

STRESZCZENIE

Terminem „mezenchymalne komórki macierzyste” (MSC, ang. *mesenchymal stem cells*) określa się multipotencjalne komórki progenitorowe zdolne do różnicowania się co najmniej w kierunku tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej. Komórkom tym przypisywana jest rola wytwarzania tkanki łącznej stanowiącej składową poszczególnych narządów. Tworzą one także podścielisko szpiku dla komórek krwiotwórczych a ostatnio wykryto również, że są one zdolne do modulacji funkcji układu odpornościowego. MSC mogą być pozyskiwane z tkanek pochodzenia płodowego (sznur pępowinowy, krew pępowinowa i łożysko) oraz szeregu lokalizacji w organizmie dorosłym, z których największe praktyczne znaczenie mają szpik kostny i tkanka tłuszczowa. Zdolność do wielokierunkowego różnicowania, własności immunomodulacji i regulacji endogennej naprawy tkanek sprawiły, że obecnie mezenchymalne komórki macierzyste są szeroko wykorzystywane w medycynie regeneracyjnej.

WPROWADZENIE

Odkrycie mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC, ang. *mesenchymal stem cells* lub *mesenchymal stromal cells*) datuje się na późne lata 60-te ubiegłego wieku, kiedy Friedenstein zaobserwował przypominające fibroblasty komórki tworzące kolonie *in vitro* [1,2] i nazwał je CFU-F (ang. *colony forming unit-fibroblastoid*). Ponieważ komórki te pozyskiwano z aspiratów szpiku kostnego, przypuszczano, że są one składową mikrośrodowiska krwiotwórczego czyli komórek tworzących tzw. nisze krwiotwórcze w kości. W odróżnieniu od poznanych i scharakteryzowanych w tym samym czasie krwiotwórczych komórek macierzystych, nie udawało się wykazać cechy „macierzystości” MSC, stąd zaproponowano, aby nazywać je mezenchymalnymi komórkami zrębu (ang. *mesenchymal stromal cell*), co pozwoliło na zachowanie akronimu MSC. Z uwagi na to, że skrótowa nazwa MSC stała się powszechnie przyjętą dla oznaczenia mezenchymalnych komórek macierzystych, a w dodatku straciła bezpośredni związek z pełną nazwą, wywodząc się zarówno od „stem cell” jak „stromal cell”, autorzy niniejszej publikacji proponują jej stosowanie również w polskiej nomenklaturze. Do roku 2005 termin MSC był używany do opisu bliżej nie scharakteryzowanych komórek o morfologii fibroblastów, cechujących się zdolnością do przylegania do dna naczyń hodowlanych (plastyku lub szkła), proliferacji bez dodatku czynników wzrostowych i tworzenia kolonii *in vitro*. Umieszczone w hodowli, komórki te dzieliły się do fazy pełnego pokrycia powierzchni, na której rosły (ang. *monolayer*), zachowując zdolność do proliferacji przez kilkadziesiąt pasaży. Nie istniał jednak model badania zdolności do samoodnowy populacji MSC drogą wielokrotnych pasaży *in vivo*, jak to jest możliwe w przypadku komórek krwiotwórczych. Z tego powodu nie było więc możliwe rozróżnienie dwóch hipotez, czy MSC są komórkami macierzystymi, które w badaniu *in vitro* stopniowo zatracają macierzystość i różnicują się na skutek niedoskonałości modelu badawczego (brak czynników środowiskowych przeciwdziałających utracie cechy macierzystości), czy też rzeczywiście stanowią populację „wczesnych” i mało zróżnicowanych komórek, obdarzonych cechą multipotencjalności, ale już niezdolnych do samoodnowy. Liczne badania na zwierzętach i badania kliniczne polegające na przeszczepianiu MSC na ogół wykazują ograniczony czas, w jakim MSC są obecne w miejscu ich wprowadzenia do tkanek biorcy. Sugerowałyoby to brak cechy macierzystości i klasyfikowałyoby do kategorii komórek ukierunkowanych (progenitorowych), zdolnych do wielokierunkowego różnicowania. Wydaje się jednak, że nawet w przypadku udowodnienia, że MSC nie wykazują cechy samoodnowy, nazwa „mezenchymalna komórka macierzysta” pozostanie nadal jedyną będącą w użyciu w naszym języku.

W latach 2005–2006 podjęto próbę uporządkowania nomenklatury i ujednocznienia definicji MSC. Grupa robocza działająca w ramach ISCT (ang. *International Society for Cellular Therapy*, Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej) opublikowała wspólne stanowisko [3,4] zalecające zastąpienie w nazwie terminu „stem” określeniem „stromal” oraz zaliczanie do kategorii MSC jedynie

Zygmunt Pojda✉

Eugeniusz Machaj

Agata Kurzyk

Sławomir Mazur

Tomasz Dębski

Joanna Gilewicz

Juliusz Wysocki

Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Warszawa Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Warsaw, Poland

✉Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Roentgena 5, 02-781 Warszawa, tel. (22) 546 31 65; e-mail: zpojda@coi.waw.pl

Artykuł otrzymano 12 marca 2013 r.

Artykuł zaakceptowano 25 kwietnia 2013 r.

Słowa kluczowe: mezenchymalne komórki macierzyste, MSC, multipotencjalność, różnicowanie, medycyna regeneracyjna

Podziękowania: Badania prowadzone przez autorów niniejszej pracy przeglądowej są finansowane ze środków projektu POIG 01.01.02-00-022/09-00 „Bio-Implant”.

komórek spełniających łącznie warunki: wzrostu *in vitro* w postaci przylegającej do podłoża, fenotypu charakteryzującego się syntezą antygenów powierzchniowych CD73+, CD90+, CD105+, CD45-, CD34-, CD14- lub CD11b-, CD79a- lub CD19-, oraz zdolności do różnicowania się w tkankę kostną, chrzęstną i tłuszczową.

Komórki spełniające kryteria przynależności do klasy MSC były izolowane z licznych tkanek zarówno pochodzenia płodowego, jak i od dorosłych dawców. Na etapie życia płodowego MSC obecne są w krwi płodu (krwi pępowinowej) [5], galarety Whartona [6,7], okolicy okołonaczyniowej [8,9] i błony podowodniowej [10,11] sznura pępowinowego, łożyska oraz płynu owodniowego [12], biorąc pod uwagę jedynie te lokalizacje, które pozwalają na bezpieczne i etyczne pozyskanie wystarczającej dla zastosowań klinicznych liczby MSC. U osobników dorosłych MSC są obecne w większości narządów. Można je zidentyfikować m. in. w szpiku, tkance tłuszczowej, okostnej, błonie maziówkowej, mięśniach szkieletowych, skórze, kościach, płucach, więzadłach przyzębia i miążdże zębów. Jednak praktyczne pozyskiwanie tych komórek do zastosowań klinicznych ogranicza się do szpiku kostnego [13,14] i tkanki tłuszczowej [15-18]. Do niedawna najczęściej wykorzystywanym źródłem MSC pozyskiwanych od dorosłych był szpik kostny (BM-MSC, ang. *bone marrow-derived mesenchymal stromal cells*). Zaletą pozyskiwania szpiku (metodą aspiracji, ale już nie po ich mobilizacji cytokinami) była stosunkowa prostota i bezpieczeństwo zabiegu, wadą natomiast heterogenność populacji uzyskiwanych komórek, wśród których przeważały komórki macierzyste krwiotworzenia, a w znacznie mniejszym odsetku BM-MSC. Od kilku lat zyskuje na popularności pozyskiwanie MSC z tkanki tłuszczowej. Komórki te, z racji źródła pochodzenia nazywane „*adipose-derived stem cells*” (ADSC, ASC), stanowią populację znacznie bardziej homogenną niż MSC szpiku. W tej populacji (jedyną znaczącą ilościowo domieszkę, w proporcji kilku - kilkunastu procent, stanowią komórki prekursorowe śródbłonna naczyń krwionośnych (EPC, ang. *endothelial progenitor cells*), przydatne zresztą dla celów indukowania lokalnego tworzenia naczyń krwionośnych w lokalizacjach, w których implantowane są MSC. Wykazano, że częstość występowania MSC w szpiku kostnym, mierzona testem CFU-F, wynosząca pomiędzy 1:2500 a 1:100000 [19-21] jest mniejsza niż częstość ADSC w populacji komórek tkanki tłuszczowej, która wynosi 1:50 [22]. Bezpośrednie porównanie liczby CFU-F generowanej przez komórki szpiku lub tkanki tłuszczowej *in vitro* wykazało, że liczba kolonii z komórek tkanki tłuszczowej siedmiokrotnie przewyższa liczbę CFU-F z komórek szpiku [23]. Porównując częstości występowania BM-MSC i ADSC, jak również objętości szpiku lub tkanki tłuszczowej możliwe do pobrania od dawcy, wykazano, że dla celów praktycznych tkanka tłuszczowa jest lepszym źródłem MSC niż szpik kostny [22].

CHARAKTERYSTYKA MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

Mezenchymalne komórki macierzyste wyglądem i sposobem wzrostu *in vitro* przypominają fibroblasty. Są to wrzecionowate komórki rozpoczynające proliferację *in vitro* w postaci kolonii wywodzących się z pojedynczych komórek przylegających do plastyku i stopniowo pokrywających całą dostęp-

ną powierzchnię. Również metoda kontynuacji hodowli jest identyczna, komórki pokrywające 80% powierzchni podłoża są odklejane od niego poprzez inkubację z trypsyną i pasażowane do nowych naczyń hodowlanych. Duże podobieństwo do fibroblastów budziło wątpliwość, czy w istocie MSC nie są tymi właśnie komórkami [24]. Brak markerów powierzchniowych w pełni swoistych dla MSC i brak dowodu na ich „macierzystość” nie sprzyjał wyjaśnieniu tej kwestii.

Wiele uwagi poświęcono poszukiwaniu ewentualnych różnic pomiędzy morfologią MSC, ich potencjałem proliferacyjnym i zdolnością do różnicowania w komórki dojrzałe w zależności od lokalizacji tkankowej. Koncentrowano się przede wszystkim na BM-MSC i ADSC jako populacjach najprzydatniejszych do zastosowań w układzie auto- i allogenicznym w medycynie regeneracyjnej. Porównawcza analiza BM-MSC i ADSC nie wykazała różnic w zakresie morfologii i immunofenotypu tych komórek, różniły się one natomiast dynamiką różnicowania w kierunku osteo- i chondrogeny [23,25]. W zastosowanych modelach doświadczalnych potencjał chondro- i osteogeny ADSC jest niższy w stosunku do BM-MSC [26], z kolei MSC są bardziej narażone na wystąpienie częściowego zahamowania proliferacji [27].

Znajomość markerów powierzchniowych MSC jest ważną dla identyfikacji i charakterystyki tych komórek, izolacji poprzez sortowanie (izolacja immunomagnetyczna, FACS) oraz, dzięki znajomości funkcji biologicznych większości markerów, dla uzyskania nowych informacji o biologii MSC. Skład antygenów powierzchniowych jest niemal identyczny dla ADSC i BM-MSC, co spełnia kryteria wymagane dla zaszeregowania ich do klasy MSC [3,4]. Komórki te charakteryzuje obecność antygenów powierzchniowych CD105, CD73, CD90 przy jednoczesnym braku CD45, CD34, CD14 lub CD11b, CD79a, lub CD19 i HLA-DR. MSC charakteryzują się obecnością powierzchniowych markerów multipotencjalności – STRO-1, CD105 i CD166 [28-33], markerów związanych z terapeutyczną przydatnością MSC: CD29 (beta-integryna, indukcja angiogenezy) [34], ICAM-1 (CD54, rodzina supergenów immunoglobulinowych) [35], CD44 (receptor hialuronowy, wytwarzanie macierzy zewnątrzkomórkowej) [36], HLA-DR-, w większości MHC Class 1 – pozytywne (niska immunoreaktywność po przeszczepieniu w przypadku niezgodności HLA) [36]. Innymi markerami obecnymi na MSC są: CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD49e, CD54, CD55, CD59, CD73, CD117 i CD146 [37-40]. BM-MSC i ADSC różnią się syntezą integryny VLA-4 (CD49d) i jej receptora VCAM-1 (CD106): BM-MSC mają fenotyp CD49d-/CD106+ [41], podczas gdy ADSC są CD49d+/CD106- [37].

Część świeżo izolowanych komórek zarówno szpiku, jak tkanki tłuszczowej posiada na powierzchni antygen CD34. Różnica polega na tym, że komórki CD34+ obecne w populacji BM-MSC są komórkami krwiotwórczymi (eksprymują również inne markery komórek krwiotwórczych, jak CD38, CD45), a frakcja CD34+ izolowana z tkanki tłuszczowej nie zawiera komórek krwiotwórczych i najprawdopodobniej składa się wyłącznie z EPC. Potwierdzają to obserwacje dokumentujące, że komórki CD34+, CD133+ tkanki tłuszczowej tworzą *in vitro* kolonie składające się z komórek śródbłonna oraz indukują *in vivo* proces angiogenezy [42-46]. Zgodnie z naszymi obserwacjami odsetek komórek CD34+

w populacji mononuklearów izolowanych z tłuszczu z reguły nie przekracza 10%.

Analiza proteomu MSC (ADSC i BM-MSC) oraz proteomu fibroblastów [47-49] wykazała ich duże podobieństwo. Również badania ADSC i BM-MSC, przeprowadzone techniką mikromacierzy [50-52] wykazały, że obydwa rodzaje komórek mają identyczny transkryptom [53] cechujący się ekspresją genów specyficznych dla komórek macierzystych (np. Oct4, Sox2, Rex1) [25]. Szczegółowa analiza podobieństw i różnic pomiędzy MSC i fibroblastami potwierdziła wprawdzie duże podobieństwo transkryptomów, z drugiej jednak strony wykazała znamienne różnice ekspresji 64 genów i 21 mikroRNA [24].

TKANKOWE ŹRÓDŁA MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

MSC, jako „komórki zrębu”, są obecne we wszystkich tkankach zarówno płodów, jak dorosłych ludzi. Komórki płodowe mogą być bez szkody pozyskiwane z tkanek, które po porodzie są zbędne dla noworodka (sznur pępowinowy, krew pępowinowa, łożysko, płyn owodniowy) i wykorzystywane do diagnostyki oraz do leczenia dorosłych zarówno w układzie auto-, jak i allogenicznym [54].

Wprawdzie MSC dorosłych można zidentyfikować w większości tkanek, ale praktyczne zastosowanie kliniczne mogą znaleźć jedynie te, których pozyskanie nie wiąże się z zagrożeniami dla dawcy, a liczba, nawet przy uwzględnieniu nie zawsze możliwej ekspansji *in vitro*, wystarczy dla potencjalnych zastosowań. Stosunkowo dokładnie scharakteryzowano MSC pozyskane ze szpiku kostnego [55,56], tkanki tłuszczowej [15,57], kości [58], błony maziówkowej [59], więzadeł okołozębowych i miazgi zębowej [60], mięśni [61] i ścięgien [62]. Izolacja MSC ze szpiku kostnego jest stosunkowo prostym zabiegiem, gdyż aspiruje się zawiesinę pojedynczych komórek. Ponieważ komórki krwiotwórcze nie przylegają do podłoża, wstępnym zabiegiem jest kilkugodzinna inkubacja pobranego szpiku *in vitro*, a następnie usunięcie komórek nieprzylegających. W przypadkach innych tkanek izolacja MSC wymaga przeważnie wstępnego rozdrobnienia mechanicznego tkanki i zastosowania trawienia enzymatycznego (kolagenaza).

MEZENCHYMALNE KOMÓRKI MACIERZyste A NOWOTWORY

Zastosowanie komórek macierzystych w terapii zawsze wymaga bardzo ostrożnej oceny ryzyka indukowania nowotworów. Zagrożenia wynikają albo z samej natury komórki macierzystej, z procedur stosowanych wobec niej przed implantacją pacjentowi, albo z wpływu tej komórki na nowe otoczenie. Problem pierwszy dotyczy z reguły komórek macierzystych, dla których środowisko tkankowe po implantacji nie jest dla nich naturalne, np. zarodkowych komórek macierzystych (ESC, ang. *embryonic stem cells*) i ich „sztucznych” odpowiedników – indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (IPSC, ang. *induced pluripotent stem cells*) przeszczepionych dorosłym. Zagrożeniem jest z jednej strony zdolność ESC lub IPSC do różnicowania się we wszystkie rodzaje tkanek, z drugiej ich mniejsza po-

datność na poddawanie się regulacji poprzez kontakt komórkowy lub sygnalizację na drodze cytokiny/receptory. Przykładem efektów niedostatecznej komunikacji ESC lub IPSC z otoczeniem jest tworzenie przez nie potworniaków (teratoma) – tworów nie spełniających wszystkich kryteriów procesu nowotworowego (brak cech złośliwości i zdolności do wytwarzania przerzutów), niemniej skutkujących formowaniem struktur zawierających dojrzałe tkanki, w miejscach innych niż ich fizjologiczna lokalizacja.

Badania stabilności genetycznej MSC podczas długotrwałej (4–5 miesięcznej) hodowli *in vitro* nie wykazały ryzyka transformacji komórkowej w przedziale czasowym do 6–8 tygodni. Natomiast kilkumiesięczna hodowla tych komórek może skutkować spontanicznymi zmianami fenotypu, niestabilnością kariotypu i utratą cechy inhibicji kontaktowej [63]. Dotychczasowe doświadczenia *in vivo* polegające na przeszczepianiu zwierzętom od kilku do kilkudziesięciu milionów MSC nie skutkowały indukowaniem nowotworów wywodzących się z tych komórek. Nie opisywano także zagrożenia neo-onkogenezą w ponad 300 prowadzonych obecnie lub ukończonych badaniach klinicznych, w wyniku których biorcy otrzymywali autologiczne lub allogeniczne MSC. Zagrożeniem w postaci możliwości indukowania nowotworów przez MSC nie są więc same komórki macierzyste mogące dać początek komórkom nowotworowym, ale potencjalny stymulujący efekt wywierany przez nie na wywodzące się z innego źródła nowotwory. Już w połowie XIX wieku James Paget sformułował tezę, że relacja pomiędzy rozwijającym się nowotworem, a jego mikrośrodowiskiem przypomina zależność ziarna od gleby [65]. Mikrośrodowisko nowotworu jest skomplikowanym połączeniem różnych typów komórek: fibroblastów powinowatych do nowotworu (TAF, ang. *tumor associated fibroblasts*), komórek układu odpornościowego, śródbłonna, adipocytów, MSC [66,67], a także macierzy zewnątrzkomórkowej oraz cytokin. Skład czynników humoralnych (EGF, VEGF-A, FGF, PDGF, HGF, TGF- β 1, TNF- α , SDF-1 α , IL-6, IL-8, G-CSF, MCP-1, uPA i GM-CSF [67-72]) w otoczeniu nowotworu przypomina środowisko niegojącej się rany, pobudzając migrację i kotwiczenie (ang. *homing*) MSC [73]. Receptory tych chemokin (CCR1, CCR4, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, c-met) odgrywają istotną rolę w kotwiczeniu MSC w otoczeniu nowotworu.

W zdrowym organizmie MSC lokalizują się w okolicach bogatych w macierz międzykomórkową, takich jak płuca, kość i chrząstka. W tych lokalizacjach można bez problemu wykryć MSC po ich dożylnym podaniu. W przypadkach lokalnych uszkodzeń tkanek, odczyn zapalny i niedotlenienie stanowią atraktant dla MSC sprawiając, że migrują one w strefę uszkodzenia, niezależnie od specyfiki tkankowej i narządowej [72,74-77].

Wykazano, że w wielu przypadkach dodanie MSC do komórek nowotworowych hodowanych *in vitro* lub wszczepianych zwierzętom przyspiesza ekspansję guza (osteosarkoma [78], rak okrężnicy [79], rak jajnika [80], rak piersi [81,82]). Publikowano też wyniki sugerujące antynowotworowe działanie MSC w podobnym układzie doświadczalnym (mięsak Kaposiego [79] rak trzustki [83]). Migracja MSC w okolicę nowotworu wykorzystywana jest dla uzy-

skania efektu przeciwnowotworowego po „uzbrojeniu” MSC w toksyny lub cytokiny, np. poprzez transdukcję re-trowialnym wektorem kodującym proapoptotyczny ligand TRAIL [84] lub dezaminazę cytozynową, w połączeniu z podawaniem choremu 5-fluorocytozyny [85].

Jednym z mechanizmów odpowiedzialnych za stymulację nowotworów przez MSC może być indukowanie neoangiogenezy w otoczeniu guza. Udział MSC w powstawaniu naczyń krwionośnych może być zależny od ich różnicowania w pericyty, albo też od wydzielania przez MSC cytokin proangiogennych (PDGF, FGF, VEGF, CXCL12) [86]. Inne cytokiny, np. CXCL7 i IL-6 mogą stymulować proliferację nowotworowych komórek macierzystych [87-89]. Progresa nowotworu zależna jest w dużym stopniu od aktywności układu odpornościowego pacjenta. Immunosupresja indukowana w otoczeniu guza przez MSC, poprzez wydzielanie chemokin [90], lokalne hamowanie aktywności limfocytów T [91,92], supresję limfocytów B przez hamowanie receptorów cytokinowych [93] oraz pobudzanie wytwarzania limfocytów T-regulatorowych (Treg) [94], może osłabić efekt przeciwnowotworowy wywierany przez układ odpornościowy, tym samym przyspieszając ekspansję nowotworu.

Dotychczas zgromadzone dane doświadczalne nie przemawiają za istnieniem znaczącego ryzyka związku nowotworzenia z terapią MSC. Zarówno badania *in vivo*, jak ponad 300 badań klinicznych nie wykazały ani jednego przypadku, kiedy podanie zwierzęciu lub pacjentowi allogenicznym lub autologicznym MSC byłoby warunkiem wystarczającym do powstania nowotworu w sytuacji, kiedy w organizmie biorcy nie ma komórek nowotworowych. Zjawisko wspomagania istniejącego procesu nowotworowego przez MSC zostało doświadczalnie wykazane, ale należy pamiętać, że przeszczepienie MSC jedynie zwiększa ich liczbę w określonej lokalizacji. Potencjalny efekt pronowotworowy może być równie dobrze wywołany przez własne, endogenne MSC obecne we wszystkich tkankach chorego. W podsumowaniu, zarówno dane teoretyczne, jak i analiza wyników doświadczalnych nie przemawiają za możliwością indukowania *de novo* nowotworów przez przeszczepiane MSC. Z drugiej strony, udokumentowana możliwość wspomagania proliferacji nowotworów przez MSC jest silnym argumentem za niestosowaniem terapii komórkami macierzystymi u pacjentów z podejrzeniem choroby nowotworowej.

ZALEŻNOŚĆ MORFOLOGII I POTENCJAŁU RÓŻNICOWANIA MSC OD WIEKU DAWCY – CZY MSC SIĘ STARZEJĄ?

Zgodnie z definicją komórki macierzystej, jej zdolność do samoodnowy powinna skutkować wytwarzaniem komórek potomnych o cechach identycznych jak komórki rodzicielskie, więc cechy populacji komórek macierzystych powinny być niezależne od wieku dawcy. W praktyce z wiekiem osobnika zmianom ilościowym i jakościowym ulegają wszystkie rodzaje komórek składających się na organizm, nie wyłączając komórek macierzystych (empirycznie określona jest granica wieku dawcy krwiotwórczych komórek macierzystych). W efekcie zmienia się zdolność odtwarzania komórek ulegających rotacji (układ

odpornościowy, skóra, nabłonek jelitowy), a pogorszeniu ulega nawet jakość najlepiej zachowanych w ewolucji komórek rozrodczych. W przypadku MSC różnice zależne od wieku dawcy mogą być jeszcze większe, gdyż jest to populacja komórek z których duży odsetek pozostaje aktywny proliferacyjnie.

Można wyróżnić dwa modele doświadczalne wykorzystywane do oceny starzenia się MSC: badanie różnic cech MSC zależnych od czasu ich hodowli *in vitro*, a dokładniej liczby podziałów komórkowych w hodowli, oraz analizę różnic pomiędzy cechami komórek pozyskanych od osobników w różnym wieku. Pierwszy model pozwala na wychwycenie zmian zachodzących w czasie proliferacji tej samej populacji komórkowej, więc nie jest obciążony błędami wynikającymi z nieuwzględnienia zmienności osobniczej. Nie pozwala on natomiast na uwzględnienie czynników, jakie wpływają na populację MSC rezydującą w starzejącym się organizmie, gdzie częstość podziałów komórkowych może zależeć od lokalizacji tkankowej MSC. Generalnie, zmiany obserwowane podczas hodowli MSC *in vitro* są podobne, ale bardziej nasilone i wyraźniej manifestowane niż różnice wynikające z różnego wieku dawców MSC.

RÓŻNICE MORFOLOGICZNE

In vitro MSC przylegające do podłoża przybierają dwie postacie: typ I, są to komórki kształtu wrzecionowatego, o szybszym tempie proliferacji oraz typ II, który tworzą komórki o kształcie owalnym, bardziej spłaszczonym, cechujące się powolną proliferacją [14]. Świeżo izolowane MSC młodych dawców cechują się przewagą MSC typu I, podczas, gdy MSC osobników w wieku podeszłym cechują się znaczną redukcją komórek typu I na rzecz MSC typu II [95] (zjawisko obserwowane również w badaniach *in vitro*). Komórki stają się silniej rozplaszczone, większe i zawierają więcej włókien aktyny [96-98], zwiększa się również liczba ziarnistości w ich cytoplazmie [99].

MARKERY STARZENIA MSC

Prowadzone są poszukiwania markerów starzenia się populacji MSC *in vitro* oraz markerów związanych z wiekiem dawcy MSC [97,100-103]. Z wiekiem (komórek *in vitro* lub dawcy) rośnie zawartość p53 i p21, korelując z ograniczeniem proliferacji tych komórek, ale także zmniejszoną zdolnością do różnicowania w kierunku osteogenezy. Po długotrwałej hodowli *in vitro* rośnie również odsetek komórek ekspresujących (SA)-beta-gal. Pozostaje to w zgodzie ze zwiększoną akumulacją tego markera w hodowlach MSC pozyskanych od dawców w podeszłym wieku w porównaniu z hodowlami MSC dawców młodych. Podwyższony poziom (SA)-beta-gal w MSC dawców w podeszłym wieku sugeruje większą liczbę podziałów przebytych przez MSC *in vivo* przed ich pozyskaniem od dawcy.

TELOMERAZA, DŁUGOŚĆ TELOMERÓW I POTENCJAŁ PROLIFERACJI I RÓŻNICOWANIA

Wyniki badania aktywności telomerazy w MSC nie są jednoznaczne [104,105], dla bezpieczeństwa należy przyjąć, że problem wymaga dalszych badań. W trakcie hodowli MSC *in vitro* dochodzi do skracania się telomerów w tempie

około 50 bp na każdy pasaż [99], przy czym średnia długość telomerów na początku hodowli wynosiła około 10,4 kbp, malejąc w końcowych pasażach do 7,1 kbp [103]. Redukcja potencjału proliferacyjnego MSC korelowała ze skracaniem telomerów nie tylko *in vitro*, ale również *in vivo* [106]. Starzenie ma również wpływ na zdolność do różnicowania się zarówno *in vivo* jak i *in vitro* chrząstkę, kość i tkankę tłuszczową. Zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* zaznacza się tendencja zmiany w kierunku różnicowania MSC w tkankę tłuszczową „kosztem” osteogenezy [97-99]. Zjawisko to może tłumaczyć występujący w wieku podeszłym defekt regeneracji i mineralizacji kości i zamianę części szpiku w tkankę tłuszczową kości długich [97]. Narastający z wiekiem defekt osteogenezy przejawia się obniżeniem ekspresji genów specyficznych dla różnicowania w osteoblasty, takich jak CBFA1, Runx2, Dlx5, przy jednoczesnym wzroście aktywności genów charakterystycznych dla adipogenezy (PPAR- γ , aP2) [107,108]. Znacznie mniej danych zgromadzono na temat zmian potencjału chondrogeny związanej ze starzeniem się MSC. Wstępne wyniki sugerują zmniejszenie zdolności do różnicowania w chrząstkę u badanych w wieku ponad 40 lat w porównaniu z młodszymi dawcami [97], a efekt ten jest znacznie bardziej znamieny u chorych z zapaleniem stawów [109]. Klinicznie, potwierdzeniem obserwowanego *in vitro* obniżenia potencjału chondrogenego starzejących się MSC może być narastające z wiekiem obniżenie zdolności regeneracyjnych chrząstki [110].

KLINICZNE ZASTOSOWANIA MEZENCHYMALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

MULTIPOTENCJALNOŚĆ MSC JAKO NARZĘDZIE DLA REGENERACJI TKANEK

Jak już wspomniano, mezenchymalna komórka macierzysta z definicji jest zdolna do różnicowania się w kierunku adipogenezy [111-114], osteogenezy [115-118] i chondrogeny [52,119,120]. Oprócz tych dobrze udokumentowanych *in vitro* i *in vivo* przykładów różnicowania, istnieje szereg doniesień sugerujących możliwość powstawania z MSC szeregu innych tkanek. Opisywano wytwarzanie przez MSC komórek mięśni szkieletowych [121-123], mięśni gładkich [124,125], mięśnia sercowego [41,44,126], komórek ośrodkowego układu nerwowego [34,127,128], hepatocytów [75,129,130] i komórek wysp Langerhansa trzustki [131-133]. Wydaje się jednak, że większość tych doniesień wymaga weryfikacji i potwierdzenia dalszymi badaniami, i na razie w żadnym wypadku nie można ich traktować jako danych pozwalających na wdrożenie w przewidywalnym czasie zastosowań klinicznych. Szereg pozytywnych wyników doświadczeń na zwierzętach i badań klinicznych jest raczej rezultatem immunomodulacyjnego i regulującego endogenną regenerację wpływu MSC, a nie odtwarzaniem tkanek przez komórki wytwarzane przez MSC i różnicujące się w komórki zastępujące uszkodzone tkanki.

DOŚWIADCZENIA *IN VIVO* I BADANIA KLINICZNE Z WYKORZYSTANIEM MSC

Liczba rejestrowanych badań klinicznych z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych rośnie w szybkim tempie. Podczas, kiedy w roku 2009 rejestr Clinical Trials.gov (Narodowe Instytuty Zdrowia USA) nie prze-

kraczał 30 badań w wykorzystaniu autologicznych lub allogenicznych MSC, w marcu 2013 liczba analogicznych zarejestrowanych badań wyniosła 308. Całkowita liczba pacjentów, którym przeszczepiane są MSC wzrasta o co najmniej kilkadziesiąt tysięcy rocznie z uwagi na „turystykę komórek macierzystych” (ang. *stem cell tourism*) czyli chorych udających się z USA i Europy do krajów azjatyckich, w których „kliniczne” stosowanie komórek macierzystych podlega liberalniejszym prawnym regulacjom i nie wymaga wstępnych, udokumentowanych doświadczeń potwierdzających bezpieczeństwo i skuteczność stosowanych „terapii”. W wielu krajach ośrodki stosujące komercyjnie komórki macierzyste nie publikują wiarygodnych naukowo wyników swojej działalności, stąd szacunkowa ocena zjawiska oparta jest głównie na ocenie liczby „turystów” odwiedzających je celem odbycia kuracji.

W dużym uproszczeniu, terapeutyczny efekt może być uzyskiwany przy wykorzystaniu trzech właściwości MSC: różnicowania w kilka rodzajów tkanek, efektu immunomodulacyjnego oraz zdolności do regulacji zjawisk zachodzących w ich otoczeniu poprzez wydzielanie odpowiednich cytokin i bezpośredni kontakt z innymi komórkami. Zdolność do bezpośredniego wytwarzania tkanki, w miejsce tej uszkodzonej w wyniku urazu lub choroby, wydawała się początkowo najprzystatniejszą w zastosowaniach medycyny regeneracyjnej. Obecnie wykazano, że za naprawę uszkodzeń stosunkowo rzadko odpowiedzialne są struktury bezpośrednio tworzone przez komórki potomne MSC, np. korzystny wpływ MSC na proces regeneracji mięśni w niewielkim stopniu wiąże się z tworzeniem miotub z udziałem komórek powstających z MSC [134,135]. Wydaje się więc, że w przeważającej liczbie przypadków MSC pełnią rolę miejscowego koordynatora naprawy tkankowej. Ich przewagą nad stosowaniem innych mediatorów (cytokin, PRP) jest sprzężenie zwrotne pomiędzy MSC a innymi komórkami i mediatorami regeneracji tkanek umożliwiające dostosowywanie sygnalizacji MSC do zmieniającej się sytuacji, np. hamowanie odczynu zapalnego w pierwszej fazie regeneracji i wytwarzanie stymulatorów dla proliferacji i różnicowania komórek w fazie następnej.

Cechą istotną dla klinicznych zastosowań MSC jest ich zdolność do gromadzenia się w rejonie naprawy tkanek. Po podaniu drogą dożylną migrują one do okolic uszkodzeń manifestujących się odczynem zapalnym, w którym to procesie uczestniczy szereg chemokin, molekuł adhezyjnych i metaloproteinaz (CCL-12, CCL-2, CCR4, CXCR4, VCAM-1) [136-139]. Podane dożylnie MSC są w dużej ich części wychwytywane i zatrzymywane w naczyniach włosowatych pęcherzyków płucnych [91,140], co utrudnia ich migrację do rejonu uszkodzenia. Istnieją jednak przesłanki przemawiające za tym, że w płucach zmieniają one niektóre swoje właściwości (np. aktywacja syntezy CXCR4) i podejmują dalszą migrację drogą naczyń krwionośnych.

MSC są stosowane klinicznie zarówno w układzie autologicznym, jak również jako przeszczep allogeniczny. Jest to możliwe z uwagi na wspomniane już właściwości immunomodulacyjne tych komórek, skutkujące zarówno brakiem reakcji układu odpornościowego na przeszczepienie MSC pochodzących od innego dawcy, jak też brakiem

rozpoznawania przez allogeniczne MSC biorcy jako obcego. Wiele doświadczeń *in vivo* wykonywanych jest w układzie ksenogenicznym poprzez przeszczepienie ludzkich MSC zwierzętom mającym w pełni aktywny układ odpornościowy. Zaletą terapii autologicznymi MSC jest pełna zgodność przeszczepianych komórek z biorcą na poziomie genomu i proteomu, gwarantująca brak jakichkolwiek niepożądanych reakcji, trudnych do przewidzenia i wykluczenia w układzie allogenicznym. Wadami natomiast są: ograniczenie możliwości pozyskania MSC z nielicznych i z wiekiem coraz mniej „wydajnych” źródeł (praktycznie jedynie szpiku i tkanki tłuszczowej), prawdopodobnie mniejsza przydatność MSC pozyskanych od pacjenta w podeszłym wieku oraz posiadanie przez MSC tych samych potencjalnych defektów genomu (defekty genetyczne, podatność na rozwój nowotworów), jakie mogą występować u pacjenta. Układ allogeniczny pozwala na wykorzystywanie komercyjnie dostępnych MSC pozyskiwanych od innych dawców, co powinno pozwolić na obniżenie kosztów i większą dostępność terapii z wykorzystaniem tych komórek. Obecnie jedynym dopuszczonym w USA lekiem zawierającym żywe MSC jest Prochymal firmy Osiris Therapeutics, ale liczba podobnych preparatów najprawdopodobniej wzrośnie.

Komórki przeznaczone do stosowania w układzie allogenicznym mogą być pozyskiwane zarówno od dawców-ochotników, podobnie, jak w przypadku komórek krwiotwórczych, jak też z niepotrzebnych „odpadów medycznych”, jakimi jest pozostały po porodzie sznur pępowinowy i łożysko. Są to bardzo dobre i wydajne źródła MSC, których wykorzystanie nie stwarza żadnych zagrożeń natury medycznej ani nie budzi kontrowersji etycznych. MSC sznura pępowinowego są populacją bardziej homogeną niż pobierane od dorosłych dawców, a jako komórki powstałe na etapie życia płodowego są w znacznie mniejszym stopniu obciążone ryzykiem transmisji patogenów albo środowiskowo indukowanych uszkodzeń genomu. W testach *in vitro* wykazano (m. in. obserwacje własne), że MSC wieku płodowego posiadają znacząco większy potencjał proliferacji i różnicowania w porównaniu do ich odpowiedników pochodzących od dorosłych dawców. Obecnie rysuje się tendencja, zgodnie z którą stosowanie allogenicznych MSC w wybranych jednostkach chorobowych może stać się powszechniejsze niż terapia autologiczna [141-145].

W dotychczasowych badaniach wykazano dużą skuteczność MSC w hamowaniu niekorzystnych reakcji o podłożu immunologicznym; zaawansowane są badania nad możliwością leczenia choroby wynikającej z niezgodności w układzie HLA pomiędzy dawcą a biorcą szpiku (GVHD, ang. *graft versus host disease*) [146-149].

Stosunkowo liczne badania poświęcone zostały możliwości modulacji aktywności układu odpornościowego pacjenta w chorobie Crohna [150-152].

Szereg badań potwierdza przydatność MSC do leczenia uszkodzeń układu kostnoszkieletowego, w takich sytuacjach MSC służą do zasiedlania naturalnych lub sztucznych rusztowań wszczepianych w miejsca, w których istnieje potrzeba uzupełnienia brakującej kości lub chrząstki [153-155]. Rozpoczęto badania przedkliniczne i kliniczne

skoncentrowane na regeneracji więzadeł i ścięgien. Komórki typu MSC mogą w tych przypadkach albo różnicować się bezpośrednio w tenocyty, albo pełnić rolę regulatora migracji komórek endogennych i aktywacji tenocytów [156-159].

Szereg badań przedklinicznych i klinicznych dotyczy innych jednostek chorobowych, jak zawału serca [160-163], uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego lub nerwów obwodowych [164-167], cukrzycy [131,168,169], marskości wątroby [170,171], regeneracji mięśni szkieletowych [172,173] lub choroby popromiennej [174-176]. MSC przeszczepiane są albo w nadziei na odtworzenie przez ich komórki potomne uszkodzonej tkanki albo dla lokalnej regulacji endogennych procesów naprawczych.

Wnioskami z większości cytowanych badań klinicznych są korzystne efekty stosowania MSC, pozostałe wyniki sprowadzają się do braku niepożądanych skutków ubocznych zastosowanej terapii. Dotychczasowe próby kliniczne często jednak wykonywane były na pacjentach, których liczba była niewystarczająca dla uzyskania statystycznie udokumentowanych wyników. Ponadto, próby te nie były randomizowane, a korzyści z zastosowanej terapii były często subiektywne i nie udokumentowane w znamiennej statystycznie sposób. Również heterogenność MSC pozyskiwanych z różnych źródeł i stosowanych, jako nie w pełni scharakteryzowane mieszaniny niejednorodnych komórek, nie ułatwia analizy publikowanych wyników. W podsumowaniu, wyniki dotychczasowych przedklinicznych i klinicznych badań przydatności MSC jako materiału dla zastosowań w medycynie regeneracyjnej pozwalają wprowadzić na sformułowanie wniosków potwierdzających bezpieczeństwo ich użycia i niewielkie zagrożenie efektami niepożądanymi, ale są niewystarczające dla prognozowania skali docelowej przydatności terapeutycznej tych komórek. Wzrastająca liczba doświadczeń klinicznych, wśród których coraz większy odsetek stanowią randomizowane badania prowadzonych na licznych grupach pacjentów pozwalają przypuszczać, że w niedługim czasie wybrane metody terapii przy użyciu MSC mogą być wprowadzone do rutynowego repertuaru zastosowań klinicznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Friedenstajn AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3: 393-403
2. Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstajn AY (1971) Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion* 11: 345-349
3. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A (2005) Position paper. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393-395
4. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317
5. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103: 1669-1675
6. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medi-

- cetty S (2003) Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 21: 50-60
7. Weiss ML, Mitchell KE, Hix JE, Medicetty S, El-Zarkouny SZ, Grieger D, Troyer DL (2003) Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Exp Neurol* 182: 288-299
 8. Baksh D, Yao R, Tuan RS (2007) Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25: 1384-1392
 9. Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE (2005) Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23: 220-229
 10. Karahuseynoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, Tukun A, Uckan D, Can A (2007) Biology of the stem cells in human umbilical cord stroma: *in situ* and *in vitro* surveys. *Stem Cells* 25: 319-331
 11. Karahuseynoglu S, Kocaefe C, Balci D, Erdemli E, Can A (2008) Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. *Stem Cells* 26: 682-691
 12. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Clas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH (2003) Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102: 1548-1549
 13. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM (2003) Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 121: 368-374
 14. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001) Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7841-7845
 15. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-228
 16. Bjornorp P, Karlsson M, Pertoft H, Pettersson L, Sjoström U, Smith J (1978) Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *Lipid Res* 19: 316-324
 17. Hauner HG, Entenmann M, Wabitsch D, Gaillard G, Ailhaud R, Negrel EF, Pfeiffer J (1989) Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *Clin Invest* 84: 1663-1670
 18. Oedayrajsingh-Varma MJ, van Ham SM, Knippenberg M, Helder MN, Klein-Nulend J, Schouten TE, Ritt MJ, van Milligen FJ (2006) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 8: 166-177
 19. Banfi A, Bianchi G, Galotto M, Cancedda R, Quarto R (2001) Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment. *Leuk Lymphoma* 42: 863-870
 20. Banfi A, Podesta M, Fazzuoli L, Sertoli MR, Venturini M, Santini G, Cancedda R, Quarto R (2001) High-dose chemotherapy shows a dose-dependent toxicity to bone marrow osteoprogenitors: a mechanism for post-bone marrow transplantation osteopenia. *Cancer* 92: 2419-2428
 21. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA (1999) Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res* 14: 1115-1122
 22. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54: 132-141
 23. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301
 24. Bae S, Ahn JH, Park CW, Son HK, Kim KS, Lim NK, Jeon CJ, Kim H (2009) Gene and microRNA expression signatures of human mesenchymal stromal cells in comparison to fibroblasts. *Cell Tissue Res* 335: 565-573
 25. Izadpanah R, Trygg C, Patel B (2006) Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99: 1285-1297
 26. Im GI, Shin YW, Lee KB (2005) Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone-marrow derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 13:845-53
 27. Hui JH, Li L, Teo YH (2005) Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. *Tissue Eng* 11: 904-912
 28. Dennis JE, Carbillet JP, Caplan A, Charbord P (2002) The STRO-1⁺ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissue Org* 170 :73-82
 29. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189: 54-63
 30. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994) The STRO-1⁺ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84: 4164-4173
 31. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL (1998) Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176: 57-66
 32. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147
 33. Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A, Ohta S, Graves S (1994) Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Prog Clin Biol Res* 389: 271-280
 34. Ashjian PH, Elbarbary AS, Edmonds B, DeUgarte D, Zhu M, Zuk PA, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH (2003) In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg* 111: 1922-1931
 35. Roebuck KA, Finnegan A (1999) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 66: 876-888
 36. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, Willingmyre GD, Gimble JM (2004) Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 6: 7-14
 37. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, Hedrick MH, Fraser JK (2003) Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 89: 267-270
 38. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH (2003) Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissue Org* 174: 101-109
 39. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM (2006) The immunophenotype of human adipose derived cells: temporal changes in stromal- and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24: 376-338
 40. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Halvorsen YD, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM (2006) The immunogenicity of human adipose derived cells: temporal changes *in vitro*. *Stem Cells* 24: 1245-1253
 41. Strem BM, Zhu M, Alfonso Z, Daniels EJ, Schreiber R, Beygui R, MacLellan WR, Hedrick MH, Fraser JK (2005) Expression of cardiomyocyte markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy* 7: 282-291
 42. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, Traktuev D, Cornetta K, Ingram DA, Rosen ED, March KL (2007) Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells* 25: 3234-3243
 43. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A (2004) Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110: 349-355

44. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L, Casteilla L (2004) Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 94: 223-229
45. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109: 1292-1298
46. Sumi M, Sata M, Toya N, Yanaga K, Ohki T, Nagai R (2007) Transplantation of adipose stromal cells, but not mature adipocytes, augments ischemia-induced angiogenesis. *Life Sci* 80: 559-565
47. Delany J, Floyd ZE, Zvonic S, Smith A, Gravois A, Reiners E, Wu X, Kilroy G, Lefevre M, Gimble JM (2005) Proteomic analysis of primary cultures of human adipose derived stem cells: modulation by adipogenesis. *Mol Cell Proteomics* 4: 731-740
48. Sun HJ BY, Choi YR, Shim JH, Han SH, Lee YW (2006) A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. *J Orthop Res* 24: 2059-2071
49. Wang D, Park JS, Chu JS, Krakowski A, Luo K, Chen DJ, Li S (2004) Proteomic profiling of bone marrow mesenchymal stem cells upon transforming growth factor beta1 stimulation. *J Biol Chem* 279: 43725-43734
50. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC (2005) Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hadas) cells. *Stem Cells* 23: 412-423
51. Liu TM, Martina M, Huttmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B (2007) Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* 25: 750-760
52. Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W (2003) Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 48: 418-429
53. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 24: 150-154
54. Pojda Z (2011) Use of non-hematopoietic stem cells of fetal origin from cord blood, umbilical cord, and placenta in regeneration medicine. In: regenerative medicine using pregnancy-specific biological substances. *Wyd: N Bhattacharya, P Stubblefield, Springer, London Dordrecht Heidelberg New York, ISBN 978-1-84882-717-2: 283-296*
55. Owen M (1988) Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci* 105: 1663-1668
56. Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthopaedic Res* 5: 641-650
57. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295
58. Tuli RS, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS (2003) Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. *Stem Cells* 21: 681-693
59. de Bari C, Dell'acchio F, Przemyslaw (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheumatism* 44: 1928-1942
60. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004) Investigation of multipotent post-natal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364: 149-155
61. Poulosom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA (2002) Muscle stem cells. *J Pathol* 197: 457-467
62. Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A, Noda M (2003) Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 287: 289-300
63. Akiyama K, Chen C, Gronthos S, Shi S (2012) Lineage differentiation of mesenchymal stem cells from dental pulp, apical papilla, and periodontal ligament. *Methods Mol Biol* 887: 111-121
64. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 65: 3035-3039
65. Paget J (1887) The Morton lecture on cancer and cancerous diseases. *Br Med J* 2: 1091-1094
66. Hall B, Dembinski J, Sasser AK, Studeny M, Andreeff M, Marini F (2007) Mesenchymal stem cells in cancer: tumor-associated fibroblasts and cell-based delivery vehicles. *Int J Hematol* 86: 8-16
67. Korkaya H, Liu S, Wicha MS (2011) Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest* 121: 3804-3809
68. Komarova S, Roth J, Alvarez R, Curiel DT, Pereboeva L (2010) Targeting of mesenchymal stem cells to ovarian tumors via an artificial receptor. *J Ovarian Res* 3: 12
69. Gao H, Priebe W, Glod J, Banerjee D (2009) Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and focal adhesion kinase by stromal cell-derived factor 1 is required for migration of human mesenchymal stem cells in response to tumor cell-conditioned medium. *Stem Cells* 27: 857-865
70. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102: 3837-3844
71. Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE (2006) Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 24: 1030-1041
72. Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL (2005) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 145-152
73. Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F (2008) Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 15: 730-738
74. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, Coulter SC, Lin J, Ober J, Vaughn WK, Branco RV, Oliveira EM, He R, Geng YJ, Willerson JT, Perin EC (2005) Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 111: 150-156
75. Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, et al. (2005) Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 106: 756-763
76. Natsu K, Ochi M, Mochizuki Y, Hachisuka H, Yanada S, Yasunaga Y (2004) Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers. *Tissue Eng* 10: 1093-1112
77. Lange C, Tögel F, Ittrich H, Clayton F, Nolte-Ernsting C, Zander AR, Westenfelder C (2005) Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int* 68: 1613-1617
78. Xu WT, Bian ZY, Fan QM, Li G, Tang TT (2009) Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett* 281: 32-41
79. Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y (2006) Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth *in vivo*. *Exp Mol Pathol* 80: 267-274
80. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F (2009) Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* 4: e4992
81. Zimmerlin L, Donnenberg AD, Rubin JP, Bassse P, Landreneau RJ, Donnenberg VS (2011) Regenerative therapy and cancer: *In vitro* and *in vivo* studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates. *Tissue Eng Part A* 17: 93-106
82. Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, Seidensticker M, Ricke J, Altman AM, Devarajan E, Liu W, Arlinghaus RB, Alt EU (2009) Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis* 30: 589-597

83. Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, Touil I, André M, Grolleau JL, Péron JM, Chavoin JP, Bourin P, Pénicaud L, Casteilla L, Buscail L, Cordelier P (2009) Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 4: e6278
84. Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L, Petak I, Rasini V, Veronesi E, De Santis G, Spano C, Tagliazzucchi M, Barti-Juhász H, Scarabelli L, Bambi F, Frassoldati A, Rossi G, Casali C, Morandi U, Horwitz EM, Paolucci P, Conte P, Dominici M (2010) Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res* 70: 3718-3729
85. Kucerova L, Altanerova V, Matuskova M, Tyciakova S, Altaner C (2007) Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res* 67: 6304-6313
86. Bianchi G, Borgonovo G, Pistoia V, Raffaghello L (2011) Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells. *Histol Histopathol* 26: 941-951
87. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, Korkaya H, Heath A, Dutcher J, Kleer CG, Jung Y, Dontu G, Taichman R, Wicha MS (2011) Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res* 71: 614-624
88. Abarrategi A, Marinas-Pardo L, Mirones I, Rincon E, Garcia-Castro J (2011) Mesenchymal niches of bone marrow in cancer. *Clin Transl Oncol* 13: 611-616
89. McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, Bai S, Cabrera L, Keller E, McCauley L, Cho KR, Buckanovich RJ (2011) Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis *via* altered BMP production. *J Clin Invest* 121: 3206-3219
90. Han Z, Jing Y, Zhang S, Liu Y, Shi Y, Wei L (2012) The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. *Cell Biosci* 2: 8
91. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ (2009) Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5: 54-63
92. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y (2008) Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2: 141-150
93. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Riso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107: 367-372
94. Patel SA, Dave MA, Murthy RG, Helmy KY, Rameshwar P (2011) Metastatic breast cancer cells in the bone marrow microenvironment: novel insights into oncoprotection. *Oncol Rev* 5: 93-102
95. Baxter MA, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004) Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following *in vitro* expansion. *Stem Cells* 22: 675-682
96. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9363-9367
97. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A (2008) Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev* 129: 163-173
98. Sethe S, Scutt A, Stolzing A (2006) Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 5: 91-116
99. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006) Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. *BMC Cell Biol* 7: 14
100. Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K (1995) Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8348-8352
101. Byun CH, Koh JM, Kim DK, Park SJ, Lee KU, Kim GS (2005) Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 20: 1125-1135
102. Campisi J (2001) From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp Gerontol* 36: 607-618
103. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M (2003) Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33: 919-926
104. Filioli-Urbanio M, Valentini L, Lange-Consiglio A, Caira M, Guaricci AC, L'Abbate A., Catacchio CR, Ventura M, Cremonesi F, Dell'Aquila ME (2011) Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and *in vitro* differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix. *Molec Reprod Dev* 78: 361-373
105. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, Mishra GC, Wani MR (2010) Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun* 393: 377-373
106. Sharpless NE, DePinho RA (2004) Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 113: 160-168
107. Jiang Y, Mishima H, Sakai S, Liu YK, Ohyabu Y, Uemura T (2008) Gene expression analysis of major lineage-defining factors in human bone marrow cells: effect of aging, gender, and age-related disorders. *J Orthop Res* 26: 910-917
108. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka-Czernik B (2004) Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Ageing Cell* 3: 379-389
109. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F (2002) Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46: 704-713
110. Im GI, Jung NH, Tae SK (2006) Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from patients in late adulthood: the optimal conditions of growth factors. *Tissue Eng* 12: 527-536
111. Barry FP, Murphy JM (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 568-584
112. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Götherström C, Blomqvist L, Arner P, Ryden M (2005) Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 308: 283-290
113. Ryden M, Dicker A, Götherström C, Astrom G, Tammik C, Arner P, Le Blanc K (2003) Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 391-397
114. Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YD, Gimble JM (2001) Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem* 81: 312-319
115. Drago J, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, Hendrick MH, Benhaim P (2003) Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res* 21: 622-629
116. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM (2000) Adipose-derived stromal cells – their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: S41-S44
117. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J Cell Biochem* 64: 295-312
118. Lecoer L, Ouhayoun JP (1997) *In vitro* induction of osteogenic differentiation from non-osteogenic mesenchymal cells. *Biomaterials* 18: 989-993
119. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F (2002) Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 763-769
120. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF (1998) Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4: 415-428

121. Lee JH, Kemp DM (2006) Human adipose-derived stem cells display myogenic potential and perturbed function in hypoxic conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 882-888
122. Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH (2002) Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg* 109: 199-209
123. Nöth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS (2010) Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 62: 765-783
124. Abderrahim-Ferkoune A, Bezy O, Astri-Roques S, Elabd C, Ailhaud G, Amri EZ (2004) Transdifferentiation of preadipose cells into smooth muscle-like cells: role of aortic carboxypeptidase-like protein. *Exp Cell Res* 293: 219-228
125. Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, Jung JS, Kim JH (2006) Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smooth-muscle-like cells through a $\text{tgf-}\beta$ -dependent mechanism. *J Cell Sci* 119: 4994-5005
126. Song YH, Gehmert S, Sadat S, Pinkernell K, Bai X, Matthias N, Alt E (2007) VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 999-1003
127. Kang SK, Putnam LA, Ylostalo J, Popescu IR, Dufour J, Belousov A, Bunnell BA (2004) Neurogenesis of rhesus adipose stromal cells. *J Cell Sci* 117: 4289-429
128. Krampera M, Marconi S, Pasini A, Galie M, Rigotti G, Mosna F, Tinelli M, Lovato L, Anghileri E, Andreini A, Pizzolo G, Sbarbati A, Bonetti B (2007) Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 40: 382-390
129. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS (2005) Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 258-264
130. Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gomez-Lechon MJ (2006) Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 12: 5834-5845
131. Karaoz E, Okcu A, Unal ZS, Subasi C, Saglam O, Duruksu G (2013) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells efficiently differentiate into insulin-producing cells in pancreatic islet microenvironment both *in vitro* and *in vivo*. *Cytherapy, w druku*
132. Marappagounder D, Somasundaram I, Dorairaj S, Sankaran RJ (2013) Differentiation of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and subcutaneous adipose tissue into pancreatic islet-like clusters *in vitro*. *Cell Mol Biol Lett* 18: 75-88
133. Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M, Keller U, Muller B, Zulewski H (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 1135-1140
134. Grabowska I, Brzoska E, Gawrysiak A, Stremińska W, Moraczewski J, Polanski Z, Hoser G, Kawiak J, Machaj EK, Pojda Z, Ciemerych MA (2012) Restricted myogenic potential of mesenchymal stromal cells isolated from umbilical cord. *Cell Transplant* 21: 1711-1726
135. Grabowska I, Stremińska W, Janczyk-Ilach K, Machaj EK, Pojda Z, Hoser G, Kawiak J, Moraczewski J, Ciemerych MA, Brzoska E (2013) Myogenic potential of Mesenchymal Stem Cells – the case of adhesive fraction of human umbilical cord blood cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 8: 82-90
136. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I (2004) A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 104: 2643-2645
137. Belema-Bedada F, Uchida S, Martire A, Kostin S, Braun T (2008) Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell Stem Cell* 2: 566-575
138. Cheng Z, Ou L, Zhou X, Li F, Jia X, Zhang Y, Liu X, Li Y, Ward CA, Melo LG, Kong D (2008) Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. *Mol Ther* 16: 571-579
139. Ruister B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistran R, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R (2006) Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 108: 3938-3944
140. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Keddes LH, Kloner RA, Leor J (2003) Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108: 863-868
141. Carrion F, Nova E, Ruiz C, Diaz F, Inostroza C, Rojo D, Mönckeberg G, Figueroa FE (2010) Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 19: 317-322
142. Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, Wildenberg ME, Wendrich BB, Verspaget HW, Kooy-Winkelaar EM, Koning F, Zwaginga JJ, Fidler HH, Verhaar AP, Fibbe WE, van den Brink GR, Hommes DW (2010) Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: Results of a phase I study. *Gut* 59: 1662-1669
143. Liang J, Zhang H, Hua B, Wang H, Lu L, Shi S, Hou Y, Zeng X, Gilkeson GS, Sun L (2010) Allogenic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: A pilot clinical study. *Ann Rheum Dis* 69: 1423-1429.
144. Liang J, Zhang H, Wang D, Feng X, Wang H, Hua B, Liu B, Sun L (2012) Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in seven patients with refractory inflammatory bowel disease. *Gut* 61: 468-469
145. Wang D, Zhang H, Liang J, Li X, Feng X, Wang H, Hua B, Liu B, Lu L, Gilkeson GS, Silver RM, Chen W, Shi S, Sun L (2012) Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years experience. *Cell Transplant, w druku*
146. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringden O (2008) Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, phase II study. *Lancet* 371: 1579-1586
147. Muller I, Kordowich S, Holzwarth C, Isensee G, Lang P, Neunhoffer F, Dominici M, Greil J, Handgretinger R (2008) Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis* 40: 25-32
148. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, Devetten M, Jansen J, Herzig R, Schuster M, Monroy R, Uberti J (2009) Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 804-811
149. Prasad VK, Lucas KG, Kleiner GI, Talano JA, Jacobsohn D, Broadwater G, Monroy R, Kurtzberg J (2011) Efficacy and safety of *ex vivo* cultured adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biol Blood Marrow Transplant* 17: 534-541
150. Sun L, Wang D, Liang J, Zhang H, Feng X, Wang H, Hua B, Liu B, Ye S, Hu X, Xu W, Zeng X, Hou Y, Gilkeson GS, Silver RM, Lu L, Shi S (2010) Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 62: 2467-2475
151. Carrion F, Nova E, Ruiz C, eDiaz F, Inostroza C, Rojo D, Mönckeberg G, Figueroa FE (2010) Autologous mesenchymal stem cell treatment increased T regulatory cells with no effect on disease activity in two systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 19: 317-322
152. Ciccocioppo R, Bernardo ME, Sgarella A, Maccario R, Avanzini MA, Ubezio C, Minelli A, Alvisi C, Vanoli A, Calliada F, Dionigi P, Perotti C, Locatelli F, Corazza GR (2011) Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut* 60: 788-798
153. Phadke A, Hwang Y, Kim SH, Kim SH, Yamaguchi T, Masuda K, Varghese S (2013) Effect of scaffold microarchitecture on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 25: 114-128
154. Khojasteh A, Behnia H, Hosseini FS, Dehghan MM, Abbasnia P, Abbas FM (2013) The effect of PCL-TCP scaffold loaded with mesenchymal stem cells on vertical bone augmentation in dog mandible: a preliminary report. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater, w druku*

155. Crowley C, Wong JM, Fisher D, Khan WS (2013) A systematic review on preclinical and clinical studies on the use of scaffolds for bone repair in skeletal defects. *Curr Stem Cell Res Ther* 8: 243-252
156. Ouyang H, W, Cao T, Zou XH, Heng BC, Wang LL, Song XH, Huang HF (2006) Mesenchymal stem cell sheets revitalize nonviable dense grafts: implications for repair of large-bone and tendon defects. *Transplantation* 82: 170-174
157. Butler DL, Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, Shearn JT, Gooch C, Awad H (2008) Functional tissue engineering for tendon repair: A multidisciplinary strategy using mesenchymal stem cells, bio-scaffolds, and mechanical stimulation. *J Orthop Res* 26: 1-9
158. Gulotta LV, Chaudhury S, Wiznia D (2012) Stem cells for augmenting tendon repair. *Stem Cells Int* 2012: 291431
159. Alberton P, Popov C, Präger M, Kohler J, Shukunami C, Schieker M, Docheva D (2012) Conversion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into tendon progenitor cells by ectopic expression of scleraxis. *Stem Cells Dev* 21: 846-858
160. Valina C, Pinkernell K, Song Y-H, Bai X, Sadat S, Campeau RJ, Thierry H, Le Jemtel TH, Alt E (2007) Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodeling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 28: 2667-2677
161. Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Tan J, Fishbein MC, Chen P-S, March KL (2009) IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells* 27: 230-237
162. Schenke-Layland K, Strem BM, Jordan MC, DeEmedio MT, Hedrick MH, Roos KP, Fraser JK, MacLellan WR (2009) Adipose tissue-derived cells improve cardiac function following myocardial infarction. *J Surg Res* 153: 217-223
163. Lopez Y, Lutjemeier B, Seshareddy K, Trevino EM, Hageman KS, Musch TI, Borgarelli M, Weiss ML (2013) Wharton's jelly or bone marrow mesenchymal stromal cells improve cardiac function following myocardial infarction for more than 32 weeks in a rat model: a preliminary report. *Curr Stem Cell Res Ther* 8: 46-59
164. Lopez MJ, McIntosh KR, Spencer ND, Borneman JN, Horswell R, Anderson P, Yu G, Gaschen L, Gimble JM (2009) Acceleration of spinal fusion using syngeneic and allogeneic adult adipose derived stem cells in a rat model. *J Orthop Res* 27: 366-373
165. Kishk NA, Gabr H, Hamdy S, Afifi L, Abokresha N, Mahmoud H, Wafaie A, Bilal D (2010) Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair* 24: 702-708
166. Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N, Nagata I (2013) Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke. *Stroke* 44: 720-726
167. Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Teresa Vallejo-Cremades M, Fuentes B, Cerdán S, Díez-Tejedor E (2013) Effects of intravenous administration of allogeneic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther* 4: 11
168. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A et al. (2009) Immunomodulatory function of bone marrow derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol* 183: 993-1004
169. Ezquer ME, Ezquer FE, Arango-Rodríguez ML, Conget PA (2012) MSC transplantation: a promising therapeutic strategy to manage the onset and progression of diabetic nephropathy. *Biol Res* 45: 289-96
170. Peng L, Xie DY, Lin BL, Liu J, Zhu HP, Xie C, Zheng YB, Gao ZL (2011) Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: Short-term and long-term outcomes. *Hepatology* 54: 820-828
171. Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, Telkabadi M, Atashi A, Honardoost M, Zali MR, Soleimani M (2009) Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: A phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 21: 1199-1205
172. Tsai CC, Huang TF, Ma HL, Chiang ER, Hung SC (2012) Isolation of mesenchymal stem cells from shoulder rotator cuff: potential source for muscle and tendon repair. *Cell Transplant* 22: 413-422
173. Winkler T, von Roth P, Radojewski P, Urbanski A, Hahn S, Preininger B, Duda GN, Perka C (2012) Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats. *J Tissue Eng Regen Med* 6 Suppl 3: 60-67
174. Semont A, Francois S, Mouisseddine M, Francois A, Sache A, Frick J, Thierry D, Chapel A (2006) Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. *Adv Exp Med Biol* 585: 19-30
175. Kotenko K, Moroz B, Nadezhina N, Galstyan I, Eremin I, Deshevoy J, Lebedev V, Slobodina T, Grinakovskaya D, Zhgutov Y, Bushmanov A (2012) Successful treatment of localised radiation lesions in rats and humans by mesenchymal stem cell transplantation. *Radiat Prot Dosimetry* 151: 661-665
176. François M, Birman E, Forner KA, Gaboury L, Galipeau J (2012) Adoptive transfer of mesenchymal stromal cells accelerates intestinal epithelium recovery of irradiated mice in an interleukin-6-dependent manner. *Cytotherapy* 14: 1164-1170

Mesenchymal Stem Cells

Zygmunt Pojda[✉], Eugeniusz Machaj, Agata Kurzyk, Sławomir Mazur, Tomasz Dębski, Joanna Gilewicz, Juliusz Wysocki

Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, 5 Roentgena St., 02-781 Warsaw, Poland

[✉]e-mail: zpojda@coi.waw.pl

Key words: mesenchymal stem cells, MSC, multipotentiality, differentiation, regenerative medicine

ABSTRACT

The multipotential progenitor cells called „Mesenchymal Stem Cells” (MSC) are capable of differentiation at least into bone, cartilage, and adipose tissues. The commonly recognized role of these cells is the formation of connective tissue which participates in formation of every organ. The progeny of MSC produces also the hematopoietic microenvironment, recently it have been documented that these cells are capable of the modulation of the immune system activities. MSC are isolated from the tissues of fetal origin (umbilical cord, cord blood, or placenta), or from several adult donor sites, in particular from bone marrow and adipose tissue which are most useful for practical purposes. The capability of multipotential differentiation, immunomodulation, and the regulation of the endogenous tissue repair are the reasons why mesenchymal stem cells are widely applied for regenerative medicine purposes.