

# Procesy starzenia komórek krwiotwórczych i układu białokrwinkowego

The aging of hematopoietic stem cells and white blood cells

Joanna Kopeć-Szlęzak

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

## Streszczenie

Zmiany związane z procesem starzenia organizmu obejmują komórki krwiotwórcze (KK) i komórki układu białokrwinkowego. W organizmie starszym następuje zaburzenie proporcji pomiędzy trzema subpopulacjami komórek macierzystych: Ly-bi o ukierunkowaniu głównie limfoidalnym, My-bi — o przeważającym ukierunkowaniu różnicowania komórek w linii mieloidalne i subpopulacji „zrównoważonej” (Bala). Powstaje znaczna przewaga liczebności komórek różnicujących się w kierunku linii mieloidalne, przy jednoczesnym zaniku komórek różnicujących się w limfocyty. Zmianom proporcji subpopulacji komórek krwiotwórczych towarzyszą zmiany w fenotypie, zdolności samoodnawiania i prawidłowego różnicowania poszczególnych komórek. Zmiany w układzie białokrwinkowym to zaburzenia funkcjonowania komórek odporności wrodzonej: obniżenie aktywności fagocytarnej i bakteriobójczej neutrofilów i makrofagów, obniżenie zdolności prezentacji antygeny przez komórki dendrytyczne i zmniejszenie właściwości cytotoksycznych komórek NK. Istotne zmiany dotyczą komórek odporności nabytej tj. limfocytów T i B, przejawiające się w redukcji liczebności tych populacji, zwłaszcza CD4+, zmiany proporcji subpopulacji komórek „naiwnych” i pamięci na korzyść tych ostatnich, obniżenie zdolności tworzenia synaps immunologicznych i osłabienie odpowiedzi na szczepionki. Zmianom tym towarzyszy wzrost stężenia cytokin prozapalnych.

**Słowa kluczowe:** komórki krwiotwórcze, leukocyty, starzenie się

*J. Transf. Med.* 2013; 6: 8–16

## Summary

The hematopoietic system does not escape the negative effects of aging. Aging of the hematopoietic cells (HSC) compartment causes marked shift in representation of three main subsets (Lymphoid-biased, Myeloid-biased and Balanced-biased) and myeloid biased cells accumulate in the aged bone marrow. Aged HSCs show the self-renewal not complete and the reduction of activity. In the aging of the hematopoiesis both stem cells intrinsic and extrinsic (micro-environmental) factors are involved. Simultaneously the remodeling of the innate immune system is evidenced and defective activation, decreased chemotaxis as well as phagocytosis and intracellular killing of pathogens by neutrophils and macrophages have been described. Also NK cells show decreased cytotoxicity and dendritic cells — weak antigen presenting process. Immunosenescence of cellular and humoral adaptive response manifested in the reduction of T and B precursors and mature lymphocytes number, especially T CD4+ naïve cells. This

*remodeling of immune system is connected with impaired reaction for vaccination and increased susceptibility to infections. In aging the concentration of pro-inflammatory cytokins in peripheral blood is increased.*

**Key words:** aging, HSC compartment, leukocyte

*J. Transf. Med. 2013; 6: 8–16*

## Wstęp

Ostatnie lata przyniosły wiele badań nad procesami starzenia komórek układu krwiotwórczego, głównie z powodu starzenia się populacji ludzkiej, zwłaszcza w USA i Unii Europejskiej. Występujące w starszym wieku przewlekłe procesy zapalne, zakażenia bakteryjne i wirusowe, obniżona odpowiedź na szczepionki, a także procesy nowotworowe układu krwiotwórczego oraz inne nowotwory są związane z zaburzeniami w prawidłowej strukturze systemów komórkowych i samych komórek krwiotwórczych (KK) oraz komórek układu odpornościowego [1, 2].

Zmiany związane z procesem starzenia organizmu obejmujące zarówno hematopoetyczne komórki macierzyste i progenitorowe, jak i komórki układu białokrwinkowego zachodzą nie tylko w samych komórkach, ale i w mikrośrodowisku tych komórek, takich jak szpik czy grasica. Przejawem tych zmian są zaburzenia w prawidłowym powstawaniu dojrzałych komórek krwi i ich wychodzeniu ze szpiku (tzw. *aging hematopoietic system*), a także zmiany w układzie odpornościowym (tzw. *immunosenescence*). Generalną zmianą jest utrata aktywności przez komórki krwiotwórcze [3, 4], a w układzie odpornościowym — nieprawidłowa odpowiedź na czynniki patogenne zarówno procesów z zakresu odporności wrodzonej, jak i nabytej.

## Procesy starzenia się komórek krwiotwórczych

Proces starzenia się hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych (HSC, *hematopoietic stem cells/HPC*, *hematopoietic progenitor cells*) wraz z wiekiem organizmu jest ogólnie znany. Przyjmowany do niedawna pogląd o homogenicznej strukturze populacji komórek macierzystych został zastąpiony poglądem, że populacja ta jest heterogenna i u młodych oraz dorosłych organizmów zawiera trzy wyraźne subpopulacje, które odróżnia kryterium programów ich różnicowania: limfoidalny (Ly-bi), mieloidalny (My-bi) i zbalansowany (Bala) [5]. W subpopulacji Bala równowaga nie oznacza równej liczby komórek

różnicujących się w linie mieloidalne i limfoidalne, ale odpowiada prawidłowym proporcjom komórek linii mielo- i limfoidalnej wychodzących ze szpiku do krwi obwodowej. Subpopulacje te odpowiadają w różnorodny sposób na działanie tych samych cytokin; np. niskie dawki TGF- $\beta$  (*transforming growth factor*) stymulują aktywność My-bi, ale powodują supresję subpopulacji Ly-bi [6].

Proces starzenia organizmu powoduje istotne zmiany w proporcjach między tymi subpopulacjami — zmniejszenie liczebności komórek z programem rozwoju i różnicowania w kierunku limfoidalnym i znaczącej przewadze liczebności komórek HSC w kierunku różnicowania w komórki mieloidalne. Przyczyną dominacji linii mieloidalnej w szpiku w starszym organizmie może być ich dłuższy okres przeżywania (*life span*) lub większa zdolność do samoodnawiania, niezależna od wieku. Zmniejszenie populacji o ukierunkowaniu limfoidalnym znajduje wyraz w redukcji prekursorów komórek T i B [7].

Starzenie się komórek hematopoetycznych jest inicjowane i regulowane w sposób kierunkowy poprzez wpływ czynników zewnętrznych (mikrośrodowisko) i wewnętrznych (genom).

## Zmiany w mikrośrodowisku komórek macierzystych

Obecnie uważa się, że mikrośrodowisko jest zdolne wpływać na różnicowanie i proliferację komórek macierzystych, przy czym i samo mikrośrodowisko ulega procesom starzenia „faworyzując” wytwarzanie pojedynczych klonów komórek macierzystych, co ułatwia ich przejście do „monoklonalności”. Na modelu mysim wykazano, że taka sama pula komórek macierzystych w mikrośrodowisku w organizmie starym (u myszy jest to 18.–20. mies. życia) daje znacznie mniejszą liczbę klonów komórkowych w porównaniu z mikrośrodowiskiem w organizmie młodym (2 mies.) [8]. Opisano także zmiany w starzejącym się mikrośrodowisku dotyczące występowania cytokin i chemokin. Stwierdzono między innymi wysokie stężenie prozapalnej chemokiny RANTES/CCL5 z jednoczesnym ubytkiem prekursorów limfocytów T i wzrostem liczby komórek ukierunkowanych w linię mieloidalną. Zwierzęta doświadczalne

pozbawione tej chemokiny reagowały zmniejszeniem liczby komórek ukierunkowanych w linie mieloidalną i zwiększeniem liczby komórek różnicujących się w linie limfoidalne [9].

Istotną zmianą w starzejącym się mikrośrodoisku jest lokowanie się wczesnych progenitorowych komórek krwiotwórczych w większej odległości od okostnej wewnętrznej niż w mikrośrodoisku osobników młodych i jednocześnie zmniejszenie adhezji do komórek mikrośrodoiska. Zaobserwowano, że u starszych myszy średnia odległość od okostnej wewnętrznej wynosiła około 18  $\mu\text{m}$ , a maksymalna do 40  $\mu\text{m}$ , zaś u młodych — około 10  $\mu\text{m}$ . Na komórkach macierzystych zanotowano zmniejszony poziom ekspresji molekuł adhezyjnych CD49d, CD44 i CD31, przy czym między poziomem ekspresji CD49d a odległością od okostnej wewnętrznej stwierdzono korelację ujemną: im komórka macierzysta znajdowała się dalej od okostnej, tym ekspresja CD49d była silniejsza [10]. Kolejne opisane zmiany w mikrośrodoisku starszego organizmu to zwiększona liczba komórek tłuszczowych i włókien, co jest oznaką starzejącej się niszy komórki macierzystej i co wpływa na dynamikę i aktywność komórki macierzystej w mikrośrodoisku [8]. Innym elementem związanym z kontaktowaniem się komórki macierzystej z mikrośrodoiskiem jest zmniejszenie zawartości koneksyny 43 (składnika połączeń międzykomórkowych *gap junctions*) wraz z wiekiem, co skutkuje upośledzeniem zdolności przenoszenia rodników tlenowych ROS z komórki macierzystej do mikrośrodoiska, a nagromadzone rodniki tlenowe wywołują procesy starzenia się komórki macierzystej [11].

### Zmiany w komórkach macierzystych

Z badań nad genomem w komórkach macierzystych w starszym wieku wynika, że z 14 000 analizowanych genów u myszy 1500 wraz z wiekiem wzmagają swoją aktywność, a 1600 obniżało swoją aktywność [12]. U dawców pomiędzy 27. a 73. rokiem życia stwierdzono, że w komórkach macierzystych aktywność 432 genów wraz z wiekiem zwiększała się, a 495 genów — ulegała obniżeniu. Geny o zredukowanej aktywności transkrypcyjnej to geny zaangażowane w integralność genomu oraz w regulację procesów transkrypcyjnych. Jednocześnie autorzy tej pracy obserwowali u starszych ludzi zmienność aktywności telomerazy i długości telomerów i uważają, że nie jest to główna przyczyna starzenia fenotypu komórek macierzystych [13].

Z procesem starzenia się komórek macierzystych związana jest zmiana aktywności elementów

wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych, do których należy na przykład czynnik transkrypcyjny STAT3 czy białko RBM15 (oznaczane także jako Ott1), wiążące się z RNA za pomocą kilku domen [14]. W komórkach macierzystych myszy stwierdzono, że brak tego czynnika powoduje pojawienie się fenotypu charakterystycznego dla „starej” komórki macierzystej [15], a brak białka RBM15 skutkuje niemożnością utrzymania komórki macierzystej w stanie spoczynku w przypadku działania stresu, co charakteryzuje także proces starzenia tych komórek [16].

W wielu pracach opisuje się zmiany cyklu komórkowego i dynamiki procesów proliferacji komórek krwiotwórczych w zależności od wieku organizmu. Odsetek komórek w chodzących w cykl komórkowy w dorosłym wieku obliczono na 5–11% w ciągu doby, a w wieku starszym — na około 5% w ciągu 52 godzin. Jednak odsetek komórek macierzystych w stanie spoczynku nie różnił się od odsetka w wieku młodym i wynosił około 95% [17]. Autorzy ci twierdzą również, że z wiekiem obniża się aktywność substancji regulujących cykl komórkowy, a nie zmienia się poziom ich ekspresji. Niektórzy starzenie się komórek macierzystych określają jako „niemożność wejścia w G1” cyklu komórkowego, ma to też związek z aktywnością genu *p53*, odgrywającego rolę w promowaniu stanu spoczynkowego, a wchodzenie w cykl komórkowy ze stanu spoczynku komórki macierzystej lub w podział procesu samoodnawiania czy też różnicowania wiąże się z obniżeniem aktywności tego genu [18]. Utrata zdolności samoodnawiania znajduje wyraz w zastąpieniu podziałów tzw. asymetrycznych, w których powstaje komórka macierzysta, jako proces samoodnawiania i komórka ulegająca różnicowaniu do stadiów dojrzałych komórek krwi, na podziały tzw. symetryczne, gdzie obie potomne komórki podlegają tylko procesowi różnicowania [19].

Podsumowując, można powiedzieć, że cechy starzenia się komórek krwiotwórczych to a) zmiany aktywności odpowiednich fragmentów genomu, b) nieprawidłowe procesy samoodnowy i c) uszkodzenie odpowiedzi na sygnały mikrośrodoiska, w tym — na działanie cytokin [20].

Niektórzy badacze przez „poprawianie” przewodzenia sygnałów działania cytokin próbowali doświadczalnie przeciwdziałać procesom starzenia się komórek macierzystych [21].

Większość badań nad starzeniem się komórek krwiotwórczych jest prowadzona na modelu mysim, jednak grupa badaczy z USA (m.in. z *Harvard Medical School*) uważa, że starzenie się układu krwiotwórczego jest procesem ewolucyjnie kon-



serwatycznym i procesy te u człowieka i myszy są bardzo zbliżone [22]. Na koniec należy dodać, że — jak pokazują wyniki niektórych badań, pomimo procesów starzenia się układu krwiotwórczego komórki macierzyste u ludzi powyżej 60. roku życia, zebrane drogą mobilizacji dla autoprzeszczepu, wykazują *in vitro* zdolność tworzenia kolonii nieróżniącą się od komórek CD34+ pobranych od młodych dawców [23]. W niektórych pracach wiek 60 lat określa się jako „średni”, a za wiek starszy uznaje się powyżej 75. roku życia, młody — między 20. a 35. rokiem życia.

### **Starzenie się komórek układu odpornościowego**

Zmiany związane z wiekiem dotyczą w różnym stopniu komórek odporności wrodzonej tj. komórek NK, komórek dendrytycznych, monocytów/makrofagów, granulocytów (głównie neutrofilów), a także komórek NKT, czyli komórek o właściwościach komórek NK z ekspresją molekuly CD3, charakterystycznej dla limfocytów T. Komórki odporności nabytej ulegają redukcji liczebności, a także zmianom proporcji poszczególnych subpopulacji limfocytów T i B przy jednoczesnych zmianach funkcjonalnych, w zależności od rodzaju subpopulacji tych komórek.

### **Zmiany komórek układu odporności wrodzonej**

#### **Komórki NK**

Subpopulacje komórek NK zmieniają się w procesie starzenia się organizmu pod względem proporcji komórek o aktywności głównie cytotoksycznej i komórek wytwarzających cytokiny. Liczba komórek o silnej ekspresji CD56 i słabej CD16, którą charakteryzuje wysoki poziom wydzielania cytokin, zmniejsza się wraz z wiekiem, co powoduje obniżenie poziomu wydzielania takich cytokin jak IL-8 (*interleukin 8*), chemokin RANTES/CCL5 (*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*) i MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (*macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* ), a zwłaszcza IFN- $\gamma$  (*interferon-gamma*) i TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor alfa*). Natomiast subpopulacja o właściwościach cytotoksycznych CD56-/+CD16+, wykazuje wzrost liczebności [24]. Wprawdzie utrzymanie zdolności cytotoksycznych powinna zabezpieczać zwiększona liczba komórek NK CD56-/+CD16+, ale stwierdzono obniżenie aktywności tych komórek NK, na przykład zmniejszenie ekspresji perforyn, co upośledza rozpoczęcie procesu cytotoksycznego wobec patogennej komórki czy też spowolnienie migracji

komórek NK do węzłów chłonnych oraz obniżenie ekspresji receptorów immunoglobulinopodobnych i receptorów cytotoksyczności naturalnej [25].

Ekspresja molekuly CD57 na komórkach NK, markera komórek o wysokim stopniu zróżnicowania, zwiększa się u osób starszych, co powoduje zmianę profilu populacji NK w kierunku komórek o wysokim stopniu zróżnicowania na niekorzyść komórek mniej dojrzałych. Świadczy to również o zmniejszeniu zdolności proliferacyjnych komórek NK [26]. Stymulatorem rozwoju komórek NK i ich przeżycia jest IL-15, jednak w starszym wieku następuje obniżenie poziomu wytwarzania tej interleukiny, między innymi wskutek zmniejszenia masy mięśni, które są jednym ze źródeł jej wytwarzania [27].

#### **Komórki NKT**

U osób w starszym wieku nie obserwowano zmniejszenia liczebności tych komórek, a niekiedy notowano wzrost ich liczby w krwi obwodowej i w węzłach chłonnych (150–400%) w porównaniu z wiekiem młodym [28]. Na podstawie badań *in vitro* stwierdzono, że profil wydzielanych cytokin przez komórki NKT osób w wieku starszym jest zbliżony do profilu cytokin wytwarzanych przez limfocyty Th2 (IL-3, IL-4, IL-10), inaczej niż u ludzi młodych, u których przeważają cytokiny wydzielane przez limfocyty Th1, na przykład IL-2 [29]. Na komórkach NKT stwierdzono także obniżenie ekspresji receptora CD94/Kp43, inhibitora reakcji cytotoksyczności oraz możliwość migracji NKT ze szpiku wprost do wątroby, z pominięciem grasicy. Te zmiany są tłumaczone jako rekompensata zmniejszenia potencjału reakcji cytotoksycznych układu odpornościowego, podobnie jak zwiększenie wydzielania interferonu INF- $\alpha$  przez komórki NKT z receptorem TCR  $\gamma\delta$  [2].

#### **Komórki dendrytyczne**

Zmiany liczebności komórek dendrytycznych (DC, *dendritic cells*) w starszym wieku przejawiają się w zredukowaniu zwłaszcza komórek plazmocytoidalnych (pDC), przy jednoczesnym obniżeniu poziomu wydzielania przez te komórki cytokin — głównie interferonu IFN- $\alpha$  [30]. Opisano także osłabienie zdolności migracyjnych tych komórek i zdolności fagocytarnych, jednakże istotną zmianą wydaje się zmniejszenie ekspresji receptorów CD283/TLR 3 (*Toll-like receptor*) i CD288/TLR8 na komórkach dendrytycznych pochodzenia mieloidalnego (mDC) i receptora TLR7 na komórkach dendrytycznych plazmocytoidalnych pDC. Te molekuly na komórkach dendrytycznych służą jako

receptory rozpoznające molekuly związane z patogenami, na przykład pochodzenia bakteryjnego, a obniżenie ich ekspresji powoduje zwiększenie podatności na infekcje [31]. Równolegle zanotowano zmniejszenie poziomu wydzielania interleukin IL-6 i/lub IL-12 przez komórki dendrytyczne pochodzenia mieloidalnego oraz TNF- $\alpha$  i interferonu IFN- $\alpha$  przez plazmocytoidalne komórki dendrytyczne. Obniżenie poziomu wytwarzania interferonu wywołuje zmniejszenie odporności antywirusowej u ludzi starszych, a także osłabia odpowiedź na szczepienia na przykład przeciw grypie [31].

Komórki dendrytyczne jako jedyne wśród komórek prezentujących antygen (APC, *antigen presenting cells*) mają zdolność aktywowania naiwnych komórek T, co jest krytycznym warunkiem powstania właściwej odpowiedzi immunologicznej na nowe antygeny. Z obserwacji niektórych autorów wynika, że komórki starszych osób mogą wykazywać zaburzenia tego procesu, potwierdza się też obniżenie zdolności fagocytarnych komórek dendrytycznych wobec własnych antygenów związanych z powstawaniem komórek apoptotycznych [30].

### Monocyty/makrofagi

We krwi obwodowej dorosłych osób około 95% populacji monocytów stanowią komórki o fenotypie CD14+CD16- a tylko pozostałe 5% — komórki o niższej ekspresji CD14 i wyraźnej ekspresji CD16; u ludzi starszych zwiększa się liczebność subpopulacji z ekspresją CD16 (tzw. „nieklasycznych”). Towarzyszy temu wzmożona ekspresja molekuly adhezyjnej CD11b oraz zmniejszona ekspresja molekuly „aktywacyjnej” CD38, selektyny CD62L oraz CD115 — receptora dla czynnika M-CSF (makrofagowy czynnik wzrostu [*macrophage-specific colony-stimulating factor*]) [32]. Zaobserwowano także, że monocyty krwi obwodowej starszych kobiet różnią się nieco w strukturze subpopulacji od mężczyzn: mniej jest monocytów nieklasycznych i wyższy poziom ekspresji CD115. U osób starszych na krążących monocytach stwierdzono też obniżenie ekspresji receptorów „rozpoznających” bakterie: TLR1 i TLR2, zmniejszenie wytwarzania cytokin IL-6 i TNF- $\alpha$ , a także redukcję zdolności fagocytarnych monocytów [30].

W szpiku osób po 80. roku życia stwierdzono zmniejszenie liczebności populacji makrofagów i zwiększenie częstości apoptozy tych komórek, a także skłonności do obniżenia poziomu chemotaksji i zdolności do fagocytozy. Na makrofagach tych zanotowano też mniejszą ekspresję receptora TLR3, co wpływa ujemnie na reakcję odpornościowe

u ludzi starszych [33]. Obniżenie stopnia ekspresji poziomu aktywatora transkrypcji STAT-1 i zmniejszenie aktywności czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (np. po działaniu LPS bakterii *in vitro*), jako elementów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej stwierdzono w makrofagach uzyskanych od starszych myszy [34]. Ponadto aktywowane mysie i ludzkie makrofagi wytwarzają w wieku starszym więcej prostaglandyny PGE2 niż w wieku młodym, co może się wiązać z rozchwianiem odpowiedzi immunologicznej. Stwierdzono bowiem na modelu mysim, że prostaglandyna zmienia funkcje komórek dendrytycznych poprzez zmniejszenie ekspresji MHC-II oraz przez supresję wydzielania interleukiny IL-12 i IL-2, co obniża odpowiedź proliferacyjną limfocytów T. Badania na modelu mysim pokazały również, że makrofagi starsze wydzielają mniej czynnika wzrostu naczyń (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) niż młode, co spowalnia angiogenezę i może opóźnić gojenie ran [35, 36].

### Neutrofile

Wraz z wiekiem nie zaobserwowano zmian liczebności populacji neutrofilów ani też granulopoezy pod wpływem działania GM-CSF (*granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor*). Stwierdzono jednak obniżenie wrażliwości na działanie G-CSF, a także obniżenie ekspresji receptorów bakteryjnych TLR2 i TLR4, choć przepływ sygnałów od receptora TLR4 do wnętrza komórki jest niezmienny [36, 37]. Jednocześnie zanotowano zmniejszenie ekspresji molekuly związanej z adhezją: CD15 i integryny CD11b oraz obniżenie zdolności chemotaktycznych w odpowiedzi na działanie GM-CSF i osłabienie drogi sygnalizacyjnej wewnątrz komórki z udziałem białek o własnościach inhibitorów przewodzenia sygnalizacji: SHP-1 (z rodziny niereceptorowych fosfatyz tyrozyny) i SOCS (*suppressors of cytokine signaling*) [37]. Nie stwierdzono jednak osłabienia odpowiedzi chemotaktycznej neutrofilów na działanie lipopolisacharydów pochodzenia bakteryjnego — LPS [38]. Wielu autorów zgodnych jest co do obniżania się z wiekiem zdolności fagocytarnej i własności bakteriobójczych neutrofilów za pomocą reakcji utleniającej (*oxydative burst*), między innymi za przyczyną obniżenia ekspresji receptora CD16 (Fc $\gamma$ ) na powierzchni tych komórek, koniecznego do rozpoczęcia procesu bakteriobójczego [38]. Jest interesujące, że u stulatków opisano zachowanie zdolności procesów antyoksydacyjnych w neutrofilach na poziomie ludzi młodych w przeciwieństwie do grupy starszych osób pomiędzy 65. a 90. rokiem życia; autorzy tłumaczą to utrzymaniem

dobrej „kondycji” zdrowotnej, w tym odporności, pozwalającej na osiągnięcie długowieczności u tej grupy ludzi [39].

Z najnowszych badań nad neutrofilami wynika, że komórki te u myszy i człowieka mają rearanżowane receptory typu TCR, tzw. *TCR-like immune receptors* — TCRL [40]. Około 5–8% neutrofilów we krwi wykazuje obecność łańcuchów  $\alpha\beta$  TCR. Stwierdzono, że powyżej 70. roku życia przeważają neutrofile z TCR V  $\beta$ , co wskazuje na zmiany tego receptora wraz z wiekiem.

Istotną zmianą funkcjonalną neutrofilów w starszym wieku jest upośledzenie procesu ucieczki przed apoptozą, wskutek zaburzeń hamowania aktywności kaspazy. Efektem jest skrócony czas przeżycia tych komórek i jako działanie niepożądane — duża liczba apoptotycznych neutrofilów w miejscu procesu zapalnego. Powoduje to z kolei utrudnienie ich fagocytozy przez makrofagi, czego następstwem jest częsty w starszym wieku przewlekły stan zapalny [41], zwłaszcza przy obniżonych własnościach bakteriobójczych i grzybobójczych neutrofilów.

Zmniejszenie aktywności komórek układu odporności wrodzonej ma znaczenie przede wszystkim w upośledzeniu pierwszego zetknięcia organizmu z patogenem, a brak właściwej reakcji obronnej na tym etapie jest przyczyną ogólnego osłabienia odporności i przetrwałych stanów zapalnych u ludzi w wieku starszym. Uważa się jednak, że bardziej znaczące zmiany związane z wiekiem dotyczą komórek układu odporności nabytej [2].

## **Zmiany komórek układu odporności nabytej**

### **Limfocyty T**

U podstaw zmian w populacji limfocytów T znajduje się inwolująca z wiekiem grasica, która u osoby w wieku lat 70 jest niemal całkowicie wypełniona tkanką tłuszczową, a także modyfikacja proporcji pomiędzy typami komórek macierzystych w szpiku osób w starszym wieku. Zmiany ogólne to przede wszystkim obniżenie bezwzględnej liczby limfocytów, zwłaszcza subpopulacji limfocytów T CD4<sup>+</sup> (pomocniczych), i odwrócenia wartości proporcji CD4:CD8 na korzyść limfocytów CD8, a także zmniejszenie zdolności komórek T do tworzenia synapsy immunologicznej, czyli połączenia pomiędzy komórką prezentującą antygen a limfocytym T [42].

Procesy destrukcyjne w grasicy dotyczą defektów funkcjonalnych i proliferacyjnych komórek nabłonkowych i brak wytwarzania IL-7, co ma bez-

pośredni wpływ na zaburzenia rozwoju tymocytów w limfocyty T i powstawanie mniejszej liczby limfocytów T naiwnych w starszym wieku, zwłaszcza po 70. roku życia, przy czym obniżenie odpowiedzi na szczepienia występuje już po 65. roku życia [43]. Ponadto, w starszym wieku stwierdzono większą podatność na apoptozę tych limfocytów wskutek obniżenia poziomu białka antyapoptotycznego bcl-2 oraz wzrost poziomu kaspazy 8 i 3 w limfocytach T naiwnych [44]. Limfocyty T CD4 naiwne zachowują jednak zdolność do przekształcania w limfocyty Th17, które mogą wytwarzać nie tylko cytokinę IL-17, która pobudza makrofagi do wytwarzania innych cytokin uczestniczących w reakcjach odpornościowych, ale także cytokinę IL-21 zwiększającą cytotoksyczność komórek NK [45].

Jednocześnie obserwuje się wzrost liczebności subpopulacji limfocytów T pamięci, które wykazują spadek ekspresji molekuly kostymulacyjnej CD28, aż do całkowitego jej braku, co powoduje powstawanie tak zwanych limfocytów anergiczych, czyli niereagujących na stymulację antygenową (zwłaszcza po 65. rż.) i również podatnych na apoptozę [46]. Maleje jednocześnie udział w populacji limfocytów T efektorowych, co znajduje wyraz w obniżeniu kontroli zakażeń wirusowych w starszym wieku [47].

Liczebność subpopulacji limfocytów T regulacyjnych (Treg) wzrasta, co wiąże się między innymi ze zwiększoną tolerancją powstających komórek nowotworowych. Równolegle stwierdzona supresja funkcji cytotoksycznych limfocytów T CD8, na przykład obniżenie poziomu wydzielania granzymu, także zmniejsza zdolność obrony przeciwnowotworowej układu odpornościowego [45]. Limfocyty T w starszym wieku wykazują również zmiany w samej komórce: głównie zaburzenia struktury cytoszkieletu i defekty w przechodzeniu sygnału przez receptor TCR [48], a także istotne zmniejszenie wydzielania IL-2, co wpływa niekorzystnie na przebieg reakcji odpornościowych.

Niekorzystne dla odporności organizmu zmiany prawidłowej aktywności funkcjonalnej populacji limfocytów T stały się przyczyną przeprowadzania prób „poprawiających” niedomogi limfocytów T na modelach doświadczalnych. Uzyskano między innymi na modelu mysim odnowę struktury grasicy poprzez zastosowanie hormonu greliny, którego zawartość spada w grasicy wraz z wiekiem, a który spowodował w tym doświadczeniu zwiększenie tymopoezy [49].

### **Limfocyty B**

Wraz z wiekiem obniża się liczba komórek pro-B w szpiku i zmniejsza zdolność różnicowania

w komórki pre-B — w efekcie następuje redukcja liczebności limfocytów B w krwi obwodowej. Jedną z przyczyn może być zaobserwowane zmniejszenie ekspresji molekuly powierzchniowej BAFF (*B cell activating factor*) i zawartości ligandu APRIL (*A proliferation inducing ligand*) w zmienionym w wieku starszym mikrośrodowisku szpiku [50]. Jednocześnie zmienia się równowaga pomiędzy pulą naiwnych limfocytów B (CD19+CD27-) i limfocytów B pamięci na korzyść zwiększenia puli komórek pamięci CD19+CD27+ [51]. Stwierdzono także, że z wiekiem maleje liczba limfocytów B w centrach rozrodczych węzłów chłonnych i liczba komórek wytwarzających IgM, co przy równoczesnej redukcji liczby limfocytów T CD4+ powoduje

osłabienie reakcji odpornościowych w organizmie, zwłaszcza na nieznane dotąd antygeny [28].

Zmiany w limfocytach B pojawiają się w starszym wieku przejawiają się również w upośledzeniu sygnalizacji wewnątrzkomórkowej, na przykład redukcji aktywności kinazy tyrozynowej PTK i ekspresji kinazy proteinowej C [52], a także ekspresji czynnika transkrypcyjnego E47. W populacji limfocytów B zwiększa się mało liczna w młodszym wieku subpopulacja limfocytów B CD5+ (B1), co często daje wzrost autoreaktywności u osób starszych [53]. W przypadku limfocytów B również próbowano u starszych myszy doświadczalnych stosować procesy odnawiające populację poprzez usunięcie komórek tak zwanych długo żyjących;

**Tabela 1.** Zmiany związane ze starzeniem się komórek macierzystych i układu białokrwinkowego [wg 1, 2, 6]

**Table 1.** The aging-connected changes in hematopoietic and white blood cells [acc.1, 2, 6]

Rodzaj komórek	Główne zmiany komórek	Skutek czynnościowy
Komórka macierzysta	Przewaga mielopozy nad limfopożą Niekompletny proces samoodnawiania Obniżenie zdolności proliferacyjnych	Upośledzenie odporności Obniżenie poziomu hematopozy
<b>Komórki odporności wrodzonej:</b>		
<b>Neutrofile</b>	Zmniejszenie chemotaksji Zmniejszenie fagocytozy Zmniejszenie własności bakteriobójczych	Upośledzenie aktywności przeciwbakteryjnej
<b>Makrofagi</b>	Wzrost syntezy cytokin prozapalnych Zmniejszenie fagocytozy Zmniejszenie własności bakteriobójczych	Przewlekłe stany zapalne Upośledzenie aktywności przeciwbakteryjnej
<b>Komórki dendrytyczne</b>	Obniżenie ekspresji receptorów TLR Obniżenie wytwarzania interferonu $\gamma$	Obniżenie prezentacji antygenów limfocytom T Obniżenie odporności przeciwwirusowej
<b>Komórki NK</b>	Obniżenie zdolności proliferacyjnych w odpowiedzi na IL-2 Obniżenie własności cytotoksycznych	Obniżenie odporności przeciwnowotworowej
<b>Komórki NKT</b>	Zmiana profilu wydzielanych cytokin Obniżenie własności cytotoksycznych	Obniżenie reakcji na stymulację antygenami
<b>Komórki odporności nabytej:</b>		
<b>Limfocyty T</b>	Zmniejszenie liczby limfocytów T, głównie CD4+ naiwnych Zwiększenie liczby limfocytów pamięci T CD4+ Obniżenie proliferacji limfocytów cytotoksycznych T CD8+ w odpowiedzi na IL-2 i antygeny	Oslabienie odpowiedzi na szczepionki Zmniejszenie tworzenia synaps immunologicznych Obniżenie odporności przeciwnowotworowej
<b>Limfocyty B</b>	Zmniejszenie liczby limfocytów B, głównie naiwnych Zwiększenie liczby limfocytów B pamięci oraz BCD5+ Zmniejszenie proliferacji w odpowiedzi na IL-7	Oslabienie odpowiedzi na szczepionki Zwiększenie autoreaktywności



efektem było wzmocnienie limfopoetyki komórek linii B i zwiększenie immunokompetencji [54].

Oslabienie reakcji układu odpornościowego w wieku starszym na szczepionki powstaje wskutek niewydolności komórek APC (zwłaszcza dendrytycznych), zmniejszenia subpopulacji limfocytów CD4 naiwnych, ale istotny wpływ ma redukcja limfocytów B, która powoduje obniżenie poziomu wytwarzania przeciwciał przeciw antygenom szczepionki. Ponadto zmiany w mikrośrodowisku szpiku uniemożliwiają dłuższą przeżywalność komórek plazmatycznych i przez to skracają czas ochrony immunologicznej [55]. Z wiekiem, w wyniku zmian w populacjach komórek układu białokrwinkowego, zmieniają się profil i stężenie krążących cytokin. Wzrasta stężenie cytokin prozapalnych w krwi oraz w monocytach krwi obwodowej; wyższa też jest zawartość IL-12, IL-10 i IL-6 oraz czynnika TNF- $\alpha$  [56]. Ponadto stwierdzono, że zwiększenie zawartości IFN- $\gamma$  w stanach zapalnych u starszych mężczyzn w porównaniu z młodymi jest większe niż u kobiet ( $5,78 \times v. 2,97 \times$ ) [57].

Z uwagi na fakt, że procesy starzenia obejmują w znaczącym stopniu układ krwiotwórczy i odpornościowy, znajomość przebiegu i rozległości tych procesów może przyczynić się do prowadzenia prób zapobiegania szczególnie istotnym upośledzeniom funkcjonowania tych układów w organizmie. Najważniejsze zmiany związane z procesami starzenia się komórek krwiotwórczych oraz układu białokrwinkowego przedstawiono w tabeli 1.

### Podsumowanie

1. Zmiany w strukturze populacji komórek krwiotwórczych postępują wraz z wiekiem, ale stwierdzono, że u osób 60-letnich nie wpływają na kondycję komórek CD34+ uzyskanych drogą mobilizacji.
2. Zmiany związane z wiekiem dotyczą komórek odporności zarówno wrodzonej (np. neutrofilów), co przejawia się w powstawaniu przewlekłych stanów zapalnych, jak i odporności nabytej, czego wynikiem jest osłabienie reakcji na szczepienia i odpowiedzi na zetknięcie z patogenami, wskutek upośledzenia procesu tworzenia synaps immunologicznych.
3. Znajomość procesów starzenia się komórek krwiotwórczych oraz komórek odporności wrodzonej i nabytej może być pomocna w podejściu hematologów i transfuzjologów do starszych pacjentów.

### Piśmiennictwo

1. Henry C.I., Marusyk A., DeGregor J. Aging associated changes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Aging* 2011; 3: 643–655.
2. Reber A., Chirkova T., Kim J.H. Immunosenescence and challenges of vaccination against influenza in the aging population. *Aging and Disease* 2012; 3: 68–88.
3. Beerman I., Maloney W.J., Weissmann I.L., Rossi D.J. Stem cells and the aging hematopoietic system. *Curr. Opin. Immunol.* 2010; 22: 500–506.
4. Woolthuis C.M., de Haan G., Huis G. Aging of hematopoietic stem cells: intrinsic changes or micro-environmental effects. *Curr. Opin. Immunol.* 2011; 23: 512–517.
5. Cho R.H., Sieburg H.B., Muller-Sieburg C.E. A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes of the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood* 2008; 111: 5553–5561.
6. Muller-Sieburg C., Sieburg H. Stem cell aging. *Cell Cycle* 2008; 7: 3798–3804.
7. Muller-Sieburg C.E., Sieburg H.B., Bernitz J.M., Cattarosa G. Stem cell heterogeneity: implication for aging and regenerative medicine. *Blood* 2012; 119: 3900–3907.
8. Vas V., Senger K., Dorr K., Niebel A., Geiger H. Aging of the microenvironment influences clonality in hematopoiesis. *PLoS ONE* 2012; 7: e42080.
9. Ergen A.V., Boles N., Goodell M.A. Rantes/CCL5 influences hematopoietic stem cell subtypes and causes myeloid skewing. *Blood* 2012; 119: 2500–2509.
10. Kohler A., Schmithorst V., Filippi M.D. i wsp. Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-laps intravital imaging in long bones. *Blood* 2009; 114: 290–298.
11. Ishikawa T., Gonzalez-Nieto D., Ghiaur G. i wsp. Connexin-43 prevents hematopoietic stem cell senescence through transfer of reactive oxygen species to bone marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; 109: 9071–9076.
12. Chambers S.M., Shaw C.A., Gatz C., Fisk C.J., Donehower L.A., Goodell M.A. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol* 2007; 5: e20.
13. Wagner W., Bork S., Horn P. i wsp. Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS ONE* 2009; 4: e5846.
14. Niu C., Zhang J., Breslin P., Onclu M., Ma Z., Morris S.W. c-Myc is a target of RNA-binding motif protein 15 in the regulation of adult hematopoietic stem cell. *Blood* 2008; 114: 2087–2096.
15. Mantel C., Messina-Graham S., Moh A. i wsp. Mouse hematopoietic cell-targeted STS3 deletion: stem/progenitor cell defects, mitochondrial dysfunction, ROS overproduction and a rapid aging-like phenotyp. *Blood* 2012; 120: 2589–2599.
16. Xiao N., Jani K., Morgan K. i wsp. Hematopoietic stem cells lacking Ott1 display aspects associated with aging and are unable to maintain quiescence during proliferating stress. *Blood* 2012; 119: 4898–4907.
17. Pietras E., M. Warr M.R., Passegue E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J. Cell Biol.* 2011; 195: 709–720.
18. Nii T., Marumoto T., Tani K. Roles of p53 in various biological aspects of hematopoietic stem cells. *J. Biomed. Biotechn.* 2012; ID903435.
19. Liu L., Rando T.A. Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J. Cell Biol.* 2011; 193: 257–266.



20. Jones D.L., Rando A.T. Emerging models and paradigms for stem cell aging. *Nat. Cell. Biol.* 2011; 13: 506–512.
21. Norddahl G. L., Wahlestedt M., Gisler S., Sigvardsson M., Bryder D. Reduced expression of cytokine signaling ameliorates age-induced decline in hematopoietic stem cell function. *Aging Cell* 2012; 11: 1128–1231.
22. Pang W.W., Price E.A., Sahoo D. i wsp. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108: 20012–20017.
23. Bozdog C., Bay M., Ayyildiz E., Topocuoğlu P., İlhan O. Older age and capacity of colony forming unit in autologous peripheral derived hematopoietic cells. *Transfus. Apher. Sci.* 2012; 47: 113–116.
24. Shaw A.C., Joshi S., Greenwood H., Panda A., Lord J.M. Aging of the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 2010; 22: 507–513.
25. Almeida-Oliveira A., Smith-Carvalho M., Porto L.C. Age related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum. Immunol.* 2011; 72: 319–329.
26. Gayoso I., Sanchez-Correa B., Campos C. i wsp. Immunosenescence of human natural killer cells. *Innate Immunol.* 2011; 3: 337–343.
27. Lutz C.T., Quinn L.S. Sarcopenia, obesity and natural killer cell immune senescence in aging. *Aging* 2012; 4: 535–545.
28. Dewan S.K., Zheng S., Xia S., Bill K. Senescent remodeling of the immune system and its contribution to the predisposition of the elderly infection. *Chin. Med. J.* 2012; 125: 3325–3331.
29. Panda A., Arjona A., Sapey E. i wsp. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* 2009; 30: 325–333.
30. Agrawal A., Gupta S. Impact of aging on dendritic cells functions in humans. *Ageing Res. Rev.* 2011; 10: 336–345.
31. Panda A., Qian F., Mohanty S. i wsp. Age-associated decrease in TLR function in primary dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J. Immunol.* 2010; 184: 2518–2527.
32. Hearn A.C., Martin G.E., Angelovich T.A. i wsp. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell* 2012; 11: 867–875.
33. Gomez C.R., Nomellini V., Faunce D.E., Kovacs E.J. Innate immunity and aging. *Exp. Gerontol.* 2008; 43: 718–728.
34. Kovacs E.J., Palmer J.L., Fortin C.F., Fulop T., Goldstein D.R., Linton P.J. Aging and innate immunity in mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol.* 2009; 30: 319–324.
35. Mahbub S., Brubaker A.L., Kovacs E.J. Aging of the innate immune system: an update. *Curr. Immunol. Rev.* 2011; 7: 104–115.
36. Wessels I., Jansen J., Rink L., Uciechowski P. Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils. *Sci. World* 2010; 10: 145–160.
37. Tortorella C., Simone O., Piazzolla G., Stella I., Antonacci S. Age-related impairment of GM-CSF induced signaling in neutrophils: role of SHP-1 and SOCS proteins. *Ageing Res. Rev.* 2007; 6: 81–93.
38. Desai A., Grolleau-Julius A., Yung R. Leukocyte function in the aging immune system. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 87: 1001–1009.
39. Alonso-Fernandez P., Puerto M., Mate I., Reibera J., M., Fuente M. Neutrophils of centenarians show function levels similar to those of young adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2008; 56: 2244–2251.
40. Fuchs T., Puellmann K., Scharfenstein O. i wsp. The neutrophil recombinatorial TCR-like immune receptor is expressed across the entire human life span but repertoire diversity declines in old age. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012; 419: 309–315.
41. Fortin C.F., McDonald P.P., Lesur O., Fulop T. Aging and neutrophils: there is still much to do. *Rejuven. Res.* 2008; 11: 873–882.
42. Sun L., Brown R., Chen S., Zhuge Q., Su D. Aging induced decline in T-lymphopoiesis is primarily dependent on status of progenitor niches in bone marrow and thymus. *Aging* 2012; 4: 606–619.
43. Lefebvre J. S., Maue A. C., Eaton S. M., Lanthier P.A., Tighe M., Haynes L. The aged microenvironment contributes to the age related functional defects of CD4 T cells in mice. *Aging Cell* 2012; 11: 732–740.
44. Decman V., Laidlaw B. J., Dimenna L. J. i wsp. Cell-intrinsic defects in the proliferative response of antiviral CD8 T cells in aged mice upon secondary infection. *J. Immunol.* 2010; 184: 5151–5159.
45. Haynes L., Mane A.C. Effects of aging on T cell function. *Curr. Opin. Immunol.* 2009; 21: 414–417.
46. Weng N., Akbar A., N., Goronzy J. CD28-T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol.* 2009; 30: 306–312.
47. Nikolich-Zugich J., Rudd B.D. Immune memory and aging: an infinite or finite resource. *Curr. Opin. Immunol.* 2010; 22: 535–540.
48. Garcia G.G., Miller R.A. Age-related defects in cytoskeleton signaling pathways of CD4 cells. *Ageing Res. Rev.* 2011; 10: 26–34.
49. Taub D. D., Murphy W.J., Longo D.L. Rejuvenation of the aging thymus: growth hormone and ghrelin-mediated signaling pathways. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010; 10: 408–424.
50. Jin R., Kaneko H., Suzuki H. i wsp. Age-related changes in BAFF and APRIL profiles and upregulation of BAFF and APRIL expression in patients with primary antibodies deficiency. *Int. J. Mol. Med.* 2008; 21: 233–238.
51. Cancro M. P., Hao Y., Scholz J.L. i wsp. B cell and aging: molecules and mechanisms. *Trends Immunol.* 2009; 30: 313–318.
52. Gibson K. L., Wu Y. C., Barnett Y. i wsp. B cell diversity decreases in old age and is correlated with poor health status. *Aging Cell* 2009; 8: 18–25.
53. Frasca D., Diaz A., Romero M., Landin A.M., Blomberg B.B. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res. Rev.* 2011; 10: 330–335.
54. Keren Z., Naor S., Nussbaum S. i wsp. B cell depletion reactive B lymphopoiesis in the BM and rejuvenates the B lineage in aging. *Blood* 2011; 117: 3104–3112.
55. Weinberger B., Handler-Brandstetter D., Schwanninger A., Weiskopf D., Grubeck-Loebenstien B. Biology of immune response to vaccines in elderly persons. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46: 1078–1084.
56. Alvarez-Rodriguez L., Lopez-Hoyos M., Munoz-Cacho P., Martinez-Taboada V.M. Aging is associated with circulating cytokine dysregulation. *Cell Immunol.* 2012; 273: 124–132.
57. Goetzl E.J., Huang M.C., Kon J. Gender specificity of altered human immune cytokine profiles in aging. *FASEB J.* 2010; 24: 3580–3589.