

Received: 2014.11.03  
Accepted: 2015.04.27  
Published: 2015.07.27

## Komórki macierzyste i czynniki wzrostu w gojeniu ran\*

### Stem cells and growth factors in wound healing

Michał Pikuła<sup>1</sup>, Paulina Langa<sup>1</sup>, Paulina Kosikowska<sup>2</sup>, Piotr Trzonkowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Wydział Lekarski, Gdański Uniwersytet Medyczny

<sup>2</sup>Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

#### Streszczenie

Gojenie rany jest złożonym procesem, który jest uzależniony od obecności wielu rodzajów komórek, czynników wzrostu, cytokin oraz elementów macierzy zewnątrzkomórkowej. Rana stanowi wrota zakażenia dla wielu patogenów, stąd w toku ewolucji proces gojenia został bardzo szybko uformowany, będąc krytycznym dla przetrwania każdego osobnika. Szczególną rolę w procesie gojenia ran odgrywają komórki macierzyste dające początek komórkom progenitorowym oraz zróżnicowanym. Spośród najważniejszych komórek biorących udział w gojeniu ran należy wyróżnić komórki macierzyste naskórka, a także skórne prekursorzy fibroblastów, komórki macierzyste tkanki tłuszczowej oraz komórki pochodzenia szpikowego. Ich aktywność jest ściśle regulowana przez mikrośrodowisko tworzone m.in. przez czynniki wzrostu, takie jak: czynnik wzrostu naskórka (EGF), czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), transformujący czynnik wzrostu (TGF), czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF). Zaburzenia w funkcjonowaniu komórek macierzystych oraz w syntezie i degradacji czynników wzrostu mogą np. opóźnić gojenie lub stymulować tworzenie blizn przerostowych. Stąd wiedza na temat mechanizmów gojenia ran jest niezwykle istotna z klinicznego punktu widzenia. W pracy przedstawiono najnowszy stan wiedzy na temat roli komórek macierzystych oraz czynników wzrostu w procesie gojenia rany. Omówiono również niektóre aspekty kliniczne gojenia ran, w tym możliwości terapii w oparciu o komórki macierzyste oraz czynniki wzrostu.

#### Słowa kluczowe:

rana • komórki macierzyste • czynniki wzrostu • terapia komórkowa

#### Summary

Wound healing is a complex process which depends on the presence of various types of cells, growth factors, cytokines and the elements of extracellular matrix. A wound is a portal of entry for numerous pathogens, therefore during the evolution wound healing process has formed very early, being critical for the survival of every individual. Stem cells, which give rise to their early descendants progenitor cells and subsequently differentiated cells, play a specific role in the process of wound healing. Among the most important cells which take part in wound healing the following cells need to be distinguished: epidermal stem cells, dermal precursor of fibroblasts, adipose-derived stem cells as well as bone marrow cells. The activity of these cells

\* Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2011/03/D/NZ5/00555. Paulina Kosikowska dziękuje za wsparcie finansowe ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych w ramach finansowania stażu po uzyskaniu stopnia naukowego doktora na podstawie decyzji numer DEC- 2012/04/S/ST5/00074.

|                       |   |
|-----------------------|---|
|                       | is strictly regulated by various growth factors, inter alia epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor (TGF), vascular endothelial growth factor (VEGF). Any disorders in functioning of stem cells and biological activity of growth factors may lead to the defects in wound healing, for instance delayed wound healing or creation of hypertrophic scars. Therefore, knowledge concerning the mechanisms of wound healing is extremely essential from clinical point of view. In this review the current state of the knowledge of the role of stem cells and growth factors in the process of wound healing has been presented. Moreover, some clinical aspects of wound healing as well as the possibility of the therapy based on stem cells and growth factors have included. |
| <b>Key words:</b>     | <b>wound • stem cells • growth factors • cell therapy</b>   |
| <b>Full-text PDF:</b> | <a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1162989">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1162989</a>   |
| <b>Word count:</b>    | 4634  |
| <b>Tables:</b>        | –   |
| <b>Figures:</b>       | 2   |
| <b>References:</b>    | 97  |

**Adres autora:** dr n. med. Michał Pikuła, Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Dębinki 7, 80-211 Gdańsk; pikula@gumed.edu.pl

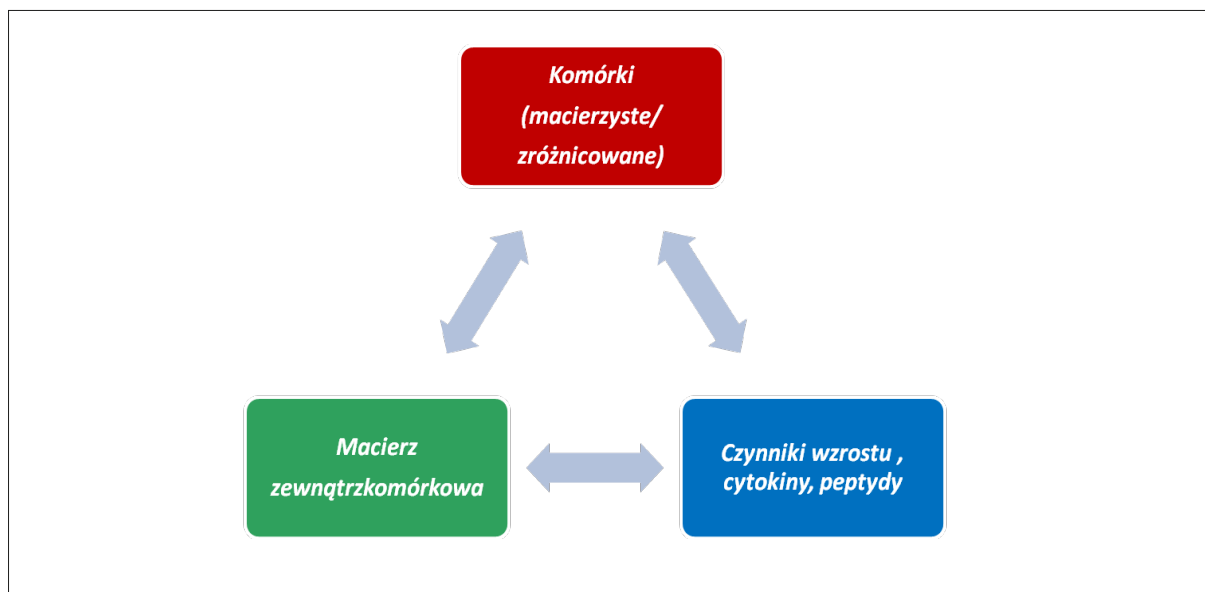
**Wykaz skrótów:** **AMPs** – peptydy przeciwbakteryjne (antimicrobial peptides); **ASCs** – komórki macierzyste tkanki tłuszczowej (adipose derived stem cells); **ECM** – macierz zewnątrzkomórkowa (extracellular matrix); **EPC** – progenitorowe komórki śródbłonka (endothelial progenitor cells); **FGF** – czynnik wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor); **FGFR** – receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów (fibroblast growth factor receptor); **GM-CSF** – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor); **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor); **HSCs** – hematopoetyczne komórki macierzyste (hematopoietic stem cells); **IGF** – insulinopodobny czynnik wzrostu (insulin-like growth factor); **IL** – interleukina (interleukin); **IFN-γ** – interferon γ (interferon γ); **KGF** – czynnik wzrostu keratynocytów (keratinocyte growth factor); **MAPK** – kinazy aktywowane mitogenami (mitogen activated kinases); **MSCs** – mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cells); **NGF** – czynnik wzrostu nerwów (nerve growth factor); **NF-κB** – czynnik jądrowy-κB (nuclear factor-κB); **PDGF** – czynnik wzrostowy pochodzenia płytkowego (platelet derived growth factor); **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor beta); **TIMP** – tkankowy inhibitor metaloproteinaz (tissue inhibitor of metalloproteinase); **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor); **VCAM-1** – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (vascular cell adhesion molecule-1); **VEGF** – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (vascular endothelial growth factor).

## WPROWADZENIE

Skóra stanowi największy organ ludzkiego organizmu pełniący wiele ważnych dla niego funkcji. Tworzy przede wszystkim barierę dla przenikania patogenów oraz czynników chemicznych i fizycznych, reguluje również temperaturę ciała, odbiera bodźce zewnętrzne, chroni przed utratą wody, wpływa na gospodarkę hormonalną i współtworzy układ immunologiczny [2,51,78]. Przez złożoność i ważność tych funkcji dla organizmu niezbędne jest prawidłowe działanie tego organu, a zwłaszcza zapewnienie pełnej jego ciągłości. Dlatego też w wyniku ewolucji wykształciło się wiele mechanizmów zapewniających skuteczne gojenie ran i ubytków skórnych. Odpowiednie zagojenie rany chroni bowiem organizmy przed dostaniem się patogenów, które mogą wywołać

miejscowe, jak i uogólnione infekcje włączając w to posocznice [47,60].

Należy zauważyć, iż u zwierząt oprócz procesu gojenia (naprawy), jednocześnie może następować proces regeneracji. Regeneracja, w odróżnieniu od gojenia urazów, doprowadza do całkowitego odtworzenia w pełni funkcjonalnej tkanki lub narządu bez pozostawienia blizny. Gojenie natomiast przebiega z udziałem odmiennych mechanizmów i prowadzi do utworzenia tkanki o zmienionej budowie histologicznej. Regeneracja zachodzi głównie u zwierząt bezkręgowych oraz w mniejszym stopniu u niższych kręgowców. U niektórych gatunków ssaków może następować ograniczona regeneracja tkanek, występująca jednak w pojedynczych narządach (regeneracja ucha, wątroby, tkanek płodowych) [2,8,51].



Ryc. 1. Prawidłowe gojenie rany wymaga odpowiedniego współdziałania komórek, macierzy zewnątrzkomórkowej oraz czynników wzrostu. Współdziałanie to polega na dynamicznych interakcjach, dzięki którym możliwa jest aktywacja, migracja i różnicowanie komórek, przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej oraz synteza czynników wzrostu

W mechanizmach gojenia ran główną rolę pełnią komórki macierzyste dające początek komórkom wyspecjalizowanym, odpowiadającym za określone funkcje podczas gojenia rany, tworzących również nową tkankę [2,80]. Aktywność zarówno komórek macierzystych, jak i innych komórek skóry zależy od obecności wielu elementów, w tym macierzy zewnątrzkomórkowej, cytokin oraz wielu biologicznie aktywnych peptydów i białek [2,92,95] (ryc. 1). Wśród tych ostatnich najważniejsze znaczenie mają czynniki wzrostu. Nieprawidłowa aktywność komórek macierzystych i/lub niektórych czynników wzrostu może brać udział w etiopatogenezie ran przewlekłych, a także, keloidów czy blizn przerostowych. Ocenia się, iż na świecie dotkniętych trudno gojącymi się ranami jest 0,2-1% ludzi, natomiast w Polsce liczba takich pacjentów szacowana jest na około 0,5 mln. Nieprawidłowości w gojeniu ran są zatem nie tylko dużym problemem zdrowotnym, ale również ekonomicznym i społecznym [11,80]. Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w poznaniu mechanizmów odpowiedzialnych za prawidłowe i patologiczne gojenie ran. Wiąże się to z coraz większymi możliwościami technicznymi obrazowania i analizy materiału biologicznego na poziomie komórkowym i molekularnym. Należy tu wymienić choćby eksperymentalne modele stabilnego wprowadzania markerów komórkowych (śledzenie losów komórki *in vivo* oraz *in vitro*), przeszczepiania różnych populacji komórek (wynik biologiczny/terapeutyczny zależy od fenotypu komórek) oraz zaawansowane hodowle komórkowe (odpowiedź komórek na poszczególne bodźce/czynniki *in vitro*) [2,32,61,74,90].

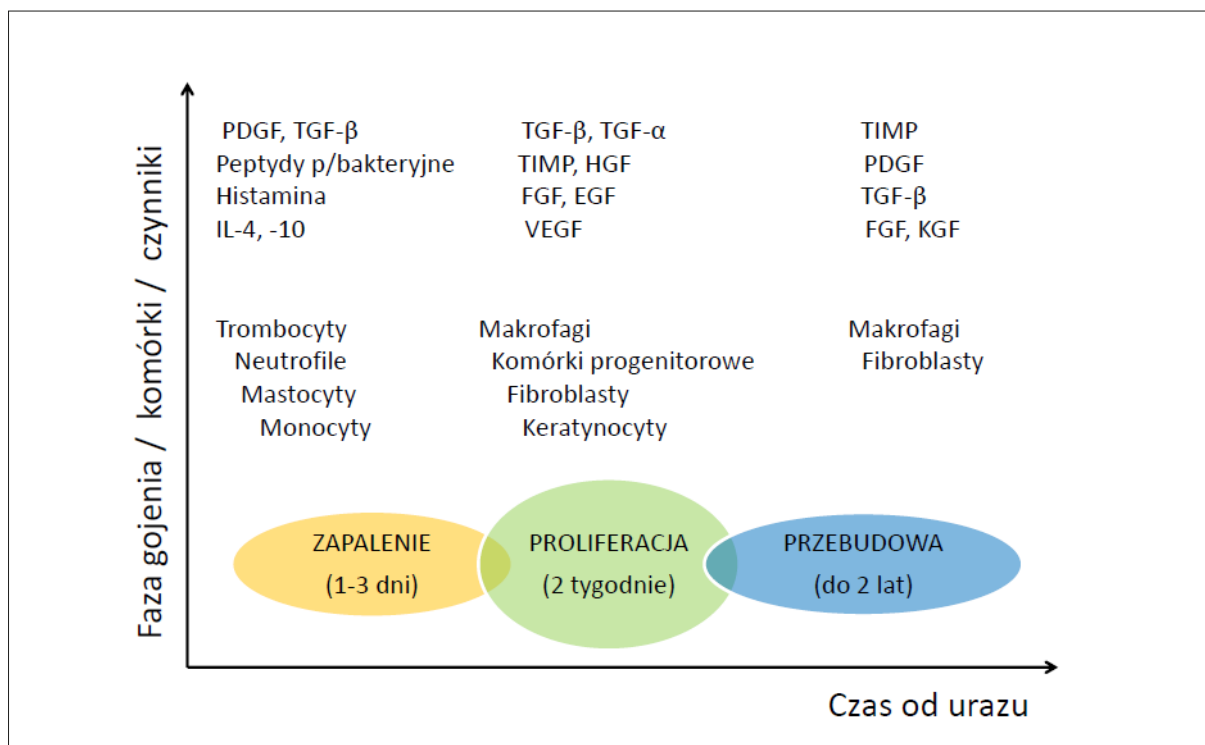
Pełne poznanie roli poszczególnych komórek oraz czynników wzrostu podczas gojenia ran umożliwia wprowadzenie bardziej skutecznych metod ich leczenia opartych o terapie komórkowe, rekombinowane czynniki wzrostu,

peptydy, preparaty biologiczne bogate w czynniki wzrostu itp. W pracy przedstawiono aktualny stan wiedzy na temat roli komórek macierzystych oraz czynników wzrostu w gojeniu ran, uwzględniając przy tym wybrane aspekty kliniczne. Przedstawiono własne spostrzeżenia oparte na badaniach *in vitro* jak i obserwacjach klinicznych.

## GLÓWNE FAZY GOJENIA RANY

Podczas gojenia rany wyróżnia się trzy nachodzące na siebie fazy: zapalenia, proliferacji i przebudowy. Po uszkodzeniu tkanek naczynia krwionośne oraz płytki krwi są ekspozowane na białka macierzy zewnątrzkomórkowej, co powoduje tworzenie się skrzepu. Towarzyszy temu wytwarzanie takich czynników jak: SDF-1, PDGF czy TNF- $\alpha$  z jednoczesnym napływem monocytów, neutrofilów i komórek tucznych (ryc. 2). Działanie tych komórek polega przede wszystkim na eliminacji mikroorganizmów i stymulacji angiogenezy oraz regeneracji tkanek. Powstały skrzep stanowi tymczasowe rusztowanie, umożliwiające migrację komórek, będąc jednocześnie źródłem mediatorów gojenia rany [2,60,84].

Szczególną rolę odgrywa PDGF wytwarzany przez trombocyty. PDGF aktywuje makrofagi i fibroblasty, które wydzielają następne czynniki wzrostu, podstawowe w dalszych etapach zamykania rany [1]. Przebieg fazy zapalnej jest bardzo uzależniony od obecności bakterii w ranie, które znacznie wydłużają czas trwania zapalenia i aktywność oraz liczbę neutrofilów. Należy również dodać, iż faza zapalna nie występuje podczas gojenia skóry płodowej. Jest to jednym z głównych powodów braku tworzenia się blizn po urazach skóry płodu [51]. Uważa się, iż cytokiny i czynniki wzrostu, zwłaszcza PFGF, FGF, TGF- $\beta$ , wydzielane podczas fazy zapalnej stymulują tworzenie tkanki



Ryc. 2. Trzy fazy gojenia rany z zaznaczonymi komórkami oraz czynniki zaangażowane w ten proces

włóknistej. Przejście z fazy zapalnej do proliferacyjnej jest zależne głównie od aktywności makrofagów i następuje 4-5 dni od urazu (dla rany niezakażonej). Podczas fazy proliferacji, aktywnej między 5 a 14 dniem od urazu, dochodzi do tworzenia ziarniny, która tworzy tymczasowe podłoże do odtworzenia właściwego naskórka [79]. Następuje silna proliferacja wzajemnie pobudzanych przez siebie keratynocytów oraz fibroblastów, stymulowanych dodatkowo przez komórki tuczne [52,76]. Odbyna się to dzięki wydzielaniu wielu cytokin i czynników wzrostu, takich jak: IL-1, IL-6, GM-CSF, KGF, FGF, HGF. Ziarninę tworzy luźna sieć włókien kolagenowych, fibronektyny oraz kwasu hialuronowego, których wytwarzanie jest zależne m.in. od obecności TGF- $\beta$ 1 oraz TGF- $\beta$ 2 [2,71]. W fazie proliferacji dochodzi również do angiogenezy, która umożliwia napływ nowych komórek progenitorowych, czynników wzrostu i substancji odżywczych. W trzeciej fazie gojenia rany następuje przebudowa macierzy zewnątrzkomórkowej z towarzyszącą syntezą kolagenu typu I, który jest najbardziej występującym elementem ECM w skórze. W tej fazie gojenia pojawiają się również miofibroblasty, które przez właściwości kurczliwe ułatwiają zamknięcie rany. Przebudowa tkanki po urazie skóry może trwać nawet rok lub dłużej od zamknięcia rany [8,51].

### Komórki macierzyste naskórka

Podczas zamykania rany głównym etapem jest odtworzenie naskórka, który jest zbudowany głównie z keratynocytów (ponad 90%). Komórki te wywodzą się z komórek macierzystych naskórka, znajdujących się w warstwie

podstawnej naskórka, jak również macierzy mieszka włosowego oraz regionie wybruszenia (bulge region), przy ujściu gruczołu łojowego. Komórki macierzyste naskórka wyróżnia wysoka ekspresja białka p63, beta-1 oraz alfa-6 integryny, przy jednoczesnej niewielkiej ekspresji receptorów dla EGF i transferyny [53,64]. Niska ekspresja receptorów niektórych czynników wzrostu oraz stan uśpienia metabolicznego chroni te komórki przed nadmierną aktywacją i zmniejszeniem się puli komórek nieodróżnionych. Jednocześnie dzięki temu, komórki macierzyste mogą precyzyjnie kontrolować podziały komórkowe zmniejszając ryzyko mutacji (wydłużony czas replikacji DNA) [76]. Komórki macierzyste naskórka są aktywowane głównie przez szlaki związane z TGF-beta, Wnt oraz białkiem Shh [10,23,83]. Czynniki, które również stymulują ich aktywność promitogenną są KGF, EGF oraz FGF. Są one wykorzystywane podczas hodowli komórek progenitorowych (powstających po aktywacji komórek macierzystych *in vitro* do celów badawczych i klinicznych [73,74,84]. Przyjmuje się, iż w czasie fizjologicznego cyklu wymiany komórek naskórka (trwającego około 30 dni) dochodzi do aktywacji i wykorzystywania głównie komórek warstwy podstawnej naskórka. Natomiast po zranieniu aktywacji ulegają również komórki macierzyste w innych miejscach skóry, szczególnie regionu wybruszenia, macierzy włosa (głównie komórki z ekspresją K19 oraz LGR6). Komórki z tych obszarów skóry intensywnie migrują w rejon naskórka i przekształcają się w dojrzałe keratynocyty [56,65]. Tłumaczy to szybsze gojenie rany powstałej na skórze owłosionej, co szczególnie jest widoczne, gdy włosy są w fazie anagenu [52]. U człowieka,

udział komórek pączka w gojeniu rany jest jednak przejściowy i po pewnym czasie komórki te nie są wykrywane w naskórku [43]. U gryzoni opisywano trwałe udziały komórek macierzystych wybrzuszenia w odbudowie naskórka, co było szczególnie widoczne dla komórek z ekspresją LGR5 oraz SOX9 [45]. Należy jednak pamiętać, iż mimo że gryzonie są bardzo często wykorzystywane w modelach gojenia rany, to zwierzęta te wykazują wiele odmienności fizjologicznych od ludzi, dotyczy to również budowy mikrośrodowiska nisz komórek macierzystych [69].

### Komórki macierzyste szpiku

Szpick kostny jest bogatym źródłem komórek macierzystych hematopoetycznych (HSCs) oraz mezenchymalnych (MSCs). Ocenia się, iż w szpiku znajdują się również komórki progenitorowe tkanek obwodowych, które mogą być mobilizowane podczas urazów. Komórki macierzyste, szczególnie HSCs w sposób znaczący biorą udział w procesie gojenia ran, zwłaszcza rozległych z dużą domeną zapalną [20,84]. Ich mobilizacja następuje wskutek uwalniania z uszkodzonych tkanek wielu cytokin i czynników wzrostu (SDF-1, VEGF, HGF, angiopoetyna) oraz aktywacji metaloproteinaz [2,84]. Podczas pierwszej fazy gojenia rany zapalnej, dochodzi przede wszystkim do mobilizacji hematopoetycznych komórek macierzystych, które dają początek m.in. prekursorom neutrofilów oraz monocytów. Komórki te następnie migrują do rejonu rany i są odpowiedzialne za jej oczyszczenie. W tej fazie istotny jest również udział macierzystych komórek mezenchymalnych (MSCs), które stymulują Notch-zależne różnicowanie HSCs w kierunku linii mieloidalnej. Istnieją również przesłanki świadczące o różnicowaniu, w odpowiednich warunkach, HSCs w kierunku keratynocytów [26]. Badania eksperymentalne na gryzoniach wykazały również, iż komórki MSCs mogą dawać początek komórkom skóry, zarówno fibroblastom, jak i keratynocytom [22]. Powstałe z MSCs fibroblasty różnią się jednak od rezydujących komórek skóry właściwej, m.in. różną ekspresją kolagenu III. Keratynocyty natomiast powstają za pośrednictwem zjawiska MET (mesenchymal-to-epithelial transition), związanego z transróżnicowaniem mezenchymalnym [58]. Należy zauważyć, iż oprócz zjawiska MET również fuzja komórek MSCs z komórkami naskórka jest możliwym wytłumaczeniem tego fenomenu [85]. Mobilizacja MSCs ze szpiku odbywa się m.in. przez aktywację szlaków związanych z receptorami CXCL12/CXCR4. U gryzoni, po wywołanym oparzeniu, surowica nabiera silnych właściwości chemotaktycznych w stosunku do MSCs [41]. U ludzi istnieją również dane świadczące o bezpośrednim udziale komórek szpiku w regeneracji skóry, co jak się wydaje, może być związane z różnicowaniem komórek MSCs w keratynocyty oraz fibroblasty. Ponadto we krwi obwodowej (komórkach jednojądrzastych) wykazano obecność progenitorów keratynocytów [66]. Szpick kostny jest również bogatym źródłem prekursorów komórek śródbłonna, które są uwalniane do krwiobiegu pod wpływem m.in. SDF, VEGF, GM-CSF, niedotlenienia, oparzeń. Komórki te pełnią istotną rolę w gojeniu rozległych ran zapewniając powstawanie nowych naczyń krwionośnych

[89]. Warto również podkreślić, iż u pacjentów, u których przeprowadzono allotransplantację HSCs, komórki dawcy są wykrywane w skórze nawet do trzech lat od zabiegu. Komórki te są wykrywane zarówno w skórze właściwej, jak również naskórku, wykazując ekspresję m.in. antygenów charakterystycznych dla keratynocytów [70].

### Komórki macierzyste tkanki tłuszczowej

Ostatnie lata przyniosły ogromny przełom w badaniach nad komórkami macierzystymi tkanki tłuszczowej (ASCs), wskazując na ich duże znaczenie biologiczne i ogromne możliwości terapeutyczne [75]. Wydaje się, iż komórki te w stanie fizjologicznym są słabo aktywne, natomiast po stymulacji (rana, podane w postaci przeszczepu, hodowla *in vitro*), mogą uwidocznić wiele właściwości proregeneracyjnych. Najwięcej informacji na temat tych komórek pochodzi jednak z badań *in vitro* oraz wyników ich przeszczepiania u ludzi i zwierząt. Komórki ASCs stymulują nie tylko gojenie ostre ran, ale również przewlekłe, przy czym jednocześnie zapobiegają tworzeniu się blizn przerostowych oraz keloidów [12,19]. Jedną z głównych funkcji ASCs jest stymulacja angiogenezy przez ich różnicowanie w komórki śródbłonna oraz pobudzanie zróżnicowanych endoteliocytów. Komórki ASCs mogą również stymulować, a także same się przekształcać w fibroblasty, a w odpowiednich warunkach również keratynocyty [3,18,54]. Egzogennie podane ASCs także mobilizują endogenne komórki macierzyste, w tym komórki macierzyste naskórka z regionu wybrzuszenia. Działanie to opiera się m.in. na wytwarzaniu wielu czynników wzrostu, w tym FGF, HGF, TGF-beta, VEGF. Bardzo istotnym elementem aktywności ASCs jest ich działanie immunosupresyjne i antyzapalne, bardzo istotne w ranach chronicznych, którym towarzyszy przewlekły stan zapalny [12]. Aktywność komórek ASCs jest zależna w dużej mierze od warunków mikrośrodowiska i wzrasta w warunkach hipoksji, ale również pod wpływem innych rodzajów czynników wzrostu, np. TGF-β. Ze względu na dużą aktywność metaboliczną ASCs oraz dużą liczbę czynników wzrostu uwalnianych przez te komórki w czasie hodowli, testuje się również możliwość wykorzystania medium hodowlanego ASCs w leczeniu stanów zapalnych skóry [75]. W mysim modelu atopowego zapalenia skóry (indukowanym oksazoloniem) powierzchniowe podawanie pożywki z hodowli ASCs na skórę umożliwiło przywrócenie naturalnej bariery ochronnej naskórka (ponowny wzrost ekspresji białek profilagryny, inwolukryny, lorikryny, odpowiedzialnych za rogowacenie naskórka), zmniejszyło również odczyn zapalny skóry oraz przywróciło ekspresję endogennych AMPs [55,75].

### Pozostałe rodzaje komórek macierzystych

Spośród komórek macierzystych zaangażowanych w proces gojenia ran należy również wymienić komórki macierzyste/progenitorowe melanocytów, komórek śródbłonna oraz prekursorów fibroblastów. Melanocyty, które znajdują się głównie w warstwie podstawnej naskórka pełnią główną rolę protekcyjną przed działaniem promieniowania UV [47,77]. Wiele dowodów wskazuje, iż repigmentacja



skóry po zranieniu zachodzi przede wszystkim z udziałem komórek mieszków włosowych, a tylko w niewielkim stopniu ma swoje źródło w naskórku [2]. Proces ten odbywa się dzięki proliferacji i migracji komórek progenitorowych melanocytów. Komórki te są umiejscowione przede wszystkim w rejonie wybrzuszenia (bulge region) oraz w mniejszym stopniu rozproszone w sąsiedztwie nerwów skóry właściwej. Komórki progenitorowe melanocytów ulegają aktywacji i proliferacji pod wpływem wielu czynników np.: SCF, HGF oraz ACTH i  $\alpha$ -MSH [2,14]. U ludzi proces repigmentacji skóry po uszkodzeniu lub przeszczepie wyhodowanego naskórka trwa wiele miesięcy. Kliniczne obserwacje wskazują, iż repigmentacja zachodzi na skórze przede wszystkim punktowo w miejscach odpowiadającym mieszkom włosowym [20,52]. Komórki progenitorowe śródbłonka pełnią podstawową funkcję podczas angiogenezy [48]. Proces ten jest szczególnie istotny podczas odbudowy dużych ubytków skóry. W skórze, szczególnie w mieszkach włosowych, znajdują się macierzyste komórki mezenchymalne, wykazujące ekspresję nestyny. Komórki te mogą tworzyć sieć naczyń krwionośnych zarówno *in vivo* jak i *in vitro*. Modele mysie ubytków skórnych, wykazały obecność prekursorów komórek śródbłonka pochodzenia szpikowego, w głębszych warstwach skóry. Był to jednak efekt przejściowy, co może być związane z fizjologiczną regresją naczyń krwionośnych podczas późniejszych faz gojenia rany [89]. Skóra właściwa w odróżnieniu od naskórka, ma niewielki udział komponenty komórkowej. Mimo to znajdują się tam komórki odpowiadające tzw. dorosłym komórkom macierzystym, zlokalizowane głównie w brodawce włosa (dermal stem cells). Komórki te można podzielić na Sox2 pozytywne, regulowane przez czynniki Wnt, BMP, FGF oraz Sox2 negatywne, które odpowiadają na sygnalizację związaną z Shh, IGF, Notch oraz integrzynami. Komórki macierzyste skóry właściwej izolowane ze skóry noworodków wykazują bardzo duże właściwości proliferacyjne oraz zdolności do różnicowania w wiele linii komórkowych, np. chondrocyty, adipocyty, melanocyty. Ich potencjał jednak obniża się z wiekiem, co przekłada się również na słabsze właściwości naprawcze skóry osób dorosłych w porównaniu do dzieci [76,93].

## CZYNNIKI WZROSTU

### Rodzina PDGF

Czynnik PDGF (płytkopochodny czynnik wzrostu) był pierwszym opisanym i oczyszczonym czynnikiem wzrostu biorącym udział w gojeniu ran. Rodzina czynników PDGF obejmuje pięć izoform (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC i PDGF-DD) o różnych właściwościach biologicznych, których mechanizm działania polega na aktywacji dimerycznych receptorów o aktywności kinazy tyrozynowej. PDGF jest podstawowym czynnikiem występującym podczas embriogenezy i rozwoju układu mięśniowego, nerwowego oraz skóry [1,51]. Geny kodujące tę grupę czynników wykazują wiele podobieństw do genów czynnika VEGF, jednocześnie stanowią fragmenty silnie konserwatywne w całym królestwie zwierząt. Uważa się,

że PDGF to jeden z najważniejszych i najsilniejszych stymulatorów gojenia ran. Uczestniczy w tym procesie już w pierwszych godzinach od zranienia i jest wydzielany aż do zamknięcia rany [2,72]. PDGF jest wytwarzany przede wszystkim przez degranulujące płytki krwi, napływające wraz z krwią do miejsca zranienia. Innym źródłem tego białka są także keratynocyty, fibroblasty, komórki śródbłonka oraz migrujące do regionu rany makrofagi. PDGF działa chemotaktycznie na komórki MSCs obecne w szpiku oraz na neutrofile, monocyty oraz na skórne fibroblasty [92]. Zakumulowane w ranie MSCs mogą następnie dawać początek fibroblastom, co jest związane z aktywnością szlaku Wnt/ $\beta$ -katenina. Receptory PDGF znajdują się również na komórkach śródbłonka (indukcja angiogenezy) oraz płytkach krwi [79]. Ponadto PDGF stymuluje proliferację fibroblastów i wpływa na wytwarzanie przez te komórki składników macierzy zewnątrzkomórkowej w późniejszych etapach gojenia. PDGF indukuje zmianę fenotypu fibroblastów w miofibroblasty, umożliwiając obkurczanie się rany [60]. Badania *in vitro* wykazały, iż optymalne stężenia izoformy PDGF AB do uzyskania maksymalnej aktywności jako chemoatraktanta monocytów oraz czynnika mitogenowego dla komórek skóry wynoszą odpowiednio 20 i 1 ng/ml [2]. Wiele informacji na temat działania PDGF wykazały również bezpośrednie aplikacje tego czynnika na rany zwierząt (szczury, króliki). Dowiedziono, iż suprafizjologiczne stężenia PDGF powodują szybsze pojawianie się ziarniny oraz zamykanie rany, a także nabywanie przez skórę odpowiedniej wytrzymałości mechanicznej [51]. Niewielkie stężenie PDGF obserwuje się natomiast u pacjentów ze „stopą cukrzycową” i opóźnionym gojeniem ran [5,72]. Natomiast wzmoczone wytwarzanie PDGF przyczynia się do nadmiernego wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej i tworzenia się keloidów [68]. Należy również zaznaczyć, iż jak większość czynników wzrostu również PDGF ma znaczący udział w procesach nowotworzenia. Warto podkreślić, iż łańcuch B PDGF jest identyczny w 92% z produktem onkogenu genu *v-vis*, biorącego udział m.in. w tworzeniu mięsaków [2,48].

### Rodzina EGF

Rodzina naskórkowego czynnika wzrostu EGF obejmuje wiele mitogenów, w tym najważniejsze w procesie gojenia: EGF, TGF-alfa, HB-EGF, epiregulinę, amfiregulinę oraz heregulinę. Czynniki te mogą się wiązać z czterema receptorami o aktywności kinazy tyrozynowej, wykazującymi różne powinowactwo do agonistów: EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 oraz HER4/ErbB4 [36,97]. Receptory te, szczególnie HER-2 są również związane z patogenezą wielu nowotworów człowieka, w tym głównie raka gruczołu piersiowego [49,63]. Po raz pierwszy duże stężenia EGF i TGF-alfa stwierdzono w wysięku z ran pacjentów, którzy ulegli oparzeniom [33]. EGF, TGF-alfa, HB-EGF są głównymi regulatorami proliferacji keratynocytów. Stężenie tych białek znacząco wzrasta tuż po urazie. Czynniki wzrostu z rodziny EGF są wytwarzane przede wszystkim przez napływające w rejon rany makrofagi i neutrofile. Wykazano także, że keratynocyty umiejscowione na

brzegach rany są dodatkowym źródłem TGF-alfa. HB-EGF jest natomiast mitogenem keratynocytów i fibroblastów, w związku z tym wydaje się istotny w procesie odbudowy naskórka oraz tworzenia tkanki ziarninowej [2]. Potwierdzono jego występowanie m.in. w ranie oparzeniowej. Należy zaznaczyć, iż komórki macierzyste naskórka wykazują niewielką ekspresję receptorów EGF, natomiast po aktywacji i przekształceniu w komórki przejściowo namnażające się, ich ekspresja wzrasta [76]. Terapeutyczne działanie EGF polega na stymulowaniu migracji oraz proliferacji komórek naskórka (co przyspiesza naskórkowanie), a także wpływu na aktywność fibroblastów biorących udział w regeneracji tkanki trudno gojących się ran [13,37]. Badania *in vitro* wykazały, iż EGF i TGF-alfa stymulują migrację komórek *in vitro* już przy bardzo małych stężeniach (0,01-1,0 ng/ml) [37].

### Rodzina FGF

Do rodziny czynników wzrostu fibroblastów (FGF) należą 22 polipeptydów. Białka te wiążą się z receptorami transbłonowymi o aktywności kinazy tyrozynowej: FGFR1-4. Cechą charakterystyczną białek FGF jest ich oddziaływanie z heparyną i proteoglikanami (w tym siarczanem heparanu), które działają na nie stabilizująco [44,46]. Czynniki FGF są aktywnymi mitogenami, które stymulują proliferację wielu komórek pochodzenia ekto-, mezo- oraz endodermalnego [31]. Wyjątek stanowi tu FGF-7, zwany także czynnikiem wzrostu keratynocytów (KGF-1), który oddziałuje przede wszystkim na keratynocyty [91]. KGF-1 wraz z innymi białkami ze swojej rodziny, głównie FGF-10 (KGF-2) oraz FGF-22 są syntezowane po uszkodzeniu skóry, a następnie stymulują proliferację keratynocytów [2]. Oprócz działania mitogennego, czynniki FGF indukują również migrację oraz prawidłowe różnicowanie komórek, a nawet pełnią funkcję ochronną w warunkach stresu komórkowego [44]. Szczególnie istotną rolę pełni czynnik FGF-2 (basic fibroblast growth factor, bFGF) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów. Natychmiast po zranieniu lub głębokim oparzeniu jest wytwarzany przez uszkodzone komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, a w następnych etapach gojenia przez napływające do rany makrofagi [24,31]. bFGF stymuluje dojrzałe komórki śródbłonna oraz ich prekursorzy do migracji oraz podziałów mitotycznych [25]. W surowicy chorych na cukrzycę bFGF występuje w zwiększonej ilości, jednak na skutek glikacji jego aktywność proangiogenna jest zahamowana [44]. Interesującym może być jednak to, iż w jednym z badań podwyższone stężenie FGF-2 korelowało z większą liczbą komplikacji (np. infekcji) po zastosowaniu preparatów substytutów skóry [67].

### TGF-beta

Przedstawiciele rodziny czynnika wzrostu TGF-beta, które biorą udział w procesie gojenia to trzy białka TGF-beta1-3. Białka te są ligandami receptorów o aktywności kinazy serynowo-treoninowej; wykazują zarówno stymulujący, jak i hamujący wpływ na komórki skóry. TGF-beta jest wytwarzany przede wszystkim przez obecne w regionie zra-

nienia płytki krwi tuż po uszkodzeniu tkanek. TGF-beta działa głównie chemotaktycznie na neutrofile, makrofagi i fibroblasty [50]. Komórki te w dalszych etapach gojenia oprócz innych cytokin i czynników wzrostu wytwarzają także TGF-beta. Jednocześnie, TGF-beta może hamować wytwarzanie wielu proteaz wydzielanych m.in. przez makrofagi [21]. TGF-beta jest również silnym mitogenem dla fibroblastów skórnych; jednocześnie stymuluje migrację keratynocytów w głąb tymczasowego rusztowania budowanego przez składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Czynnikiem ten w odpowiednich stężeniach działa także hamująco na proliferację keratynocytów i bierze udział w utrzymaniu stanu nieodróżnicowania komórek macierzystych naskórka (występuje w niszach komórek macierzystych). Kilka dni po zranieniu TGF-beta stymuluje ekspresję genów kodujących integryny i białka macierzy zewnątrzkomórkowej. Podczas gojenia ran płodowych wytwarzana jest głównie izoforma TGF-beta 3, natomiast po urodzeniu przeważają izoformy TGF-beta 1 oraz TGF-beta 2. Jest to jednym z powodów, który powoduje, iż rany i niewielkie ubytki skóry powstałe podczas okresu płodowego goją się bez tworzenia blizny [2]. Niekiedy po zabliznieniu rany może dochodzić do powstania blizn przerostowych lub keloidów. Jest to związane z nieprawidłowościami i nadmierną syntezą włókien kolagenowych przez fibroblasty. Podobny skutek można obserwować także w innych chorobach, którym towarzyszy włóknienie, np. twardzinie [38,95].

### Rodzina VEGF

Czynniki z rodziny VEGF są jednymi z najsilniej działających induktorów angiogenezy i waskulogenezy. W ludzkim organizmie syntezowane są cztery izoformy VEGF (A, B, C, D) działające przede wszystkim przez receptory VEGFR1 oraz VEGFR2. Występują głównie na powierzchni komórek śródbłonna i działają za pośrednictwem kinazy tyrozynowej [27]. W skórze, VEGF może być wytwarzany przez wiele komórek, w tym przede wszystkim keratynocyty, fibroblasty oraz makrofagi, również komórki śródbłonna, napływające płytki krwi oraz neutrofile [4]. Najważniejszą funkcją VEGF jest stymulowanie procesu angiogenezy. Tuż po napływie płytek krwi w miejsce rany, VEGF stymuluje ich agregację i stworzenie skrzepu, zabezpieczającego mikrośrodowisko rany. W dalszych etapach gojenia, VEGF jest istotnym czynnikiem stymulującym proliferację komórek śródbłonna oraz ich progenitorów, które budują nowo powstałe naczynia krwionośne na rusztowaniu utworzonym z kolagenu oraz innych białek macierzy zewnątrzkomórkowej [92]. Wykazano także udział VEGF w regulacji tworzenia włókien kolagenowych, które następnie przekształcają się w tkankę budującą bliznę. Na przykładzie modeli zwierzęcych wykazano również, iż VEGF przyczynia się do przyspieszonego gojenia rany w okresie płodowym, które nie powoduje powstawania blizny. Ponadto zaobserwowano w ranach znaczny spadek stężenia VEGF wraz z dojrzałością płodu (model zwierzęcy) [2]. U osób chorujących na cukrzycę stężenia VEGF w obrębie ran przewlekłych jest obniżone. Podanie natomiast powierzchniowe VEGF w mysim modelu cukrzycy znacznie przyspieszało gojenie rany

przez aktywację komórek progenitorowych śródbłonka. Również pośrednia aktywacja ekspresji VEGF-A *in vivo* za pomocą hybrydy białkowej przyspieszała gojenie ran przewlekłych u zwierząt [16].

### Pozostałe czynniki wzrostu

Gojenie rany jest doskonałym przykładem procesu angażującego wiele wzajemnie wpływających na siebie komórek oraz czynników wzrostu. Należy tu jeszcze wymienić m.in. czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Jest on wytwarzany tuż po zranieniu, głównie przez fibroblasty, makrofagi, komórki śródbłonka i komórki dendrytyczne. Czynnik ten stymuluje proliferację keratynocytów, a także wspomaga odpowiedź zapalną (aktywacja neutrofilów, monocytów) oraz stymuluje tworzenie naczyń krwionośnych w rejonie gojącej się rany [59,92]. W procesie naprawy skóry po zranieniu bierze udział również rodzina czynników IGF. Należą do niej dwa produkty białkowe - IGF-I oraz IGF-II. Ich stężenie w zdrowej skórze jest niewielkie, lecz kilka dni po uszkodzeniu znacznie wzrasta. Podwyższone stężenie IGF obserwuje się zarówno w ranach poparzeniowych, jak i mechanicznych. Działanie IGF polega głównie na aktywacji keratynocytów oraz stymulacji proliferacji komórek progenitorowych naskórka. Niewielkie stężenie IGF jest związane z zaburzeniami gojenia u osób z cukrzycą, dlatego też białko to może być zastosowane do leczenia przewlekłych ran [51]. Należy jednak mieć na względzie, że zbyt duże stężenie IGF w obrębie rany może utworzyć zbyt rozległe i widoczne blizny, szczególnie u pacjentów, którzy ulegli oparzeniom [29]. Do innej rodziny czynników wzrostu zaangażowanych w proces gojenia rany zalicza się czynnik wzrostu hepatocytów (HGF), należący do rodziny SF (scatter factors). Przez interakcję z produktem protonogenu c-Met, receptorem wykazującym aktywność kinazy tyrozynowej, HGF spełnia wiele ważnych biologicznych funkcji podczas embriogenezy i regeneracji tkanek [30,39,88]. Syntezowany jako nieaktywny czynnik, ulega aktywacji proteolitycznej, a następnie bierze m.in. udział w regulacji migracji i różnicowania komórek macierzystych naskórka i tworzeniu naczyń krwionośnych [57,87]. Czynnikiem wzrostu, który bierze udział w gojeniu ran i budzi nadzieje na zastosowanie praktyczne jest NGF. Udowodniono jego wpływ na przyspieszenie gojenia chronicznych owrzodzeń charakterystycznych dla „stopy cukrzycowej” [6,9]. NGF budową jest podobny do rodziny neurotrofin - polipeptydów stymulujących różnicowanie i aktywność komórek nerwowych. Komórki, które w czasie gojenia ekspresyjnie kodują NGF, to przede wszystkim komórki śródbłonka i fibroblasty. Pozwala to sądzić, że białko to wpływa na tworzenie tkanki ziarninowej oraz nowych naczyń krwionośnych [92].

### Aspekt kliniczny

W międzynarodowej bazie badań klinicznych (ClinicalTrials.gov) na zapytanie „wound healing” uzyskuje się ponad 3000 wyników (badania aktualne oraz zakończone, marzec, 2015). Liczba ta świadczy o dużym zainteresowa-

niu zespołów klinicznych oraz firm farmaceutycznych problemem gojenia ran. Badania dotyczą głównie testowania antybiotyków, białek, peptydów oraz komórek macierzystych. Te ostatnie stanowią dziś dużą nadzieję, jak również wyzwanie dla nowoczesnej chirurgii, dermatologii oraz inżynierii tkankowej. Populacje komórek wzbogaconych w komórki macierzyste i progenitorowe mogą być podawane pacjentowi w różnej postaci: bezpośredniej aplikacji na ranę (np. jako zawiesina), iniekcji (naczynia obwodowe), podania systemowego oraz podania na odpowiednim rusztowaniu biologicznym [96]. Tak podane komórki są podstawą do odbudowy tkanek, jak również źródłem czynników wzrostu oraz tworzą aktywną ochronę rany. Doświadczenia autorów wskazują, iż oprócz samej „jakości” komórek (stan zróżnicowania, żywotność), również postać podania (nośnik) ma ogromne znaczenie terapeutyczne. Przykładem może być żel fibrynowy, który jest efektywnym nośnikiem komórek skóry, wpływając pozytywnie na ich aktywność biologiczną [42]. Najczęściej aplikowanymi komórkami są namnożone *in vitro*, autologiczne komórki progenitorowe naskórka [73]. Trwają również intensywne prace nad wykorzystywaniem w leczeniu ran komórek MSCs (głównie pochodzenia szpikowego), ASCs lub HSCs. Komórki te podawane w różnej postaci stymulują gojenie rany, jednak ich działanie zależy od wielu czynników, takich jak etiologia rany, sposób podania, aktywacja przed podaniem itd. [19,80,94]. Testowane jest również podawanie dwóch rodzajów komórek np. MSCs oraz keratynocytów, co znacznie zwiększało wytwarzanie czynników wzrostu i wynik terapeutyczny (model zwierzęcy). Podejmowane są również próby wpływania na komórki macierzyste przez hamowanie/aktywację niektórych ich ścieżek sygnałowych. Eksperymentalnie udowodniono, że wprowadzenie inhibitora szlaku JAK/STAT do hodowli komórek macierzystych pozyskanych z dorosłych myszy miało znaczący wpływ na proliferację i zwiększało zdolność komórek do tworzenia kolonii. Wyniki testów *in vivo* na myszach, wykazały natomiast, że tygodniowe stosowanie opatrunku nasączonego wybranym inhibitorem JAK/STAT znacząco (powyżej 35%) zwiększało liczbę aktywnych cebulek włosa (patent WO2014013014 A1). Bada się również możliwości wpływania na komórki macierzyste przez modyfikacje genetyczne. Wprowadzenie do komórek MSCs genu kodującego PDGF-A oraz beta-defensyny zwiększało ich proliferację z działaniem stymulującym gojenie ran u zwierząt. Jednocześnie w wycinkach zregenerowanej skóry zaobserwowano mniejsze miana bakterii [35].

Powszechnie uważa się, iż profil wydzielania czynników wzrostu w trudno gojących się ranach, różni się znacznie od tego jaki występuje w skórze nienaruszonej, jak i ranach prawidłowo gojących się. Stąd próby aplikacji klinicznej czynników wzrostu mających przywrócić prawidłową dynamikę gojenia rany [51]. Nieprawidłowości w wytwarzaniu bądź aktywności czynników wzrostu mogą być spowodowane m.in. obecnością bakterii, brakiem substratów do wytwarzania białek (niedożywienie), słabym ukrwieniem, czy też przyjmowaniem leków cytotoksycznych (pacjenci onkologiczni) [2,11]. Istnieje wiele badań klinicznych, które mają na celu sprawdze-



nie wpływu danych czynników wzrostu na gojenie ran. W różnych badaniach klinicznych wykazano poprawę parametrów gojenia rany po miejscowej aplikacji NGF (po 15 dniach i 6 tygodniach), GM-CSF, jak również bFGF oraz EGF [36,40,59]. Dotychczas jednak największe nadzieje wiąże się z PDGF-BB, który przeszedł pomyślnie wszystkie fazy badań klinicznych. Dostępne są już żele zawierające PDGF, które aplikowane na ranę stymulują gojenie ran powstałych np. z powodu neuropatii cukrzycowej [7,33]. Obecnie testowany klinicznie jest również rekombinowany czynnik wzrostu VEGF<sub>165</sub> (VEGF-A), który planuje się także podawać łącznie z PDGF [28]. Przyspieszone gojenie ran obserwowane po zastosowaniu opatrunków okluzyjnych, według niektórych badaczy wiąże się m.in. ze wzrostem VEGF, wskutek przejściowej hipoksji związanej z opatrunkiem. Badania nad zastosowaniem inhibitorów TGF-beta w terapii gojenia ran są prowadzone również w redukcji tworzenia blizn. Proces gojenia w życiu płodowym kończy się odtworzeniem zdrowej tkanki, bez trwałego śladu (blizny). Odpowiada za to m.in. niewielkie stężenie TGF-beta w rejonie rany [2]. W fazie badań klinicznych znajdują się zarówno preparaty uwalniające izoformę TGF-beta3 (płodową) oraz preparaty zawierające antagonistów TGF-beta 1 i/lub 2. Trwają również intensywne badania nad tworzeniem konstruktów tkankowych uwalniających czynniki wzrostu (HGF, bFGF, CXCL5), stanowiące chemoatraktanty dla komórek macierzystych pochodzenia szpikowego [71]. Podejmowane są również owocne próby stosowania preparatów bogato płytkowych w leczeniu ran przewlekłych. Osocze bogato płytkowe zawiera wiele czynników wzrostu, w tym szczególnie PDGF, IGF, VEGF i tym samym stymuluje zarówno komórki naskórka, jak również fibroblasty skórne i komórki MSCs [78]. Badaczom udało się również zidentyfikować i wyizolować z ludzkich lisatów płytek krwi wiele krótkich peptydów o aminokwasowych sekwencjach podobnych do fragmentów ludzkiej trombiiny, które podane pojedynczo lub w mieszaninie kilku pep-

tydów wykazywały silne działanie proangiogenne i proliferacyjne wobec komórek śródbłonka *in vitro* oraz stymulowały gojenie ran w modelu zwierzęcym z lepszym skutkiem, niż dostępny komercyjnie preparaty [16]. Również peptydy otrzymane z odpowiedniego cięcia macierzy zewnątrzkomórkowej mają potencjał stymulujący gojenie ran (badania *in vitro*) [15,86]. Należy jednak zauważyć, iż czynniki wzrostu połączone ze stanem zapalnym, często obserwowanym w ranach przewlekłych, mogą również nieść potencjalne ryzyko transformacji nowotworowej. Z punktu widzenia mechanizmów komórkowych i humoralnych proces nowotworzenia ma wiele wspólnych cech z prawidłowym gojeniem rany (silna proliferacja, podobne czynniki wzrostu, udział komórek macierzystych, stan zapalny) [81]. Podstawowa różnica polega jednak na tym, iż prawidłowe gojenie rany jest ściśle kontrolowane i po jego zakończeniu dochodzi do naturalnego samoograniczenia. Należy zwrócić uwagę, że w leczeniu przewlekłych ran, oprócz wspomnianych czynników wzrostu i wielu rodzajów komórek, ogromne znaczenie mają również: przygotowanie chirurgiczne rany, kolonizacja bakteriami, ukrwienie danego obszaru tkanek oraz choroby towarzyszące, np. metaboliczne, autoimmunologiczne [51,60,62].

## PODSUMOWANIE

Gojenie rany przebiega z udziałem wielu czynników wzrostu oraz komórek macierzystych. Świadczy to o dużej złożoności tego procesu oraz wskazuje na potrzebę jego kompleksowego rozpatrywania zarówno pod kątem badawczym jak również klinicznym. Obecnie prowadzonych jest wiele badań klinicznych z udziałem czynników wzrostu oraz komórek macierzystych. Część z nich przyniosło już bardzo obiecujące wyniki terapeutyczne. Pozwala to mieć nadzieję, że nowoczesne terapie, szczególnie komórkowe oraz białkowe, pozwolą na osiągnięcie przełomu w leczeniu ubytków skórnych, np. oparzeń i ran przewlekłych.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Andrae J., Gallini R., Betsholtz C.: Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.*, 2008; 22: 1276-1312
- [2] Atala A., Lanza R., Thomson J.A., Nerem R.: *Principles of Regenerative Medicine*. Elsevier, New York 2011
- [3] Auxenfans C., Lequeux C., Perrusel E., Mojallal A., Kinikoglu B., Damour O.: Adipose-derived stem cells (ASCs) as a source of endothelial cells in the reconstruction of endothelialized skin equivalents. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2012; 6: 512-518
- [4] Bao P., Kodra A., Tomic-Canic M., Golinko M.S., Ehrlich H.P., Brem H.: The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J. Surg. Res.*, 2009; 153: 347-358
- [5] Beer H.D., Longaker M.T., Werner S.: Reduced expression of PDGF and PDGF receptors during impaired wound healing. *J. Invest. Dermatol.*, 1997; 109: 132-138
- [6] Bernabei R., Landi F., Bonini S., Onder G., Lambiasi A., Pola R., Aloe L.: Effect of topical application of nerve-growth factor on pressure ulcers. *Lancet*, 1999; 354: 307
- [7] Bhansali A., Venkatesh S., Dutta P., Dhillon M.S., Das S., Agrawal A.: Which is the better option: recombinant human PDGF-BB 0.01% gel or standard wound care, in diabetic neuropathic large plantar ulcers off-loaded by a customized contact cast? *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2009; 83: 13-16
- [8] Bielefeld K.A., Amini-Nik S., Alman B.A.: Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013; 70: 2059-2081
- [9] Blakytyn R., Jude E.: The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet. Med.*, 2006; 23: 594-608
- [10] Brownell I., Guevara E., Bai C.B., Loomis C.A., Joyner A.L.: Nerve-derived sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells. *Cell Stem Cell*, 2011; 8: 552-565
- [11] Burgdorf W.H., Plewig G., Wolff N.H., Landthaler M.: Braun-Falco Dermatologia, Wyd. Czelej, Lublin 2011
- [12] Cherubino M., Rubin J.P., Miljkovic N., Kelmendi-Doko A., Marra K.G.: Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Ann. Plast. Surg.*, 2011; 66: 210-215
- [13] Choi J.S., Leong K.W., Yoo H.S.: In vivo wound healing of diabetic ulcers using electrospun nanofibers immobilized with human epidermal growth factor (EGF). *Biomaterials*, 2008; 29: 587-596

- [14] Cichorek M., Wachulska M., Stasiewicz A., Tymieńska A.: Skin melanocytes: biology and development. *Postępy Dermatol. Alergol.*, 2013; 30: 30-41
- [15] Demidova-Rice T.N., Geevarghese A., Herman I.M.: Bioactive peptides derived from vascular endothelial cell extracellular matrices promote microvascular morphogenesis and wound healing in vitro. *Wound Repair Regen.*, 2011; 19: 59-70
- [16] Demidova-Rice T.N., Wolf L., Deckenback J., Hamblin M.R., Herman I.M.: Human platelet-rich plasma- and extracellular matrix-derived peptides promote impaired cutaneous wound healing in vivo. *PLoS One*, 2012; 7: e32146
- [17] Dent C.L., Lau G., Drake E.A., Yoon A., Case C.C., Gregory P.D.: Regulation of endogenous gene expression using small molecule-controlled engineered zinc-finger protein transcription factors. *Gene Ther.*, 2007; 14: 1362-1369
- [18] Deveza L., Choi J., Imanbayev G., Yang F.: Paracrine release from nonviral engineered adipose-derived stem cells promotes endothelial cell survival and migration in vitro. *Stem Cells Dev.*, 2013; 22: 483-491
- [19] Ebrahimian T.G., Pouzoulet F., Squiban C., Buard V., André M., Cousin B., Gourmelon P., Benderitter M., Casteilla L., Tamarat R.: Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2009; 29: 503-510
- [20] Ennis W.J., Sui A., Bartholomew A.: Stem Cells and Healing: Impact on Inflammation. *Adv. Wound Care (New Rochelle)*, 2013; 2: 369-378
- [21] Faler B.J., Macsata R.A., Plummer D., Mishra L., Sidawy A.N.: Transforming growth factor- $\beta$  and wound healing. *Perspect. Vasc. Surg. Endovasc. Ther.*, 2006; 18: 55-62
- [22] Fan Q., Yee C.L., Ohshima M., Tock C., Zhang G., Darling T.N., Vogel J.C.: Bone marrow-derived keratinocytes are not detected in normal skin and only rarely detected in wounded skin in two different murine models. *Exp. Hematol.*, 2006; 34: 672-679
- [23] Fathke C., Wilson L., Shah K., Kim B., Hocking A., Moon R., Isik F.: Wnt signaling induces epithelial differentiation during cutaneous wound healing. *BMC Cell Biol.*, 2006; 7: 4
- [24] Fiddes J.C., Hebda P.A., Hayward P., Robson M.C., Abraham J.A., Klingbeil C.K.: Preclinical wound-healing studies with recombinant human basic fibroblast growth factor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1991; 638: 316-328
- [25] Friedlander M., Brooks P.C., Shaffer R.W., Kincaid C.M., Varner J.A., Cheresch D.A.: Definition of 2 angiogenic pathways by distinct  $\alpha(V)$  integrins. *Science*, 1995; 270: 1500-1502
- [26] Fujita Y., Inokuma D., Abe R., Sasaki M., Nakamura H., Shimizu T., Shimizu H.: Conversion from human haematopoietic stem cells to keratinocytes requires keratinocyte secretory factors. *Clin. Exp. Dermatol.*, 2012; 37: 658-664
- [27] Gale N.W., Yancopoulos G.D.: Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.*, 1999; 13: 1055-1066
- [28] Galiano R.D., Tepper O.M., Pelo C.R., Bhatt K.A., Callaghan M., Bastidas N., Bunting S., Steinmetz H.G., Gurtner G.C.: Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *Am. J. Pathol.*, 2004; 164: 1935-1947
- [29] Ghahary A., Shen Y.J., Nedelec B., Scott P.G., Tredget E.E.: Enhanced expression of messenger-RNA for insulin-like growth factor-I in post-burn hypertrophic scar tissue and its fibrogenic role by dermal fibroblasts. *Mol. Cell. Biochem.*, 1995; 148: 25-32
- [30] Gherardi E., Sandin S., Petoukhov M.V., Finch J., Youles M.E., Öfverstedt L.G., Miguel R.N., Blundell T.L., Vande Woude G.F., Skoglund U., Svergun D.I.: Structural basis of hepatocyte growth factor/scatter factor and MET signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 4046-4051
- [31] Gibran N.S., Isik F.F., Heimbach D.M., Gordon D.: Basic fibroblast growth factor in the early human burn wound. *J. Surg. Res.*, 1994; 56: 226-234
- [32] Gołab K., Kizilel S., Bal T., Hara M., Zielinski M., Grose R., Savari O., Wang X.J., Wang L.J., Tibudan M., Krzystyniak A., Marek-Trzonkowska N., Millis J.M., Trzonkowski P., Witkowski P.: Improved coating of pancreatic islets with regulatory T cells to create local immunosuppression by using the biotin-polyethylene glycol-succinimidyl valeric acid ester molecule. *Transplant. Proc.*, 2014; 46: 1967-1971
- [33] Grayson L.S., Hansbrough J.F., Zapata-Sirvent R.L., Dore C.A., Morgan J.L., Nicolson M.A.: Quantification of cytokine levels in skin graft donor site wound fluid. *Burns*, 1993; 19: 401-405
- [34] Grazul-Bilska A.T., Johnson M.L., Bilski J.J., Redmer D.A., Reynolds L.P., Abdullah A., Abdullah K.M.: Wound healing: the role of growth factors. *Drugs Today*, 2003; 39: 787-800
- [35] Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T.: Wound repair and regeneration. *Nature*, 2008; 453: 314-321
- [36] Hao L., Wang J., Zou Z., Yan G., Dong S., Deng J., Ran X., Feng Y., Luo C., Wang Y., Cheng T.: Transplantation of BMSCs expressing hPDGF-A/hBD2 promotes wound healing in rats with combined radiation-wound injury. *Gene Ther.*, 2009; 16: 34-42
- [37] Hardwicke J., Schmaljohann D., Boyce D., Thomas D.: Epidermal growth factor therapy and wound healing - past, present and future. *Surgeon*, 2008; 6: 172-177
- [38] Hawinkels L.J., Ten Dijke P.: Exploring anti-TGF- $\beta$  therapies in cancer and fibrosis. *Growth Factors*, 2011; 29: 140-152
- [39] Holmes O., Pillozzi S., Deakin J.A., Carafoli F., Kemp L., Butler P.J., Lyon M., Gherardi E.: Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains. *J. Mol. Biol.*, 2007; 367: 395-408
- [40] Hong J.P., Jung H.D., Kim Y.W.: Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers. *Ann. Plast. Surg.*, 2006; 56: 394-398
- [41] Hu C., Yong X., Li C., Lü M., Liu D., Chen L., Hu J., Teng M., Zhang D., Fan Y., Liang G.: CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair. *J. Surg. Res.*, 2013; 183: 427-434
- [42] Imko-Walczyk B., Okuniewska A., Pikuła M., Nowacka-Pikuła D., Jaśkiewicz J., Trzonkowski P.: Możliwość klinicznego wykorzystania hodowli keratynocytów i komórek macierzystych naskórka w leczeniu przewlekłych owrzodzeń podudzi: doniesienie wstępne. *Przegl. Dermatol.*, 2012; 99: 230-234
- [43] Ito M., Liu Y., Yang Z., Nguyen J., Liang F., Morris R.J., Cotsarelis G.: Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat. Med.*, 2005; 11: 1351-1354
- [44] Itoh N., Ornitz D.M.: Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. *J. Biochem.*, 2011; 149: 121-130
- [45] Jaks V., Barker N., Kasper M., van Es J.H., Snippert H.J., Clevers H., Toftgård R.: Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat. Genet.*, 2008; 40: 1291-1299
- [46] Johnson D.E., Williams L.T.: Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.*, 1992; 60: 1-41
- [47] Kalinin A.E., Kajava A.V., Steinert P.M.: Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays*, 2002; 24: 789-800
- [48] Korta K., Kupczyk P., Skóra J., Pupka A., Zejler P., Hołysz M., Gajda M., Nowakowska B., Barć P., Dorobisz A.T., Dawiskiba T., Szyber P., Bar J.: Komórki macierzyste i progenitorowe w biostrukturze ścian

naczyń krwionośnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2013; 18: 982-995

[49] Kruszewski W.J., Rzepko R., Ciesielski M., Szeffel J., Zieliński J., Szajewski M., Jasiński W., Kawecki K., Wojtacki J.: Expression of HER2 in colorectal cancer does not correlate with prognosis. *Dis. Markers*, 2010, 29: 207-212

[50] Lal B.K., Saito S., Pappas P.J., Padberg F.T.Jr., Cerveira J.J., Hobson R.W.2nd, Duran W.N.: Altered proliferative responses of dermal fibroblasts to TGF- $\beta_1$  may contribute to chronic venous stasis ulcer. *J. Vasc. Surg.*, 2003; 37: 1285-1293

[51] Lanza R., Langer R., Vacanti J.: *Principles of Tissue Engineering*, Elsevier, 2007

[52] Lau K., Paus R., Tiede S., Day P., Bayat A.: Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp. Dermatol.*, 2009; 18: 921-933

[53] Le Roy H., Zuliani T., Wolowczuk I., Faivre N., Jouy N., Masselot B., Kerkaert J.P., Formstecher P., Polakowska R.: Asymmetric distribution of epidermal growth factor receptor directs the fate of normal and cancer keratinocytes in vitro. *Stem Cells Dev.*, 2010; 19: 209-220

[54] Lee S.H., Jin S.Y., Song J.S., Seo K.K., Cho K.H.: Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. *Ann. Dermatol.*, 2012; 24: 136-143

[55] Lee S.H., Lee J.H., Cho K.H.: Effects of human adipose-derived stem cells on cutaneous wound healing in nude mice. *Ann. Dermatol.*, 2011; 23: 150-155

[56] Levy V., Lindon C., Zheng Y., Harfe B.D., Morgan B.A.: Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J.*, 2007; 21: 1358-1366

[57] Li J.F., Duan H.F., Wu C.T., Zhang D.J., Deng Y., Yin H.L., Han B., Gong H.C., Wang H.W., Wang Y.L.: HGF accelerates wound healing by promoting the dedifferentiation of epidermal cells through  $\beta_1$ -integrin/ILK pathway. *Biomed Res. Int.*, 2013, 2013: 470418

[58] Mani S.A., Guo W., Liao M.J., Eaton E.N., Ayyanan A., Zhou A.Y., Brooks M., Reinhard F., Zhang C.C., Shipitsin M., Campbell L.L., Polyak K., Brisken C., Yang J., Weinberg R.A.: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 2008; 133: 704-715

[59] Mann A., Breuhahn K., Schirmacher P., Blessing M.: Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J. Invest. Dermatol.*, 2001; 117: 1382-1390

[60] Martin P.: Wound healing - aiming for perfect skin regeneration. *Science*, 1997; 276: 75-81

[61] Martino M.M., Briquez P.S., Güc E., Tortelli F., Kilarski W.W., Metzger S., Rice J.J., Kuhn G.A., Müller R., Swartz M.A., Hubbell J.A.: Growth factors engineered for super-affinity to the extracellular matrix enhance tissue healing. *Science*, 2014, 343: 885-888

[62] Moffatt C.J., Doherty D.C., Smithdale R., Franks P.J.: Clinical predictors of leg ulcer healing. *Br. J. Dermatol.*, 2010; 162: 51-58

[63] Montemurro F., Di Cosimo S., Arpino G.: Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive and hormone receptor-positive breast cancer: new insights into molecular interactions and clinical implications. *Ann. Oncol.*, 2013; 24: 2715-2724

[64] Morasso M.I., Tomic-Canic M.: Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol. Cell*, 2005; 97: 173-183

[65] Morris R.J., Liu Y., Marles L., Yang Z., Trempus C., Li S., Lin J.S., Sawicki J.A., Cotsarelis G.: Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat. Biotech.*, 2004; 22: 411-417

[66] Nair R.P., Krishnan L.K.: Identification of p63+ keratinocyte progenitor cells in circulation and their matrix-directed differentiation to epithelial cells. *Stem Cell Res. Ther.*, 2013; 4: 38

[67] Nessler M., Puchala J., Wood F.M., Wallace H.J., Fear M.W., Nessler K., Drukala J.: Changes in the plasma cytokine and growth factor profile are associated with impaired healing in pediatric patients treated with INTEGRA® for reconstructive procedures. *Burns*, 2013; 39: 667-673

[68] Niessen F.B., Andriessen M.P., Schalkwijk J., Visser L., Timens W.: Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *J. Pathol.*, 2001; 194: 207-216

[69] Nowak J.A., Polak L., Pasolli H.A., Fuchs E.: Hair follicle stem cells are specified and function in early skin morphogenesis. *Cell Stem Cell*, 2008; 3: 33-43

[70] Oyama N., Kaneko F.: Cell-type-specific differentiation and molecular profiles in skin transplantation: implication of medical approach for genetic skin diseases. *J. Transplant.*, 2011; 2011: 501857

[71] Peplow P.V., Chatterjee M.P.: A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. *Cytokine*, 2013; 62: 1-21

[72] Pierce G.F., Tarpley J.E., Tseng J., Bready J., Chang D., Kenney W.C., Rudolph R., Robson M.C., Vande Berg J., Reid P.: Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and absence of PDGF in chronic non-healing wounds. *J. Clin. Invest.*, 1995; 96: 1336-1350

[73] Piłkuła M., Imko-Walczyk B., Nowacka-Piłkuła D., Okuniewska A., Langa P., Jaśkiewicz J., Trzonkowski P.: Możliwości hodowli keratynocytów oraz komórek macierzystych naskórki i ich zastosowania w leczeniu trudno gojących się ran. *Przegl. Dermatol.*, 2012; 99: 222-229

[74] Piłkuła M., Kondej K., Jaśkiewicz J., Skokowski J., Trzonkowski P.: Flow cytometric sorting and analysis of human epidermal stem cell candidates. *Cell Biol. Int.*, 2010, 34: 911-915

[75] Piłkuła M., Marek-Trzonkowska N., Wardowska A., Renkielska A., Trzonkowski P.: Adipose tissue-derived stem cells in clinical applications. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2013; 13: 1357-1370

[76] Piłkuła M., Trzonkowski P.: Biologia komórek macierzystych naskórki oraz ich znaczenie w medycynie. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2009; 63: 449-456

[77] Proksch E., Brandner J.M., Jensen J.M.: The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.*, 2008; 17: 1063-1072

[78] Roubelakis M.G., Trohatou O., Roubelakis A., Mili E., Kalaitzopoulos I., Papazoglou G., Pappa K.I., Anagnou N.P.: Platelet-rich plasma (PRP) promotes fetal mesenchymal stem/stromal cell migration and wound healing process. *Stem Cell Rev.*, 2014; 10: 417-428

[79] Santoro M.M., Gaudino G.: Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelialization during wound healing. *Exp. Cell Res.*, 2005; 304: 274-286

[80] Schreml S., Szeimies R.M., Prantl L., Landthaler M., Babilas P.: Wound healing in the 21st century. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2010; 63: 866-881

[81] Segrelles C., García-Escudero R., Garín M.I., Aranda J.F., Hernández P., Ariza J.M., Santos M., Paramio J.M., Lorz C.: Akt signaling leads to stem cell activation and promotes tumour development in epidermis. *Stem Cells*, 2014; 32: 1917-1928

[82] Shokrgozar M.A., Fattahi M., Bonakdar S., Ragerdi Kashani I., Majidi M., Haghighipour N., Bayati V., Sanati H., Saeedi S.N.: Healing potential of mesenchymal stem cells cultured on a collagen-based scaffold for skin regeneration. *Iran Biomed. J.*, 2012; 16: 68-76

[83] Silva-Vargas V., Lo Celso C., Giangreco A., Ofstad T., Prowse D.M., Braun K.M., Watt F.M.:  $\beta$ -catenin and Hedgehog signal strength can specify number and location of hair follicles in adult epidermis without recruitment of bulge stem cells. *Dev. Cell*, 2005; 9: 121-131

[84] Staniszevska M., Słuczanaowska-Głębowska S., Drukala J.: Stem cells and skin regeneration. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2011; 49: 375-380

- [85] Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meyer E.M., Morel L., Petersen B.E., Scott E.W.: Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 2002; 416: 542-545
- [86] Tomioka H., Nakagami H., Tenma A., Saito Y., Kaga T., Kanamori T., Tamura N., Tomono K., Kaneda Y., Morishita R.: Novel anti-microbial peptide SR-0379 accelerates wound healing via the PI3 kinase/Akt/mTOR pathway. *PLoS One*, 2014; 9: e92597
- [87] Toyoda M., Takayama H., Horiguchi N., Otsuka T., Fukusato T., Merlino G., Takagi H., Mori M.: Overexpression of hepatocyte growth factor/scatter factor promotes vascularization and granulation tissue formation in vivo. *Febs Lett.*, 2001; 509: 95-100
- [88] Trusolino L., Comoglio P.M.: Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat. Rev. Cancer*, 2002; 2: 289-300
- [89] Urbich C., Dimmeler S.: Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.*, 2004; 95: 343-353
- [90] Wang X.J., Leveson-Gower D., Golab K., Wang L.J., Marek-Trzonkowska N., Krzystyniak A., Wardowska A., Millis J.M., Trzonkowski P., Witkowski P.: Influence of pharmacological immunomodulatory agents on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> T regulatory cells in humans. *Int. Immunopharmacol.*, 2013; 16: 364-370
- [91] Werner S.: Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 1998; 9: 153-165
- [92] Werner S., Grose R.: Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.*, 2003; 83: 835-870
- [93] Werner S., Krieg T., Smola H.: Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Invest. Dermatol.*, 2007; 127: 998-1008
- [94] Wettstein R., Savic M., Pierer G., Scheufler O., Haug M., Halter J., Gratwohl A., Baumberger M., Schaefer D.J., Kalbermatten D.F.: Progenitor cell therapy for sacral pressure sore: a pilot study with a novel human chronic wound model. *Stem Cell Res. Ther.*, 2014; 29: 18
- [95] Wight T.N., Potter-Perigo S.: The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2011; 301: 950-955
- [96] Wu Y., Wang J., Scott P.G., Tredget E.E.: Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Rep. Reg.*, 2007; 15: S18-S26
- [97] Yarden Y.: The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer*, 2001; 37: S3-S8
- 

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.