

WŁODZIMERZ KOROHODA

Zakład Biologii Komórki

Instytut Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego

Uniwersytet Jagielloński

Al. Mickiewicza 3, 31-120 Kraków

e-mail: Korohoda@mol.uj.edu.pl

BIOLOGIA I INŻYNIERIA KOMÓRKOWA NA PRZEŁOMIE WIEKÓW

Rozwój nauki jest procesem ciągłym, ale niejednostajnym. Nikt nie jest w stanie przewidzieć, kiedy i w którym z tysięcy laboratoriów



Włodzimierz Korohoda, urodzony w 1937 r., profesor zwyczajny, kierownik Zakładu Biologii Komórki w Instytucie Biologii Molekularnej im. J. Zurzyckiego, Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jest biologiem komórkowym, interesującym się rolą błony komórkowej i cytoszkieletu w regulacji ruchów komórek, ich wzrostu i różnicowania. Badania prowadzi na modelowych komórkach takich jak *Amoeba proteus*, *Dictyostelium discoideum*, *Physarum polycephalum* oraz na hodowanych *in vitro* prawidłowych i nowotworowych komórkach ludzkich i zwierzęcych. W ostatnich latach szeroko wykorzystuje m. in. ilościowe metody cytometrii komórkowej. Opublikował

dokonał ktoś przełomowego odkrycia. Lata przełomu wieków nie muszą korelować z jakimikolwiek jakościowymi zmianami w nauce. Skłaniają jednak badaczy do podsumowań osiągnięć mijającego stulecia i do prób określenia najważniejszych kierunków jej rozwoju.

Często można się spotkać z opinią, że wiek XIX był wiekiem techniki i przemysłu, wiek XX wiekiem fizyki, natomiast wiek XXI będzie wiekiem biologii. Oczekiwać należy, że dalszy rozwój nauk przyrodniczych będzie zmierzał do poznania organizacji i działania organizmów żywych, włącznie z człowiekiem. Medycyna i farmakologia w coraz to większym stopniu będą związane z biologią molekularną i komórkową, chemią, fizyką i informatyką. Nastąpi przesunięcie głównego kierunku zainteresowań nauki. W XX w. dominowało zainteresowanie otaczającym nas światem — najpierw mikroświatem atomów, a potem cząstek elementarnych, i makroświatem — kosmosem. W XXI w. zapewne nastąpi wzrost zainteresowania nami samymi — czym jesteśmy, jak działa nasz organizm i jego jednostki, jak działa nasz mózg i jak kontroluje on funkcje organów i budujących je komórek.

O tym, że komórka jest podstawową jednostką budowy organizmów zwierzęcych i roślin-

wraz ze współpracownikami około 100 prac doświadczalnych (w takich czasopismach jak *Nature*, *J. Cell Sci.*, *Europ. J. Cell Biol.*, *Cell Motility & Cytoskeleton*, *Protoplasma*, *Biochem. Cell Biol.*, *Acta Protozool.*, *Folia Biol.*) oraz kilkudziesiąt artykułów przeglądowych i rozdziałów w podręcznikach. Jest członkiem Polskiej Akademii Umiejętności. Prezesem Polskiego Towarzystwa Biologii Komórki oraz członkiem Komitetów Cytobiologii, Patofizjologii Komórkowej i Molekularnej PAN. Kilku z jego uczniów piastuje stanowiska profesorskie (niestety, większość poza Polską).

nych wiedzano już w XIX w. Pod koniec XIX w. zdano sobie również sprawę, że komórka jest także najmniejszym układem zdolnym do przejawiania funkcji pozwalających określić go jako układ żywy. Od sformułowania Rudolfa Virchoffa w 1859 r., że „*omnis cellula e cellula*” i rozszerzenia tej zasady na komórki prokariotyczne przez Ludwika Pasteura wiedzano, że życie na Ziemi trwa dzięki zdolności komórek do mnożenia się. Wiedzano także, że rozwój nawet najbardziej złożonych organizmów zwierzęcych zaczyna się od podziałów zygoty — zapłodnionej komórki jajowej. Konsekwencje tych podstawowych stwierdzeń zostały jednakże docenione dopiero w drugiej połowie XX w., a wyjaśnienie, jakie mechanizmy molekularne są zaangażowane w procesy wzrostu, rozwoju i

mnożenia się organizmów będą nadal przedmiotem badań w XXI w.

Nie jest możliwe ani celowe podsumowanie w jednym krótkim eseju wszystkich zdobyczy nauki o komórce dokonanych w XX w. Dlatego poniżej skupię się na trzech zagadnieniach:

1) najbardziej spektakularnych osiągnięciach ostatnich 20 lat (1980–2000);

2) problemach aktualnie analizowanych w licznych laboratoriach, których rozwiązanie wydaje się realne, chociaż nie można przewidzieć, kiedy ono nastąpi;

3) przewidywaniach dotyczących rozwoju biologii i inżynierii komórkowej w najbliższych 20 latach i pytaniach już sformułowanych, na które nie znamy odpowiedzi i nie można przewidzieć czy i kiedy odpowiedzi takie znajdziemy.

OSIĄGNIĘCIA BIOLOGII I INŻYNIERII KOMÓRKOWEJ W LATACH 1980–2000

Chociaż cytologia — nauka o komórce — zaczęła się rozwijać w XIX w., biologia komórki wyodrębniła się w latach 60. w Wielkiej Brytanii, a gwałtowny jej rozwój nastąpił po pierwszych jej światowych kongresach w latach 1976 w Toronto i 1980 w Berlinie. Pierwszy Europejski Kongres Biologii Komórki odbył się w Paryżu w 1982 r. Wyodrębnienie się biologii komórki jako dyscypliny naukowej było wyrazem z jednej strony uświadomienia sobie złożoności komórki jako układu żywego, z drugiej — potrzeby integracji rozmaitych badań prowadzonych na komórkach w obrębie biochemii, biofizyki, genetyki, embriologii, patologii i immunologii. O ile cytologia kładła nacisk na poznanie morfologii komórki, to biologia komórki zwraca równocześnie uwagę na czynności komórki jako układu żywego, na organizację dynamiczną procesów zachodzących w komórkach, na porozumiewanie się komórek między sobą w organizmie tkankowym. Integracja badań okazała się konieczna ze względu na złożoność układu, jakim jest komórka. Warunkiem kompetencji badacza i osiągnięcia przez niego sukcesu w badaniach jest wąska specjalizacja w obrębie jakiejś dziedziny wiedzy, natomiast poznanie podstawowych zjawisk biologicznych okazało się uwarunkowane współpracą rozmaitych specjalistów, badających różne strony danego zjawiska.

Pierwsze próby hodowli komórek zwierząt tkankowych poza organizmem, *in vitro*, podjęto w pierwszym dziesięcioleciu XX w. Dopiero jednak w latach 80. hodowle te znalazły zastosowanie nie tylko w badaniach podstawowych, ale i w praktyce medycznej i biotechnologii. Ich wzrastające znaczenie doprowadziło do obecnie

obserwowanego wyodrębniania się nowej specjalności — inżynierii komórkowej. Zaczęły pojawiać się nowe czasopisma i podręczniki poświęcone praktycznemu wykorzystaniu wiedzy o komórce w przemyśle farmaceutycznym, transplantologii, rolnictwie i przemyśle.

Do najważniejszych osiągnięć ostatnich 20 lat można moim zdaniem zaliczyć: klonowanie ssaków, otrzymywanie transgenicznych organizmów, postępy w hodowli komórek, tkanek i organów oraz odczytanie sekwencji nukleotydów w ludzkim DNA.

KLONOWANIE SSAKÓW

W lutym 1997 r. prasa codzienna doniosła o udanym klonowaniu owcy przez Iana Wilmuta. Sukces polegał na tym, że jądro komórkowe użyte jako nośnik materiału genetycznego pochodziło z komórki gruczołu mlecznego dorosłej owcy. Sklonowana owieczka otrzymała imię Dolly na cześć śpiewaczki w stylu country, Dolly Parton. Wkrótce powtórzone z sukcesem klonowanie małąp — Rezus, krów i myszy. Podobno, jak donosiła prasa, w Korei Płd. sklonowano człowieka, jednak zabito embrion w stadium 32 komórek. W doświadczeniu tym pozostaje wiele niewiadomych. Jak to często bywa w doświadczeniach ze złożonymi układami, badacz zadawała się uzyskiwaniem powtarzalnych wyników, nawet jeśli nie jest w stanie wyjaśnić mechanizmów obserwowanych zjawisk. Tak było i w tym wypadku. Kluczowe znaczenie zapewniające sukces miała obserwacja, że komórki, z których pobierane jest jądro z materiałem genetycznym muszą zostać przez kilka dni (zwykle pięć) przegłodzone. Od dawna wiadomo, że roz-

maite stresy, na przykład podwyższona temperatura i głodzenie, powodują zmiany ekspresji genów. Dlaczego i na jakiej drodze, pozostaje to niewyjaśnione, nawet w takich wypadkach gdy wiadomo, które z genów zostają aktywowane, a których ekspresja jest hamowana. Nie wiadomo także dlaczego w niektórych wypadkach komórki sklonowanego organizmu swoim wiekiem odpowiadają komórkom organizmu dawcy jądra i są biologicznie starsze, niż wynikałoby to z wieku sklonowanego osobnika. Ale też nie jest tak zawsze. Klonowanie ssaków może mieć znaczenie dla firm biotechnologicznych i farmaceutycznych. Nigdy zapewne nie uda się całkowicie wyeliminować badania nowych leków na zwierzętach. O ile łatwo jest uzyskać linie wsobne o wyrównanym genotypie szybko mnożących się gryzoni, to otrzymanie takich linii wsobnych na przykład małp trwałoby wiele dziesięcioleci. Natomiast metodą klonowania można uzyskiwać stosunkowo szybko wiele osobników o wyrównanym genotypie. Nie wydaje się jednak realnym zagrożeniem klonowanie ludzi dla otrzymywania organów do transplantacji, które nie byłyby odrzucane i rozpoznawane jako obce przez komórki układu odpornościowego. Znacznie większe niebezpieczeństwo może być związane z wykorzystaniem innych wyników badań z zakresu biologii komórki, genetyki i embriologii.

Ian Wilmut, ten sam który sklonował Dolly, wcześniej opracował metodę zamrażania zarodków bydła. W stanie zamrożonym zarodki te można przewozić i implantować do macicy na przykład nierasowego bydła. Metoda ta coraz częściej zastępuje sztuczną inseminację. Przy sztucznym zapłodnieniu komórki jajowej poza organizmem kobiety, zarodki ludzkie uzyskuje się często w liczbie większej niż później wykorzystuje się do wprowadzenia do macicy biologicznej matki. Opisano już przypadki handlu takimi zarodkami i implantowania ich innym kobietom, bez zgody rodziców biologicznych. O ile w większości cywilizowanych krajów zakazano klonowania ludzi, to prawo nie chroni wystarczająco organizmów ludzkich w ich wczesnych stadiach rozwoju.

OTRZYMYWANIE TRANSGENICZNYCH ORGANIZMÓW

Na przełomie lat 70. i 80. okazało się, że jeżeli do cytoplazmy komórki eukariotycznej zostaje wprowadzony DNA tak, aby nie został zdegradowany podczas procesu endocytozy, to część obcego DNA może zostać zintegrowana z DNA komórki biorcy. Opracowano wiele rozmaitych metod takiego wprowadzania DNA do komórek. Wykorzystuje się na przykład tak zwane

wektory, którymi mogą być wirusy lub niektóre białka (np. transferyna), liposomy zawierające obce kwasy nukleinowe lub oligonukleotydy i fuzujące z komórkami, odwracalną perforację elektryczną, chemiczną lub mechaniczną błon komórkowych. Nośnikiem DNA mogą być także kryształy pirofosforanu wapnia. Wprowadzenie obcego materiału genetycznego do komórek rozdrodczych prowadzi do powstania transgenicznych komórek i organizmów. Początkowo sądzono, że w ten sposób będzie można wykorzystywać transgeniczne świny lub krowy, których organy będą mogły służyć jako źródło organów do transplantacji. I rzeczywiście, uzyskano transgeniczne świny, których komórki nie hemolizują krwi ludzkiej. Takie „ksenogeniczne” transplantacje jednak wstrzymano, gdyż zbyt wielkie jest zagrożenie możliwością przeniesienia wirusów zwierzęcych na człowieka. A doświadczenia ostatnich lat z wirusami HIV wykazały, że współczesna medycyna nie potrafi skutecznie zwalczać wszystkich wirusów. Również zagrożenie ze strony bakterii chorobotwórczych okazało się niedoceniane. Pojawia się coraz większa liczba bakterii opornych na znane antybiotyki. Bakterie gruźlicy od nowa zagrażają coraz częściej osłabionym chorym, a miejsce usuniętych ze szpitali bakterii symbiotycznych i saprofitycznych zajęły bakterie chorobotwórcze oporne na antybiotyki i środki używane do sterylizacji.

Organizmy transgeniczne okazały się jednak użyteczne dla celów gospodarczych i dla przemysłu farmaceutycznego. Wprowadzane określonych genów do uprawianych roślin lub hodowanych zwierząt okazało się skutecznym środkiem poprawiania ich cech użytkowych, na przykład uzyskano przyspieszenie wzrostu, zwiększenie oporności na choroby, poprawiono właściwości smakowe. Transgeniczne zwierzęta stają się coraz częściej „fabrykami” leków. Krowy i świny wytwarzają wydzielane do mleka białka służące do wytwarzania szczepionek i innych leków. Jednym z najnowszych kierunków tego typu działań jest uzyskiwanie transgenicznych roślin, które wytwarzają białka zwierzęce (np. hirudynę) wykorzystywane jako leki. Połączenie metod genetyki molekularnej i inżynierii komórkowej zaowocowało przełamaniem wykształconych w toku ewolucji barier między organizmami z różnych gatunków.

Wyniki te współczesna biotechnologia wykorzystuje dla dobra ludzi. Ale trzeba sobie zdawać sprawę, że możliwe jest także „konstruowanie” organizmów chorobotwórczych, nazywanych kiedyś bronią biologiczną. Co więcej, jest to zagrożenie tym większe, że działania takie są stosunkowo tanie — zorganizowanie

laboratorium mogłoby kosztować kilkadziesiąt tysięcy dolarów i wymagałoby zatrudnienia kilku specjalistów. Kontrola zatem takich działań nie wymagających rozwiniętych technologii i przemysłu oraz dużych zespołów ludzkich jest bardzo trudna, znacznie trudniejsza niż na przykład kontrola produkcji broni atomowej. W obu wypadkach, produkcja broni atomowej i w jeszcze większym stopniu broni biologicznej stanowi niemal równe zagrożenie tak dla strony atakującej jak i atakowanej.

POSTĘP W HODOWLI KOMÓREK, TKANEK I ORGANÓW

W latach 80. wykazano, a w latach 90. to potwierdzono, że w stadium rozwoju organizmu zwierzęcego określanego jako blastocysta, komórki nie potrafią rozróżniać „swoich” i „obcych” komórek. Stwarza to możliwość uzyskiwania hybryd międzygatunkowych na przykład kozoowcy. W takim organizmie kozoowcy komórki tkanek i organów zwierzęcia są albo komórkami owcy albo kozy (można je identyfikować), a potomstwo tego organizmu będzie także kozą lub owcą, zależnie od tego, z których komórek rozwinęły się organy rozrodcze. Tego typu doświadczenia traktowane są jako ciekawostki. Ale ważniejsze jest stwierdzenie, że komórki rakowe (o ile ich transformacja nie była wynikiem delecji genów supresorowych) wprowadzone do blastocysty dają początek prawidłowym komórkom tkanek organów zwierzęcia. Obserwacje te jak do dzisiaj nie są w pełni wyjaśnione. Właściwości komórek blastocysty są obecnie intensywnie badane jako komórki „pnia”, zwane także macierzystymi (porównaj następny rozdział).

ODCZYTANIE SEKWENCJI NUKLEOTYDÓW W LUDZKIM DNA

W czerwcu 2000 r. publicznie ogłoszono, że zakończono prace zmierzające do określenia „mapy” genetycznej człowieka czyli ustalono sekwencję nukleotydów w genomie człowieka. Była to gigantyczna praca, w wykonanie której zaangażowanych było wiele laboratoriów. Sukces był możliwy dzięki stałemu udoskonalaniu

metod sekwencjonowania DNA (co obniżało koszty), ale także dzięki rozwojowi informatyki. Komórki człowieka (haploidalne) zawierają nie DNA o długości 3×10^9 nukleotydów (około 173 cm). W jednej komórce obecnych jest 60 do 80 tysięcy różnych białek. DNA koduje wszystkie możliwe białka, jakie organizm może wytworzyć. Pomijam tutaj procesy obróbki posttranslacyjnej i „składania” łańcuchów polipeptydowych w rozmaite białka. W latach 60. „złamano” kod genetyczny, to znaczy określono, które trójki nukleotydów kodują odpowiednie aminokwasy. Obecnie odczytano zapis sekwencji nukleotydów w ludzkim DNA. Takie określenie sekwencji nukleotydów w DNA to tak, jak gdyby zrobiono pełny spis imienny ludności świata (obecnie 6×10^9 ludzi). Nie wyjaśniłoby to, jak funkcjonują społeczeństwa, ale informacja ta byłaby i tak bardzo cenna. Obecny sukces będzie stanowił podstawę dalszych prac. Pozwoli przede wszystkim lepiej identyfikować zmiany DNA towarzyszące chorobom dziedzicznym, których liczbę ocenia się od 2000 do 5000. Z pewnością przyspieszy to rozwój terapii genowej. Należy oczekiwać, że już za kilka lat będzie możliwe uzyskiwanie „osobistych” zapisów sekwencji nukleotydów w DNA. Już teraz wykorzystując technikę tak zwanych „mikrochipów” możliwe jest określenie skłonności danego osobnika do pewnych chorób, w tym także nowotworowych. Koszt takiego mikrourządzenia wielkości pudełka od zapalek, określający genetyczną skłonność człowieka do kilkadziesiątu chorób wynosi około 10 dolarów (bez czytnika). Rozwój tych technik pozwalających na odczytywanie osobistych danych genetycznych człowieka będzie ważnym czynnikiem w tworzeniu naukowych podstaw medycyny. Brak jednak jest regulacji prawnej dotyczącej wykorzystania takich danych. Już w 1998 r. w USA badania genetyczne pozwoliły uniknąć kilkadziesiątu pomyłek sądowych wykazując niewinność skazanych na śmierć, ale równocześnie wszczęto kilkaset procesów, gdy towarzystwa ubezpieczeniowe uzyskały dostęp do danych o genetycznych skłonnościach klientów i odmówiły im polis ubezpieczeniowych.

PROBLEMY OBECNIE JUŻ SFORMUŁOWANE I BADANE, KTÓRE MOGĄ ZOSTAĆ ROZWIĄZANE W NAJBLIŻSZYCH DWUDZIESTU LATACH

TERAPIA GENOWA I JEJ OGRANICZENIA

Dalszy rozwój stosowania terapii genowej jest obecnie ograniczony przede wszystkim ko-

sztami badań i ceną stosowanych antysenso-
wych oligonukleotydów. Nawet gdy znana jest sekwencja nukleotydów w genie, którego transkrypcję albo translację chcemy zahamować, konieczne jest sprawdzenie kilkuset antysenso-

wych oligonukleotydów. Synteza i sprawdzenie takich oligonukleotydów wymaga pracy dużych zespołów. Dlatego coraz częściej badania takie prowadzone są przez duże prywatne firmy biotechnologiczne i farmakologiczne, a nie jak to było dotychczas przez pracowników wyższych uczelni. Niestety, przeniesienie badań podstawowych do prywatnych firm wiąże się z tendencją do ukrywania wyników badań podstawowych i patentowania wynikających z nich zastosowań w medycynie.

W chwili obecnej, o ile mi wiadomo, koszt wyleczenia jednego pacjenta technikami terapii genowej w przypadku złośliwego czerniaka wynosi około 400 tysięcy dolarów. Wyklucza to oczywiście masowe stosowanie tych metod w szpitalach. Między innymi dlatego obecnie kilkadziesiąt tysięcy biologów pracuje nad rozwiązaniem problemu tak zwanego „targetingu” (ang. target — cel, tarcza). W tym wypadku celem badań byłoby dostarczanie leków wyłącznie do tych komórek, do których powinny dotrzeć. Dotyczy to nie tylko leków stosowanych w terapii genowej, ale i innych leków. Gdyby ten cel osiągnięto, zostałyby znacznie zmniejszone konieczne dawki leków (nawet tysiąckrotnie) oraz ich efekty uboczne. Gdyby na przykład leki używane w schorzeniach stawów lub nerwów działały lokalnie, nie uszkadzałyby one wątroby i innych narządów. W wypadku terapii genowej szacuje się, że rozwiązanie problemu „targetingu” obniżyłoby koszt leczenia jednego pacjenta do kilkuset dolarów. Najczęściej badania prowadzone są w kierunku wykorzystania technik genetycznych w połączeniu z technikami inżynierii komórkowej poprzez konstrukcję proteoliposomów zawierających oligonukleotydy i fuzujących wybiórczo z żądanymi komórkami nowotworowymi. Inna droga to wykorzystanie białek specyficznych tkankowo, takich jak transferyny, jako nośników oligonukleotydów do danego typu tkanki. Jeśli problem ten zostanie rozwiązany w jednej z prywatnych firm, to z pewnością koszty będą znacznie zwiększane przez zyski firmy monopolizującej dany typ terapii.

Z poznaniem genomu człowieka wiąże się także nadzieję na dalszą poprawę prawidłowości diagnostyki chorób. Szczególnie w wypadku chorób nowotworowych oraz chorób dziedzicznych (jak wspomniałem liczba tych ostatnich wynosi kilka tysięcy), a także przy identyfikowaniu szczepów bakterii i wirusów chorobotwórczych postęp w badaniach genetycznych już w najbliższych latach sprawi, że metody te staną się powszechne.

NOWE MOŻLIWOŚCI HODOWLI TKANEK I NARZĄDÓW

Drugi kierunek badań o dużym znaczeniu i gwałtownie się rozwijający w ostatnich kilku latach, a jeszcze stosunkowo mało powszechnie znany, wiąże się z postępem w umiejętności wywołania różnicowania komórek w hodowlach *in vitro*, w hodowli w tak zwanych kokulturach rozmaitych tkanek w układach trójwymiarowych i tworzeniu *in vitro* organów dla transplantacji, zamrażania i przechowywania tkanek i organów, a także wykorzystania tych tkanek i organów w transplantologii. Szczególne zainteresowanie budzą badania na tak zwanych komórkach macierzystych, zwanych także komórkami pnia, komórkami prekursorowymi, komórkami omni- lub poli-potencjalnymi.

Już w latach 80. zaobserwowano, że niektóre stosunkowo proste związki chemiczne mają zdolność do indukowania różnicowania niektórych linii komórek nowotworowych hodowanych *in vitro*. Takie związki jak maślan sodu, dimetylosulfotlenek lub kwas retinowy wykazały zdolność wywołania różnicowania na przykład komórek wywodzących się z nowotworów typu embriocarcinoma w komórki serca, mięśni prążkowanych lub neuronów. Zależnie od stężenia dodanego związku z tych samych komórek wyróżnicowały się wyspecjalizowane komórki rozmaitych tkanek. Wyniki te okazały się w pełni powtarzalne mimo, że mechanizmy różnicowania związane z określoną sekwencją aktywacji wielu genów nadal nie są w pełni poznane. Tak jak dzieci korzystając z komputerów nie muszą znać zasady ich działania, tak i biologowie potrafią wywoływać powtarzalne reakcje komórek nie znając w pełni mechanizmów odpowiedzialnych za te reakcje. Wkrótce okazało się, że te same czynniki, które indukują różnicowanie komórek rakowych embriocarcinoma indukują także różnicowanie komórek embrionalnych, a kierunek tego różnicowania zależy i od typu komórki embrionalnej i od stężenia dodanego związku. Okazało się także, że te same związki (np. kwas retinowy i inne pochodne witaminy A) wywołują różnicowanie komórek *in vivo* w rozwijającym się zarodku. Badania te szybko powiązały się z badaniami dotyczącymi nowych technik hodowli komórek zwierzęcych, rozwijającymi się od mniej więcej połowy lat 80. Mimo iż hodowle komórek zwierzęcych prowadzone są już od około 90 lat (autor tego tekstu hoduje komórki już od ponad 40 lat), to dopiero w latach 80. i 90. udało się opracować tak zwane „zdefiniowane” pożywki

bez surowicy i obcych białek, umożliwiające wzrost i różnicowanie komórek zwierzęcych w określonych pożywkach, zapewniające uzyskiwanie powtarzalnych wyników. Przyczynił się do tego postęp w badaniach peptydowych czynników wzrostu, hormonów, mikroelementów, białek zapewniających adhezję do podłoża i już w ostatnich latach, postęp wiedzy o cytokinach. Na przełomie lat 80. i 90. po raz pierwszy udało się wyhodować kurczaka *in vitro*, bez jaja. Na coraz szerszą skalę zaczęto hodować komórki w układach trójwymiarowych w rusztowaniu z polimerów syntetycznych lub białek macierzy pozakomórkowej (ECM — ang. extracellular matrix — dawny polski termin, to substancje międzykomórkowe, mniej precyzyjny w dobie badań cytokin i czynników autokrynnych).

Rozwój hodowli w takich układach, gdy komórki różnych tkanek wzajemnie na siebie oddziałują wykazał, że tak hodowane mieszaniny heterogennej populacji komórek mają zdolność do spontanicznej organogenezy *in vitro*. Hodując komórki w sieci włókien kolagenów, fibronektyny i laminin uzyskano już tak zwany ekwiwalent skóry, naczynia krwionośne, soczewki oczu, tkankę tłuszczową oraz kostną, z namnożonych *in vitro* komórek autologicznych danego człowieka, które po przeszczepieniu nie są odrzucane przez układ odpornościowy. Trwają prace zmierzające do odtworzenia wątroby i innych organów. Już samo namnożenie naskórka z małych fragmentów skóry okazało się bardzo owocne w leczeniu oparzeń i nieogajających się przez wiele lat ran troficznych (najczęściej podudzi) i oparzeniowych. Przed laty pisałem, że pobieranie tkanek i organów ze zwłok ludzi, którzy zginęli w nagłych wypadkach, to stan przejściowy, a przyszłość należy do odtwarzanych *in vitro* tkanek i organów danego osobnika. Wykorzystuje się w tych pracach naturalne zdolności komórek i tkanek do samoorganizowania się w wyższe struktury. Dalecy jeszcze jesteśmy od wyjaśnienia mechanizmów molekularnych tych zjawisk, ale intensywne badania w tym kierunku są prowadzone w wielu pracowniach. Na szczególną uwagę zasługują badania prowadzone na komórkach określanych jako komórki pnia, komórki macierzyste, komórki prekursorowe. Są to komórki o zdolnościach nie tylko do namnażania się, ale i do różnicowania w rozmaite tkanki występujące w organizmie.

Jak to wykazali Wiliam Harwey w XVII w. i Ernest Haeckel w XIX w., życie osobnika zaczyna się od połączenia komórki jajowej i plemnika w zygotę. Potem w miarę procesów embriogenezy następuje nie tylko zwiększanie liczby komórek, ale i ich specjalizacja. Niektóre z komórek

zachowują jednak zdolność do podziałów i nie ulegają trwałemu zróżnicowaniu. Wszystkie komórki danego osobnika pochodzą jednak od jednej komórki. Początkowo, aż do stadium blastocysty, każda z komórek może dać początek komórkom rozmaitych tkanek. Również *in vitro*, w hodowli, można wyprowadzić linie komórkowe tych tak zwanych komórek pnia (ang. stem cells), które w sposób powtarzalny (ale nie w pełni zrozumiały) badacze mogą różnicować w rozmaite wyspecjalizowane tkanki. Wiąże się z tym nadzieja, że takie komórki są idealnym materiałem do odtwarzania *in vitro*, poza organizmem, tkanek i narządów, które w przyszłości będą wykorzystywane w transplantologii. Nadzieję budzą także doniesienia, że omnipotentne komórki macierzyste (prekursorowe) obecne są w pępowinie, a także w szpiku dorosłych osobników. Niektórzy twierdzą, że są one obecne i w innych tkankach, chociaż w bardzo małej liczbie. Istnieje uzasadniona nadzieja, że przechowanie w specjalnych bankach tkanek zamrożonej pępowiny nowonarodzonych dzieci pozwoli na odtwarzanie w miarę potrzeby, organów i tkanek do transplantacji. Uniknie się w ten sposób konieczności stosowania leków immunosupresyjnych, mających wiele działań ubocznych, dzisiaj podawanych wszystkim pacjentom po transplantacjach. W technice, zamiast naprawiać uszkodzone części złożonych aparatów, coraz częściej wymienia się całe zespoły. Można sądzić, że w XXI w., również w medycynie, na przykład zamiast leczyć ciężkie schorzenia takie jak marskość wątroby, będzie się „po prostu” wymieniać wątrobę na nową, wyhodowaną *in vitro* z własnych macierzystych komórek danego pacjenta.

Ale nie można nie zauważyć i innej możliwości. Zrozumienie mechanizmu funkcjonowania komórek w organizmie i ich wzajemnego komunikowania się może pozwolić na lepsze i szersze wykorzystanie zdolności organizmów do samonaprawy. W przyrodzie niektóre organizmy wykazują bardzo duże zdolności do regeneracji. W neotenicznej larwie płaza *Abystoma mexicanum* N. (aksolotla) występuje regeneracja nie tylko ogona, jak u jaszczurki, ale nawet odnóży. Dlaczego ssaki nie wykazują tak rozwiniętych zdolności do regeneracji — nie wiadomo. Trudno rozstrzygnąć, który z kierunków badań inżynierii komórkowej pozwoli na uzyskanie lepszych metod leczenia. Na przykład prowadzone są prace, aby w hodowli *in vitro* namnożyć komórki i odtworzyć ekwiwalent żyły do przeszczepu do naczyń wieńcowych serca w operacji określanej w języku angielskim jako bypas. Jednak okazało się także, że można podając do worka osierdziowego zasadowy czynnik wzro-

stowy fibroblastów (bFGF) wywołać angiogenezę i wytworzenie przez sam organizm pacjenta nowych naczyń wieńcowych eliminując konieczność operacji. Działania takie w kilku wypadkach zakończyły się już sukcesem, a w USA opatentowano ciągły sposób uwalniania bFGF z raz wszczepionej kapsułki.

Prasa naukowa i gazety doniosły, że wytworzono także tak zwane cybrydy — produkty inżynierii komórkowej będące odpowiednikami komórek zarodka, a pochodzące z połączonych ze sobą komórek krowy i człowieka. Czy z takich tworów można było by odtwarzać narządy do transplantacji względnie doprowadzić do rozwoju nowego organizmu o nieokreślonych cechach, nie wiadomo. Osobiście sędzę, że ze względów etycznych ten kierunek prac nie będzie rozwijany.

Trwają także prace zmierzające do zapewnienia rozwoju osobnika ssaka poza organizmem matki, w sztucznej macicy. W wypadku zwierząt doświadczalnych udało się zapewnić rozwój płodów od stadium odpowiadającego szesnastemu tygodniowi ciąży u człowieka. Można oczekiwać, że w XXI w. uda się wyhodować z zygoty małego ssaka poza naturalną macicą i organizmem matki — doświadczenia takie już są prowadzone.

BADANIA NEURONÓW I NOWE TECHNIKI ROZSZERZAJĄCE ZAKRES BADAŃ

Postęp badań zawsze zależał od opracowywania nowych technik badawczych. W biologii komórki, rozwój mikroskopii elektronowej, w latach 50. — transmisyjnej i 60. — skaningowej, rozszerzył horyzonty badań organizacji strukturalnej komórek. Ale oglądanie komórek przy stosowaniu dużych powiększeń i przy dużej rozdzielczości, wiązało się z koniecznością zabicia i utrwalenia komórek. Dopiero obserwowany w ostatnich kilku latach rozwój mikroskopii sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*) stworzył możliwość badania żywych komórek w środowisku wodnym przy stosowaniu takich (i większych) powiększeń jak w mikroskopii elektronowej. Już dziś wiadomo, że neurony, fibroblasty i makrofagi tworzą na swej powierzchni filopodia, wypustki o średnicy około 0,1 μm . Filopodia takie są wykorzystywane przez komórkę do analizy rzeźby podłoża i ukie-

runkowania migracji komórek. Dopiero mikroskop sił atomowych umożliwił badania zachowania się takich filopodiów w żywych komórkach. Mikrotechniki biochemiczne, takie jak elektroforeza kapilarna, pozwalają na analizę chemiczną pojedynczych komórek o masie 10^{-9} grama. Metody cytoimmunofluorescencyjne w połączeniu z mikrochirurgią umożliwiają badania lokalizacji i zachowania się określonych białek w żywych komórkach. W coraz większym zakresie prowadzone są badania oparte na zasadzie analizy wielu pojedynczych komórek, a nie homogenizacji i badaniu wypadkowych własności dużych, zwykle heterogennych populacji komórek. Stosowanie cytometrii obrazowej (ang. *image cytometry*) wspomaganej komputerową analizą danych, dla pojedynczej komórki zastępuje jakościowe opisy matematycznym, ilościowym opisem struktur i zjawisk biologicznych. Biologia komórki w coraz szerszym zakresie staje się nauką ilościową, podobną do fizyki i chemii.

Rozwój nowych technik badawczych, szczególnie opartych na rozbudowie komputerów i nowych generacji kamer CCD (ang. *charge counting device*) otwiera po raz pierwszy możliwość śledzenia metodami immunocytofluorescencji przebiegu impulsów nerwowych wzdłuż neurytów. Zapis takich obrazów dla sieci neuronów (*in vitro* i *in vivo*) może przybliżyć możliwość śledzenia oddziaływań między neuronami podczas pracy mózgu. Wpływ neuronów i wytwarzanych przez nie neurotransmiterów na integrację funkcji organizmu już teraz staje się tematem badań komórkowych i molekularnych. Wykazanie obecności receptorów neurotransmiterów w innych komórkach niż nerwowe i mięśniowe (np. acetylocholino w keratynocytach i komórkach układu odpornościowego) wykazuje, że układ nerwowy może znacznie silniej niż przypuszczano bezpośrednio oddziaływać na funkcje komórek budujących organizmy, na przykład wpływać na oporność immunologiczną lub gojenie się ran. Wyniki takich badań mogą mieć wpływ nie tylko na medycynę, ale i na nasze wyobrażenia o integracji organizmów Metazoa.

Szersze wprowadzanie i opracowywanie nowych metod i przyrządów badawczych z pewnością zaowocuje wieloma nieprzewidywalnymi, zaskakującymi nas odkryciami.

PRZEWIDYWANE KIERUNKI BADAŃ W NADCHODZĄCYCH 20-50 LATACH XXI WIEKU

Wymienione w poprzednim rozdziale kierunki badań biologii oraz inżynierii komórkowej i tkankowej, zarówno poznawcze, jak i te zwią-

zane z medycyną, będą zapewne nadal dynamicznie się rozwijać. „Zepsute”, chore części naszych organizmów będą zastępowane naszymi

tkankami i organami wyhodowanymi poza organizmem, względnie komórkom naszego organizmu zostaną przywrócone zdolności do odtwierzania i „naprawy” chorobowo zmienionych organów. Należy też oczekiwać, że zmieni się diagnostyka wielu chorób, a genetyka molekularna wskazując na skłonności naszych organizmów do określonych chorób pozwoli na zwiększenie znaczenia profilaktyki i prewencji. Z pewnością dużego znaczenia nabierze wykorzystanie wiedzy o działaniu diety i naturalnych produktów obecnych w pokarmach na komórki do zapobiegania chorobom i leczenia wielu chorób. Badania dotyczące profilaktyki na przykład poprzez dietę, ulegną konkretyzacji i zostaną powiązane z biologią komórkową i molekularną. Dla przykładu wiadomo już, że nadmierna kaloryczność pożywienia, zmniejszając ekspresję genu supresorowego białka p53, sprzyja rozwojowi wielu chorób nowotworowych, co powinno skłonić do walki z otyłością, nie tylko dla zapobiegania chorobom układu krążenia, ale i nowotworom. Z kolei poznanie mechanizmu działania obecnych w ziarnach i kielkach soi flawonoidów, takich jak genisteina hamująca aktywność kinaz tyrozynowych w komórkach raka prostaty i raka sutka, powinno być sygnałem do zwiększenia spożycia soi i przez to zmniejszenia przerostów prostaty prowadzących do powstawania jej nowotworów. Jeśli zostanie rozwiązany problem „targetingu”, wówczas koszt terapii genowej zostanie znacznie obniżony, co umożliwi zwiększenie skuteczności tych technik i ich wprowadzenie do praktyki klinicznej.

Zostały jednak już teraz sformułowane pytania, na które nie znamy odpowiedzi i nie wiemy czy, i kiedy odpowiedzi zostaną znalezione. Trudno przewidywać, które kierunki nowych badań będą intensywnie rozwijane i jakie nowe problemy zostaną sformułowane. Chciałbym tutaj wymienić przykładowo trzy kierunki badań z zakresu biologii komórkowej i molekularnej, które będą kontynuowane, względnie podjęte. Osobiście sędzę, że duże zainteresowanie będą skupiać na sobie badania dotyczące starzenia się komórek i organizmów Metazoa, rozwoju z komórek somatycznych organizmów Metazoa i próby budowy *de novo* żywej komórki.

STARZENIE SIĘ KOMÓREK I ORGANIZMÓW

Badania procesów starzenia się na poziomie komórkowym stanowią podstawę do zrozumienia starzenia się organizmów. Biologowie nie mają już wątpliwości, że zjawiska starzenia się organizmów określane są przez procesy starze-

nia się komórek budujących ich tkanki i organy. Starzenie się organizmów wbrew powszechnej opinii nie jest koniecznością. Są krzewy i drzewa mające dowiedziony wiek kilku tysięcy lat. Niektóre zwierzęta (papugi, żółwie, rekiny) żyją kilkaset lat. Niestety, coraz więcej danych sugeruje, że maksymalny wiek osobników większości gatunków ssaków określony jest genetycznie.

Badania Leonarda Hayflicka wykazały, że komórki ssaków starzeją się nie tylko w organizmie, ale i w hodowli *in vitro*. Poza komórkami linii rozrodczej i komórkami pnia, takie komórki jak na przykład fibroblasty lub keratynocyty, ulegają liczbie podziałów charakterystycznej dla danego gatunku. Komórki wzięte do hodowli od starszego osobnika ulegają mniejszej liczbie podziałów niż wzięte od młodego osobnika. W miarę upływu czasu w komórkach nagromadzają się uszkodzenia wywoływane między innymi przez wolne rodniki. Ochrona przed nimi, na przykład przez witaminę E, może sprzyjać wydłużeniu życia komórek i osobników Metazoa.

Obecnie najczęściej wiąże się określenie czasu maksymalnego życia komórek (i osobnika) z długością telomerów, końcowych odcinków chromosomów, których nić DNA nie jest syntezowana przez polimerazę DNA, ale specjalny enzym telomerazę, aktywną w komórkach nowotworowych i linii płciowej. W normalnych komórkach somatycznych telomery ulegają skróceniu podczas każdego kolejnego podziału komórki. „Unieśmiertelnienie” komórek, na przykład onkogenem *ras*, wiąże się niestety z ich nowotworową transformacją. Ostatnie doniesienia sugerują jednakże, że sterydy mogą wpływać na tempo skracania telomerów. Pojawiają się także doniesienia, że maksymalny czas życia komórek może zależeć od wielu genów, nie tylko układu telomerazy. Manipulacje genetyczne okazały się skuteczne w przedłużaniu życia na przykład nicieni. Tak czy inaczej należy oczekiwać, że w najbliższych latach odwieczny problem starzenia się organizmów zwierzęcych i budujących ich komórek będzie przedmiotem intensywnych badań biologów komórkowych i molekularnych.

ROZWÓJ OSOBNIKÓW Z KOMÓREK SOMATYCZNYCH

Już w latach 60. z komórek somatycznych niektórych roślin (np. marchwi, ale nadal nie wiemy dlaczego tylko z „niektórych”) można było w hodowli *in vitro* uzyskać całą roślinę, zdolną do kwitnienia. Komórka taka musi najpierw ulec odróżnicowaniu, aby później podjąć rozwój identyczny jak zapłodniona komórka ja-

jowa. Nie wiadomo natomiast, dlaczego takie odróżnicowanie (analogiczne do resetowania komputera i włączenia go od nowa) nie jest możliwe w wypadku komórek zwierząt. Ale udane klonowanie ssaków wykazało, że głodzenie komórek somatycznych powoduje pewne „resetowanie” programu ekspresji genów tak, że jądro po wprowadzeniu do aktywowanej cytoplazmy zygoty podejmuje realizację sekwencyjnej ekspresji genów według programu ontogenezy osobnika danego gatunku. Nie wiemy w jaki sposób najpierw głodzenie, a potem cytoplazma zygoty najpierw resetuje, a potem *de novo* włącza program ekspresji genomu zawartego w jądrze. Problem ten jeśli już nie jest, to będzie badany w pracowniach biologicznych.

PRÓBA SKONSTRUOWANIA KOMÓRKI

Jak to już wspomniałem, rozwój biologii komórkowej i molekularnej w ostatnich 40 latach ujawnił, że komórki, szczególnie eukariotyczne, są układami o niezwykle wysokim stopniu złożoności. Jednak to nie elementy budowy komórki (DNA, białka, organelle), ale komórka jako układ jest zdolna do wykazywania cech życia. Już w 1970 r. wykazali to K. W. Jeon, J. F. Danielli i I. J. Lorch, w eleganckim doświadczeniu wykonanym na *Amoeba proteus*. W technice złożony układ można rozdzielić na podzespoły, z których żaden sam nie może funkcjonować, ponownie je połączyć i przywrócić działanie układu. Podobnie wymienieni badacze wyizolowali jądro komórkowe, błonę komórkową i mitochondria — żadna z tych struktur sama nie

wykazuje cech życia, ale po wprowadzeniu metodą mikromanipulacji jądra i mitochondriów do pęcherzyka z błony odtworzono komórkę ameby, która z czasem uzyskała zdolność ruchu, wzrostu i podziałów. Dopiero jednak obecnie planowane jest podjęcie próby budowy możliwie najprostszej komórki z syntetyzowanych w pracowni substancji chemicznych. Obecnie synteza białek i polinukleotydów poza komórką, o planowanej sekwencji odpowiednio aminokwasów lub nukleotydów jest już prowadzona w wielu pracowniach. Wykazano, że najprostsza komórka, o stopniu złożoności budowy zbliżonym do ciał podstawowych mykoplazm, musi zawierać nie mniej niż 300 genów, kilkaset rodzajów białek, błonę lipoproteinową. Skala trudności budowy takiego najprostszego układu, który mógłby wykazywać cechy życia, byłaby porównywalna do konstrukcji wahadłowców wykorzystywanych w badaniach kosmosu. W przypadku realizacji takiego projektu trudno byłoby oceniać jego konsekwencje praktyczne i teoretyczne. Trzeba pamiętać, że wszystkie organizmy tkankowe na Ziemi (i oczywiście budujące je komórki) są potomstwem jednej prakomórki. Tak dzisiaj uważa większość biologów. Niektórzy badacze wyrażają nawet pogląd, że odnosi się to także i do komórek prokariotycznych. A można spotkać i tak skrajne poglądy, że to jedna cząsteczka RNA zapoczątkowała całą ewolucję organizmów żyjących na Ziemi. Hipotezy takie, dzisiaj rozwijane w sferze spekulacji, w XXI w. (albo później) mogą nabrać charakteru naukowego i być może będą mogły być weryfikowalne w doświadczeniach.

UWAGI KOŃCOWE

Dokonany przeze mnie wybór badań z zakresu biologii i inżynierii komórkowej, które w ostatnich pięciu latach zaczęły się rozwijać, jest subiektywny. Czas pokaże, czy oczekiwania moje są słuszne. Jestem jednak przekonany, że to właśnie badania zmierzające do rozszerzenia naukowych, opartych o biologię komórkową i molekularną podstaw medycyny i biotechnologii będą dominować w najbliższych latach. Od samych biologów i lekarzy będzie zależało, czy wyniki ich badań wzbudzą zainteresowanie społeczeństwa.

Postęp nauki w XIX i XX w. sprawił, że produkcja żywności i dóbr konsumpcyjnych wymaga coraz mniejszego nakładu pracy fizycz-

nej człowieka. Obok korzyści, przyniosło to jednak plagę bezrobocia, konkurencję i prowadzący do stresów i frustracji wyścig niemal w każdej dziedzinie ludzkiej działalności. Oczekiwany rozwój biologii i medycyny prowadząc do przedłużenia średniego czasu życia i poprawy zdrowia może w konsekwencji przyczynić się do dalszego wzrostu konkurencji, przyspieszenia tempa życia i wzrostu agresji. Z pewnością pojawiają się też nowe zagrożenia, których dzisiaj nie umiemy określić. Rozporządzając dostępną nam wiedzą nie potrafimy także przewidzieć tych osiągnięć biologii i inżynierii komórkowej, które mogą okazać się największe.

ZALECANA LITERATURA

- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WATSON J.D. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition. Garland publ. Inc., New York & London.
- ALBERTS B., BRAY D., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., 1999. *Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej*. (tytuł oryginału: *Essential Cell Biology. An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*. Garland Publ. Inc., New York & London). PWN, Warszawa.
- CAMPIONE-PICCARDO J., SUN J., CRAIG J., MCBURNEY M.W., 1985. *Cell-cell interaction can influence drug-induced differentiation of murine embryonal carcinoma cells*. *Developmental Biology* 109, 25–31.
- ENGEL A., LYUBCHENKO Y., MÜLLER D., 1999. *Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work*. *Trends in Cell Biology* 9, 77–80.
- HORGAN J., 1999. *Koniec nauki, czyli o granicach wiedzy u schyłku ery naukowej*. (tytuł oryginału: *The End of Science. Facing the Limits of Knowledge in the Twilight of the Scientific Age*. Addison-Wesley Publ. Co. Inc. 1996). Prószyński i S-ka, Warszawa.
- JEON K.W., LORCH I.J., DANIELI J.F., 1970. *Reassembly of living cells from dissociated components*. *Science* 167, 1626–1627.
- KAKU M., 2000. *Wizje, czyli jak nauka zmieni świat w XXI wieku*. (tytuł oryginału: *Visions. How Science Will Revolutionize the 21st Century*. Anchor Books, Doubleday, 1997). Prószyński i S-ka, Warszawa.
- KNISLEY S.B., BLITCHINGTON T.F., HILL B.C., GRANT A.O., SMITH W.M., PILKINGTON T.C., IDEKER R.E., 1993. *Optical measurements of transmembrane potential changes during electric field stimulation of ventricular cells*. *Circulation Research* 72, 255–270.
- KOJ A., 1997. *Granice inżynierii genetycznej*. [W:] *Granice nauki*. HELLER M., MACZKA J., URBANIEC J. red., OBI Kraków & Biblos Tarnów, str. 31–40.
- KOROHODA W., 1990. *Development prospects of experimental biology to the end of the century*. [W:] *Die Wissenschaften in der Entwicklung Perspektive 2000*. red. KASZYŃSKI S.H., Wydawnictwo naukowe UAM. Poznań, str. 254–262.
- KRZANOWSKA H., TISCHNER M., STRĄCZEK D., 1998. *Klonowanie*. Znak, Kraków.
- LANGER R.S., VACANTI J.P., 199. *Tissue engineering. The challenges ahead*. *Scientific American* 280, 62–65.
- LASIC D.D., TEMPLETON N.S.D., 1996. *Liposomes in gene therapy*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 20, 221–266.
- MATSUHISA T., 1981. *Phenotypic reversion of SV40 transformed 3T3 cells by dimethylsulphoxide*. *Cell Biol Intern. Rep.* 5, 179–183.
- MCBURNEY M.W., 1982. *Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line*. *Nature* 299, 165–166.
- MEYERS R.A., red. 1995. *Molecular Biology and Biotechnology*. A Comprehensive Desk Reference. VCH Publ. Inc., New York.
- MOONEY D.J., MIKOS A.G., 1999. *Growing new organs*. *Scientific American* 280, 38–43.
- MRSNY R.J., 1996. *Targeting technologies — Recent patent literature*. *J. Drug Targeting* 4, 191–194.
- NORTHROP M.A., BENETT B., HADLEY D., LANDRE P., LEHEW S., RICHARDS J., STRATON P., 1998. *A miniature analytical instrument for nucleic acid based on micromachined silicon reaction chambers*. *Anal. Chem.* 70, 918–922.
- OHGUSHI H., CAPLAN A.I., 1999. *Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering*. *J. Biomed. Mater. Res.* 48, 913–927.
- OLINS A.L., HERRMANN H., LICHTER P., OLINS D.E., 2000. *Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization*. *Exp. Cell Res.* 254, 130–142.
- PEDERSEN R.A., 1999. *Embryonic stem cells for medicine*. *Scientific American* 280, 44–49.
- PERRY M.M., 1988. *A complete culture system for the chick embryo*. *Nature* 331, 70–72.
- POTTEN C.S., 1998. *Stem cells in gastrointestinal epithelium: numbers, characteristics and death*. *Phil. Trans. R. Soc. London B* 353, 821–830.
- PRELLE K., VASSILIEV I.M., VASSILIEVA S.G., WOLF E., WOBUS A.M., 1999. *Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species — Present status and future perspectives*. *Cells Tissues Organs* 165, 220–236.
- RIDLEY M., 1998. *Choroby*. (tytuł oryginału: *The Future of Disease*. Phoenix, Orion Publ. Gr. Ltd., 1997). Prószyński i S-ka, Warszawa.
- SCHILLERS H., DANKER T., SCHNITTNER H.J., LAND F., OBERLEITHNER H., 2000. *Plasma membrane plasticity of *Xenopus laevis* oocyte imaged with atomic force microscopy*. *Cellular Physiol. Biochem.* 10, 99–107.
- SHANER L.M., BROWN P.R., 2000. *Single cell analysis using capillary electrophoresis*. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 23, 975–997.
- SUDA Y., SUZUKI M., IKAWA Y., AIZAWA S., 1987. *Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential*. *J. Cell. Physiol.* 133, 197–201.
- TARKOWSKI K., 1998. *Klonowanie i klony zwierząt. Cloning and clones in animals*. *Kosmos* 47, 209–222.
- WEINBERG C.B., BELL E., 1986. *A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells*. *Science* 231, 397–400.
- WILSON R., 1998. *Manipulacje genetyczne*. (tytuł oryginału: *The Future of Genetic Manipulation*. Phoenix, Orion Publ. Gr. Ltd., 1997). Prószyński i S-ka, Warszawa.
- WOLPERT L., 1996. *Nienaturalna natura nauki. Dlaczego nauka jest pozbawiona zdrowego rozsądku*. (tytuł oryginału: *The Unnatural Nature of Science*, Co(C) Lewis Wolpert, 1992). Gdańskie Wydawnictwo Psychologiczne, Gdańsk.
- WOLPERT L., BEDDINGTON R., BROCKES J., JESSELL T., LAWRENCE P., MEYEROWITZ E., 1998. *Principles of Development*. Oxford University Press, Oxford.
- WOLPERT L., RICHARDS A., 1999. *Pasja poznawania*. (tytuł oryginału: *Passionate Minds. The Inner world of Scientists*. Oxford University Press, 1997). Wydawnictwo CiS, Warszawa.
- YOU H.X., LAU J.M., ZHANG S., YU L., 2000. *Atomic force microscopy imaging of living cells: a preliminary study of the disruptive effect of the cantilever tip on cell morphology*. *Ultramicroscopy* 82, 297–305.
- ZHOU J.R., GUGGER E.T., TANAKA T., GUO Y., BLACKBURN G.L., CLINTON S.K., 1999. *Soybean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumour angiogenesis in mice*. *J. Nutr.* 129, 1628–1635.