

MEZENCHYMALNE KOMÓRKI MACIERZyste SZPIKU KOSTNEGO A STARZENIE*

BONE MARROW DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AND AGING

Kamila GALA, Anna BURDZIŃSKA, Leszek PĄCZEK

Klinika Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Instytut
Transplantologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie: Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) to adherentne komórki, izolowane ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej lub innych tkanek, mające zdolność do multipotentnego różnicowania. MSC stanowią nadzieję w leczeniu licznych chorób degeneracyjnych, w tym także takich, które pojawiają się u osób starszych. Rozważa się możliwość ich wykorzystania w terapii komórkowej, a także w przeszczepach autologicznych, bez wywoływania reakcji immunologicznej. Dlatego, istotne jest, aby poznać i zrozumieć zależności między starzeniem się organizmów a właściwościami tej populacji komórek macierzystych. Niniejsza praca przedstawia stan wiedzy na temat zmian morfologicznych i funkcjonalnych, takich jak zdolność do podziałów czy różnicowania, mezenchymalnych komórek macierzystych wraz z wiekiem, a także podczas starzenia *in vitro*. Dyskutowane są mechanizmy decydujące o zmianach w starzejących się MSC, takich jak: skracanie telomerów czy wpływ wolnych rodników na strukturę i funkcje MSC, a także wrażliwość tych komórek na niekorzystne warunki środowiskowe w zależności od wieku dawcy. Analizowane wyniki doświadczeń są często niespójne, jednak większość badań *in vitro* wskazuje, że komórki pochodzące od starych organizmów mogą wykazywać słabsze zdolności terapeutyczne w porównaniu z komórkami izolowanymi od młodych organizmów. Wyniki nielicznych prób klinicznych prowadzonych u ludzi nie pozwalają na wyciągnięcie wniosków odnośnie wpływu wieku dawcy komórek na efektywność zastosowanej terapii komórkowej.

Słowa kluczowe: mezenchymalne komórki macierzyste, starzenie, potencjał różnicowania, przeszczep komórkowy.

Summary: Mesenchymal stem cells (MSC) are considered to be a promising tool for cellular transplantations. This population of cells can find potential applications in multiple clinical disorders as a stimulant for regeneration and/or an immuno-modulator for the treated tissue. As adult stem cells, MSC allow performance of autologous transplantations. Therefore, it is crucial to understand the relationships between ageing and properties of this cell population. This review presents the current knowledge of morphological and functional changes in bone marrow-derived MSC during their ageing both *in vivo* and *in vitro*. This review discusses the mechanisms of cell ageing, such as telomere shortening or free radical effects on MSC, along with the susceptibility of cells to negative environmental conditions, depending on

*Dofinansowanie pracy: Statut Kliniki Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

donor's age. The analyzed results often differ from each other, but the majority of *in vitro* studies indicate that the donor's age has an impact on mesenchymal cell properties. The data suggest that cells derived from aged individuals display a lower therapeutic potential than the cells isolated from young organisms. Very few clinical trials conducted in humans do not allow drawing conclusions about the relationship between the donor's age and the transplantation outcome.

Key words: mesenchymal stem cells, ageing, cellular transplantation, differentiation potential.

Wykaz skrótów: **ALP** (*Alkaline phosphatase*) – fosfataza alkaliczna; **bp** (*base pair*) – para zasad, czyli komplementarne zasady azotowe nukleotydów w kwasach nukleinowych; **BMP** (*Bone Morphogenic Protein*) – białko morfogenetyczne kości; **FGF-2** (*Fibroblast Growth Factor-2*) – czynnik wzrostu fibroblastów-2; **GVHD** (*Graft-Versus-Host Disease*) – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi; **G-CSF** (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) – czynnik stymulujący kolonie granulocytów; **GM-CSF** (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) – czynnik stymulujący kolonie granulocytów i makrofagów; **HGF** (*Hepatocyte Growth Factor*) – czynnik wzrostu hepatocytów; **HO-1** (*Heme Oxygenase*) – oksygenaza hemowa-1; **HSP** (*Heat Shock Protein*) – białka szoku cieplnego; **MSC** (*Mesenchymal Stem Cells*) – mezenchymalne komórki macierzyste; **m-MS** – mezenchymalne komórki macierzyste izolowane od młodych organizmów; **M-SCF** (*Macrophage-Colony Stimulating Factor*) – czynnik stymulujący kolonie makrofagów; **PD** (*Population Doublings*) – podwojenie populacji komórek; **ROS** (*Reactive Oxygen Species*) – reaktywne formy tlenu; **SDF-1** (*Stromal-Derived Factor-1*); **s-MS** – mezenchymalne komórki macierzyste izolowane od starych organizmów; **SOD** (*SuperOxide Dismutase*) – dysmutaza ponadtlenkowa; **TGF- β 1** (*Transforming growth factor beta 1*) – transformujący czynnik wzrostu- β 1; **VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*) – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego; **r.ż.** – rok życia.

MEZENCHYMALNE KOMÓRKI MACIERZyste SZPIKU (MSC)

Mezenchymalne komórki macierzyste – MSC (*Mesenchymal Stem Cells*) to multipotentne adherentne komórki mające zdolność do różnicowania *in vitro*, izolowane ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej lub innych tkanek [26]. Komórki te opisywane były już przez Friedensteina w latach 70. [16,17], ale termin „*mesenchymal stem cells*” został upowszechniony przez A. Caplana w latach 90. XX wieku [7]. Głównym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych jest szpik kostny. Jednak MSC stanowią 0,01–0,001% wszystkich jednojądrzastych komórek obecnych w szpiku, a więc ich odsetek jest niewielki [31,44]. Początkowo uważano, że MSC mogą różnicować się jedynie w komórki pochodzenia mezodermalnego, jak komórki kostne, chrzęstne oraz tłuszczowe [44]. Obecnie wiadomo, że możliwa jest indukcja różnicowania w inne komórki pochodzenia mezodermalnego, takie jak: kardiomiocyty [63], włókna mięśniowe [13], komórki kanalików nerkowych [46], a także komórki pochodzenia ektodermalnego, takie jak: neurony [33] czy endodermalnego, jak np. hepatocyty [9] oraz komórki wysp trzustki [61].

Mezenchymalne komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego wykazują ekspresję takich antygenów powierzchniowych, jak: CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, CD105, CD106, CD120a, CD124, ale nie mają na swojej powierzchni markerów charakterystycznych dla komórek hematopoetycznych: CD14, CD34, CD45 oraz endotelialnych: CD11b, CD31, CD33, CD133 [44]. Pomimo licznych badań nie udało się ustalić uniwersalnego zestawu markerów powierzchniowych, które byłyby standardem w identyfikacji tych komórek.

Badania *in vitro* wykazały, że MSC mają właściwości immunosupresyjne. Wprawdzie komórki mezenchymalne wykazują ekspresję antygenów MHC klasy I, jednak ze względu na brak cząsteczek kostymulujących – B7.1 (CD80) oraz B7.2 (CD86) nie dochodzi do pełnej aktywacji alloreaktywnych limfocytów T, dzięki temu MSC uznawane są za komórki „uprzywilejowane immunologicznie” [27]. Dodatkowo nie obserwuje się na ich powierzchni antygenów MHC klasy II.

Le Blanc i wsp. [36] wykazali, że MSC mogą być wykorzystywane w zapobieganiu reakcji przeszczep przeciwko gospodarzowi – GVHD (ang. *Graft-Versus-Host Disease*) po transplantacji hematopoetycznych komórek macierzystych. Te właściwości komórek mezenchymalnych mogą przyczynić się do zwiększenia efektywności przeszczepień szpiku kostnego. Podejmowane są próby wykorzystania MSC jako czynnika immunosupresyjnego w przeszczepach narządowych, ale jak dotąd wyniki nie są zbyt obiecujące [28].

Kolejną istotną cechą komórek mezenchymalnych, z klinicznego punktu widzenia, jest ich zdolność do syntezy i wydzielania wielu cytokin, takich jak interleukiny: IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15 oraz czynników wzrostu, biorących udział w regulacji hematopoezy, np. czynnika stymulującego kolonie granulocytów – G-CSF (ang. *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*), czynnika stymulującego kolonie granulocytów i makrofagów – GM-CSF (ang. *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), czynnika stymulującego kolonie makrofagów – M-CSF (ang. *Macrophage-Colony Stimulating Factor*). Oprócz tego MSC wydzielają m.in. czynnik wzrostu hepatocytów – HGF (ang. *Hepatocyte Growth Factor*) oraz czynnik wzrostu śródbłónki – VEGF (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), które odgrywają ważną rolę w procesie regeneracji uszkodzonych tkanek. Niektóre z tych czynników uwalniane są przez niepobudzone komórki, a inne po ich stymulacji [11,12,34]. Należy wspomnieć, że na powierzchni MSC obecny jest receptor CXCR4, którego ligandem jest chemokina SDF-1 (ang. *Stromal Derived Factor-1*) uważana za istotny czynnik regulujący migrację, proliferację i aktywację komórek układu krwiotwórczego. Chemokina SDF-1 łącząc się z receptorem CXCR pobudza MSC do migracji ze szpiku kostnego do tkanek obwodowych, co może mieć duże znaczenie w mobilizacji tych komórek [62]. Wykazano, że MSC mogą migrować do uszkodzonego miejsca i wspierać proces regeneracji zniszczonej tkanki, np. kostnej [25] czy tkanki mięśnia szkieletowego [42].

Obecnie prowadzone są liczne badania nad wykorzystaniem komórek mezenchymalnych w leczeniu chorób serca, ponieważ mogą one różnicować się w kardiomiocyty zarówno *in vitro* [63], jak i *in vivo* [45]. W badaniach *in vivo* dowiedziono, że MSC pobudzają regenerację mięśnia sercowego po zawale. Uważa się, że terapeutyczny efekt MSC spowodowany jest przede wszystkim wtórną reakcją indukowaną przez transplantację komórkową. Dzięki aktywacji takich czynników, jak: VEGF, HGF oraz G-CSF, inicjowana jest angiogeneza, a niedojrzałe komórki mięśnia sercowego migrują i zasiedlają uszkodzony mięsień [45]. Jiang i wsp. [30] wykazali w badaniach na szczurach, że komórki mezenchymalne mają zdolność do przemieszczania się w kierunku niewydolnego serca po ich dożylniej iniekcji.

Innym przykładem zastosowania transplantacji MSC to leczenie dysfunkcji zwieraczy. W badaniach przeprowadzonych na szczurach wykazano, że iniekcja mezenchymalnych komórek macierzystych poprawia regenerację oraz kurczliwość uszkodzonych mięśni zwieraczy odbytu [38]. Wykazano także, że przeszczepienie MSC przyczynia się do poprawy funkcji uszkodzonego mięśnia, ponieważ komórki te promują dojrzwienie włókien mięśniowych [42], co wydaje się być korzystne w leczeniu chorób mięśni szkieletowych.

Mezenchymalne komórki macierzyste stanowią zatem obiecujące narzędzie, które mogłoby znaleźć zastosowanie w terapii komórkowej wielu chorób degeneracyjnych, w tym także chorób pojawiających się u osób w podeszłym wieku.

II. MEZENCHYMALNE KOMÓRKI MACIERZYTE A STARZENIE

Starzenie się organizmu jest złożonym procesem fizjologicznym, który definiuje się jako zespół zmian zachodzących w organizmach żywych w toku ich rozwoju osobniczego. Zmiany starcze dotyczą komórek oraz macierzy pozakomórkowej i w efekcie prowadzą do pogorszenia sprawności czynnościowej tkanek i narządów.

Istnieje wiele teorii na temat starzenia. Jedna z nich mówi, że komórki mogą przestać się dzielić z powodu tzw. starzenia replikacyjnego, które jest wynikiem skracania telomerów [2,47]. Wiadomo, że komórki wyizolowane z organizmu starzeją się podczas hodowli pozaustrojowej. W latach 60. XX wieku Hayflick i Moorhead zaobserwowali, że komórki *in vitro* mogą podzielić się określoną liczbę razy, a maksymalna liczba podziałów komórkowych dla ludzkich fibroblastów wynosi 50 i jest to tzw. limit Hayflicka [23,24]. Komórki mogą ulegać również starzeniu niereplikacyjnemu, na skutek m.in. upośledzenia zdolności naprawy DNA, mutacji somatycznych, uszkodzeń wywołanych przez wolne rodniki, nagromadzenia zmienionych białek, upośledzonej czynności układu immunologicznego [5,22,57].

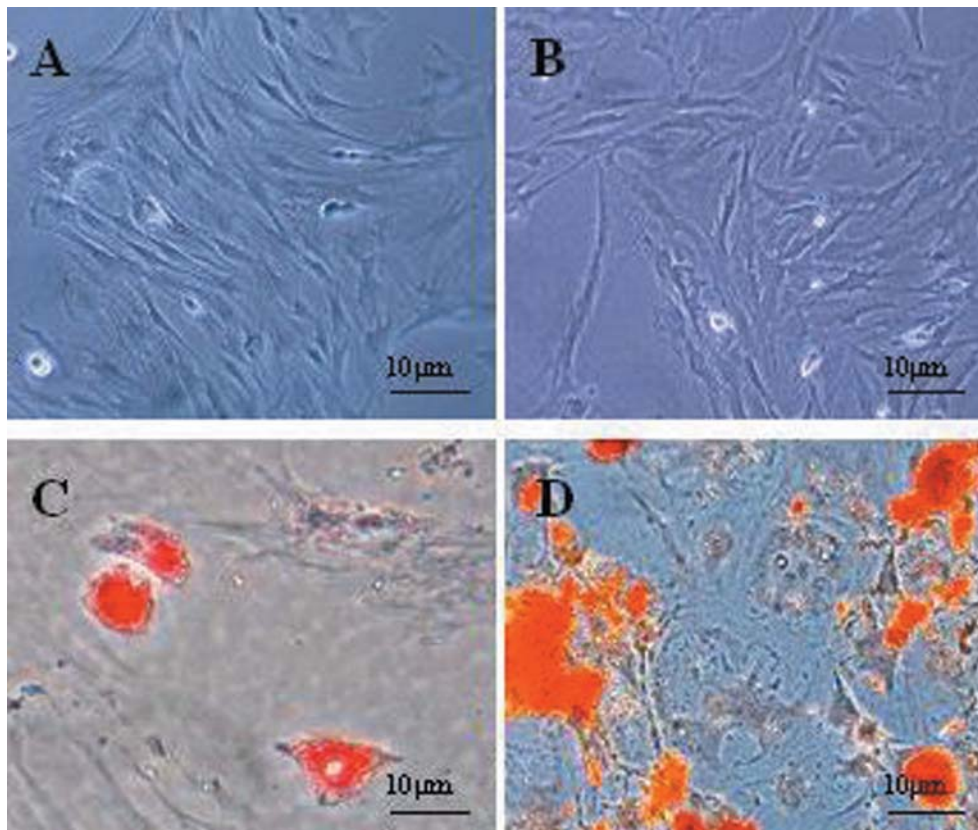
Poznanie zależności pomiędzy starzeniem się organizmu a właściwościami komórek mezenchymalnych jest niezmiernie ważne przed wprowadzeniem autologicznych przeszczepów z wykorzystaniem MSC w terapii chorób dotykających starszych pacjentów. Jak wcześniej wspomniano, odsetek komórek mezenchymalnych w szpiku kostnym jest niewielki, dlatego w celu uzyskania odpowiedniej liczby komórek do przeszczepienia konieczna jest ich ekspansja *in vitro*. Należy więc określić, czy i w jaki sposób zmieniają się właściwości samych komórek mezenchymalnych w trakcie prowadzenia hodowli *in vitro*, co może pogarszać efektywność terapii z wykorzystaniem MSC. Dotychczasowe badania skupiały się na określaniu zależności pomiędzy wiekiem organizmu i zmianami w otaczającym środowisku a właściwościami i funkcjonowaniem MSC. Badano także starzenie się samych komórek mezenchymalnych *in vitro*, przez oznaczanie ich właściwości w hodowlach krótko- i długoterminowych [50]. Niestety przedstawiane wyniki doświadczeń są często niejednoznaczne, a niekiedy nawet sprzeczne. Niespójności wynikać mogą m.in. z różnorodnych metod izolacji i hodowli komórek mezenchymalnych, wyboru gatunku

organizmów do badań, źródeł pozyskiwania komórek mezenchymalnych. Poniżej omówione zostaną poszczególne właściwości MSC w odniesieniu do wieku dawców komórek mezenchymalnych oraz „wieku” samych komórek w hodowli *in vitro*.

1. Morfologia i wielkość komórek oraz zdolność tworzenia kolonii

Mezenchymalne komórki macierzyste opisywane są jako komórki o wrzecionowatym, wydłużonym kształcie [7,44]. Okazuje się jednak, że ich morfologia i wielkość zależą zarówno od wieku organizmu (ryc. 1A, B), jak i czasu prowadzenia hodowli komórek *in vitro*.

W badaniach wykonanych na ludzkich komórkach, MSC izolowane ze szpiku pobranego od młodych organizmów (m-MSC – mezenchymalne komórki macierzyste



RYCINA 1. Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego izolowane od szczura: A – mezenchymalne komórki macierzyste izolowane od młodego szczura; B – mezenchymalne komórki macierzyste izolowane od starego szczura; C – szczurze MSC po różnicowaniu w komórki tłuszczowe wybarwione czerwienią olejową O; D – szczurze MSC po różnicowaniu w komórki kostne wybarwione Alizarin Red

FIGURE 1. Bone marrow derived mesenchymal stem cells from rats: A – mesenchymal stem cells from adult-young rat; B – mesenchymal stem cells from old rat; C – oil red O staining – fat accumulation after adipogenic differentiation in MSC; D – Alizarin Red staining after osteogenic differentiation of MSC

uzyskane od młodego organizmu) charakteryzują się wrzecionowatym kształtem, który zanika wraz z czasem trwania hodowli. W komórkach izolowanych od starych organizmów (s-MSC – mezenchymalne komórki macierzyste uzyskane od starego organizmu) nie obserwuje się wrzecionowatego kształtu *in vitro* nawet na wczesnym etapie hodowli [2]. Poza tym s-MSC są większe niż m-MSC, co wykazano przez cytometryczny pomiar wielkości komórek [54].

W badaniach *in vitro* stwierdzono, że ludzkie MSC w starszych hodowlach trwających kilka tygodni są większe i bardziej płaskie w porównaniu z komórkami z początkowego stadium hodowli [52,59]. Wraz z czasem prowadzenia hodowli komórki mezenchymalne zmieniają nie tylko swoją wielkość, ale i kształt. Dodatkowo uznaje się, że duże kolonie tworzone są przez komórki wrzecionowate, a małe kolonie przez duże i płaskie komórki, które obserwuje się w starszych hodowlach *in vitro* [37]. W niektórych pracach wykazano, że zdolność tworzenia kolonii przez MSC obniża się wraz z wiekiem organizmu, od którego izolowane są komórki (tab. 1), co interpretowano jako wynik zmniejszania się ogólnej liczby komórek mezenchymalnych w szpiku kostnym [10,54]. Z drugiej strony istnieją badania, w których nie zaobserwowano różnic pomiędzy wiekiem dawcy komórek a zdolnością do tworzenia kolonii *in vitro* [32]. Należy podkreślić, że ocena morfologii jest trudna w przypadku MSC, gdyż komórki te charakteryzują się różnorodnością nie tylko międzygatunkową, ale także międzyosobniczą.

2. Zdolność do podziałów

Jedną z oznak starzenia się komórek *in vitro* jest malejąca zdolność do podziałów. Baxter i wsp. [2] postulują, że liczba podwojeń populacji – PD (ang. *Population Doublings*), w przypadku komórek mezenchymalnych hodowanych *in vitro* wynosi maksymalnie 30–40. Stenderup i wsp. [52] wykazali, że początkowa faza wzrostu komórek pochodzących od młodych i starych osób jest podobna, natomiast po 60. dniach hodowli liczba podziałów w s-MSC znacząco spada. Limit Hayflicka w m-MSC osiągany jest przy ok. 41. cyklu podwojenia populacji, natomiast w s-MSC już przy 24. cyklu. Dodatkowo, średni wskaźnik liczby podwojeń populacji znacząco spada wraz z wiekiem, ponieważ w m-MSC wynosi on $0,09 \pm 0,02$ PD/dobę, natomiast w s-MSC jest obniżony i wynosi $0,05 \pm 0,02$ PD/dobę.

TABELA 1. Wybrane właściwości MSC w zależności do wieku dawcy komórek
TABLE 1. Characteristic of MSC during aging

Wybrane właściwości	Starzenie	Gatunek	Autor
Zdolność do podziałów	Spadek wraz z wiekiem	Człowiek	Stenderup i wsp. [52]
		Człowiek	Stolzing i wsp. [54]
Zdolność do tworzenia kolonii	Spadek wraz z wiekiem	Człowiek	D'Ippolito i wsp. [10]
		Człowiek	Stolzing i wsp. [54]
	Brak zmian	Człowiek	Justesen i wsp. [32]
Zdolność do różnicowania w osteoblasty	Spadek wraz z wiekiem	Mysz	Moerman i wsp. [40]
		Człowiek	Roura i wsp. [48]
		Człowiek	Stolzing i wsp. [54]
		Człowiek	Zhou i wsp. [64]
	Brak zmian	Człowiek	Stenderup i wsp. 2003

Badania dotyczące zależności pomiędzy wiekiem dawcy komórek, a ich zachowaniem w hodowli *in vitro* przeprowadzili także Stolzing i wsp. [54]. Badali oni kinetykę wzrostu komórek od młodych (7–18 r.ż.), dorosłych (19–40 r.ż.) i osób po 40 r.ż. Zauważono, że w początkowej fazie hodowli komórki dzieliły się w podobnym tempie. Dopiero po 5 tygodniach prowadzenia hodowli komórki pochodzące od osób po 40 r.ż. zaczęły wykazywać mniejszą dynamikę proliferacji w stosunku do komórek od młodych osobników, po czym krzywa wzrostu osiągnęła *plateau*, a komórki nie dzieliły się dalej. Inaczej wyglądała krzywa wzrostu komórek uzyskanych od młodych i dorosłych osób. Komórki te wykazywały zdolność do podziałów przez cały czas prowadzenia hodowli, czyli okres 16 tygodni. Powyższe badania sugerują zatem, że wiek dawcy komórek mezenchymalnych może mieć wpływ na zdolność do podziałów i podwajania populacji komórek *in vitro* (tab.1).

3. Zdolność do różnicowania

Uważa się, że mezenchymalne komórki macierzyste w szpiku dorosłych organizmów reprezentują złożoną populację komórek multi-, bi-, unipotencjalnych na różnych etapach różnicowania [21,41,44]. Jak już wspomniano, MSC mogą różnicować się w tkanki różnego pochodzenia, ale większość badań naukowych skupia się wokół tworzenia komórek kostnych (ryc.1D), tłuszczowych (ryc.1C) oraz chrzęstnych [44].

Istnieją doniesienia, w których wykazano, że potencjał komórek mezenchymalnych do różnicowania w tkankę kostną i tłuszczową ulega zmianie wraz z wiekiem [50,53], ale nie wszyscy badacze zgadzają się z takim poglądem [52] (tab.1). Zaobserwowano, że komórki mezenchymalne uzyskane od starych myszy (26-miesięcznych) tworzą relatywnie mniejszą liczbę osteoblastów, a większą adipocytów, natomiast u tych pobranych od dorosłych myszy (8-miesięcznych) powstaje więcej kolonii osteoblastów niż adipocytów. Prawdopodobnie starzenie wpływa na zmianę ekspresji białek ścieżki sygnałowej TGF- β /BMP (ang. *Transforming Growth Factor- β /Bone Morphogenic Protein*) w komórkach mezenchymalnych. TGF- β stymuluje proliferację osteoblastów, a hamuje różnicowanie w adipocyty, natomiast BMP-4 pobudza komórki macierzyste do tworzenia adipocytów. Zaobserwowany spadek aktywności TGF- β w s-MSC oraz zwiększenie ekspresji BMP-4 podczas starzenia może prowadzić do obniżenia zdolności różnicowania w osteoblasty, na rzecz różnicowania w adipocyty. Dlatego też niektórzy badacze sugerują, że z wiekiem komórki mezenchymalne są bardziej podatne na sygnały indukujące adipogenezę niż osteogenezę [40].

Stolzing i wsp. [54] zaobserwowali, że MSC uzyskane od osób powyżej 40 r.ż. i poddane różnicowaniu w kierunku komórek kostnych wykazują obniżoną aktywność fosfatazy alkalicznej – ALP (ang. *Alkaline phosphatase*) w porównaniu z komórkami od osób młodych (do 19 r.ż.) i dorosłych (19–40 r.ż.). Fosfataza alkaliczna jest enzymem produkowanym przez aktywne osteoblasty, dlatego jej obniżona aktywność wskazuje na mniejszą zdolność tworzenia osteoblastów przez komórki mezenchymalne. Podobne wyniki uzyskali Zhou i wsp. [64], którzy zauważyli, że komórki uzyskane od osób powyżej 55 r.ż. wykazują obniżoną aktywność fosfatazy

alkalicznej w porównaniu z komórkami uzyskanymi od osób młodszych (< 50 r.ż.). Oprócz tego, ekspresja genów charakterystycznych dla osteoblastów (Cbfa/Run2, Osterix, fosfataza alkaliczna, osteokalcyna) była niższa w s-MSC niż w m-MSC. Na tej podstawie autorzy stwierdzili, że s-MSC charakteryzują się mniejszą zdolnością do różnicowania w komórki kostne niż m-MSC [64]. W innym doświadczeniu przeprowadzonym przez Roura i wsp. [48] komórki uzyskane od ludzi młodych ($24 \pm 6,4$ r.ż.) i starszych ($77 \pm 8,4$ r.ż.) poddano różnicowaniu, a następnie wybarwiono barwnikiem von Kossa, w celu wykazania obecności wapnia w komórkach. Okazało się, że 55% m-MSC różnicowało się w osteoblasty (obecne były depozyty wapnia), podczas gdy spośród s-MSC jedynie 12% [48]. Należy również wspomnieć, że w niektórych badaniach nie odnotowano zależności pomiędzy wiekiem dawcy komórek a zdolnością do różnicowania w osteoblasty. Stenderup i wsp. [52] badali komórki uzyskane od młodych, dorosłych osób (18–29 r.ż.) oraz od osób starszych (66–81 r.ż.). Komórki poddano różnicowaniu osteogennemu i wykazano, że ilość zmineralizowanej macierzy w komórkach od młodych i starszych osób nie różni się istotnie [52]. Badacze ci oceniali także zdolność komórek mezenchymalnych do formowania kości *in vivo*. W tym celu wyhodowane *in vitro* m-MSC oraz s-MSC umieszczano na odpowiednim nośniku (hydroksyapatyt/fosforan trójwapniowy), przeszczepiano do immunoniekompetentnych myszy i analizowano po 8 tygodniach. Nie odnotowano jednak zależności pomiędzy wiekiem dawcy komórek, a zdolnością do formowania kości *in vivo*. Oprócz tego wykazano, że komórki z późnych pasaży (po szóstym pasażu), zarówno od młodych, jak i starszych osób, słabiej tworzą kość. Wysłunięto zatem wniosek, że to „wiek” komórek hodowanych *in vitro*, a nie wiek dawcy wpływa na potencjał tworzenia kości *in vivo*.

W przypadku różnicowania MSC w komórki tłuszczowe Stolzing i wsp. [54] nie odnotowali zależności pomiędzy wiekiem dawcy komórek mezenchymalnych a liczbą i rozmiarem tworzonych przez nie adipocytów.

W kilku badaniach stwierdzono, że potencjał różnicowania zarówno w komórki kostne, jak i tłuszczowe spada na etapie późnych pasaży. Zaobserwowano, że MSC z późnych pasaży w większym stopniu tracą potencjał różnicowania w komórki tłuszczowe, a w mniejszym w komórki kostne [3,52,59]. Z tego względu w terapii genowej czy komórkowej należałoby wykorzystywać głównie komórki pasażowane tylko kilka razy [3].

4. Długość telomerów i aktywność telomerazy

Telomery są wyspecjalizowanymi sekwencjami DNA, które tworzą końce liniowej cząsteczki DNA chromosomu eukariotycznego. Telomer zawiera setki kopii krótkiej sekwencji powtórzonej (dla chromosomów człowieka jest to sekwencja 5'-TTAGGG-3'), które są syntetyzowane przez enzym zwany telomerazą. Telomerowy DNA tworzy strukturę drugorzędową, dzięki czemu końce chromosomów są zabezpieczone przed degradacją. Synteza telomerów przeciwdziała stopniowemu skracaniu się chromosomu. Jednak w większości ludzkich komórek somatycznych telomeraza jest nieaktywna, co prowadzi do stopniowego skracania się chromosomów [58]. Uważa

się, że kiedy telomery osiągną określoną długość, wówczas komórki (np. fibroblasty) przestają się dzielić i rozpoczynają proces starzenia [2]. Należy jednak zauważyć, że w komórkach somatycznych większości gryzoni (np. myszy i szczurów) znajduje się aktywna telomeraza, dlatego u tych organizmów nie dochodzi do skracania telomerów i starzenia replikacyjnego [19].

Aktywność telomerazy w komórkach mezenchymalnych jest nadal kwestią sporną. Istnieją badania, w których wykazano taką aktywność [49], oraz takie, podczas których nie wykryto aktywności tego enzymu [20,65] w komórkach uzyskanych zarówno od młodych, jak i starszych osób nawet na wczesnych etapach hodowli *in vitro* [52]. Takie rozbieżności mogą być wynikiem stosowania metod detekcji o różnej czułości. Być może komórki mezenchymalne, w których aktywna jest telomeraza, stanowią bardzo małą subpopulację komórek w obrębie wszystkich MSC [65]. W badaniach przeprowadzonych na komórkach uzyskanych ze szpiku kostnego myszy pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego telomerazę zaobserwowano, że komórki mezenchymalne nie różnicują się w komórki tłuszczowe i chrzęstne, podczas gdy MSC, w których aktywny był gen kodujący telomerazę, wykazują taką zdolność. Na tej podstawie stwierdzono, że obecność telomerazy jest konieczna do różnicowania się mysich komórek mezenchymalnych *in vitro* [37].

Podjęmowano próby, które miały na celu zwiększenie zdolności proliferacyjnych komórek mezenchymalnych oraz wzmocnienie ich potencjału różnicowania. Dlatego też ludzkie komórki mezenchymalne transdukowano wektorem retrowirusowym, zawierającym gen podjednostki katalitycznej ludzkiej telomerazy (hTERT). W tak traktowanych komórkach telomeraza była aktywna, a średnia długość telomerów była wyższa w porównaniu z telomerami komórek kontrolnych. W konsekwencji w komórkach transdukowanych liczba podwojeń populacji osiągała 260, podczas gdy w komórkach kontrolnych jedynie 26, czyli 10 razy mniej. Dodatkowo komórki transdukowane zachowywały potencjał osteogeny, a komórki zróżnicowane miały prawidłowy kariotyp i nie wykazano w nich procesów nowotworzenia [51].

Wykazano, że długość telomerów w mezenchymalnych komórkach macierzystych izolowanych od dzieci (< 10 r.ż.) jest większa niż w komórkach pozyskanych od osób starszych (57–75 r.ż.). Baxter i wsp. [2] oszacowali, że średnia utrata długości telomerów *in vivo* wynosi 17 bp/rok (bp – ang. *base pair* – para zasad, czyli komplementarne zasady azotowe nukleotydów w kwasach nukleinowych). Natomiast w hodowli *in vitro* telomery skracają się po każdym podziale komórki. Zahamowanie podziałów komórek mezenchymalnych zaobserwowali, gdy telomery uległy skróceniu do ok. 10 kbp (kbp – z ang. *kilo base pairs* – tysiąc par zasad azotowych). Inni badacze donoszą, że średnia długość telomerów w komórkach pasażowanych dwa razy wynosi 10,4 kbp, podczas gdy w komórkach pasażowanych wielokrotnie (po szóstym pasażu) jedynie 7,1 kbp. Na tej podstawie stwierdzono, że po każdym podwojeniu populacji telomery ulegają skróceniu aż o 100 bp [52]. Według innych autorów telomery ulegają skróceniu o 100 bp, ale po każdym dwóch pasażach [3]. Różnice w wynikach prezentowanych przez Bonab i wsp. [3] oraz Stenderup i wsp.

[52] mogą być spowodowane różnym czasem trwania hodowli *in vitro* (Bonab i wsp. 120 dni, a Stenderup i wsp. >500 dni).

5. Apoptoza i regulacja cyklu komórkowego

Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki, jest zjawiskiem fizjologicznym, istotnym dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Proces ten odgrywa ważną rolę w rozwoju zarodkowym, starzeniu się organizmu oraz zjawiskach odpornościowych. Dzięki apoptozie możliwa jest stopniowa dezintegracja komórki bez uwalniania z jej wnętrza enzymów i substancji cytotoksycznych, przez co w sąsiadujących tkankach nie powstaje proces zapalny.

Spośród genów zaangażowanych w regulację procesu apoptozy wymienić można geny aktywujące, np. *TP53*, *BAX*, oraz hamujące, np. *BCL-2* proces samobójczej śmierci komórki [14]. Należy podkreślić, że rodzina genów *BCL-2* koduje białka zarówno hamujące apoptozę (*Bcl-2*, *Bcl-xL*), jak i ją inicjujące (*Bax*, *Bcl-xS*, *Bak*, *Bik*, *Bim*, *Bad*, *Bid*). Produktem ekspresji genu *TP53* jest białko p53, będące czynnikiem transkrypcyjnym, aktywującym geny proapoptotyczne, np. *Bax* [18]. Informacja o uszkodzeniu DNA przekazywana jest do białka p53, które wywołuje krótkotrwale zahamowanie cyklu komórkowego i naprawę DNA, albo całkowite zatrzymanie podziałów komórkowych, co prowadzi do starzenia komórkowego, albo też do apoptozy [47]. Jednym z białek, którego transkrypcja jest indukowana przez białko p53, jest białko p21. Jest to inhibitor kinaz zależnych od cyklin (CDK) i przez to jest negatywnym regulatorem cyklu komórkowego.

Zaobserwowano, że w komórkach mezenchymalnych uzyskanych od osób starszych ekspresja białek p53, p21 oraz *Bax* jest znacząco większa niż w komórkach od osób młodych [54, 64]. Zwiększona aktywność genów kodujących p53/p21 może wpływać na obniżenie zdolności do proliferacji w s-MSC, ponieważ po uszkodzeniu DNA, p53-zależny wzrost ekspresji białka p21 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego. Natomiast zwiększona aktywność genów kodujących p53/*Bax* w s-MSC może mieć związek z nasileniem apoptozy w komórkach od starszych osób [64]. Wiadomo, że białko p53 aktywuje proces apoptozy przez wzrost ekspresji białka *Bax*, które powoduje wypływ cytochromu c z mitochondriów. Cytochrom c zaś aktywuje kaspazę 9, która uruchamia kaskadę kaspaz, prowadzącą do apoptozy [56]. Powyższe badania sugerują, że proces apoptozy w MSC wzrasta się wraz z wiekiem organizmu.

6. Stres oksydacyjny

Nadmierna produkcja i aktywność wolnych rodników, reaktywnych form tlenu – ROS (ang. *Reactive Oxygen Species*) oraz niedostateczna aktywność antyoksydantów prowadzi do powstania tzw. „stresu oksydacyjnego”. Wolne rodniki oraz reaktywne formy tlenu mogą być generowane przez czynniki zewnętrzne, np. promieniowanie UV, ale głównym ich źródłem są reakcje wewnątrzkomórkowe, takie jak łańcuch oddechowy, metabolizm nukleotydów purynowych, czy reakcje z udziałem oksydoreduktaz. Produktem tych reakcji jest najczęściej anionorodnik ponadtlenkowy

lub nadtlenek wodoru. Należy podkreślić, że w warunkach homeostazy ROS pełnią funkcje mediatorów i regulatorów metabolizmu, np. regulują ekspresję genów, aktywują białka kierujące podziałami komórkowymi, wpływają na przekazywanie sygnałów do komórek, indukują różnicowanie komórek, zwiększają przepuszczalność ścian naczyń włosowatych, działają rozszerzająco bądź kurcząco na ścianę naczyń krwionośnych. Oprócz tego biorą udział w procesach obronnych organizmu [39,35].

Skutki stresu oksydacyjnego są niekorzystne dla organizmu, ponieważ dochodzi do pęknięcia nici DNA, powstawania mutacji prowadzących do zmian nowotworowych, uszkodzenia chromosomów, a także utleniania białek, utleniania lipidów, które tracą swoją funkcję. Istnieją trzy podstawowe linie obrony przed niekorzystnym działaniem ROS. Pierwsza z nich opiera się na działaniu enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa – SOD (ang. *Superoxide Dismutase*), katalaza, peroksydaza glutationowa, których zadaniem jest zapobieganie powstawaniu rodnika wodorotlenowego. Kolejną linię obrony stanowią antyoksydanty małoszczeczkowe, takie jak np. witamina E i C, konkurujące ze związkami chemicznymi, które mogłyby zostać utlenione przez ROS. W wyniku utleniania czynnika antyoksydacyjnego reakcja wolnorodnikowa zostaje przerwana. Ostatnią linię obrony stanowią enzymy antyoksydacyjne o aktywności oksydoreduktaz. Dzięki tym enzymom dochodzi do naprawy uszkodzeń DNA powstałych w wyniku działania ROS przez redukcję produktów peroksydacji lipidów lub mostków disulfidowych powstałych w wyniku peroksydacji DNA [39,35].

Reaktywne formy tlenu i stres oksydacyjny to hasła, które często towarzyszą tematyce starzenia się. Obecnie dysponujemy niewielką wiedzą na temat oporności mezenchymalnych komórek macierzystych na stres oksydacyjny. Badania *in vitro* wskazują na znacznie wyższy poziom ROS generowany przez MSC uzyskane od osób powyżej 40 r.ż. niż przez komórki osób młodych (7–18 r.ż.). W hodowlach komórek osób starszych zwiększa się również ilość utlenionych białek [54]. Tlenek azotu promuje zdolność MSC do różnicowania zarówno w osteoblasty, jak i adipocyty. Poziom NO w komórkach mezenchymalnych wzrasta progresywnie wraz z wiekiem i w s-MSC jest 6 razy wyższy niż w m-MSC. Ponadto, s-MSC charakteryzuje obniżona o ok. 60% aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w porównaniu z m-MSC, przez co maleje ich zdolność do inaktywacji reaktywnych form tlenu i przyczynia się to do powstawania stresu oksydacyjnego [54].

Niektórzy badacze prezentują pogląd, że podczas hodowli *in vitro* produkty stresu oksydacyjnego są gromadzone w komórkach mezenchymalnych [15] oraz że mogą one indukować apoptozę [6]. Jednak obecny stan wiedzy na temat stopnia nasilenia tych procesów w komórkach młodych i starych organizmów jest niewielki. Stolzing i wsp. [54] badali wpływ stresu oksydacyjnego na MSC uzyskane od osób w różnym wieku. Uzyskane przez nich komórki traktowane były 1 mM H_2O_2 , co doprowadziło do 10-krotnego wzrostu liczby komórek apoptotycznych wśród s-MSC w porównaniu z m-MSC. Dodatkowo, komórki młodych i starych osób poddano różnicowaniu w kierunku komórek kostnych, a następnie potraktowano 1 mM nadtlakiem wodoru. Okazało się, że aktywność fosfatazy alkalicznej po traktowaniu H_2O_2 obniżyła się

2-krotnie w zróżnicowanych m-MSC, natomiast 3-krotnie w zróżnicowanych s-MSC w porównaniu z kontrolą. Na podstawie tych doświadczeń można stwierdzić, że stres oksydacyjny nie tylko indukuje apoptozę, ale także hamuje różnicowanie zwłaszcza w komórkach mezenchymalnych uzyskanych od starych organizmów [54].

7. Odporność na niekorzystne warunki środowiska zewnętrznego

Wstrzyknięcie komórek do organizmu biorcy wiąże się z działaniem różnego rodzaju niekorzystnych bodźców, zwłaszcza w przypadku wprowadzenia komórek bezpośrednio do tkanki docelowej. Komórki utrzymywane w stabilnych warunkach hodowli *in vitro* narażone są na gwałtowną zmianę otoczenia. Często środowisko, w które wstrzykiwane są komórki jest niedotlenione (np. blizna pozawałowa, blizny po urazach) lub wykazuje wysoki poziom wolnych rodników tlenowych (tkanka degenerująca). Dodatkowo, w odpowiedzi na przeszczep pojawia się mniejszy lub większy proces zapalny. A zatem, przeszczepiane komórki powinny charakteryzować się możliwie wysoką odpornością na niekorzystne bodźce. Istnieją naturalne mechanizmy chroniące komórki w takich sytuacjach. Przykładem może być wytwarzanie białek szoku cieplnego – HSP (ang. *Heat Shock Protein*). Ekspresja białek HSP rośnie w komórce, gdy jest ona narażona na różne czynniki potencjalnie uszkadzające, np. wzrost lub spadek temperatury, zwiększenie poziomu stresu oksydacyjnego, niedotlenienie, obecność toksyn. Białka HSP są białkami opiekuńczymi (chaperonowymi), co znaczy, że biorą udział w wytworzeniu i utrzymaniu przestrzennej struktury innych białek. Dzięki temu pomagają komórce przetrwać niekorzystny dla niej okres. Dodatkowo, większość białek HSP uważa się za czynniki antyapoptotyczne (np. HSP27, HSP70, HSP90), choć inne, jak HSP60, mogą również wykazywać działanie proapoptotyczne [1]. Interesujące jest, czy mechanizmy uruchamiane podczas działania potencjalnie cytotoksycznych czynników są tak samo sprawne w komórkach pochodzących od organizmów w różnym wieku. Stolzing i wsp. [55] porównywali odpowiedź komórek MSC izolowanych od młodych i starych szczurów na hodowlę w obniżonej temperaturze (32°C). Wykazali, że ekspresja białek szoku cieplnego w obu typach komórek różni się zarówno w temperaturze 37°C (różnice istotne dla HSP60, HSP70 i HSP90), jak i po stymulacji obniżoną temperaturą (różnice istotne dla HSP27, HSP70 i HSP90), przy czym wyższa ekspresja białek HSP o działaniu antyapoptogennym była notowana w komórkach od zwierząt młodych. Poziom stężenia wolnych rodników tlenowych nie różnił się w obu typach komórek hodowanych w temp. 37°C, jednak w komórkach hodowanych w obniżonej temperaturze poziom ROS w s-MSC wzrastał, a w m-MSC obniżył się istotnie. Dodatkowo, podczas hodowli w 32°C poziom enzymatycznych antyoksydantów (dysmutazy ponadtlenkowej – SOD i peroksydazy glutationowej) był znacząco wyższy w m-MSC niż w s-MSC.

Testowano także odpowiedź m-MSC i s-MSC w warunkach *in vitro* na niedotlenienie i ponowne utlenowanie [29]. Komórki były na 6 godzin pozbawiane tlenu, a następnie przez kolejne 24 godziny hodowane w warunkach standardowych. Co ciekawe, oprócz porównania komórek pochodzących od młodych i starych

zwierząt badano też zachowanie komórek hodowanych w kokulturze (m-s-MSC). Okazało się, że niekorzystne warunki wywołały apoptozę w znacznie większym zakresie w komórkach s-MSC i m-s-MSC w stosunku do komórek izolowanych od zwierząt młodych. Było to odpowiednio 27, 18 i 6% komórek, które uległy apoptozie. Poziom apoptozy w komórkach pochodzących od młodych i starych szczurów utrzymywanych w warunkach niedotlenienia *in vitro* badali też Wang i wsp. [60]. Uzyskane przez nich wyniki wskazują również, że komórki izolowane od starych zwierząt są istotnie bardziej wrażliwe na środowisko beztlenowe, jednak różnice między grupami nie były aż tak znaczące (3% versus 5% komórek ulegających apoptozie po 24 godzinach w środowisku pozbawionym tlenu). Jiang i wsp. [29] dodatkowo wykryli, że ekspresja ufosforylowanej formy kinazy Akt, która aktywuje szlaki sygnałowe hamujące apoptozę i promujące proliferację komórki, była wyższa w m-MSC niż w s-MSC, zarówno podczas niedotlenienia jak i po ponownym utlenowaniu. Podobnie, inhibitory kinaz zależnych od cyklin – p21 i p27, które wywołują zwolnienie lub zatrzymanie cyklu komórkowego i tym samym pozwalają przetrwać komórce w warunkach stresu oksydacyjnego, wykazywały znacząco wyższą ekspresję w m-MSC niż w s-MSC. Ciekawe były również obserwacje dotyczące ekspresji czynników promujących angiogenezę, takich jak: czynnik wzrostu śródbłonna – VEGF, czynnik wzrostu fibroblastów 2 – FGF-2 (ang. *Fibroblast Growth Factor*), czy też oksygenaza hemowa 1 – HO-1 (ang. *Heme Oxygenase*). W warunkach normalnych poziom ekspresji mRNA kodującego te czynniki nie różnił się statystycznie w populacjach s-MSC i m-MSC. W warunkach niedotlenienia i ponownego utlenowania ekspresja czynników proangiogennych wzrastała w obu typach komórek, co jest naturalną reakcją obronną. Reakcja ta jednak była znacząco większa w m-MSC niż w s-MSC. Co ciekawe, najmniejszy wzrost ekspresji VEGF, bFGF i HO-1 w opisanych warunkach zaobserwowano w komórkach hodowanych w kokulturze m-s-MSC [29].

A zatem, badania te wskazują, że w mezenchymalnych komórkach macierzystych pochodzących od starszych organizmów mechanizmy adaptacji do niekorzystnych warunków środowiskowych są upośledzone w porównaniu z komórkami organizmów młodych. Może mieć to istotne znaczenie dla efektywności przeszczepów autologicznych przeprowadzanych u starszych osób.

8. Zachowanie się komórek po przeszczepieniu

Wyniki przedstawionych badań *in vitro* budzą podejrzenie, że komórki pochodzące od starszych dawców mogą wykazywać mniejszą przeżywalność po przeszczepie w porównaniu z komórkami pobieranymi od dawców młodych. Wstępne badania przeprowadzone na zwierzętach potwierdzają tę tezę. Porównanie efektu wywołanego przez przeszczep komórek uzyskanych od dawców w różnym wieku przeprowadzono na modelu zawału mięśnia sercowego u szczurów [31,60]. Wykazano, że 4 tygodnie po wstrzyknięciu zarówno komórki m-MSC, jak i s-MSC przeżywały w miejscu podania. Co ważne, w obu grupach parametry anatomiczne i funkcjonalne serca, takie jak: grubość ściany lewej komory, objętość wyrzutowa lewej komory '

LVEF (ang *left ventricular ejection fraction*), frakcja skracania lewej komory – LVFS (ang *left ventricular fractional shortening*) oceniane na podstawie badania echokardiograficznego były istotnie wyższe w stosunku do kontroli (wstrzyknięcie pożywki hodowlanej bez surowicy). Podobnie, efekt angiogeny (gęstość naczyń, ekspresja VEGF w mięśniu sercowym) wywołany przez transplantację komórek MSC był w obu grupach wiekowych znacząco wyższy niż w grupie kontrolnej. Udział komórek apoptotycznych w obszarze pozawałowym również zmniejszył się istotnie w obu grupach badanych w porównaniu z kontrolą. A zatem, zarówno komórki pochodzące od młodych, jak i od starych dawców mogą wywołać pozytywne skutki kliniczne. Jednakże, w przypadku oceny LVEF i LVFS komórki izolowane od młodych dawców wywoływały efekt bardziej korzystny w stopniu statystycznie znaczącym niż komórki od dawców starszych. Dodatkowo, Jiang i wsp. [31] zaobserwowali, że 4 tygodnie po wstrzyknięciu do mięśnia sercowego komórki m-MSC tworzyły struktury wydłużone, zbliżone wyglądem do kardiomiocytów, natomiast komórki s-MSC pozostawały w większości owalne, co może wskazywać na mniejszą zdolność do różnicowania się w tkankę mięśnia sercowego [31]. Potwierdzało to badanie poziomu ekspresji α -aktyny, który był wyższy w mięśniu sercowym zwierząt po przeszczepie m-MSC. Wyniki te wskazują, że komórki pochodzące od młodych organizmów mają większy potencjał regeneracyjny i mogą być bardziej obiecującym materiałem do przeszczepów.

Oprócz badań prowadzonych na modelach zwierzęcych dostępne są też wyniki wstępnych prób klinicznych u ludzi. Wiele badań dotyczących wykorzystania komórek MSC odnosi się do prób leczenia ludzi po zawale mięśnia sercowego. Większość takich pacjentów to osoby starsze. Jako, że przeszczepy autologiczne są uważane za procedury stosunkowo bezpieczne, są jako pierwsze wprowadzane do kliniki. Wówczas, zachodzi konieczność izolacji i hodowli komórek właśnie od starszych osób. Nieliczne z przeprowadzonych prób wskazują, że transplantacja komórek mezenchymalnych pochodzących od dorosłych i starszych osób korzystnie wpływa na parametry pracy mięśnia sercowego po przebytych zawale [4,8]. Jednak, cytowane badania były wykonywane bądź na małych grupach pacjentów, bądź w zbyt krótkim okresie (3–6 miesięcy).

III. PODSUMOWANIE

MSC stanowią obiecujący materiał do terapii komórkowych w przypadku licznych chorób, ze względu na swój duży potencjał proliferacyjny, zdolność do różnicowania w komórki różnych tkanek, a także możliwość izolacji od dorosłych osobników. Jednak, pomimo licznych badań prowadzonych w ostatnich latach, pozostaje jeszcze wiele pytań, na które nie znamy odpowiedzi. Nadal nie wiemy, jaka jest zdolność MSC do zasiedlania tkanek gospodarza, czy długość przeżycia po przeszczepie.

Wyniki badań wskazują, że komórki pochodzące od starszych dawców mogą wywoływać słabszy efekt terapeutyczny niż komórki od młodych osobników. Istnieje

jednak nadzieja, że nawet przeszczepy komórek pochodzących od starszych dawców mogą powodować skuteczną regenerację tkanek. Porównanie efektu wywołwanego przez komórki pochodzące od młodych i starszych osób nie jest na razie możliwe. Badania porównawcze wymagałyby wieloletnich i wielośrodkowych prób klinicznych. Doświadczenia na modelach zwierzęcych i badania prowadzone *in vitro* na ludzkich MSC sugerują, że komórki pochodzące od młodych osób mogą mieć większy potencjał regeneracyjny niż MSC izolowane od starszych ludzi. Nie można jednak zapominać, że przeszczep komórek od młodego dawcy będzie się bardzo często wiązać z koniecznością wykonania przeszczepu allogenicznego. Kluczowa będzie zatem ocena, czy korzyści płynące z młodego wieku dawcy przewyższą korzyści płynące z możliwości wykonania przeszczepu autologicznego.

LITERATURA

- [1] ARYA R, MALLIK M, LAKHOTIA SC. Heat shock genes – integrating cell survival and death. *J Biosci* 2007; **32**: 595–610.
- [2] BAXTER MA, WYNN RF, JOWITT SN, WRAITH JE, FAIRBAIRN LJ, BELLANTUONO I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. *Stem Cells* 2004; **22**: 675–682.
- [3] BONAB MM, ALIMOGHADDAM K, TALEBIAN F, GHAFARI SH, GHAVAMZADEHA, NIKBIN B. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biology* 2006; **7**: 14.
- [4] BONAB MM, MOHAMAD-HASSANI MR, ALIMOGHADDAM K, SANATKAR M, GASEMI M, MIR-KHANI H, RADMEHR H, SALEHI M, ESLAMI M, FARHIG-PARSAA, EMAMI-RAZAVI H, ALEMOHAMMAD MG, SOLIMANIAA, GHAVAMZADEHA, NIKBIN B. Autologous *in vitro* expanded mesenchymal stem cell therapy for human old myocardial infarction. *Arch Iran Med* 2007; **10**: 467–473.
- [5] BROWNER WS, KAHN AJ, ZIV E, REINER AP, OSHIMA J, CAWTHON RM, HSUEH WC, CUMMINGS SR. The genetics of human longevity. *Am J Med* 2004; **117**: 851–860.
- [6] BYUN, CH, KOH JM, KIM DK, PARK SI, LEE KU, KIM GS. Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 2005; **20**: 1125–1135.
- [7] CAPLAN AI. Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res* 1991; **9**: 641–650.
- [8] CHEN SL, FANG WW, QIAN J, YE F, LIU YH, SHAN SJ, ZHANG JJ, LIN S, LIAO LM, ZHAO RC. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J* 2004; **117**: 1443–1448.
- [9] CHEN Y, DONG XJ, ZHANG GR, SHAO JZ, XIANG LX. *In vitro* differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem* 2007; **102**: 52–63.
- [10] D'IPPOLITO G, SCHILLER PC, RICORDI C, ROOS BA, HOWARD GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 1999; **14**: 1115–1122.
- [11] DAZZI F, RAMASAMY R, GLENNIE S, JONES SP, ROBERTS I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006; **20**: 161–171.
- [12] DEANS RJ, MOSELEY AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000; **28**: 875–884.
- [13] DEZAWA M, ISHIKAWA H, ITOKAZU Y, YOSHIHARA T, HOSHINO M, TAKEDA S, IDE C, NABESHIMA Y. Bone Marrow Stromal Cells Generate Muscle Cells and Repair Muscle Degeneration. *Science* 2005; **309**: 314–317.
- [14] DWORAKOWSKA D. Rola białka p53, pRb, p21, PCNA, mdm2 oraz cykliny D1 w regulacji cyklu komórkowego oraz apoptozy. *Onkol Pol* 2005; **8**: 4: 223–228.

- [15] EBERT R, ULMER M, ZECK S, MEISSNER-WEIGL J, SCHNEIDER D, STOPPER H, SCHUPP N, KASSEM M, JAKOB F. Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells *in vitro*. *Stem Cells* 2006; **24**: 1226–1235.
- [16] FRIDENSHTEIN AI, CHAILAKHIAN RK, LALYKINA KS. Fibroblast-like cells in cultures of guinea pig hematopoietic tissue. *Tsitologija* 1970; **12**: 1147–1155.
- [17] FRIEDENSTEIN AI. Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Patol* 1982; **44**: 3–11.
- [18] GARNER E, RAJ K. Protective mechanisms of p53-p21-pRb proteins against DNA damage-induced cell death. *Cell Cycle* 2008; **7**: 277–282.
- [19] GORBUNOVA V, SELUANOV A. Coevolution of telomerase activity and body mass in mammals: from mice to beavers. *Mech Ageing Dev* 2009; **130**: 3–9.
- [20] GRAAKJAER R, CHRISTENSEN S, KOLVRAA N, SERAKINCI. Mesenchymal stem cells with high telomerase expression do not actively restore their chromosome arm specific telomere length pattern after exposure to ionizing radiation. *BMC Mol Biol* 2007; **8**: 49.
- [21] GRONTHOS S, ZANNETTINO AC, HAY SJ, SHI S, GRAVES SE, KORTESIDIS A, SIMMONS PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003; **116**: 1827–1835.
- [22] HARMAN D. Aging: phenomena and theories. *Ann NY Acad Sci* 1998; **854**: 1–7.
- [23] HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961; **25**: 585–621.
- [24] HAYFLICK L. Antecedents of cell aging research. *Exp Gerontol* 1989; **24**: 355–369.
- [25] HORWITZ EM, GORDON PL, KOO WK, MARX JC, NEEL MD, MCNALL RY, MUULL, HOFMANN T. Isolated allogenic bone-marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 8932–8937.
- [26] HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, DEANS RJ, KRAUSE DS, KEATING A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; **7**: 393–395.
- [27] IMANISHI Y, SAITO A, KOMODA H, KITAGAWA-SAKAKIDA S, MIYAGAWA S, KONDOHA H, ICHIKAWA H, SAWA Y. Allogenic mesenchymal stem cell transplantation has a therapeutic effect in acute myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **44**: 662–671.
- [28] INOUE S, POPP FC, KOEHL GE, PISO P, SCHLITT HJ, GEISLER EK, DAHLKE MH. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 2006; **81**: 1589–1595.
- [29] JIANG S, KH HAIDER H, AHMED RP, IDRIS NM, SALIMA, ASHRAF M. Transcriptional profiling of young and old mesenchymal stem cells in response to oxygen deprivation and reparability of the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **44**: 582–596.
- [30] JIANG WH, MAAQUN, ZHANG YM, HAN K, LIU Y, ZHANG ZT, WANG TZ, HUANG X, ZHENG XP. Migration of intravenously grafted mesenchymal stem cells to injured heart in rats. *Acta Physiol Sin* 2005; **57**: 566–572.
- [31] 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.
- [32] JUSTESEN J, STENDERUP K, ERIKSEN EF, KASSEM M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcif Tissue Int* 2002; **71**: 36–44.
- [33] KHOO ML, SHEN B, TAO H, MA DD. Long-term serial passage and neuronal differentiation capability of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2008; **17**: 883–896.
- [34] KIM DH, YOO KH, CHOI KS, CHOI J, CHOI SY, YANG SE, YANG YS, IM HJ, KIM KH, JUNG HL, SUNG KW, KOO HH. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine* 2005; **31**: 119–126.
- [35] LASKOWSKA-KMITA T. Wolne rodniki tlenowe i obrona przeciwutleniająca. *Med Wieku Rozw* 1997; **1**: 43–54.
- [36] LE BLANC K, RASMUSSEN I, SUNDBERG B. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; **363**: 1439–1441.

- [37] LIU L, DIGIROLAMO CM, NAVARRO PAAS, BLASCO MA, KEEFE DL. Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2004; **294**: 1–8.
- [38] LORENZI B, PESSINA F, LORENZONI P, URBANI S, VERNILLO R, SGARAGLI G, GERLIR, MAZZANTI B, BOSI A, SACCARDI R, LORENZI M. Treatment of experimental injury of anal sphincters with primary surgical repair and injection of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Dis Colon Rectum* 2008; **51**: 411–420.
- [39] ŁUSZCZEWSKI A, MATYSKA-PIEKARSKA E, TREFLER J, WAWER I, ŁĄCKI J, ŚLIWIŃSKA-STANĆZYK P. Reaktywne formy tlenu – znaczenie w fizjologii i stanach patologii organizmu. *Reumatologia* 2007; **45**, 5: 284–289.
- [40] MOERMAN EJ, TENG K, LIPSCHITZ DA, LECKA-CZERNIK B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR- γ 2 transcription factor and TGF- β /BMP signaling pathways. *Aging Cell* 2004; **3**: 379–389.
- [41] MURAGLIA A, CANCEDDA R, QUARTO R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *J Cell Sci* 2000; **113**: 1161–1166.
- [42] NATSU K, OCHI M, MOCHIZUKI Y. Allogenic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers. *Tissue Eng* 2004; **10**: 1093–1112.
- [43] NAUTA AJ, FIBBE WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; **110**: 3499–3506.
- [44] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**: 143–147.
- [45] PSALTIS PJ, ZANNETTINO A, WORTHLEY SG, GRONTHOS S. Mesenchymal Stromal Cells – potential for cardiovascular repair. *Stem Cells* 2008; **26**: 2201–2210.
- [46] QIAN H, YANG H, XU W, YAN Y, CHEN Q, ZHU W, CAO H, YIN Q, ZHOU H, MAO F, CHEN Y. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells. *Int J Mol Med* 2008; **22**: 325–332.
- [47] RODIER F, CAMPISI J, AND BHAUMIK D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: 7475–7484.
- [48] ROURA S, FARRÉ J, SOLER-BOTIJAC, LLACHA, HOVE-MADSEN L, CAIRÓ JJ, GÓDIA F, CINCAJ, BAYES-GENIS A. Effect of aging on the pluripotential capacity of human CD105+ mesenchymal stem cells. *Eur J Heart Fail* 2006; **8**: 555–563.
- [49] SERUYA M, SHAHA, PEDROTTY D, DU LANEY T, MELGIRI R, MCKEE JA, YOUNG HE, NIKLASON LE. Clonal population of adult stem cells: life span and differentiation potential. *Cell Transplant* 2004; **13**: 93–101.
- [50] SETHE S, SCUTT A, STOLZING A. Aging of Mesenchymal Stem Cells. *Ageing Res Rev* 2006; **5**: 91–116.
- [51] SIMONSEN JL, ROSADA C, SERAKINCIN, JUSTESEN J, STENDERUP K, RATTAN SI, JENSEN TG, KASSEM M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 2002; **20**: 592–596.
- [52] STENDERUP K, JUSTESEN J, CLAUSEN C, KASSEM M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; **33**: 919–926.
- [53] STENDERUP K, JUSTESEN J, ERIKSEN EF, RATTAN SI, KASSEM M. Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2001; **16**: 1120–1129.
- [54] STOLZING A, JONES E, MCGONAGLE D, SCUTT A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 2008; **129**: 163–173.
- [55] STOLZING A, SETHE S, SCUTT AM. Stressed stem cells: Temperature response in aged mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2006; **15**: 478–487.
- [56] SZPRINGER E, LUTNICKI K. Znaczenie apoptozy w wybranych chorobach w dermatologii. *Nowa Medycyna* 2002; **116**: 3–4.
- [57] TROEN BR. The biology of aging. *Mt Sinai J Med* 2003; **70**: 3–22.
- [58] TURNER PC, MCLENNAN AG, BATES AD, WHITE MRH, Krótkie wykłady: Biologia molekularna, wyd. PWN 2000.

- [59] WAGNER W, HORN P, CASTOLDI M, DIEHLMANN A, BORK S, SAFFRICH R, BENES V, BLAKE J, PFISTER S, ECKSTEIN V, HO AD. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 2008; **21**; 3(5): e2213.
- [60] WANG YQ, WANG M, ZHANG P, SONG JJ, LI YP, HOU SH, HUANG CX. Effect of transplanted mesenchymal stem cells from rats of different ages on the improvement of heart function after acute myocardial infarction. *Chin Med J* 2008; **121**: 2290–2298.
- [61] WU XH, LIU CP, XU KF, MAO XD, ZHU J, JIANG JJ, CUI D, ZHANG M, XU Y, LIU C. Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 3342–3349.
- [62] WYNN RF, HART CA, CORRADI-PERINI C, O'NEILL L, EVANS CA, WRAITH JE, FAIRBAIRN LJ, BELLANTUONO I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 2004; **104**: 2643–2645.
- [63] XU W, ZHANG X, QIAN H, ZHU W, SUN X, HU J, ZHOU H, CHEN Y. Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Bone Marrow Differentiate into a Cardiomyocyte Phenotype *In Vitro*. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; **229**: 623–631.
- [64] ZHOU S, GREENBERGER JS, EPPERLY MW, GOFF JP, ADLER C, LEBOFF MS, GLOWACKI J. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell* 2008; **7**: 335–343.
- [65] ZIMMERMANN S, VOSS M, KAISER S, KAPP U, WALLER CF, MARTENS UM. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia* 2003; **17**: 1146–1149.

Mgr inż. Gala Kamila

*Klinika Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych,
Instytut Transplantologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
02-006 Warszawa, ul. Nowogrodzka 59,
e-mail: kamila.gala@wum.edu.pl*