMAJER W, REMY V, PLATTNER R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarium polycephalum*. *Exptl Cell Res* 1980; 2: 41–48.

Tabele, opisy schematów i rycin powinny być załączone na oddzielnych stronach. Schematy i rysunki muszą być wykonane w postaci nadającej się do reprodukcji. Fotografie powinny być kontrastowe i wykonane na błyszczącym papierze. Barwne ryciny i zdjęcia są płatne. Wymiary poszczególnych rycin, schematów i fotografii nie mogą przekraczać 125 x 180 mm lub ich połowy. Na zdjęciach prosimy zamieszczać podziałkę, a nie podawać powiększenia w podpisie w związku z potrzebą zmniejszania ilustracji. Jeżeli załączniki są zapożyczone z innych źródeł, należy podać, skąd zostały zaczerpnięte i dołączyć zgodę autora i wydawnictwa na reprodukcję, jeżeli materiały te zamieszcza się w niezmienionej formie. Wszystkie załączniki, np. wykaz skrótów, muszą mieć na odwrocie nazwisko i. autora i oznaczenie góry i dołu ilustracji. Jednostki miar muszą być zgodne z układem SI.

Redakcja zastrzega sobie prawo dokonywania skrótów uzgodnionych z autorem. Autor zobowiązany jest do wykonania korekty autorskiej i zwrócenia jej w ciągu doby. Koszty, spowodowane większymi zmianami tekstu wprowadzanymi w korekcie poza poprawkami błędów drukarskich, ponosi autor. Autorzy otrzymują bezpłatnie 1 egz. zeszytu PBK z opublikowaną pracą oraz mogą zamówić odbitki odpłatnie odsyłając korektę. Poprawioną po recenzji wersję pracy należy zwrócić do redakcji koniecznie w ciągu 30 dni. Redakcja zrezygnuje z publikacji maszynopisu, którego autorzy do 30 dni nie odpowiadają na list redaktora. Od stycznia 2003 r. Redakcja wprowadza **odpłatność 300,- zł za artykuł nie przekraczający 15 str. druku.**

Redakcja prosi także o dołączenie tytułu artykułu i podpisanej odpowiedzi na następujące pytania:

Dołączono 2 kopie maszynopisu, tabel i rycin	Treść pracy nie była uprzednio publikowana,	
Wszyscy Autorzy znają i akceptują pracę	nie została wysłana do innej redakcji	<i>tak nie</i>
Jest zgoda osób, których informacje niepublikowane są zamieszczone w tekście	Dołączono kopię pracy wraz z rycinami na dyskietce z podaniem nazwy pliku i użytego programu edycyjnego z komputera IBM	<i>tak nie</i>

Odpowiadam za całość pracy opisaną w załączonym maszynopisie *tak nie*

Wyrażam zgodę na to, że artykuł po przyjęciu do druku w „Postęпах” przechodzi na własność Fundacji Biologii Komórki i Biologii Molekularnej i jego reprodukcja wymaga zgody redakcji. *podpisy wszystkich autorów*

TREŚĆ – CONTENT

TRZEBSKI A.: Wstęp – Od komórek macierzystych do medycyny regeneracyjnej Introduction – From stem cells to regenerative medicine	2
ZIELIŃSKA E.: Dopuszczalność wykorzystania zarodkowych komórek macierzystych do celów badawczych	5
RATAJCZAK MZ., KUCIA M.: Komórki macierzyste – wyzwanie XXI wieku? Stem cells – great expectations?	11
DOMAŃSKA-JANIK K.: Zarodkowe versus somatyczne komórki macierzyste w terapii regeneracyjnej mózgu Embryonic versus somatic stem cells in regenerative therapy of brain	27
SNARSKI E., JĘDRZEJCZAK W. W.: Zarodkowe komórki macierzyste i możliwości wykorzystania ich w medycynie Embryonic stem cells – potential utilization in medicine	41
OSTROWSKI K.: Przeprogramowanie genomu komórek somatycznych – alternatywą dla zarodkowych komórek macierzystych (EC)? Reprogramming of the genom of somatic cells as an alternative for the use of embryonic stem cells	55
KUCIA M., GOŹDZIK J., RATAJCZAK M.Z. Szpik kostny jako źródło krążących CXCR4 ⁺ ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych Bone marrow as source of circulating CXCR4 ⁺ tissue committed stem cells	59
KURPISZ M., SIMINIAK T.: Zastosowanie autologicznych mioblastów w uszkodzonym mięśniu sercowym u pacjentów po zawale z niewydolnością krążenia Application of autologous myoblasts in post-infarction heart of patients with cardiova- scular insufficiency	79
CHYROWICZ B.: Moralne kontrowersje wokół badań nad komórkami macierzystymi The moral controversies concerning stem cell research	89
HOŁÓWKA J.: Trzy stanowiska w sprawie klonowania ludzkich zarodków	105
DŁUBEK D., WITKIEWICZ W., LANGE A.: Szpikowe komórki macierzyste – identyfikacja i zastosowanie kliniczne Bone marrow stem cells – identification and clinical application	125
Dyskusja	133
Wskazówki dla Autorów i warunki prenumeraty	151