

# Możliwości hodowli keratynocytów oraz komórek macierzystych naskórka i ich zastosowania w leczeniu trudno gojących się ran

## The culture of keratinocytes and epidermal stem cells and their possible application in the treatment of chronic wounds

Michał Pikuła<sup>1</sup>, Beata Imko-Walczuk<sup>2,3</sup>, Danuta Nowacka-Pikuła<sup>4</sup>, Aleksandra Okuniewska<sup>2</sup>, Paulina Langa<sup>1</sup>, Janusz Jaśkiewicz<sup>5</sup>, Piotr Trzonkowski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: dr hab. n. med. Piotr Trzonkowski, prof. nadzw. GUmed

<sup>2</sup>Oddział Dermatologii Pomorskiego Centrum Traumatologii im. M. Kopernika w Gdańsku  
Ordynator: dr n. med. Maria Czubek

<sup>3</sup>Wyższa Szkoła Zdrowia, Urody i Edukacji w Poznaniu, Wydział Zamiejscowy w Gdyni  
Rektor: prof. dr hab. n. med. Barbara Raszeja-Kotelba

<sup>4</sup>Oddział Rehabilitacji dla Dzieci Wojewódzkiego Zespołu Reumatologicznego w Sopocie  
Ordynator: dr n. med. Agata Deja

<sup>5</sup>Katedra i Klinika Chirurgii Onkologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Janusz Jaśkiewicz

Przeł Dermatol 2012, 99, 222–229

---

### STRESZCZENIE

**SŁOWA KLUCZOWE:**  
rany przewlekłe, hodowla keratynocytów, komórki macierzyste naskórka.

**KEY WORDS:**  
chronic wounds, keratinocyte culture, epidermal stem cells.

Leczenie trudno gojących się ran wciąż stanowi poważny problem współczesnej medycyny. W większości przypadków wymaga ono wielokierunkowej interdyscyplinarnej współpracy wyspecjalizowanych zespołów lekarskich i pielęgniarskich, co pociąga znaczne nakłady finansowe. W wielu przypadkach jednak leczenie konwencjonalne ran przewlekłych nie przynosi spodziewanych efektów terapeutycznych, dlatego wciąż poszukuje się nowych, alternatywnych metod terapii. Jedną z nich jest przeszczepianie wyhodowanych *in vitro* keratynocytów. W pracy omówiono metody hodowli keratynocytów i komórek macierzystych naskórka oraz możliwości ich przeszczepiania. Poruszono również aspekty bezpieczeństwa oraz ograniczenia omawianej techniki, a także przedstawiono doświadczenia własne autorów związane z techniką hodowli komórek naskórka dla celów terapeutycznych.

### ABSTRACT

Treatment of chronic wounds is still a serious problem in contemporary medicine. In the majority of cases it requires multi-disciplinary cooperation of specialized doctor and nursing teams and significant financial expenses. In many cases the conventional treatment of chronic wounds does not bring the expected therapeutic results, although new alternative therapeutic methods are being researched. One such method is the transplantation of *in vitro* cultured keratinocytes. The presented work focuses on methods of keratinocyte and epidermal stem cell culture, and the possibility of their transplantation. Safety aspects as well as the limitations of the analysed techniques are discussed. Also the authors present their experience concerning with epidermal cell culture for therapeutic purposes.

**ADRES DO KORESPONDENCJI:**  
dr n. med. Michał Pikuła  
Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
ul. Dębinki 7  
80-211 Gdańsk  
tel.: +48 58 349 15 92 (90)  
e-mail: pikula@gumed.edu.pl

## WPROWADZENIE

Leczenie trudno gojących się, przewlekłych ran stanowi poważny problem terapeutyczny. W wielu przypadkach terapia konwencjonalna nie przynosi spodziewanych efektów, dlatego wciąż poszukuje się nowych, alternatywnych metod, a jedną z nich jest przeszczepianie wyhodowanych *in vitro* keratynocytów.

## KERATYNOCYTY I KOMÓRKI MACIERZYTE NASKÓRKA

Keratynocyty są głównym komponentem komórkowym ludzkiego naskórka. Tworzą one nie tylko barierę dla przenikania wirusów, bakterii, różnorodnych związków chemicznych i czynników fizycznych, lecz także pełnią wiele funkcji fizjologicznych i immunologicznych. Zarówno keratynocyty, jak i komórki Langerhansa mogą prezentować antygeny limfocytom T oraz wydzielać cytokiny, włączając inne komórki do odpowiedzi immunologicznej. Keratynocyty chronią również organizm przed utratą wody oraz są odpowiedzialne za prawidłową homeostazę organizmu [1–3]. Prekursorami dojrzałych keratynocytów są komórki macierzyste naskórka, warunkujące ciągłą jego odnowę i wymianę keratynocytów [4]. Komórki macierzyste odgrywają również istotną rolę podczas gojenia się ran, a ich dysfunkcja lub niewystarczająca liczba są częstymi przyczynami utrudnionego, przewlekłego procesu gojenia. Komórki te odpowiadają również za prawidłową hodowlę (namnażanie) keratynocytów w warunkach *in vitro* [5]. Komórki macierzyste stanowią około 2–7% komórek warstwy podstawnej naskórka i jako długo rezydujące komórki są w sposób szczególny narażone na mutacje, stąd biorą one także udział w etiopatogenezie nowotworów skóry. Dzieląc się asymetrycznie, dają początek komórkom przejściowo namnażającym się, charakteryzującym się wysokim potencjałem proliferacyjnym, oraz komórkom macierzystym [6]. Komórki macierzyste naskórka umiejscowione są w trzech regionach naskórka: w warstwie podstawnej, górnym rejonie mieszka włosowego (w małym wybrzuszeniu) oraz w macierzy germinalnej mieszka włosowego. Komórki macierzyste występujące w małym wybrzuszeniu są największym rezerwuarem komórek macierzystych skóry. Uważane są za komórki pluripotencjalne zdolne do odtwarzania m.in. gruczołów łojowych i mieszków włosowych. Komórki macierzyste naskórka oraz inne tzw. dorosłe komórki macierzyste (ang. *adult stem cells*) cechuje stan uśpienia metabolicznie powiązanego z wydłużeniem cyklu komórkowego. Z tego względu mogą one być izolowane za pomocą cytometru sortującego jako komór-

ki słabo kumulujące barwniki metaboliczne, np. rodaminę 123 [7, 8]. Obecnie integryny  $\beta 1$  oraz  $\alpha 6$  wykorzystuje się również jako markery tych komórek. Wysoka ekspresja cząsteczek adhezyjnych pozwala także na selekcję komórek macierzystych naskórka w technice tzw. szybkiego przylegania oraz podczas rutynowej hodowli przez pierwsze 24 godziny (niespecyficzenie) [9]. Komórki macierzyste mają też wysoki poziom  $\beta$ -kateniny cytoplazmatycznej, cytokeratyny 19 oraz białka p63 [10].

## IZOLACJA KERATYNOCYTÓW I KOMÓREK MACIERZYSTYCH NASKÓRKA

Izolację komórek w laboratorium poprzedza pobranie materiału do hodowli od pacjenta. Zwykle wycinek skóry o wielkości około 1 cm<sup>2</sup> pobiera się w znieczuleniu nasiękowym (1% lignokaina). Następnie całą procedurę izolacji komórek naskórka przeprowadza się w warunkach sterylnych z użyciem metody mechanicznej, a następnie metod enzymatycznych (ryc. 1.). Wycinek skóry pobrany od pacjenta przemywa się roztworem penicyliny ze streptomycyną, a następnie tnie się na małe fragmenty, które są inkubowane w roztworze enzymu – dyspazy (16 godzin). Po tym etapie naskórek zostaje mechanicznie oddzielony od skóry właściwej. Następnie rozdzielone fragmenty naskórka są inkubowane w roztworze kolejnego enzymu – trypsyny –



Rycina 1. Schemat obrazujący kolejne etapy izolacji keratynocytów ze skóry pacjenta

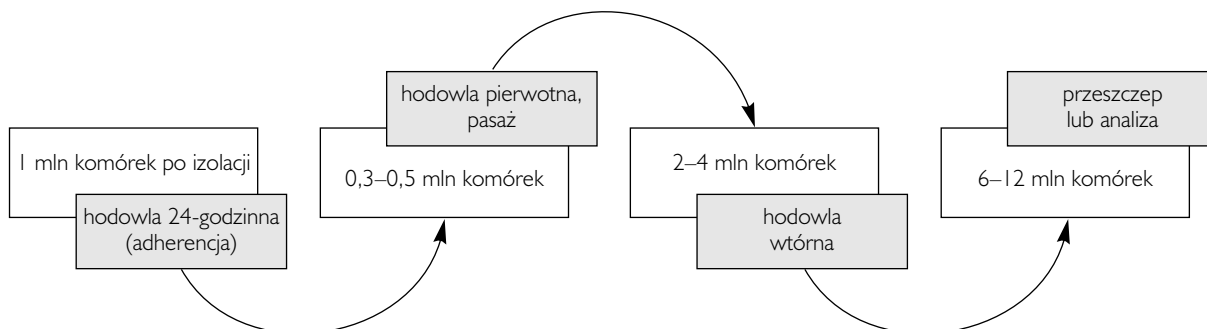
Figure 1. Diagram showing the stages of isolation of keratinocytes from patient's skin

w celu otrzymania zawiesiny pojedynczych komórek, które po odwirowaniu są przenoszone do naczyń hodowlanych lub alternatywnie poddawane procedurze selektywnej izolacji w cytometrze sortującym (ang. *fluorescent-activated cell sorter* – FACS) [11, 12]. Metoda sortowania opiera się na wyznakowaniu komórek przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromem, analizie cytometrycznej, podobnie jak w konwencjonalnej cytometrii przepływowej, a następnie izolacji komórek o pożądanym fenotypie (obecności odpowiednich antygenów). W przypadku izolacji komórek macierzystych naskórka sortowane są najczęściej komórki o wysokiej ekspresji  $\beta 1$  integryny oraz niskiej ekspresji receptora CD71 (receptor dla transferyny). Wyselekcjonowane komórki są następnie przenoszone do medium i hodowane do uzyskania odpowiedniej ich liczby. Krótkotrwała hodowla komórek bezpośrednio po izolacji również stanowi pewien element ich selekcji. Hodowane są bowiem wyłącznie komórki przylegające do podłoża, a usuwane wraz z wymianą medium komórki nieprzylegające (martwe, uszkodzone, wysoko zróżnicowane keratynocyty). Po tym etapie komórki są hodowane do uzyskania odpowiedniej ich liczby do przeszczepu [9, 13].

## MODELE HODOWLI KERATYNOCYTÓW I NASKÓRKA

Hodowle keratynocytów w postaci jednej warstwy i całego naskórka oraz złożonych substytutów skórnych wciąż wiążą się z pewnymi trudnościami technicznymi, dlatego obecnie istnieje wiele modeli ich prowadzenia na potrzeby terapii [14, 15]. Pierwszym modelem hodowli keratynocytów była metoda opracowana w 1975 roku przez Rheinwalda i Greena [16]. Komórki naskórka hodowane były w pożywce z surowicą na warstwach odżywczych inaktywowanych fibroblastów. Fibroblasty wydzielają w tym układzie wiele mitogenów oraz elementów macierzy zewnątrzkomórkowej, tym samym ułatwiają wzrost

i adhezję keratynocytów. Modyfikacją hodowli komórek naskórka upraszczającą tę procedurę było wykorzystanie odpowiednich plastików jako powierzchni dla wzrostu komórek. Powierzchnie te zapewniały odpowiednią adhezję oraz proliferację komórek [17]. Do hodowli komórek naskórka stosuje się także powierzchnie powlekanie białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (kolagen I, IV, Matrigel), keratynocyty wykazują bowiem lepsze właściwości adhezyjne oraz proliferacyjne podczas wzrostu na tego typu powierzchniach [18]. Modyfikując powierzchnie do wzrostu komórek, ocenia się również interakcje keratynocytów z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, co ma istotne znaczenie np. podczas badania procesów gojenia się ran lub nowotworzenia [19]. Nowe powierzchnie mogą ponadto modyfikować fenotyp hodowanych keratynocytów i w ten sposób przyczynić się do bardziej efektywnej terapii komórkowej. Białka macierzy są też pomocne przy tworzeniu przestrzennych modeli skóry, które mogą zawierać również inne, poza keratynocytami, komórki, takie jak fibroblasty, melanocyty lub komórki śródbłonna [20]. Jako medium hodowane na początku stosowano głównie pożywki z dodatkiem płodowej surowicy bydlęcej [21]. Pożywki te mogą jednak zawierać przeciwciała oraz indukować niespecyficznym różnicowanie keratynocytów. Ponadto surowica nie gwarantuje powtarzalności warunków hodowli (różne serie). Dlatego też obecnie stosuje się równolegle pożywki oparte na rekombinowanych czynnikach wzrostu. Media te zapewniają prawidłową proliferację komórek oraz większe bezpieczeństwo terapii [22]. Keratynocyty hodowane w tych pożywkach z dodatkiem jonów wapnia (0,06–0,15 mM zamiast 1,2 mM) wykazują wiele podobieństw do komórek warstwy podstawnej naskórka. Należy do nich wysoka aktywność proliferacyjna, ekspresja cytokeratyn 5 i 14 oraz  $\beta 1$  integryn. Szacunkowe liczby komórek, jakie są uzyskiwane podczas kolejnych etapów hodowli, oraz zdjęcie przykładowej hodowli keratynocytów przedstawiono na rycinach 2. i 3.



Rycina 2. Schemat obrazujący szacunkowe liczby komórek uzyskiwanych na potrzeby terapii podczas kolejnych etapów hodowli komórkowej (dane własne)

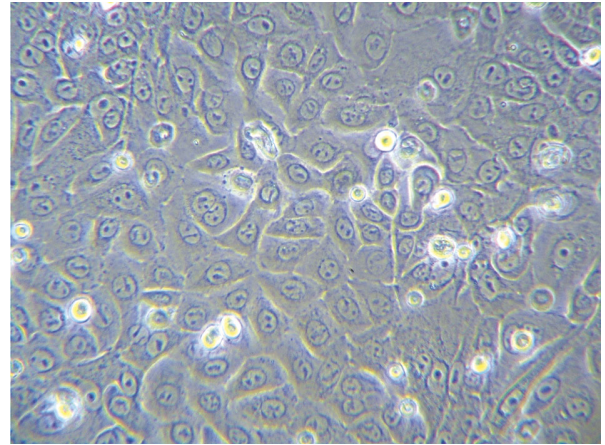
Figure 2. Diagram showing the estimated numbers of cells obtained for therapy in the various stages of cell culture (own data)

Dodanie do pożywki jonów wapnia indukuje wiele strukturalnych i biochemicznych zmian charakterystycznych dla suprabazalnych warstw naskórka. Należy do nich m.in. wytworzenie silnych połączeń międzykomórkowych, zahamowanie cyklu komórkowego oraz ekspresja markerów terminalnego różnicowania keratynocytów (w tym zmniejszenie ekspresji integryn). Fenotyp tych komórek wykorzystuje się do uzyskania pełnej grubości naskórka *in vitro*. Otrzymanie pełnego naskórka ułatwia dodanie do pożywki surowicy, po uzyskaniu przez komórki odpowiedniej konfluencji. Uzyskany w ten sposób naskórek oddzielany jest od podłoża bez niszczenia połączeń międzykomórkowych za pomocą dyspazy [23]. Inną metodą hodowli naskórka jest technika z ułatwionym dostępem powietrza (ang. *air-liquid interface*), wprowadzona po raz pierwszy w 1983 roku. Metoda ta pozwoliła na uzyskanie w pełni zróżnicowanego naskórka mającego warstwę rogową oraz ziarnistą. W tym przypadku wykorzystuje się filtry, na których hodowane są keratynocyty. Zapewniają one trwałą podporę dla komórek, które mogą się przyczepiać do podłoża za pomocą integryn oraz tworzyć hemidesmosomy, a następnie ulegać różnicowaniu i nawarstwianiu. W takim układzie komórki łatwo mogą podlegać działaniu atmosfery, ponieważ pożywka znajduje się tylko w dolnym przedziale, pod filtrem [24]. Dostęp powietrza w tym modelu ma wzmacniać syntezę profilagryny oraz formowanie ziaren keratohialinowych, które są niezbędne do ostatecznego różnicowania naskórka. Uzyskany *in vitro* naskórek różni się jednak od tego *in vivo*, m.in. przepuszczalnością. Wynika to z różnic w budowie warstwy rogowej oraz z faktu, że dotąd nie udało się wystymulować tworzenia łoju i powierzchni hydrofobowej.

W przypadku rozległych oparzeń uzyskanie zdrowej tkanki do autoprzeszczepu jest wyjątkowo trudne i dlatego optymalizacja namnażania keratynocytów *in vitro* wydaje się szczególnie istotna. Należy również zwrócić uwagę na aktywację komórek naskórka po ich izolacji i przeniesieniu do hodowli. Dzięki temu po ich przeszczepieniu obserwuje się wzmoczoną stymulację gojenia się rany w porównaniu z przeszczepem komórek bezpośrednio izolowanych i przeszczepianych, bez wcześniejszej hodowli *in vitro* [25, 26].

#### NAMNAŻANIE KOMÓREK MACIERZYSTYCH NASKÓRKA *IN VITRO*

Efektywna ekspansja komórek macierzystych jest wciąż problemem badawczym, do którego pełnego poznania jeszcze daleka droga, i dotyczy to w zasa-



Rycina 3. Konfluentna hodowla ludzkich keratynocytów po pierwszym pasażu

Figure 3. Confluent culture of human keratinocytes after the first passage

dzie wszystkich rodzajów komórek macierzystych mogących służyć terapii komórkowej. Jak już wcześniej zaznaczono, komórkami decydującymi o prawidłowym wzroście keratynocytów *in vitro* są ich prekursorzy, czyli komórki macierzyste naskórka. Populacja komórek macierzystych ma także decydujące znaczenie w procesie gojenia się ran po przeszczepie. W związku z tym oczywista wydaje się potrzeba utrzymania komórek macierzystych w hodowli w ich stanie fenotypowym komórek niezróżnicowanych [27]. W tym celu należy poszukiwać z jednej strony czynników stymulujących wzrost tych komórek, a z drugiej hamujących ich różnicowanie. Jednocześnie uzasadnione wydaje się sortowanie komórek macierzystych pochodzących z naskórka pacjenta, a następnie ich hodowla *in vitro* w stanie niezróżnicowanym. Podczas hodowli obserwuje się jednak efekty stopniowego różnicowania keratynocytów, co nazywa się inwersją klonalną. Polega ona na stopniowym zastępowaniu holoklonów, w skład których wchodzi komórki macierzyste, meroklonami i paraklonami (komórkami zróżnicowanymi). Do hodowli komórek macierzystych naskórka wykorzystuje się zarówno media z dodatkiem surowicy, jak i te bez surowicy, które są dodatkowo suplementowane wybranymi czynnikami wzrostu. Spośród tych czynników nadzieje budzą głównie czynniki wzrostu: nabłonkowy (ang. *epidermal growth factor* – EGF), hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor* – HGF), keratynocytów (ang. *keratinocyte growth factor* – KGF), transformujący (ang. *transforming growth factor β* – TGF-β) [7, 28]. Stosowane są także różne powierzchnie hodowlane, spośród których najbardziej efektywne wydają się powierzchnie powlekane składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zawierające inaktywowane fibroblasty [29]. Obiecujące efekty przyniosło wykorzystanie włóknika jako powierzchni dla wzro-

stu keratynocytów. Zastosowanie tego substratu powodowało hamowanie inwersji klonalnej w hodowanych keratynocytach oraz stymulowało wzrost komórek [30]. Należy jednak zwrócić uwagę na to, że stwarzanie warunków dla hodowli komórek macierzystych (zwłaszcza wcześniej specjalnie wysortowanych) może wiązać się z ich wolniejszym wzrostem *in vitro* w porównaniu z komórkami częściowo zróżnicowanymi. Może to stanowić pewną wadę z punktu widzenia aplikacji tak uzyskanych komórek. Optymalizacja hodowli komórek macierzystych naskórka musi więc uwzględniać także dynamikę podziałów komórkowych, a w konsekwencji czas potrzebny do otrzymania odpowiedniej liczby komórek [8].

### PRZESZCZEPY WYHODOWANYCH KOMÓREK

Hodowle pozaustrojowe keratynocytów, a także komórek innych narządów od lat budziły duże zainteresowanie badaczy w związku z możliwościami ich późniejszego wykorzystania w terapii. Metoda przeszczepów wyhodowanych komórek naskórka jest jednym z największych osiągnięć ostatnich lat w leczeniu oparzeń oraz trudno gojących się ran [31]. Wydaje się, że największe znaczenie mają autologiczne przeszczepy wyhodowanych komórek. Zwiększają one przede wszystkim bezpieczeństwo pacjenta (jednocześnie dawcy i biorcy) oraz nie niosą ryzyka odrzucenia przeszczepu. Leczenie ran za pomocą przeszczepiania płatów hodowanego naskórka wprowadzono w 1981 roku [32]. Modyfikacją tej metody było przeszczepianie zawiesiny komórek lub komórek będących elementem złożonego substytutu skórnoego. Uważa się, że regeneracja naskórka uzyskiwana przy użyciu hodowanych autologicznych keratynocytów może być metodą ratującą życie pacjentom z rozległymi oparzeniami [30]. Znacznym postępowaniem w przeszczepianiu komórek w postaci zawiesiny było zastosowanie keratynocytów zawieszonych w żelu fibrynowym (ang. *keratinocyte-fibrin-suspension*) w celu leczenia chronicznych owrzodzeń podudzi. Uważa się, że włóknik – naturalnie występujący substrat – odgrywa ważną rolę w procesie gojenia się rany i używano go podczas leczenia trudno gojących się ran oraz oparzeń. Wykazano, że włóknik w pośredni sposób stymuluje migrację keratynocytów, a także tworzenie naskórka zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [33]. Przeszczep wykonany z użyciem tej metody zastosowany do leczenia oparzeń skóry pełnej grubości umożliwia pełną regenerację naskórka. Hodowle tego typu redukują ponadto koszty uzyskania komórek do przeszczepu oraz upraszczają procedury związane z manipulacją i transportem przeszczepu. Jedną z ważnych zalet stosowania komórek w zawiesinie

jest stosunkowo krótki czas od pobrania do przeszczepu w porównaniu z konwencjonalnymi płatami substytutów skórnych (ang. *conventional sheet graft*) [34]. Zastosowanie techniki zawieszinowej bez nakładania warstwy siatki w leczeniu oparzeń trzeciego stopnia powoduje reepitalizację naskórka w ciągu 2 tygodni. W przypadku aplikacji na długo gojącą się ranę nie doprowadza to jednak do mechanicznej stabilności rany, podobnie jak w przypadku konwencjonalnych substytutów skórnych [35]. Doniesienia wskazują, że należy stosować równoległe pokrycie rany zabezpieczające przeszczepione komórki oraz chroniące je przed wysuszeniem podczas gojenia się rany. Przeszczepy autologicznych keratynocytów dają także zadowalające efekty w leczeniu chronicznych owrzodzeń. Dowiedziono, że po 6 tygodniach od przeszczepu następuje wyraźna poprawa jakości życia pacjentów oraz wzrasta reepitalizacja i wskaźnik gojenia rany [36]. Ostatnio podejmuje się również obiecujące próby przeszczepiania keratynocytów w systemie autologicznym pacjentom cierpiącym na wrodzone pęcherzowe oddzielanie się naskórka (*epidermolysis bullosa hereditaria*) [37]. Czynniki wpływającymi na powodzenie przeszczepów naskórka są m.in. sposób przygotowania łożyska rany oraz istnienie zakażeń bakteryjnych rany oparzeniowej, które wydają się główną przyczyną niepowodzeń w przeszczepianiu. Szczególnie w pierwszych dniach po przeszczepie delikatny i niezrogowaciały naskórek, który nie ma jeszcze wykształconego połączenia ze skórą właściwą, jest bardzo podatny na uszkodzające działanie zakażeń bakteryjnych. Dla przyjęcia przeszczepu istotna jest także odpowiednia liczba komórek macierzystych warunkujących prawidłowe gojenie się rany.

Leczenie trudno gojących się ran można prowadzić także, stosując przeszczepy hodowanego naskórka alogenicznego. Przyjmuje się jednak, że ten rodzaj przeszczepu stanowi tylko tymczasowe pokrycie ziarniny, a komórki dawcy są zastępowane przez keratynocyty biorcy pochodzące z zachowanych przydatków skóry. Keratynocyty pochodzące właśnie z mieszków włosowych i gruczołów potowych stymulowane są przez czynniki wzrostowe keratynocytów przeszczepionych, w wyniku czego następuje regeneracja naskórka biorcy. Stymulacja gojenia ran następuje przez wydzielanie wielu czynników wzrostu i cytokin, takich jak: TGF, czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor* – FGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor* – PDGF), EGF, interleukiny 1, 6, 8 (IL-1, IL-6, IL-8) [3, 38, 39]. Należy również zwrócić uwagę na możliwość łącznego stosowania keratynocytów z innymi rodzajami komórek. Przykładem może być leczenie bielactwa, w którym stosuje

się łącznie wyhodowane keratynocyty oraz melanoocyty. Metoda ta przyniosła obiecujące rezultaty w postaci trwałego przyjęcia przeszczepu komórek oraz repigmentacji [40]. Przeszczepiane mogą być również z powodzeniem keratynocyty wraz z fibroblastami, prekursorami komórek śródbłonna lub komórkami Schwanna [12, 41].

## **BEZPIECZEŃSTWO I OGRANICZENIA METODY**

Procedura przeszczepiania wyhodowanych komórek naskórka w systemie autologicznym uważana jest za bezpieczną metodę terapii. Mimo to należy dokładać wszystkich starań, aby minimalizować jakiegokolwiek ryzyko dla pacjenta. Najistotniejszym i krytycznym etapem procedury jest izolacja i hodowla komórek w laboratorium. W celu wyeliminowania ryzyka zakażenia pacjentów chorobą BSE (ang. *bovine spongiform encephalopathy*), czyli gąbczastą encefalopatią bydła, surowica używana w hodowli komórek powinna pochodzić z Australii lub Nowej Zelandii, krajów, w których nie wykryto u zwierząt zakażeń BSE. Ponadto obecnie dąży się do stosowania wyłącznie pożywek opartych na rekombinantowych czynnikach wzrostu. Komórki powinny być hodowane również zgodnie z odpowiednimi zasadami i procedurami, które gwarantują bezpieczeństwo terapii. W tym przypadku mają zastosowanie przede wszystkim zasady dobrej praktyki laboratoryjnej w hodowli komórek (ang. *good cell culture practice* – GCCP) oraz zasady dobrej praktyki wytwarzania (ang. *good manufacturing practice* – GMP) [22, 42]. Zasady te zakładają m.in. pełną kontrolę i dokumentację warunków wytwarzania produktów leczniczych oraz opisują wymagania stawiane pracownikom i sprzętowi [43]. Szczególnie ważne jest, żeby hodowla odbywała się w laboratoriach gwarantujących izolację komórek od środowiska zewnętrznego (system słuz i filtrów powietrza, kombinezony personelu) oraz zapewniających utrzymanie stałej temperatury i wilgotności powietrza oraz ich ciągle monitorowanie. Spełnienie wyżej wymienionych parametrów zapewnia z jednej strony odpowiednią ekspansję komórek *in vitro*, a z drugiej warunkuje bezpieczeństwo dla pacjenta [11, 13]. Drugim koniecznym czynnikiem jest przeszkolony i doświadczony personel prowadzący wszystkie etapy izolacji i hodowli komórek.

Innym istotnym elementem hodowli komórek jest ich stabilność genetyczna. Przeprowadzone dokładne badania molekularne nie wykazały żadnych zmian epigenetycznych w hodowanych keratynocytach oraz ich prekursorach. Nie zaobserwowano również indukcji procesów transformacji nowotworowej hodowanych komórek naskórka [44]. Również wieloletnie obserwacje skóry zregenerowanej za

pomocą hodowanych keratynocytów nie wykazały zmian przednowotworowych. Obserwowano jednak (rzadko) nadmierne złuszczenie naskórka lub tworzenie pęcherzy w miejscu przeszczepu.

Metoda przeszczepów wyhodowanych komórek naskórka ma również pewne ograniczenia i wady. Jedną z nich jest stosunkowo długi czas niezbędny do uzyskania odpowiedniej liczby komórek do przeszczepu, a szczególnie do otrzymania kilkuwarstwowego naskórka. Pewną alternatywą dla tej techniki jest stosowanie na ranę komórek uprzednio hodowanych do stanu tzw. subkonfluencji, nie czekając na uzyskanie pełnej grubości naskórka [45]. Taka hodowla trwa około 2 tygodni i w tym czasie pacjent musi być leczony konwencjonalnie. Kolejnym ważnym elementem hodowli jest uzyskanie odpowiednich parametrów hodowanych komórek, a szczególnie dynamiki podziałów mitotycznych. Doświadczenia własne autorów pracy wskazują na to, że wiek dawcy komórek ma w tym przypadku decydujące znaczenie. Komórki osób starszych wymagają bowiem znacznie dłuższego czasu hodowli do uzyskania odpowiedniej ich liczby niż komórki pochodzące od osób młodych. Biorąc pod uwagę fakt, że to właśnie pacjenci starsi stanowią duży odsetek osób z trudno gojącymi się ranami, należy opracowywać efektywniejsze metody hodowli pochodzących od nich komórek [12, 46]. Jak już wcześniej wspomniano, zarówno komórki przeszczepiane w formie zawiesiny, jak i postaci pełnego naskórka są bardzo delikatne i podatne na działanie bakterii. Ważne jest więc odpowiednie przygotowanie rany do przeszczepu, w tym eradykacja bakterii [3]. Należy również zwrócić uwagę na to, że komórki po kolejnych pasażach w hodowli podlegają zmianom morfologicznym oraz biochemicznym związanym z procesami starzenia. Podczas tych procesów komórki tracą m.in. swoją aktywność mitotyczną oraz skróceniu ulegają ich telomery [47]. Zmiany te mogą wpływać na jakość przeszczepu i regenerację skóry pacjenta.

## **PODSUMOWANIE**

Leczenie i pielęgnowanie ran przewlekłych, mimo coraz nowszych technologii i nowoczesnych materiałów opatrunkowych o coraz większej skuteczności, jest nadal dużym wyzwaniem dla lekarzy i pielęgniarek. Pomimo zastosowania odpowiednich technik i procedur leczniczych często nie udaje się uzyskać zadowalającego efektu terapeutycznego. Dlatego stale poszukuje się nowych metod leczenia ran przewlekłych i zastosowanie hodowlanych keratynocytów oraz komórek macierzystych naskórka z pewnością stanowi obiecującą możliwość.

Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2008–2012 jako projekt badawczy nr N N403 089335.

## Piśmiennictwo

1. **Kalinin A.E., Kajava A.V., Steinert P.M.:** Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioassays* 2002, 24, 789-800.
2. **Fuchs E.:** Scratching the surface of skin development. *Nature* 2007, 445, 834-842.
3. **Grzybowski J.:** Biologia rany oparzeniowej. Alfa-Medica, Bielsko-Biała, 2001.
4. **Watt M.F.:** The stem cells compartment in human interfollicular epidermis. *J Dermatol Sci* 2002, 28, 173-180.
5. **Larderet G., Fortunel N.O., Vaigot P., Cegalerba M., Malteère P., Zobiri O.:** Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells* 2006, 24, 965-974.
6. **Watt F.M., Hogan B.L.:** Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000, 287, 1427-1430.
7. **Drukała J., Majka M., Ratajczak M.:** Postępy w metodach izolacji i namnażania komórek macierzystych naskórka ludzkiego. *Post Biol Kom* 2003, supl. 21, 37-48.
8. **Pikuła 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.
9. **Kim D.S., Cho H.J., Choi H.R., Kwon S.B., Park K.C.:** Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents. *Cell Mol Life Sci* 2004, 61, 2774-2781.
10. **Pellegrini G., Dellambra E., Golisano O., Martinelli E., Fantozzi I., Bondanza S. i inni:** p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 13, 3156-3161.
11. **Fernández G.E., Bejar J.M., Alonso-Varona A., Masdevall G., Gabilondo F.J.:** Study of the human keratinocyte isolation methods and in vitro culture techniques in a single laboratory. *Eur J Plast Surg* 1998, 21, 353-357.
12. **Turksen K.:** Epidermal cells: methods and protocols, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2005.
13. **Pikuła M.:** Charakterystyka ludzkich komórek macierzystych naskórka i próba wykorzystania ich do odtworzenia naskórka z uwzględnieniem różnego wieku dawców. Praca doktorska, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, 2007.
14. **Drukała J., Sporniak-Tutak K.:** Wykorzystanie współczesnych osiągnięć inżynierii tkankowej w gojeniu ran powłok. *Przegl Lek* 2002, 10, 59.
15. **Poumay Y., Coquette A.:** Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch Dermatol Res* 2007, 298, 361-369.
16. **Rheinwald J.G., Green H.:** Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975, 6, 331-334.
17. **Poumay Y., Boucher F., Leclercq-Smekens M., Degen A., Leloup R.:** Basal cell adhesion to a culture substratum controls the polarized spatial organization of human epidermal keratinocytes into proliferating basal and terminally differentiating suprabasal populations. *Epithelial Cell Biology* 1993, 2, 7-16.
18. **Horch R.E., Debus M., Wagner G., Stark G.B.:** Cultured human keratinocytes on type I collagen membranes to reconstitute the epidermis. *Tissue Eng* 2000, 6, 53-67.
19. **Havlickova B., Bíró T., Mescalchin A., Arenberger P., Paus R.:** Towards optimization of an organotypic assay system that imitates human hair follicle-like epithelial-mesenchymal interactions. *Br J Dermatol* 2004, 10, 753-765.
20. **Blaimauer K., Watzinger E., Erovc B.M., Martinek H., Jagersberger T., Thurnher D.:** Effects of epidermal growth factor and keratinocyte growth factor on the growth of oropharyngeal keratinocytes in coculture with autologous fibroblasts in a three-dimensional matrix. *Cells Tissues Organs* 2006, 182, 98-105.
21. **Hinterhuber G., Marquardt Y., Diem E., Rappersberger K., Wolff K., Foedinger D.:** Organotypic keratinocyte coculture using normal human serum: an immunomorphological study at light and electron microscopic levels. *Exp Dermatol* 2002, 11, 413-20.
22. **Stokłowska S.:** Hodowla komórek i tkanek. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2004.
23. **Navsaria H.A., Myers S.R., Leigh I.M., McKay I.A.:** Culturing skin in vitro for wound therapy. *Trends Biotechnol* 1995, 13, 91-100.
24. **Rosdy M., Claus L.:** Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 1990, 95, 409-414.
25. **Svensjo T., Yao F., Pomahac B., Eriksson E.:** Autologous keratinocyte suspensions accelerate epidermal wound healing in pigs. *J Surg Res* 2001, 99, 211-221.
26. **Smiley A.K., Klingenberg J.M., Aronow B.J., Boyce S.T., Kitzmiller W.J.:** Microarray analysis of gene expression in cultured skin substitutes compared with native human skin. *J Invest Dermatol* 2005, 125, 1286-1301.
27. **Pikuła M., Trzonkowski P.:** Biologia komórek macierzystych naskórka oraz ich znaczenie w medycynie. *Post Hig Med Dośw* 2009, 63, 449-456.
28. **Fortunel N.O., Hatzfeld J.A., Rosemary P., Ferraris C., Monier M., Haydont V.:** Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-beta1 concentrations. *J Cell Sci* 2003, 116, 4043-4052.
29. **Papini S., Cecchetti D., Campani D., Fitzgerald W., Grivel J.C., Chen S.:** Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. *Stem Cells* 2003, 21, 481-494.
30. **Pellegrini G., Bondanza S., Guerra L., De Luca M.:** Cultivation of human keratinocyte stem cells: current and future clinical applications. *Med Biol Eng Comput* 1998, 36, 778-790.
31. **Jin Y.L., Gunter B.:** An improved organ culture for regeneration of pure autologous keratinocytes from small split-thickness skin specimens. *Dermatology* 2005, 210, 45-48.
32. **O'Connor N.E.:** Grafting of burns with culture epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981, 1, 75-78.
33. **Geer D.J., Andreadis S.T.:** A novel role of fibrin in epidermal healing: plasminogen-mediated migration and selective detachment of differentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003, 121, 1210-1216.
34. **Kopp J., Jeschke M.G., Bach A.D.:** Applied tissue engineering in the closure of severe burns and chronic wounds using cultured human autologous keratinocytes in a natural fibrin matrix. *Cell Tissue Bank* 2004, 5, 89-96.
35. **Horch R.E., Kopp J., Kneser U., Beier J., Bach A.D.:** Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J Cell Mol Med* 2005, 9, 592-608.
36. **Augustin M., Ermut T., Johnsen S., Schöpf E., Vanscheidt W., Zschocke I.:** Effects of autologous keratinocyte transplantation on the quality of life of patients with severe chronic leg ulcers. *Dermatol Psychosomat* 2001, 2, 73-76.
37. **Collin B., Balderson D., Papini R., Marsden J., Moss C.:** Cultured autologous keratinocyte grafting of chronic erosions in three patients with epidermolysis bullosa. *Clin Exp Dermatol* 2006, 31, 718-719.

38. **Gibbs S., Pinto A.N., Murli S., Huber M., Hohl D., Ponc M.:** Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Rep Regen* 2000, 8, 192-203.
39. **Lee M.J., Kim J., Lee K.I., Shin J.M., Chae J.I., Chung H.M.:** Enhancement of wound healing by secretory factors of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Cytotherapy* 2011, 13, 165-178.
40. **Eves P.C., Bullett N.A., Haddow D., Beck A.J., Layton C., Way L. i inni:** Simplifying the delivery of melanocytes and keratinocytes for the treatment of vitiligo using a chemically defined carrier dressing. *J Invest Dermatol* 2008, 128, 1554-1564.
41. **Blais M., Grenier M., Berthod F.:** Improvement of nerve regeneration in a tissue-engineered skin enriched with Schwann cells. *J Invest Dermatol* 2009, 129, 2895-2900.
42. **Flasza M., Kemp P., Shering D., Qiao J., Marshall D., Bokta A. i inni:** Development and manufacture of an investigational human living dermal equivalent. *Regen Med* 2007, 2, 903-918.
43. Komisja Unii Europejskiej, Dyrektywa 2003/94/WE.
44. **Thepot A., Desanlis A., Venet E., Thivillier L., Justin V., Morel A.P. i inni:** Assessment of transformed properties in vitro and of tumorigenicity in vivo in primary keratinocytes cultured for epidermal sheet transplantation. *J Skin Cancer* 2011 (w druku).
45. **Hernon C.A., Dawson R.A., Freedlander E., Short R., Haddow D.B., Brotherston M. i inni:** Clinical experience using cultured epithelial autografts leads to an alternative methodology for transferring skin cells from the laboratory to the patient. *Regen Med* 2006, 1, 809-821.
46. **Gilchrest B.A., Garmyn M., Yaar M.:** Aging and photoaging affect gene expression in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol* 1994, 130, 82-86.
47. **Miyata Y., Okada K., Fujimoto A., Hata K., Kagami H., Tomita Y. i inni:** The effect of the long-term cultivation on telomere length and morphology of cultured epidermis. *J Dermatol Sci* 2004, 34, 221-230.

**Otrzymano:** 17 X 2011 r.

**Zaakceptowano:** 20 XII 2011 r.