

# Morfologiczne i molekularne wskaźniki komórek macierzystych i progenitorowych w gruczole sutkowym

OLGA KOLEK, BARBARA GAJKOWSKA, TOMASZ MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa  
Zakład Ultrastruktury Komórki Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa

Kolek O., Gajkowska B., Motyl T.

## Morphological and molecular markers of stem and progenitor cells in the mammary gland

### Summary

The mammary gland is a dynamic organ that undergoes profound remodeling dependent on proliferation, differentiation, and apoptosis of mammary epithelial cells (MEC) during the cycle of the pregnancy, lactation, and involution. Long-lived populations of stem cells, which have a unique capacity for self-renewal, are responsible for these developmental changes. There is an increasing body of discoveries regarding human and mouse mammary gland stem cells, but the studies on bovine mammary gland stem cells are still very limited. According to morphological criteria bovine MEC are classified into two types: undifferentiated type I stem/progenitor cells assembling small light cells (SLC) and large light cells (LLC), and type II partially differentiated large dark cells (LDC) and terminally differentiated cells. To date there are no identified reliable molecular markers of stem/progenitor cells in bovine mammary glands. The main candidates are membrane transporting proteins of the Adenosine Binding Cassette (ABC) family, including Multi-drug-resistance protein 1 (Mdr1) and Breast cancer resistance protein 1 (Bcrp1). These proteins allow for the isolation of side populations (SP) of MEC assembling stem/progenitor cells by exclusion of dyes. Cytometric analysis of SP revealed from 0.2% to 5% of MEC in human and mouse mammary glands. The knowledge on the number and molecular properties of stem cells in bovine mammary glands would be very useful not only for enhancing milk production but also for explanation of the natural resistance against mammary cancer in this species.

**Keywords:** stem cells, mammary gland, bovine

Większość z 300 bilionów komórek naszego ciała pełni bardzo wyspecjalizowane funkcje i nie są one w stanie wykonywać niczego innego niż zadanie, do którego zostały zaprogramowane. Względnie niewielka liczba komórek niezróżnicowanych, posiadających możliwość rozwoju w dowolny typ komórek organizmu i mających zdolność do ciągłej proliferacji, to komórki macierzyste.

Komórki macierzyste w zależności od ich zachowania klasyfikuje się jako komórki totipotencjalne, komórki pluripotencjalne oraz komórki multipotencjalne. Komórki totipotencjalne mają zdolność różnicowania się w dowolną komórkę organizmu i dowolną komórkę błon pozazarodkowych (np. łożyska). Jedyne komórki totipotencjalnymi są: zapłodniona komórka jajowa oraz kilka pierwszych komórek rozwijającego się embrionu. Komórki pluripotencjalne mają zdolność do przeobrażenia się w dowolną komórkę organizmu, ale nie w każdą komórkę błon pozazarodkowych. Wśród nich wyróżnia się: embrionalne komórki macierzyste, embrionalne komórki rozrod-

cze oraz embrionalne komórki nowotworowe. Komórki multipotencjalne mają zdolność różnicowania się w ograniczoną liczbę komórek organizmu, izolowane są ze wszystkich tkanek dorosłego organizmu.

Inny podział komórek macierzystych opiera się na ich pochodzeniu i tak wyróżnia się komórki macierzyste embrionalne oraz komórki macierzyste dorosłego organizmu. Komórki macierzyste embrionalne pochodzą z zarodka będącego na etapie rozwoju poprzedzającym implancję. Tworzące go komórki (blastomery) są niezróżnicowane, mogą rozwinąć się w dowolną komórkę organizmu i ani wyglądem, ani zachowaniem nie przypominają komórek wyspecjalizowanych. Pierwsze różnicowanie w zarodku człowieka zachodzi około piątego dnia rozwoju, kiedy powierzchowna warstwa komórek odizolowuje się od komórek wewnętrznej masy, aby stać się częścią łożyska. Komórki wewnętrznej masy mają zdolność wytwarzania każdej komórki ludzkiego organizmu, a usunięte z zarodka i hodowane w odpowiednich warunkach mogą dzielić się nieskończenie, zachowując swą pluripoten-

cialność. To właśnie te komórki nazywamy embrionalnymi komórkami macierzystymi.

Pierwsze doniesienia o otrzymaniu embrionalnych komórek macierzystych myszy ukazały się w 1981 r. (11, 23), natomiast komórek macierzystych człowieka dopiero w 1998 r. (30). Ludzkie embrionalne komórki macierzyste mogą znaleźć zastosowanie przy badaniu procesu różnicowania i funkcjonowania tkanek, w tym także przyczyn bezpłodności, poronień czy wad wrodzonych; mogą stanowić materiał przy testowaniu leków, przyczyniając się do zwiększenia ich bezpieczeństwa i efektywności; ponadto mogą być nieograniczonym źródłem tkanek wykorzystywanych do przeszczepów w ramach leczenia szerokiego zakresu chorób zwyrodnieniowych, takich jak cukrzyca czy choroba Parkinsona (13).

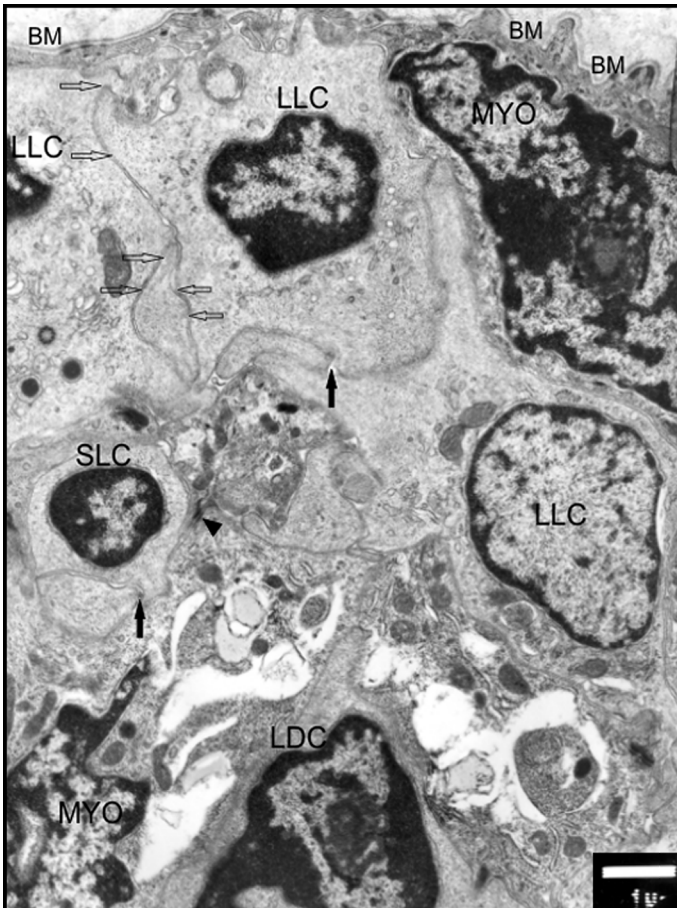
Jak dotąd bardzo mało wiadomo jest, jakie czynniki decydują o tym, że jedne z embrionalnych komórek macierzystych są pluripotencjalne, a inne są bardziej ograniczone w swoich możliwościach rozwoju. Jednym z takich czynników jest czynnik transkrypcyjny Oct4, który używany jest jako marker embrionalnych komórek macierzystych. Jego ekspresja musi być utrzymana na wyższym od krytycznego poziomie, aby komórki pluripotencjalne pozostały niezróżnicowane. Samo jednak białko Oct4 jest niewystarczające dla utrzymania embrionalnych komórek macierzystych w stanie niezróżnicowania. Innym czynnikiem transkrypcyjnym, istotnym dla zachowania pluripotencjalności embrionalnych komórek macierzystych myszy, jest Nanog, którego ekspresja gwałtownie obniża się w czasie różnicowania się komórek. Nanog jest również ekspresjonowany przez embrionalne komórki macierzyste człowieka, aczkolwiek na znacznie niższym poziomie w porównaniu do Oct4, a jego rola nie została jeszcze określona. Warto zaznaczyć, że mysie i ludzkie embrionalne komórki macierzyste wydają się znacznie różnić od siebie pod względem czynników determinujących ich samoodnawialność i możliwości rozwoju. Na przykład białka BMP (Bone Morphogenic Proteins) razem z cytokiną LIF (Leukemia Inhibitory Factor) promują samoodnawialność komórek macierzystych mysich, ale w przypadku komórek macierzystych ludzkich wywołują gwałtowne ich różnicowanie.

Poszukiwanie komórek macierzystych dorosłego organizmu rozpoczęło się po bombardowaniu Hiroshimy i Nagasaki w 1945 r. Obserwowano wówczas, iż niższe dawki promieniowania powodowały zejścia śmiertelne po dłuższym czasie na skutek upośledzenia funkcji układu hematopoetycznego, natomiast wyższe dawki promieniowania wywoływały zejścia śmiertelne po krótszym czasie na skutek dysfunkcji nie tylko układu hematopoetycznego, ale również układu pokarmowego. Później wykazano, iż myszy poddane napromieniowaniu całego ciała wykazywały identyczne do ludzi objawy napromieniowania. Co ważne, zaobserwowano również, iż zabezpieczenie przed

promieniowaniem pojedynczej kości lub śledziona chroniło przed objawami napromieniowania. Wkrótce potem wykazano, iż mysz poddana napromieniowaniu całego ciała może zostać uchroniona przed upośledzeniem funkcji układu hematopoetycznego i śmiercią, poprzez iniekcję zawiesiny komórek pochodzących z narządów krwiotwórczych, np. szpiku kostnego. W 1956 r. trzy laboratoria wykazały, że to wstrzyknięte komórki szpiku kostnego dawcy, a nie czynniki naprawcze biorcy, odpowiedzialne są za odbudowę układu krwiotwórczego (14, 15, 26).

Istnienie komórek macierzystych gruczołu sutkowego zostało udowodnione prawie 50 lat temu, kiedy DeOmé i wsp. (6) po raz pierwszy zaobserwowali, iż fragmenty tkanki nabłonkowej pobrane z dowolnego regionu gruczołu sutkowego myszy dawcy, przeszczepione do poduszeczek tłuszczowych myszy biorcy, pozbawionej jej własnej tkanki nabłonkowej, rozwijają się w normalny, zawierający przewody, pęcherzyki i komórki mięśniowonabłonkowe, gruczoł sutkowy. Kolejne doświadczenia z użyciem techniki przeszczepiania wykazały, iż komórki macierzyste są obecne w gruczole sutkowym na każdym etapie jego rozwoju i przez całą długość życia myszy (27). Następnie, Kordon i Smith (20) przy użyciu komórek nabłonka gruczołu sutkowego znakowanych wirusem MMTV (Mouse Mammary Tumor Virus) potwierdzili zdolność pojedynczej komórki macierzystej do wytworzenia kompletnego, funkcjonalnego gruczołu sutkowego po przeszczepieniu do beznabłonkowych poduszeczek tłuszczowych myszy biorcy.

Analiza cytologiczna gruczołu sutkowego myszy wykazała, iż wśród komórek nabłonkowych obecne są morfologicznie odmienne od nich, bardzo nieliczne komórki, których zachowanie *in vivo* i *in vitro* sugeruje, że mogą one reprezentować populację komórek macierzystych (27). Komórki te są małe i okrągłe, z dużym, okrągłym jądrem komórkowym i wąską, jasną cytoplazmą. Nie są to jednak limfocyty, jak wcześniej uważano, bowiem obecność połączeń typu gap junction z sąsiednimi komórkami nabłonkowymi, potwierdza ich nabłonkowe pochodzenie. Obecność tych jasno barwiących się komórek została wykazana w gruczole sutkowym wszystkich przebadanych gatunków: człowiek (12), mysz (27), szczur (5), koza (22), owca (9), bydło (10). Odróżnienie komórki macierzystej od komórki progenitorowej jest bardzo trudne, bowiem morfologicznie są one identyczne. Zarówno komórka macierzysta, jak i progenitorowa to komórki małe i jasne (Small Light Cells – SLC) (17). Komórki SLC charakteryzuje wysoki stosunek jądra komórkowego do cytoplazmy oraz ograniczona ilość lub całkowity brak organelli komórkowych, np. mitochondriów i mikrofilamentów. Mikrofilamenty kontrolują ruch komórki i zmiany jej kształtu. Ich brak w komórkach SLC może być przyczyną dużej różnorodności ich kształtu. Wraz z postępowaniem procesu różnicowania zwiększa się ilość organelli komórko-



Ryc. 1. Zdjęcie mikroskopowo-elektronowe przedstawiające 2 typy komórek na różnym etapie różnicowania się, znajdujące się w niszy tkanki gruczołu mlekowego jałówki.

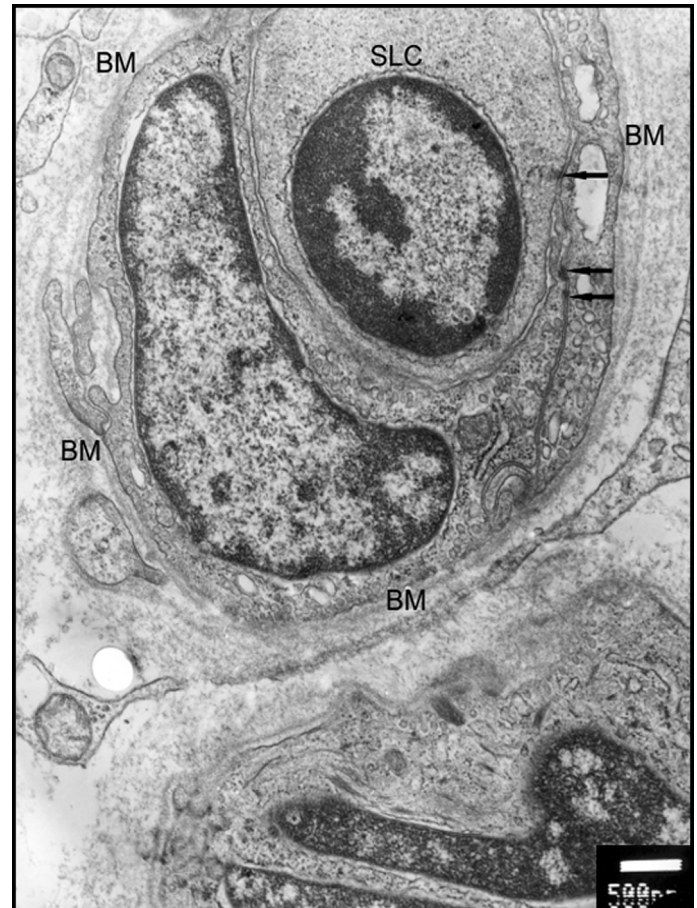
Typ I reprezentuje niezróżnicowaną małą komórkę kształtu ameboidalnego, o elektronowo jasnej, skąpej, homogennej cytoplazmie niezawierającej organelli, z dużym proporcjonalnie do ilości cytoplazmy jądrem komórkowym o zagęszczonej heterochromatinie i jasnej nukleoplazmie (SLC). Są to także trzy duże komórki o kształcie nieregularnym, często owalnym lub „dyniowatym”, o elektronowo-jasnej cytoplazmie, zawierającej w zależności od stopnia zróżnicowania zmienną ilość RER, mitochondriów, różnie wykształcony aparat Golgiego, drobne krople lipidowe, ziarnistości sekrecyjne i włókienka cytoszkieletu komórkowego. Owalne, duże jądra tych komórek charakteryzują się obfitą heterochromatiną lub są jej prawie pozbawione oraz posiadają jasną nukleoplazmę (LLC).

Typ II reprezentuje fragment zróżnicowanej komórki o kształcie nieregularnym z ciemną cytoplazmą zawierającą wiele organelli. Jądro tej komórki posiada ciemną nukleoplazmę i mocno zagęszczoną chromatinę jądrową (LDC). Na zdjęciu widoczne są także dwie komórki mioepitelialne (MYO) otoczone błoną podstawną (BM), budujące niszę dla SLC, LLC i LDC.

Komórki typu I nie posiadają błony podstawnej, a pomiędzy sobą i komórkami sąsiadującymi tworzą punktowe (strzałki pełne) i odcinkowe (strzałki puste) połączenia typu gap junction, zaś komórki sąsiadujące znajdujące się pomiędzy komórkami macierzystymi tworzą między sobą połączenia typu tight junction (główka strzałki).

Bar = 1  $\mu$ m

wych w komórkach gruczołu sutkowego, np. stopniowo zwiększa się liczba mitochondriów. Przypuszcza się, że jest to związane ze zwiększającym się zapo-



Ryc. 2. Komórka macierzysta (SLC) otoczona komórkami sąsiadującymi posiadającymi błony podstawne (BM). Pomiedzy komórkami widoczne są punktowe gap junction (strzałki pełne).

Bar = 500 nm

trzebowaniem komórki nabłonkowej na energię, wykorzystywaną do produkcji i sekrecji mleka. Innymi organellami, które pojawiają się w dojrzewającej komórce nabłonkowej są: filamenty okołojądrowe, wolne rybosomy, szorstka siateczka śródplazmatyczna, aparat Golgiego i ziarnistości wydzielnicze.

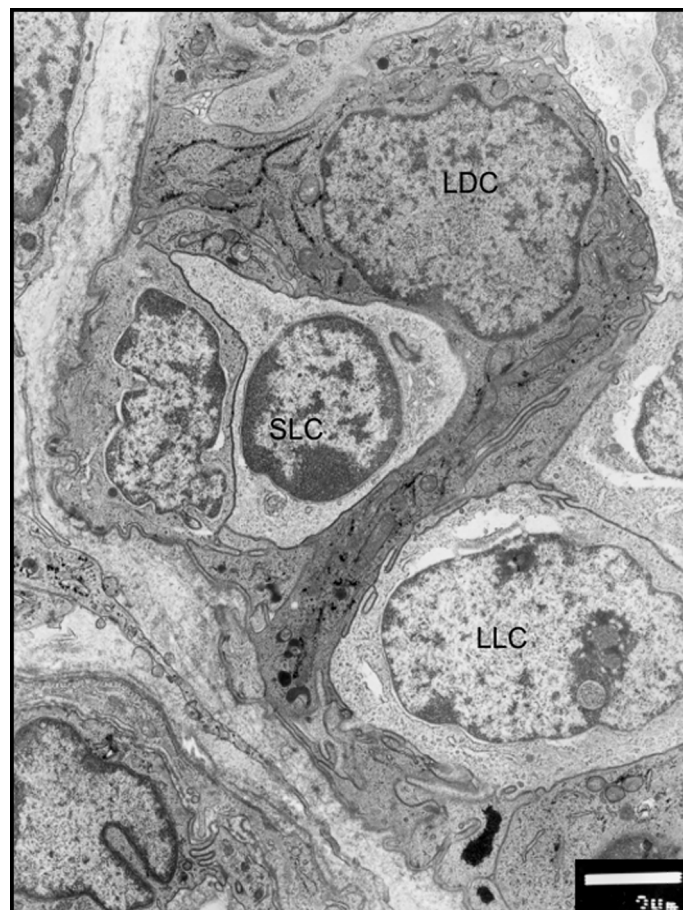
Komórki gruczołu sutkowego znajdujące się na różnych etapach różnicowania się, mają różną zdolność do pobierania barwnika. Komórki macierzyste i progenitorowe pierwotne mają ograniczoną zdolność do pochłaniania barwników komórkowych i stąd w obrazie mikroskopowym są to komórki małe i jasne (Small Light Cells). W miarę postępowania procesu różnicowania się komórek, nabierają one coraz większej zdolności do pobierania barwnika, przez co w obrazie mikroskopowym są coraz ciemniejsze.

Biorąc pod uwagę cechy morfologiczne, zaproponowano dwie pokrywające się klasyfikacje komórek gruczołu sutkowego. Komórki macierzyste i komórki progenitorowe człowieka i myszy zostały podzielone na typ I i typ II (19), natomiast bydła i innych gryzoni na komórki małe i duże (3, 5). Obserwacje komórek macierzystych i progenitorowych gruczołu sutkowego myszy, człowieka i bydła w mikroskopie świetlnym i elektronowym wykazały duże podobieństwa



Ryc. 3. Komórka typu LLC; widoczne jej połączenia typu gap junction na długich odcinkach błony komórkowej z komórkami sąsiadującymi (strzałki puste).

Bar = 1  $\mu$ m



Ryc. 4. Nisza skupiająca różne typy komórek macierzystych/progenitorowych: SLC, LLC oraz LDC z charakterystycznym brakiem błony podstawnej i obecnością gap junction pomiędzy komórkami.

Bar = 2  $\mu$ m

między komórkami tych trzech gatunków. Komórki typu I to niezróżnicowane komórki SLC i niezróżnicowane komórki LLC (komórki duże jasne – Large Light Cells). Niezróżnicowane komórki SLC to zarówno komórki macierzyste, jak i progenitorowe, które morfologicznie są nie do odróżnienia. Komórki typu II są to komórki duże średnioobarwiają się i wśród nich wyróżnia się zróżnicowane komórki LDC (komórki duże ciemne – Large Dark Cells) oraz komórki ostatecznie zróżnicowane. Komórki typu I, w tym komórki SLC, stanowią niewielki procent populacji komórek w gruczole sutkowym, co odzwierciedla niewielki procent komórek macierzystych w innych narządach. Na ryc. 1-4 przedstawiono zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego obrazujące typy komórek macierzystych i progenitorowych oraz ich specyficznie morfologiczne cechy w tkance gruczołu mlekowego jałowki.

Pomimo iż od dawna znane są markery molekularne dla komórek zróżnicowanych, to jak dotąd zidentyfikowano tylko kilka markerów dla komórek macierzystych. Przyczyną takiego stanu może być fakt, iż komórki macierzyste, które są niezróżnicowane, nie posiadają odpowiedniej maszynerii dla produkcji i ekspozycji markerów powierzchniowych charakte-

rystycznych dla komórek zróżnicowanych. Ponadto, nie jest znany żaden marker, który byłby uniwersalny dla wszystkich komórek macierzystych.

Jednym ze sposobów odróżnienia komórek macierzystych od komórek zróżnicowanych jest obecność lub brak połączeń ścisłych (17). Połączenia te funkcjonują jako międzykomórkowe kanały pomiędzy sąsiednimi komórkami, umożliwiające przepływ małych cząsteczek. Rola połączeń ścisłych w gruczole sutkowym nie jest znana, wiadomo natomiast, że są one bardzo istotne w procesie embriogenezy, różnicowania się komórek i monitorowania odpowiedzi tkankowej, jak również kontrolują podziały komórkowe. Komórki gruczołu sutkowego człowieka, które w większości są komórkami ostatecznie zróżnicowanymi, wykazują ekspresję koneksyn: Cx26 i Cx43 (21). Ekspresji Cx43 nie wykazano, natomiast, w komórkach macierzystych człowieka pochodzących z gruczołu sutkowego (18), nerki (2), rogówki (25), mózgu (8), skóry (24), trzustki (28), jak również w komórkach macierzystych gruczołu mlekowego bydła (17). Wydaje się bardzo mało prawdopodobne, aby komórki macierzyste wytwarzały inne koneksyny. Wszystkie, jak dotąd przebadane, komórki macierzyste nie wykazują cech kontaktu międzykomórkowego, natomiast

komórki zróżnicowane posiadają połączenia ścisłe i kontaktują się między sobą.

W przypadku komórek macierzystych i progenitorowych gruczolu sutkowego brak jest znanych specyficznych molekularnych markerów. Dlatego dla identyfikacji i izolacji komórek macierzystych z gruczolu sutkowego używa się markerów dla komórek macierzystych innych tkanek, takich jak tkanka: hematopoetyczna, nerwowa, naskórkowa i innych. Jak dotąd, większość badań została przeprowadzona na komórkach pochodzących z gruczolu sutkowego myszy, nie ma natomiast doniesień literaturowych dotyczących komórek macierzystych pochodzących z gruczolu mlekowego bydła.

W 1996 r. Goodell i wsp. (16) zaobserwowali, iż przy wykorzystaniu podwójnej emisji barwnika Hoechst 33342 wszystkie komórki mysiego szpiku kostnego dzieliły się na populacje komórek o specyficznych profilach barwienia. Jedną z tych populacji, z racji jej wyraźnego wyodrębnienia od reszty komórek, nazwano side population (SP). Komórki SP wykazują zdolność do zasiedlenia i odnowienia szpiku kostnego po transplantacji do myszy poddanych promieniowaniu jonizującemu, co dowodzi, iż są to hematopoetyczne komórki macierzyste. Wyodrębnienie SP zachodzi dzięki białkom z rodziny błonowych białek transportujących wiążących adenozyne (Adenosine Binding Cassette – ABC), do których należy Mdr1 (Multi-drug-resistance protein 1). Białka te aktywnie wypompowują substancje toksyczne, między innymi barwnik Hoechst z komórki, a komórki zawierające najmniejszą ilość barwnika, czyli charakteryzujące się zwiększoną ekspresją białek transportujących, tworzą SP. W przypadku potraktowania mysich komórek hematopoetycznych Verapamilem, który jest inhibitorem ww. białek transportujących, SP nie wyodrębniała się (16). Badania myszy deficytowych w białko Mdr1 wykazały, iż w komórkach obecne są inne białka transportujące, zaangażowane w wypompowywanie barwników z komórki. Do białek tych należy inny członek rodziny ABC, Bcrp1 (Breast cancer resistance protein-1). Białko Bcrp1 po raz pierwszy zostało zidentyfikowane w komórkach nowotworu piersi opornych na działanie inhibitorów topoizomery DNA. Możliwe jest, że mechanizmy zaangażowane w wypompowywanie toksycznych substancji z komórki oraz białka biorące udział w tym procesie, są odpowiedzialne za oporność wielu nowotworów na chemioterapię.

Komórki o cechach komórek SP wyodrębniono także w mysim i ludzkim gruczole sutkowym (1, 5). Side population w ludzkim gruczole waha się od 0,2% do 5% całej populacji komórek nabłonkowych i tworzą ją komórki wykazujące ekspresję takich markerów komórek macierzystych, jak: p21, cytokeratyna 19 i Msi1, ludzki homolog białka Musashi muszki owocówki. Msi1 jest to białko przyłączające się do RNA, biorące udział w ścieżce sygnałowej Delta/Notch, która włączana jest w czasie podziału asymetrycznego ko-

mórek macierzystych (4). Side population w mysim gruczole sutkowym stanowi około 2-3% lub 0,5% całej populacji komórek nabłonkowych i tworzą ją komórki wykazujące ekspresję Sca1. Pomimo toksyczności barwnika Hoechst dla komórek, wyizolowane z jego użyciem komórki SP po transplantacji do pobawionych tkanki nabłonkowej poduszczek tłuszczowych myszy biorecy, odtworzyły struktury przewodów i pęcherzyków gruczolowych (1).

Pierwsze badania profilu ekspresji genów w komórkach macierzystych, zostały przeprowadzone na komórkach tkanki nerwowej, rosnących w tzw. neurosferach (neurospheres) (29). W neurosferach obserwuje się około 4%-20% komórek macierzystych, a pozostałą część populacji stanowią komórki progenitorowe na różnych etapach różnicowania. Dotychczas, ukazała się tylko jedna praca dotycząca badań profilu transkryptomycznego w komórkach macierzystych gruczolu sutkowego człowieka (7). W badaniach tych wykorzystano analogiczną do neurosfer, metodę hodowli komórek gruczolu sutkowego w tzw. mammosferach nieadhezyjnych (nonadherent mammospheres). Mammospery tworzone były głównie poprzez komórki macierzyste i progenitorowe, i posłużyły do porównania transkryptomu ww. komórek z transkryptomem komórek zróżnicowanych rosnących na kolagenie. W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowano geny podlegające ekspresji jedynie w komórkach mammosfer, które w kolejnych badaniach mogą być wykorzystane jako markery komórek macierzystych i progenitorowych. Należą do nich: geny odpowiedzialne za utrzymywanie stanu niezróżnicowania w embrionalnych komórkach macierzystych – IL6 i gp 130 czy geny odpowiedzialne za regulację procesu samoodnowy komórek macierzystych – białka ścieżki Wnt/Frizzled. Ponadto, zaobserwowano nienormalną ekspresję wielu genów związanych z nowotworem piersi lub innymi typami nowotworów, co sugerowałoby, iż zaburzenia regulacji różnicowania komórek macierzystych i progenitorowych mogą być zaangażowane w proces nowotworzenia. Zidentyfikowane zostały także geny wykazujące ekspresję jedynie w komórkach zróżnicowanych, które w przyszłości mogą być wykorzystane jako negatywne markery komórek macierzystych, np. mammaglobina 1 i 2, WISP3, molekuly adhezyjne, białka połączeń ścisłych czy metaloproteiny. Potwierdzono także znane z wcześniejszych doniesień zaangażowanie genów takich, jak: TGF $\alpha$ , HGF czy białka z rodziny Wnt i Notch w rozwój gruczolu sutkowego. Jak dotąd, brak jest doniesień literaturowych dotyczących transkryptomicznej charakterystyki komórek macierzystych i progenitorowych gruczolu mlekowego bydła.

Badania nad komórkami macierzystymi w gruczole sutkowym człowieka i myszy rozwijają się bardzo dynamicznie, jednakże w przypadku bydła badania te są dopiero na etapie początkowym. Mając na uwadze możliwość wykorzystania wiedzy w zakresie rozwoju

komórki nabłonka gruczołu mlekowego bydła, dla opracowania strategii zwiększenia wydajności bydła mlecznego, celowe wydaje się podjęcie badań zmierzających do identyfikacji profilu ekspresyjnego genów odpowiedzialnych za różnicowanie od komórki macierzystej do komórki syntetyzującej składniki mleka. Ponadto, znajomość transkryptomu komórek macierzystych i progenitorowych w gruczole mlekowym bydła, gatunku, u którego nowotwory tegoż narządu nie występują, mogłaby być znacząca dla zrozumienia etiologii i podstaw rozwoju nowotworów gruczołu sutkowego u tych gatunków ssaków, u których częstotliwość ich występowania jest największa, tj. u człowieka i psa.

### Piśmiennictwo

- Alvi A. J., Clayton H., Joshi C., Envert T., Ashworth A., Vivanco M. M., Dale T. C., Smalley M. J.: Functional and molecular characterization of mammary side population cells. *Breast Cancer Res.* 2003, 5, 1-8.
- Chang C. C., Trosko J. E., El-Fouhy M. H., Gibson-D'Ambrosio R. E., D'Ambrosio S. M.: Contact insensitivity of a subpopulation of normal human fetal kidney epithelial cells and of human carcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1987, 47, 1634-1645.
- Chepko G., Dickson R. B.: Ultrastructure of the putative stem cell niche in the rat mammary epithelium. *Tissue Cell* 2003, 35, 83-93.
- Clarke R. B., Anderson E., Howell A., Potten C. S.: Regulation of human breast epithelial stem cells. *Cell Prolif.* 2003, 36, 45-58.
- Clayton H., Titley I., Vivanco M.: Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from human mammary gland. *Exp. Cell. Res.* 2004, 297, 444-460.
- DeOmé K. B., Faulkin L. J. Jr., Bern H. A., Blair P. B.: Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res.* 1959, 19, 515-520.
- Dontu G., Abdallah W. M., Foley J. M., Jackson K. W., Clarke M. F., Kawamura M. J., Wicha M. S.: In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes.&Dev.* 2003, 17, 1253-1270.
- Dowling-Warriner C. V., Trosko J. E.: Induction of gap junctional intercellular communication, connexin 43 expression, and subsequent differentiation in human fetal neuronal cells by stimulation of the cyclicAMP pathway. *Neuroscience* 2000, 95, 859-868.
- Ellis S., Edwards F., Akers R. M.: Morphological and histological analysis of the prepubertal ovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* 1995, 78 (Suppl 1), 157.
- Ellis S., Purup S., Sejrsen K., Akers R. M.: In vitro analysis of peripheral and medial parenchymal zones in prepubertal ruminant mammary glands. *J. Dairy Sci.* 2000, 83 (Suppl 1), 952-961.
- Evans M. J., Kaufman M. H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981, 292, 154-156.
- Ferguson D.: Ultrastructural characterization of the proliferative (stem?) cells within the parenchyma of the normal resting breast. *Cell Tissue Res.* 1985, 252 (Suppl 1), 581-587.
- Fiszler D., Rozwadowska N., Kurpisz M.: Stem cells from the perspective of clinical applications. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 751-754.
- Ford C. E., Hamerton J. L., Barnes D. W. H., Loutit J. F.: Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 1956, 177, 452-454.
- Gengozian N., Urso I. S., Congdon C. C., Conger A. D., Makinodan T.: Thymus specificity in lethally irradiated mice treated with rat bone marrow. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1957, 96, 714-720.
- Goodell M. A., Brose K., Paradis G., Conner A. S., Mulligan R. C.: Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that replicating in vivo. *J. Exp. Med.* 1996, 183, 1797-1806.
- Holland M. S., Tai M.-H., Trosko J. E., Griffin L. D., Stasko J. A., Chevillat N. C., Holland R. E.: Isolation and differentiation of bovine mammary gland progenitor cell populations. *Am. J. Vet. Res.* 2003, 64, 396-403.
- Kao C.-Y., Nomata K., Oakley C. S., Welch C. W., Chang C. C.: Two types of normal human breast epithelial cells derived from reduction mammaplasty: Phenotypic characterization and response to SV40 transfection. *Carcinogenesis* 1995, 16, 531-538.
- Kao C.-Y., Oakley C. S., Welsch C. W., Chang C. C.: Growth requirements and neoplastic transformation of two types of normal breast epithelial cells derived from reduction mammaplasty. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1997, 3, 282-288.
- Kordon E. C., Smith G. H.: An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* 1998, 125, 1921-1930.
- Lee S. W., Tomasetto C., Paul D., Keyomarsi K., Sager R.: Transcriptional down-regulation of gap junction proteins blocks junctional communication in human mammary tumor cell lines. *J. Cell. Biol.* 1992, 118, 1213-1221.
- Li P., Wilde C. J., Finch L. M., Ferning D. G., Rudland P. S.: Identification of cell types in the developing goat mammary gland. *Histochem. J.* 1999, 31 (Suppl 1), 379-393.
- Martin G. R.: 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.
- Matic M., Evans W. H., Brink P. R., Simon M.: Epidermal cells do not communicate through gap junctions. *J. Invest. Dermatol.* 2002, 118, 110-116.
- Matic M., Petrov I. N., Chen S., Wang C., Dimitrijevic W. M., Wolosin J. M.: Stem cells of the corneal epithelium lack connexins and metabolite transfer capacity. *Differentiation* 1997, 61, 251-260.
- Nowell P. C., Cole L. J., Habermeyer J. G., Roan P. L.: Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. *Cancer Res.* 1956, 16, 258-261.
- Smith G. H., Medina D.: A morphologically distinct candidate for an epithelial stem cell in mouse mammary gland. *J. Cell. Sci.* 1988, 90, 173-183.
- Tai M. H., Olson L. K., Madhukar B. V., Linning K. D., Van Camp L., Tsao M. S., Trosko J. E.: Characterization of gap junctional intercellular communication in immortalized human pancreatic ductal epithelial cells with stem cell characteristics. *Pancreas* 2003, 26, 18-26.
- Terskikh A. V., Easterday M. C., Li L., Hood L., Kornblum H. I., Geschwind D. H., Weissman I. L.: From hematopoiesis to neurogenesis: Evidence of overlapping genetic programs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98, 7934-7939.
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998, 282, 1145-1147.

Adres autora: prof. dr hab. Tomasz Motyl, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa; e-mail: tomasz\_motyl@sggw.pl