

Anna Domaszewska-Szostek

**MECHANIZM PROLIFERACJI I RÓŻNICOWANIA
KERATYNOCYTÓW W ZASTOJU LIMFATYCZNYM
KOŃCZYN DOLNYCH – WPŁYW CYTOKIN I CZYNNIKÓW
WZROSTU PŁYNU TKANKOWEGO/LIMFY**

Rozprawa doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Waldemar Lech Olszewski

**Zespół Kliniczno-Badawczy Chirurgii Transplantacyjnej
INSTYTUT MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
IM. M. MOSSAKOWSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

Warszawa 2011

SKRÓTY UŻYWANE W PRACY	5
1 WSTĘP	9
2 PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA	12
2.1 Fizjologia oraz funkcja skóry i keratynocytów	12
2.2 Płyn tkankowy/limfa jako środowisko dla komórek naskórka i skóry.....	14
2.3 Zastój płynu tkankowego/ limfy.....	15
2.4 Aktywacja keratynocytów przez cytokiny i czynniki wzrostu.....	15
2.5 Proces różnicowania keratynocytów	20
2.6 Komórki macierzyste keratynocytów i ich cykl komórkowy.....	21
3 CEL PRACY	24
4 MATERIAŁ	25
4.1 Keratynocyty	25
4.2 Płyn tkankowy/limfa i surowica	25
4.3 Model badawczy.....	26
5 METODY	28
5.1 Izolacja keratynocytów i ich charakterystyka fenotypowa przed hodowlą	28
5.2 Określenie liczbowego przyrostu keratynocytów	30
5.3 Hodowla keratynocytów w płynie tkankowym / limfie, 20 % surowicy, medium RPMI oraz określenie ich morfologii.....	30
5.4 Identyfikacja fenotypowa keratynocytów po izolacji, hodowli w płynie tkankowym/limfie, 20 % surowicy oraz medium RPMI.....	31
5.5 Neutralizacja wybranych cytokin i czynników wzrostu w hodowli keratynocytów	32
5.6 Blokowanie receptorów dla wybranych cytokin i czynników wzrostu na keratynocytach.....	33
5.7 Analiza statystyczna	33
6 WYNIKI	35
6.1 Liczba keratynocytów (l) po 1, 7 i 14 dniu hodowli w płynie tkankowym/limfie (l), (n) oraz medium RPMI	35
6.2 Procentowy przyrost keratynocytów (l) w płynie tkankowym/limfie (l), (n) oraz medium RPMI w 1, 7 i 14 dniu hodowli	37

6.3	Ilościowa charakterystyka keratynocytów (l) i (n) poszczególnych warstw naskórka po izolacji oraz po 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (l), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI	39
6.4	Różnicowanie keratynocytów z poszczególnych warstw naskórka po 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (l), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI wyrażane w stosunku do warstwy podstawnej 1	43
6.5	Ekspresja markerów tzw. komórek macierzystych keratynocytów (l) po izolacji oraz po 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (l), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI.....	46
6.6	Ekspresja markerów proliferacji keratynocytów (l) po izolacji, oraz po 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (l), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI	49
6.7	Ilościowa charakterystyka keratynocytów poszczególnych warstw naskórka po hodowli (7d) w płynie tkankowym/limfie (l) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β	52
6.8	Procentowa zmiana liczby keratynocytów w płynie tkankowym/limfie (l) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β w 1, 7 i 14 dniu hodowli.....	55
6.9	Różnicowanie keratynocytów po hodowli (7d) w płynie tkankowym/limfie(l) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β wyrażane w stosunku do keratynocytów (l) z warstwy podstawnej 1	57
6.10	Blokowanie receptorów IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGF- β R na keratynocytach (l) w 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (l).....	60
6.11	Procentowa zmiana liczby keratynocytów (l) po zablokowaniu receptorów IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGFR w 1, 7 i 14 dniu hodowli w płynie tkankowym/limfie (l).....	63
6.12	Różnicowanie keratynocytów (l) po zablokowaniu IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGF- β R w 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (l) wyrażane w stosunku do keratynocytów (l) z warstwy podstawnej 1	65
6.13	Ekspresja markerów różnicowania keratynocytów (l) po 14 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (l), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI	67

Spis treści

6.14 Ekspresja markerów aktywacji keratynocytów (I) po 14 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (I), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI	73
7 PODSUMOWANIE WYNIKÓW.....	77
8 DYSKUSJA.....	78
9 WNIOSKI.....	85
10 PIŚMIENICTWO	86
11 STRESZCZENIE	99

SKRÓTY UŻYWANE W PRACY

bFGF - (ang. basic Fibroblast Growth Factor) Czynn timer wzrostu fibroblastów

CCR6 - (ang. Chemokine CC Motif receptor 6) Receptor dla chemokiny 6

CD1a - (ang. Cluster of Differentiation 1a) Białko powierzchniowe charakteryzujące komórki Langerhansa

CD207 - (ang. Langerin, Cluster of Differentiation 207) Langeryna

CD29 - (ang. β -integrin) β integryna

CD3 - (ang. Cluster of Differentiation 3) Białko powierzchniowe charakteryzujące limfocyty T

CD34 - (ang. Cluster of Differentiation 34) Białko powierzchniowe charakteryzujące hematopoetyczne komórki macierzyste

CD4 - (ang. Cluster of Differentiation 4) Białko powierzchniowe charakteryzujące limfocyty T pomocnicze, limfocyty T regulatorowe, monocyty

CD68 - (ang. Cluster of Differentiation 68) Białko powierzchniowe charakteryzujące makrofagi

Cdk 4,6,2 - (ang. Cyclin dependent kinase) Kinazy cyklinozależne

CK1 - (ang. Cytokeratin 1) Cytokeratyna 1

CK10 - (ang. Cytokeratin 10) Cytokeratyna 10

CK14 - (ang. Cytokeratin 14) Cytokeratyna 14

CK16 - (ang. Cytokeratin 16) Cytokeratyna 16

CK17 - (ang. Cytokeratin 17) Cytokeratyna 17

CK6 - (ang. Cytokeratin 6) Cytokeratyna 6

CT - (ang. Computed Tomography) Tomografia komputerowa

CXCR2 - (ang. Chemokine receptor 2) Receptor dla chemokiny 2

d – dzień

DAG – (ang. Diacylglycerol) Diacylglycerol

dsRNA - (ang. double stranded RNA) Dwuniciowe RNA

E2F - (ang. a Family of transcription factors in higher eukaryotes) Rodzina czynników transkrypcyjnych u wyższych eukaryota

EDC - (ang. Epidermal differentiation complex) Kompleks różnicowania naskórka

EDTA - (ang. Ethylenediaminetetraacetic acid) Kwas etylenodiaminotetraoctowy

EGF - (ang. Epidermal Growth Factor) Naskórkowy czynnik wzrostu

EGFR - (ang. Epidermal growth factor receptor) Receptor naskórkowego czynn timer wzrostu

Skróty używane w pracy

- ESC – (ang. Epidermal Stem Cells) Naskórkowe komórki macierzyste
- ET-1R - (ang. Endothelin-1 receptor) Receptor dla endoteliny-1
- EthD – III - (ang. Ethidium homodimer III) Homodimer etydyny III
- FCS - (ang. Fetal Calf Serum) Płodowa surowica cielęca
- FGF - (ang. Fibroblast Growth Factor) Czynn timer wzrostu fibroblastów
- FGF-R1 - (ang. Fibroblast Growth Factor Receptor 1) Receptor 1 czynn timer wzrostu fibroblastów
- G-CSF - (ang. Granulocyte Colony-Stimulating Factor) Czynn timer stymulujący tworzenie kolonii granulocytów
- GM-CSF - (ang. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) Czynn timer stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
- GRO - (ang. Growth Regulated Oncogene) Onkogen związany ze wzrostem
- hBD-1 - (ang. Human β -defensin 1) Ludzka β defensyna 1
- hBD-2 - (ang. Human β -defensin 2) Ludzka β defensyna 2
- hBD-3 - (ang. Human β -defensin 3) Ludzka β defensyna 3
- HB-EGF - (ang. Heparin Binding Epidermal Growth Factor) Naskórkowy czynn timer wzrostu wiążący heparynę
- HLA-DR - (ang. Human Leukocyte Antigen DR) Główny układ zgodności tkankowej człowieka
- ICAM - (ang. Inter-Cellular Adhesion Molecule) Międzykomórkowa molekula adhezyjna
- IFN- $\alpha\beta\gamma$ R - (ang. Interferon Receptor) Receptor dla interferonu $\alpha\beta\gamma$
- IFN- β - (ang. Interferon β) Interferon β
- IFN- γ - (ang. Interferon γ) Interferon γ
- IgA - (ang. Immunoglobulin A) Immunoglobulina A
- IGF - (ang. Insuline Growth Factor) Insulinopodobny czynn timer wzrostu
- IGF-R - (Insuline Growth Factor Receptor) Receptor dla insulinopodobnego czynn timer wzrostu
- IgG - (Immunoglobulin G) Immunoglobulina G
- IgM - (ang. Immunoglobulin M) Immunoglobulina M
- IL-1 - (ang. Interleukin 1) Interleukina 1
- IL-18 - (ang. Interleukin 18) Interleukina 18
- IL-3 - (ang. Interleukin 3) Interleukina 3
- IL-6 - (ang. Interleukin 6) Interleukina 6
- IL-8 - (ang. Interleukin 8) Interleukina 8

Skróty używane w pracy

- INK4 - (ang. Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) Inhibitor kinazy zależnej od cyklin
- IP-10 - (ang. Interferon 10 induced protein) Białko indukowane interferonem 10
- IP3 - (ang. Inositol trisphosphate) Trójfosforan inozytolu
- IP-9 - (ang. Interferon 9 induced protein) Białko indukowane interferonem 9
- JNK - (ang. Jun N-terminal kinases) Kinaza Jun
- KC - (ang. Keratinocytes) Keratynocyty
- KC (l) – (ang. Keratinocytes (lymphedema)) Keratynocyty (limfedema)
- KC (n) - (ang. Keratinocytes (normal)) Keratynocyty (normalne)
- KGF - (ang. Keratinocyte growth factor) Czynniki wzrostu keratynocytów
- KGFR - (ang. Keratinocyte growth factor receptor) Receptor dla czynnika wzrostu keratynocytów
- Ki67 - (ang. proliferation-related Ki-67 antigen) Białko obecne w jądrach komórek aktywnych mitotycznie
- KSC – (ang. Keratinocyte stem cells) Komórki macierzyste naskórka
- LC – (ang. Langerhans cells) Komórki Langerhansa
- LIF - (ang. Leukemia inhibitory factor) Czynniki hamujące białaczkę
- LIF-R - (ang. Leukemia inhibitory factor receptor) Receptor czynnika hamującego białaczkę
- LL-37 - (ang. Human Cathelicidin LL-37) Ludzka katelicydyna LL-37
- MAPK – (ang. Mitogen - activated protein kinase) Kinaza aktywowana mitogenem
- MIP - (ang. Macrophage inflammatory protein) Białko zapalne makrofagów
- MRI - (ang. Magnetic resonance imaging) Magnetyczny rezonans jądrowy
- MyD88 - (ang. Myeloid differentiation primary response gene 88) Gen 88 związany z różnicowaniem komórek linii mieloidalnej w odpowiedzi pierwotnej
- ND-50 – (ang. Neutralization Dose 50)-Krzywa dawki połowicznej neutralizacji
- NFκB - (ang. Nuclear factor κ B) Czynniki transkrypcji jądrowej
- NGF - (ang. Nerve growth factor) Czynniki wzrostu nerwów
- NK - (ang. Natural killer cells) Komórki NK
- p21 - (ang. Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) Inhibitor 1A kinazy zależnej od cyklin
- p38 - (ang. Mitogen-activated protein kinase 14) Kinaza 14 aktywowana mitogenem
- p63 - (ang. Protein p63) Białko p63, jądrowy marker komórek macierzystych naskórka
- PAMP - (ang. Pathogen associated molecular patterns) Wzorce molekularne związane z patogenami
- PBS - (ang. Phosphate-Buffered Saline) Buforowana sól fizjologiczna
- PCNA - (ang. Proliferating Cell Nuclear Antigen) Jądrowy antygen komórek proliferujących

Skróty używane w pracy

PDGF - (ang. Platelet Derived Growth Factor) Płytkopochodny czynnik wzrostu

PMN – (ang. Polymorphonuclear leukocytes) Polimorfojądrowe leukocyty

PT/L - płyn tkankowy/limfa

PT/L (l) – płyn tkankowy/limfa (limfedema)

PT/L (n) – płyn tkankowy/limfa (normalna)

RANTES - (ang. Regulated on Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) Czynniki regulowany przez aktywację; ekspresja i wydzielanie przez prawidłowe limfocyty T

RPMI 1640 - (ang. medium Roswell Park Memorial Institute) Medium hodowlane RPMI 1640

S – (ang. Serum) Surowica

SCF - (ang. Stem Cell Factor) Czynniki komórki macierzystej

SPRs - (ang. Small Proline Rich proteins) Małe białka bogate w prolinę

SRP - (ang. Signal Recognition Particle) Cząsteczka rozpoznająca sygnał

TA – (ang. Transit amplifying cells) Komórki przejściowo namnażające się

TGF- α - (ang. Tumor Growth Factor α) Czynniki wzrostu nowotworu α

TGF- β - (ang. Tumor Growth Factor β) Czynniki wzrostu nowotworu β

TGF- β R - (ang. Tumor Growth Factor Receptor) Receptor czynnika martwicy nowotworu β

TIR – (ang. Toll/IL-1R domain) Domena TIR

TLR 10 - (ang. Toll-like receptor 10) Receptor Toll 10 podobny

TLR 2 - (ang. Toll-like receptor 2) Receptor Toll 2 podobny

TLR 3 - (ang. Toll-like receptor 3) Receptor Toll 3 podobny

TLR 5 - (ang. Toll-like receptor 5) Receptor Toll 5 podobny

TNF- α - (ang. Tumor Necrosis Factor) Czynniki martwicy nowotworu α

VEGF - (ang. Vascular Endothelial Growth Factor) Czynniki wzrostu śródbłonia naczyniowego

WHO – (ang. World Health Organization) Światowa Organizacja Zdrowia

1 WSTĘP

Jedną z częstszych chorób człowieka budzącą coraz większe zainteresowanie immunologów jest tzw. obrzęk limfatyczny kończyn i narządów. Według statystyk WHO liczba chorych z tego rodzaju patologią wynosi na świecie ok. 300 milionów.

Obrzęk limfatyczny kończyn i narządów jest objawem zastoju płynu międzykomórkowego (tkankowego) i limfy w tkankach w następstwie uszkodzenia naczyń limfatycznych prowadzących do regionalnych węzłów chłonnych. Do uszkodzenia dochodzi w bakteryjnych zapaleniach skóry i tkanek miękkich, urazów tkanek miękkich i kości, oraz po usunięciu lub naświetlaniu węzłów chłonnych w przypadkach nowotworów.

Układ limfatyczny, którego anatomia to przestrzeń międzykomórkowa, sieć naczyń limfatycznych, narządy limfoidalne oraz rozproszona tkanka chłonna (grudki chłonne), a także krążące komórki odpornościowe, sprawuje funkcję strażnika genetycznego „self” ustroju [120, 121]. Wszelkie sygnały obwodowe z tkanek, takie jak wniknięcie i rozpoznanie obcego antygeny (bakterie, wirusy, grzyby, cząstki nieorganiczne, ciała obce), jak i odsłonięte własne antygeny tkankowe i komórkowe (uraz, autoagresja) i wreszcie (allo- i ksenogeniczne) antygeny przeszczepu tkanki czy narządu powodują natychmiastową odpowiedź komórkowo-humoralną tkanki limfoidalnej [111]. Masa antygeny wnikającego do naczyń limfatycznych, jego immunogenność i oporność na degradację odgrywają rolę w procesie odpowiedzi ale także uszkodzenia i zużycia układu limfatycznego. To ostatnie jest szczególnie widoczne w postaci zaniku węzłów w starszym wieku. Następstwem uszkodzenia naczyń i węzłów chłonnych jest zastój w krążeniu płynu tkankowego i limfy, a więc klinicznie obrzęk oraz szereg zaburzeń funkcji komórkowych drenowanej tkanki. W przypadku skóry, w tym w szczególności kończyn, dochodzi do zmian funkcjonalnych keratynocytów oraz fibroblastów. Efektem tego jest hiperkeratoza (*hyperkeratosis*) i włóknienie (*fibrosis*). Mechanizm przebiegu tych procesów *in vivo* pozostaje niejasny, ponieważ uczestniczy w nim wiele współzależnych czynników komórkowych i humoralnych środowiska.

Przedmiotem niniejszej pracy było badanie wpływu czynników humoralnych środowiska międzykomórkowego skóry (płynu tkankowego/limfy) na proliferację i różnicowanie keratynocytów u chorych z zastojem limfy w kończynach dolnych.

Keratynocyty (KC) są głównymi komórkami naskórka pełniące rolę bariery środowiskowej oddzielającej wewnątrz ustroju od otoczenia. Bariera ta pełni funkcje:

a) mechaniczną - chroniącą przed urazami głębokich tkanek, b) anty-penetracyjną dla mikroorganizmów oraz c) środowiskową dla bakterii kolonizujących naskórek, głównie mieszki włosowe oraz gruczoły łojowe i potowe.

KC podlegają stałemu procesowi proliferacji i różnicowania [30]. Sygnały regulujące te procesy pochodzą ze skóry właściwej (*dermis*), w tym z jej komórek mezenchymalnych, a także z czynników humoralnych dostarczanych do naskórka drogą krwionośną [41]. Innym źródłem sygnałów jest mechaniczne uszkodzenie struktury naskórka oraz działanie antygeny bakteryjnego, wirusowego lub grzybiczego [1, 26]. KC wydzielają szereg czynników wzrostu i cytokin oraz peptydów antibakteryjnych działających w układzie autokrynnym [33, 103]. Szereg z tych czynników humoralnych dyfunduje do płynu tkankowego skóry właściwej i tkanki podskórnej, który po wpłynięciu do naczyń limfatycznych określany jest mianem limfy [115, 116].

Mechanizm regulacji proliferacji i różnicowania KC człowieka jest badany przede wszystkim w warunkach *in vitro*, stąd co się dzieje *in vivo* pod wpływem czynników wzrostu i cytokin jest mało poznane. Wynika to m. in. z ograniczonej wiedzy dotyczącej rodzaju i liczby czynników humoralnych zawartych w płynie tkankowym skóry. Niewiele wiadomo, w jaki sposób czynniki humoralne działają na komórki macierzyste keratynocytów (o słabo dotychczas zdefiniowanym fenotypie) czy też na tzw. komórki namnażające się przejściowo (ang. transit amplifying cells, TA). Nie wiadomo także, która z cytokin lub ich grupa wpływa specyficznie na proces proliferacji i różnicowania KC. Niewielka jest też wiedza o tym, w jakich przyżyciowych warunkach KC warstwy podstawnej naskórka aktywnie wyrażają receptory dla cytokin i czynników wzrostu.

Wyjaśnienie wymienionych zagadnień pozwoliłoby na opracowanie metod pobudzania lub hamowania proliferacji KC w warunkach klinicznych, np. w ranach lub hiperkeratozach czy też w obrzęku limfatycznym, którego integralną komponentą jest nadmierna proliferacja KC. Ponadto umożliwiłoby to efektywniejszą hodowlę KC *in vitro* dla celów transplantologicznych.

Powstaje zatem pytanie, które czynniki wzrostu i cytokiny znajdujące się w płynie tkankowym/ limfie skóry człowieka, pobudzają proliferację i różnicowanie KC, oraz które z komórek proliferujących mogą należeć do populacji o fenotypie uznanym obecnie za charakterystyczny dla komórek macierzystych naskórka. Aby proces ten mógł być obserwowany, niezbędny był naturalny model. Okazał się nim zastój PT/L w skórze i tkance podskórnej człowieka (obrzęk limfatyczny, ang. obstructive lymphedema), którego jednym z następstw jest nadmierna proliferacja KC. Przeniesienie procesu proliferacji i różnicowania

KC do hodowli z zastosowaniem PT/L, pozwoliłoby na śledzenie procesu proliferacji i różnicowania oraz na wyciągnięcie wniosków o wartości klinicznej.

Zastosowałam więc oryginalną, dotychczas nie publikowaną przez innych metodę hodowli izolowanych KC w PT/L człowieka, pobieranych ze skóry chorych z zastojem limfatycznym oraz zdrowych wolontariuszy. Zakład, w którym praca została wykonana jest jednym z czołowych na świecie, który zajmuje się patomechanizmem zastoju limfatycznego. Zostały w nim opracowane techniki zbierania PT/L oraz hodowli KC, stąd możliwość badania zjawisk komórkowych w naturalnym środowisku humoralnym.

2 PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

2.1 Fizjologia oraz funkcja skóry i keratynocytów

Skóra pełni kluczową rolę w utrzymaniu stabilności wewnętrznego środowiska organizmu i obronie ciała przed wpływem otoczenia. Ten największy organ ludzkiego organizmu stanowi zewnętrzną powłokę ciała i składa się z dwóch warstw: 1) naskórka i 2) skóry właściwej. Jako pierwotny organ obrony i adaptacji, skóra pozostaje także największym organem ciała wystawionym na działanie wszystkich czynników środowiska zewnętrznego. Zmienność parametrów anatomicznych (np. liczba warstw komórek w warstwie ziarnistej skóry, rozmieszczenie przydatków, odmienność struktury połączenia skórno-naskórkowego, zmiany w ukrwieniu) determinuje w pewnym zakresie zmienność jej funkcji. Naskórek jest nabłonkiem wielowarstwowym, płaskim, rogowaciejącym. Jego główną masę komórkową stanowią komórki zwane keratynocytami. Ułożone są one w czterech możliwych do zróżnicowania morfologicznych warstwach: podstawnej, kolczystej, ziarnistej i zrogowaciałej. Rycina 2. oraz tabela 6. przedstawiają warstwowy podział naskórka oraz charakterystykę KC z poszczególnych warstw. Komórki z warstwy podstawnej, które ustawione są równoległe do błony podstawnej i przyłączone do niej hemidesmosomami, biorą udział w wytworzeniu połączenia skórno-naskórkowego. Z komórkami z warstwy kolczystej, zawierającymi tonfilamenty, związane są one desmosomami. W naskórku poza KC obecne są jeszcze tzw. passenger cells, tj. komórki Merkla (receptory dotyku), komórki pochodzenia nerwowego – melanocyty (w prawidłowych warunkach proporcja KC do melanocytów wynosi 36:1), oraz komórki Langerhansa (stanowią 2-5% ogólnej ilości komórek naskórka) [79].

Naskórek stanowi barierę dla antygenów cząsteczkowych, wirusów, bakterii oraz innych komórek, a także dla rozmaitych związków chemicznych i czynników fizycznych, stwarzając w ten sposób warunki miejscowej odporności. Pełni on także inne funkcje immunologiczne: KC i komórki Langerhansa mogą prezentować antygeny limfocytom T oraz wydzielać cytokiny i czynniki wzrostu (jak np. IL-1, IL-3, IL-6, IL-8, TNF- α , TGF- α , TGF- β i in.), włączając inne komórki do odpowiedzi immunologicznej [52]. KC podobnie jak wiele innych komórek nabłonkowych, posiadają liczne receptory rozpoznające wzorce molekularne patogenów (PAMP). Są nimi: powierzchniowe TLR 2, dla których ligandem są peptydoglikany bakterii Gram dodatnich, TLR 5, którego ligandem jest flagellina bakterii Gram ujemnych i TLR 10. Ligandem wewnątrzkomórkowego TLR 3 jest dsRNA. Kontakt

z patogenami uruchamia kaskadę przeniesienia sygnałów na białka adaptorowe i indukcję kinazy NFκB, która pobudza transkrypcję genów kodujących prozapalne mediatory odpowiedzi odpornościowej (IL-1β, IL-6, TNF-α, GM-CSF, G-CSF, IL-8, GRO, RANTES i MIP, a także ICAM-1). Cząsteczki te powodują aktywację oraz przyciąganie do miejsca wniknięcia patogenów: komórek żernych, granulocytów obojętnochłonnych oraz monocytów z krwi obwodowej, z których powstają makrofagi zapalne [54].

W wyniku transdukcji sygnału dochodzi do ekspresji cytokin i innych cząsteczek sygnałowych. Cytokiny te mogą także wpływać na proliferację KC. W przekazywaniu sygnału uczestniczy białko receptorowe MyD88 oraz receptory TLR z wyjątkiem receptora TLR 3. W momencie pobudzenia receptora TLR białko MyD88 łączy się poprzez domenę TIR z receptorem TLR. KC mogą wykazywać także funkcje supresorowe, hamując aktywność komórek NK oraz proliferację limfocytów T i B poprzez uwalnianie TGF-β, co zmniejsza nasilenie objawów zapalnych [96].

Bardzo ważnym elementem działania przeciwdrobnoustrojowego KC jest zdolność do syntezy i uwalniania defensyn typu β. Defensyny to naturalne antybiotyki peptydowe, stanowiące od 30% do 50% ziarnistości azurofilnych granulocytów obojętnochłonnych. Białka o identycznej strukturze, należące do defensyn, występują także w lizosomach makrofagów. Tylko KC uwalniają defensyny typu β hBD-2 i hBD-3, podczas gdy wszystkie inne komórki nabłonkowe wykazują konstytutywną obecność defensyny typu hBD-1. Różne szczepy bakterii powodują różną dynamikę wydzielania defensyn. Zjawisko to jest zależne od częściowego lub całkowitego zablokowania przez inhibitory kinaz Janusowych (JNK) szlaku p38 lub NFκB. Bakterie zasiedlające skórę i jej przydatki, mogą wywierać selektywny wpływ na uwalnianie defensyn, wobec wszystkich rodzajów komórek nabłonkowych [14, 63]. Po stymulacji szczepami *Staphylococcus aureus*, KC uwalniają także inny naturalny antybiotyk - katelicydynę (LL-37) [37, 54, 95, 102, 130].

Pod wpływem EGF, IL-1 oraz TNF-α dochodzi w ranie do intensywnych podziałów KC z warstwy podstawnej i przypodstawnej oraz ich migracji i szybkiego wypełnienia miejsca ubytku [2]. W pracy Pastore i wsp. pojawiła się koncepcja wpływu komponent bakteryjnych na proces proliferacji KC. Wpływ ten jest uzależniony od szlaku związanego z receptorem dla EGF, który jest bogaty w cysteinę [123].

2.2 Płyn tkankowy/limfa jako środowisko dla komórek naskórka i skóry

Z włosowatych naczyń tętniczych do przestrzeni tkankowej przedostaje się woda, tlen, aminokwasy, węglowodany, tłuszcze, hormony, witaminy, sole mineralne, produkty przemiany komórkowej i związki z nich syntetyzowane. Limfa zawiera wszystkie białka występujące w osoczu krwi oraz dodatkowo pewną ilość białek syntetyzowanych w tkankach. Skład chemiczny limfy w znacznym stopniu różni się od osocza. Limfa jest produktem dyfuzji i filtracji składników osocza. Dodatkowo jest wzbogacona w produkty metabolizmu komórkowego. Skład PT/L jest uzależniony od poziomu filtracji kapilarnej, przepuszczalności ściany kapilary oraz stanu metabolicznego komórek parenchymalnych [107, 108, 109, 112, 116].

Białka wykrywane w limfie obwodowej, uczestniczące w odpowiedzi immunologicznej, mogą pochodzić z trzech źródeł: 1. osocza; 2. tkanki, z której limfa jest drenowana oraz 3. komórek znajdujących się w limfie. Przeważająca większość tych białek przechodzi z osocza poprzez dyfuzję przez ścianę kapilary, filtrację i transport pęcherzykowy. Ilość białka zależy także od przepuszczalności membrany kapilarnej tkanki lub organu. Wykazano, że nie ma znacznych różnic pomiędzy stężeniem białek w limfie i płynie tkankowym skóry oraz tkanki podskórnej. Stężenie białka całkowitego w limfie stanowi 25% białka całkowitego surowicy. Stężenie całkowitej globuliny w limfie stanowi 20% stężenia globuliny w surowicy i odpowiednio IgG 28%, IgA 16%, IgM 8%. Poziom białek dopełniacza oraz białek ostrej fazy w limfie jest niski i większość tych białek pochodzi z osocza krwi [108, 109, 116, 119]. Tabela 1 przedstawia skład białkowy PT/ L z kończyny dolnej.

Tabela 1. Skład białkowy limfy z kończyny dolnej [wg 115]

Białko	Stężenie [g/l]	L:S	Uwagi
Białko całkowite	34,9	0,39	*
	36,9	0,53	**
	19,7	0,24	***
Albumina	16,8	0,48	****
α -1- glikoproteina	0,22	0,45	****
α -1-antytrypsyna	0,69	0,25	****
α -1-antychymotrypsyna	0,12	0,25	****
α -2-HS-glikoproteina	0,19	0,35	****
β -2-glikoproteina	0,074	0,4	****

Przegląd piśmiennictwa

β -lipoproteina	1,11	0,2	****
Haptoglobina	0,15	0,17	****
Inhibitor- α -1-trypsyny	0,065	0,11	****
Plazminogen	0,026	0,22	****
Prealbumina	0,12	0,35	****
Retinol	0,007	0,11	****
Transferyna	2,3	0,55	****

L:S – stosunek stężenia danego białka w limfie do jego stężenia w surowicy

* Średnia wartość po 24 h zbierania

** Wtórny zastój

*** Pierwotny zastój

**** Średnia wartość po 3 h zbierania

2.3 Zastój płynu tkankowego/ limfy

Zastój PT/L jest procesem obejmującym gromadzenie się wody, białka, produktów metabolicznych, migrujących komórek odpornościowych (limfocytów, komórek Langerhansa), erytrocytów, komórek osiadłych (KC, fibroblastów, komórek śródbłonna) oraz *debris* komórek ulegających apoptozie w przestrzeni międzykomórkowej i naczyniach chłonnych. W jego następstwie dochodzi do postępującego włóknienia tkanki (prolifracji fibroblastów i odkładania kolagenu). Zaburzenia odpływu chłonnego z tkanki prowadzą do zatrzymania w niej mikroorganizmów penetrujących skórę, a następnie do ich kolonizacji w głębiej położonych tkankach. Obrzęk chłonny jest nie tylko gromadzeniem się wody i białka w tkance, ale także zwiększeniem się liczby komórek i substancji podstawowej samej tkanki [116].

Współistniejące zwiększenie zawartości wody w tkance, liczby komórek i masy macierzy zewnątrzkomórkowej wskazuje, że termin lymphedema powinien zostać zastąpiony terminem lymphofibroedema (obrzęk chłonno-włóknisty). Brak drenażu chłonki z kończyny powoduje retencję wody i białka oraz substancji biologicznie czynnych takich, jak: cytokiny, czynniki wzrostu czy chemokiny. Mogą one wpływać na procesy zachodzące w komórkach tkanki (ich metabolizm i tempo proliferacji) zarówno hamująco, jak i stymulująco [106, 112, 113].

2.4 Aktywacja keratynocytów przez cytokiny i czynniki wzrostu

Strefę komórek proliferujących w naskórku stanowi głównie warstwa podstawna, w której mogą się znajdować zarówno komórki macierzyste, jak i komórki TA (przejściowo

namnażające się). W warunkach fizjologicznych stopień proliferacji zależny jest głównie od komórek namnażających się przejściowo, które wywodzą się z komórek macierzystych. Komórki te po przejściu kilku cykli mitotycznych, przekształcają się w komórki zróżnicowane, niezdolne do dalszych podziałów [46]. Komórki z warstw podstawnych tworzą *in vitro* kolonie, podczas gdy duże z warstw powierzchniowych nie posiadają tej zdolności [11]. Ponadto, w małych KC (średnica 11-14 μm) są wyrażane białka charakterystyczne dla dzielących się KC, jak np. cyklina A i B; w przypadku KC o dużej średnicy (średnica $\leq 20\mu\text{m}$), które wytwarzają zrogowaciałą otoczkę, wysoka jest ekspresja inwolukryny, profilagryny oraz transglutaminazy [131]. Do podstawowych cytokin, wpływających na proces proliferacji KC, zaliczamy: IL-1, TNF- α oraz IL-6. Ponadto, czynniki wzrostu takie, jak: EGF, KGF, IGF, FGF, VEGF, TGF są niezbędne w procesie wzrostu komórek naskórka [59, 140]. W celu określenia komórek aktywowanych bada się ekspresję CK6, CK16, CK17 natomiast ekspresję cytokeratyny 1, 10, 14, filagryny oraz inwolukryny w celu badania procesu różnicowania [80]. Proces aktywacji KC jest zależny od czynników wzrostu i cytokin, m.in., takich jak: IL-1, TNF- α , IL-6, KGF, TGF- α , TGF- β , IFN- γ [43, 140, 42]. Aktywowane KC wykazują hiperproliferyację, zdolność do migracji, zmiany w cytoskieletcie, zwiększoną ekspresję receptorów powierzchniowych oraz zwiększoną produkcję składników błony podstawnej [144, 42]. Taka odpowiedź jest konieczna do odnowy uszkodzonych obszarów naskórka i skóry [140, 141]. Aktywowane KC wytwarzają także sygnały parakryne dla aktywacji fibroblastów, komórek śródbłonna naczyń, melanocytów, limfocytów, oraz sygnały autokryne skierowane do sąsiadujących keratynocytów, co zostało przedstawione na rycinie 1.

Czynnikiem inicjującym aktywację wydaje się być IL-1 β , która jest także aktywatorem skórných fibroblastów, przyczyniając się do ich migracji, proliferacji oraz wytwarzania składników macierzy zewnątrzkomórkowej [35, 88, 93]. Ponadto, IL-1 jest autokrynnym sygnałem, który pobudza KC, prowadząc do ich proliferacji, migracji i ekspresji zestawu genów aktywacji [75, 132]. KC wyrażają na swojej powierzchni receptory dla IL-1, zarówno typu I, jak i typu II, oraz dla antagonisty receptora IL-1 [15, 24, 31, 48, 76, 125]. Transdukcja sygnału w odpowiedzi na IL-1 zaczyna się na powierzchni komórki po pobudzeniu receptora typu I [146]. Aktywowane KC produkują także powierzchniowe cząsteczki takie, jak: ICAM-1, integryny oraz fibronektynę, która jest składnikiem błony podstawnej [21, 49, 51, 55, 73, 74, 85, 104].

KC aktywowane przez IL-1 mogą być utrzymywane w tym stanie właśnie przez TNF- α [101]. TNF- α jest obecny w wyższych warstwach zdrowego naskórka i może być uwalniany

przez IL-1 [13]. TNF- α aktywuje w naskórku odpowiedź immunologiczną poprzez indukcję dodatkowych cząstek sygnałowych: cytokin, czynników wzrostu i ich receptorów mających mitogeny wpływ na KC (np. amfíregulina, TGF- α , IL-1 α , antagonist receptoru IL-1 oraz EGFR) [49]. Istnieją dwa receptory dla TNF- α , lecz KC ekspresjonują tylko receptor typu 1 o masie 55 kDa.

IL-6 jest wytwarzana przez KC z warstwy podstawnej. W zapaleniu i chorobach objawiających się hiperproliferacją dochodzi do jej nadekspresji we wszystkich warstwach naskórka [57].

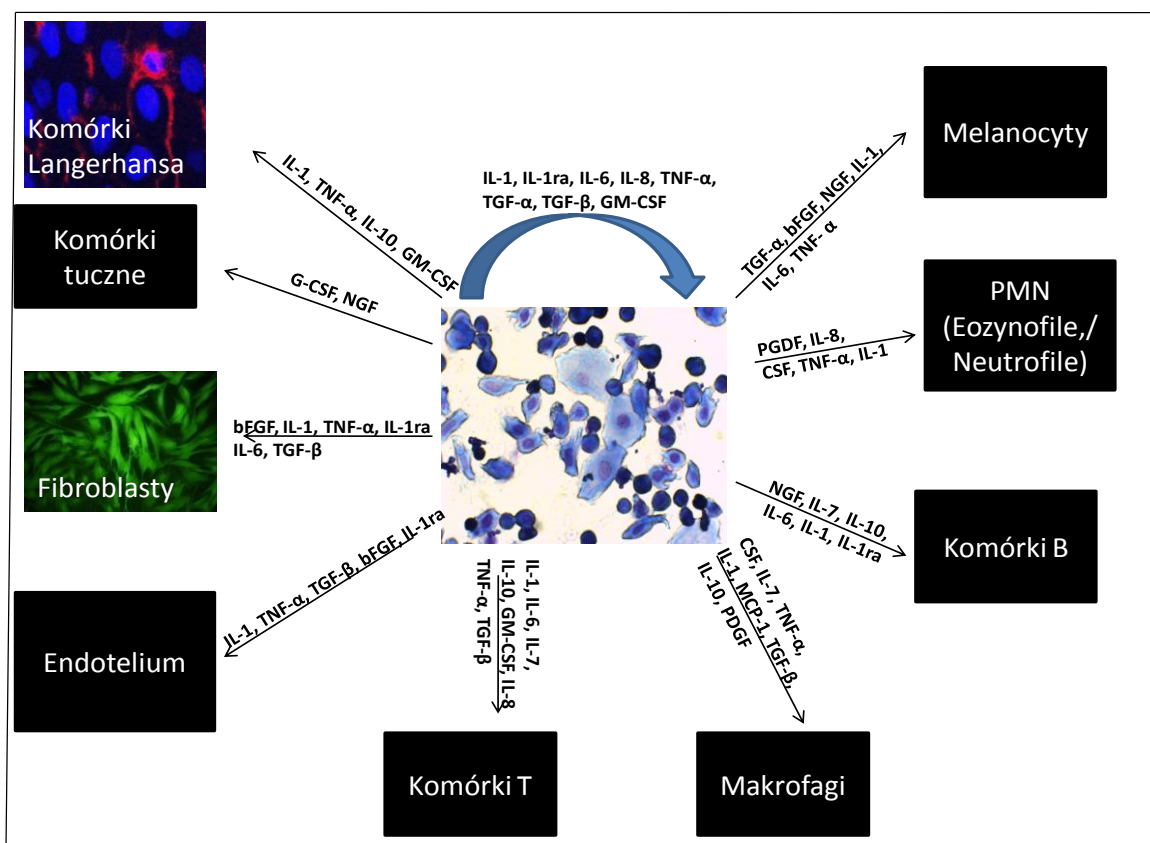
KGF, jest wytwarzany głównie przez fibroblasty w trakcie gojenia się rany. Zostało zidentyfikowanych wiele genów, które są zaangażowane w mitogeny efekt KGF na KC [7, 5]. Należą do nich geny dla czynników transkrypcyjnych c-myc oraz c-fos, a także geny kodujące enzymy regulatorowe, biorące udział w biosyntezie nukleotydów, jak np. enzymy biorące udział w syntezie puryn. Ponadto KGF indukuje ekspresję TGF - α w KC, który jest ich silnym mitogenem [25]. KGF bierze także udział w aktywacji EGFR. W dojrzałym naskórku EGFR jest obecny w warstwie podstawnej i w mniejszym stopniu w warstwie kolczystej. Przyłączanie się odpowiednich ligandów do receptora EGFR może aktywować KC [22, 66]. W odpowiedzi na aktywację EGFR, KC proliferują i stają się zdolne do migracji [36, 101]. Wykazano, że ligandy EGFR silnie indukują ekspresję CK6 oraz CK16 [61, 87, 161]. Raz aktywowane KC syntetyzują dodatkowe czynniki wzrostu i cytokiny, takie jak TGF- α , IL-3, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF oraz M-CSF [16, 22, 75, 101].

Poza wpływem KGF na aktywność proliferacyjną KC powoduje on wzrost ekspresji stromelizyny-2, bierze udział biosyntezie hialuronianu a także pobudza wytwarzanie enzymów ułatwiając migrację KC [126]. KGF redukuje także uszkodzenia wywołane stresem oksydacyjnym w KC, poprzez indukcję ekspresji enzymów, uczestniczących w detoksykacji reaktywnych form tlenu [58].

Różne markery zewnątrzkomórkowe są wyrażane przez aktywowane KC. Zalicza się do nich powierzchniowe białka błonowe, integryny, białka substancji zewnątrzkomórkowej, a także receptory dla czynników zarówno autokrynych, jak i tych produkowanych przez infiltrujące komórki układu immunologicznego [3, 18, 91, 104]. Po aktywacji KC przechodzą na drogę różnicowania. Wydzielany przez fibroblasty TGF- β jest ważnym regulatorem tego procesu [4]. Indukuje on syntezę białek macierzy zewnątrzkomórkowej i ich powierzchniowych receptorów, a także składników błony podstawnej takich, jak fibronektyna, laminina, kolagen IV i VII, integryny: α 5, α v, β 1, β 4, β 5 [143, 128, 135, 17].

Białko to redukuje szybki wzrost KC do poziomu obserwowanego w warstwie podstawnej naskórka [132].

Receptory dla cytokin, chemokin i czynników wzrostu przedstawia Tabela 2, natomiast cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu wydzielane przez KC przedstawia Tabela 3.



Rycina 1. Kooperacja KC (komórki w środkowej części ryciny) z komórkami Langerhansa, komórkami tłuszczowymi, fibroblastami, komórkami śródbłonna, komórkami T i B, makrofagami, PMN i melanocytami oraz autokryny wpływ wydzielanych cytokin i czynników wzrostu na KC (niebieska strzałka)

Tabela 2. Receptory dla cytokin, chemokin i czynników wzrostu obecne na KC [wg 33, 115]

RECEPTOR	EFEKT AKTYWACJI RECEPTORA
IL-1R1	Wydzielanie cytokiny
IL-1R2	Brak sygnału transdukcji
IL-4R	Wytwarzanie IL-6
IL-6R	Indukcja proliferacji
IL-10R	Inhibicja wytwarzania HLA-DR
IL-13R	Wytwarzanie IL-6
IL-17R	Wydzielanie cytokiny
TNF-αR	Wydzielanie cytokiny, indukcja ICAM-1, indukcja wzrostu

Przegląd piśmiennictwa

EGF-R	Indukcja proliferacji
FGF-R1	Indukcja proliferacji
KGF-R	Indukcja proliferacji
IGF-R1	Indukcja proliferacji
NGF-R	Indukcja proliferacji
ET-1R	Indukcja proliferacji
TGF- β R	Kontrola różnicowania
LIF-R	Nieznana
IFN- α/β receptor	Inhibicja proliferacji
IFN- γ receptor	Indukcja HLA-DR oraz ICAM-1
CXCR2	Przyciąganie neutrofilii
CCR6	Nieznana

Tabela 3. Cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu wydzielane przez KC [wg 33, 115]

CYTOKINA/CHEMOKINA	EFEKT DZIAŁANIA
IL-1 α , β	Wrodzone reakcje immunologiczne
IL-1Ra	IL-1 inhibitor
IL-10	Inhibicja Th1
IL-12	Indukcja Th1
IL-18	Indukcja Th1 i Th2
TNF- α	Indukcja cząsteczek adhezyjnych
GM-CSF	Regulacja funkcji LC
M-CSF	Nieznana
IL-3	Czynnik wzrostu komórek tucznych
IL-6	Proliferacja KC
IL-7	Czynnik wzrostu komórek T
IL-15	Czynnik wzrostu komórek T
TGF- α	Wpływa na ruchliwość KC
Amfiregulina, HB-EGF	Czynnik wzrostu KC
Bfgf	Czynnik wzrostu KC
FGF-10	Czynnik wzrostu KC
IGF-II	Czynnik wzrostu KC
NGF	Czynnik wzrostu KC i melanocytów
VEGF	Czynnik wzrostu komórek śródbłonka
PDGF	Czynnik wzrostu fibroblastów i komórek mięśni gładkich
ET-1	Czynnik wzrostu KC i melanocytów
SCF	Czynnik wzrostu komórek tucznych i melanocytów
LIF	Nieznana

IFN- γ	Indukcja Th1
TGF- β 1	Inhibicja proliferacji KC, indukcja ziaren Birbecka
MIP-3 α	Atraktant LC przez CCR6
SDF-1 α	Atraktant LC przez CXCR4
IP-9, IP-10	Atraktant komórek T przez CXCR3
IL-8, GRO α	Atraktant neutrofilii przez CXCR2

2.5 Proces różnicowania keratynocytów

Różnicowanie KC jest procesem inicjowanym w momencie, gdy komórki macierzyste wychodzą ze swojej niszy, aby wygenerować komórki przejściowo namnażające się [137, 41]. Proces różnicowania komórek naskórka jest wieloetapowym procesem biologicznym, w wyniku którego dochodzi do wykształcenia na powierzchni naskórka warstwy zrogowaciałej. Ten uporządkowany cykl przemian, wymaga skoordynowanego działania wielu genów kodujących specyficzne białka, będące wskaźnikami różnicowania w poszczególnych warstwach naskórka. Geny te są skupione w tzw. kompleksie różnicowania naskórka - EDC i usytuowane u człowieka na chromosomie 1q21. Przez cały ten okres KC odbierają swoiste sygnały przekazywane im na drodze aktywacji różnych szlaków sygnałowych [64, 97].

Kluczowym czynnikiem sygnałowym w procesie różnicowania, niezbędnym na wszystkich etapach tego procesu jest jon wapnia. Zarówno formowanie desmosomów, sekrecja ciałek lamellarnych, jak i aktywacja enzymów uczestniczących w różnicowaniu, są procesami zależnymi od wapnia. Jego stężenie w przestrzeni zewnątrzkomórkowej różni się w poszczególnych warstwach i jest ono czterokrotnie wyższe w szczytowych partiach naskórka w porównaniu do warstwy podstawnej. Gradient wapnia (z 1,2-1,8 mM do 0,05-1,0 mM) jest wystarczający do wzbudzenia proliferacji komórek, ale dalsze przemiany wymagają wyższego stężenia zarówno w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, jak i w cytozolu [79]. Przyłączenie Ca^{2+} do transbłonowego receptora NMDA aktywuje podjednostkę α białka G, która inicjuje szlak sygnalizacyjny rozpoczynający się działaniem fosfolipazy C. Po uwolnieniu z błony komórkowej 1,4,5-trójfosforanu inozytolu, dyfunduje on w cytozolu, dociera do retikulum endoplazmatycznego, gdzie wiąże się z zawartymi w jego błonie kanałami wapniowymi i otwiera je. Zmagazynowany wewnątrz siateczki cytoplazmatycznej wapń wpływa do cytozolu, gwałtownie zwiększając w nim stężenie jonów wapnia [64]. Wiązanie kinazy C (PKC) z fosfolipidami błony zależy od obecności jonów wapnia i rodzaju

fosfolipidów. Prawdopodobny mechanizm aktywacji PKC obejmuje kilka etapów. W pierwszym, cztery cząsteczki fosfatydyloseryny wiążą jeden jon Ca^{2+} poprzez grupy karboksylowe seryny. Następnie przyłącza się PKC tworząc nieaktywny enzymatycznie kompleks. Związanie jednej cząsteczki DAG z tym kompleksem inicjuje zmiany konformacyjne w cząsteczce enzymu i jego aktywację, której wynikiem jest fosforylacja białek docelowych, takich jak: inwolukryna, enwoplakina i periplakina, a później także lorykryna, indukując ich ekspresję [64].

Kolejny etap, prowadzący do powstania warstwy rogowej, wiąże się z tworzeniem w KC dwóch rodzajów ziarnistości. Pierwsze z nich mają nieregularny kształt i zawierają profilagrynę, podczas gdy drugie są mniejsze, okrągłe i zawierają lorykrynę - białko bogate w cysteinę. W trakcie różnicowania keratynocytów profilagryna ulega proteolizie, w wyniku której powstaje cząsteczka filagryny. Białko to łączy poszczególne filamenty keratynowe pośrednie, współtworzące szkielet komórki, w grubsze wiązki nazywane makrofibrilami i wypełniające całą komórkę. W trakcie proteolizy profilagryny jej reszta N-końcowa jest przenoszona do jądra różnicującej się komórki, odgrywając ważną rolę w jego rozpadzie [64]. Filagryna jest również źródłem wolnych aminokwasów, które dzięki swojej wysokiej higroskopijności pełnią ważną funkcję w utrzymaniu prawidłowego nawodnienia warstwy rogowej naskórka. Lorykryna, po uwolnieniu z ziarnistości, łączy się wiązaniem krzyżowym z białkiem SPR, przy udziale naskórkowo specyficznej transglutaminazy 3. Dopiero taki kompleks jest przyłączany do rusztowania powstałego wcześniej z inwolukryny, enwoplakiny i periplakiny. Podczas wczesnych etapów różnicowania dochodzi do wzmocnienia międzykomórkowej adhezji, która odbywa się za pośrednictwem adheryn i desmosomów, w sposób zależny od wapnia [40, 47, 64, 60].

2.6 Komórki macierzyste keratynocytów i ich cykl komórkowy

Komórki macierzyste KC przechodzą ograniczoną liczbę szybkich podziałów mitotycznych, następnie przechodzą w stan spoczynku, a ich komórki potomne ostatecznie się różnicują [6]. Uważa się, że spośród wszystkich KC, komórki macierzyste naskórka cechują się najwyższą ekspresją $\beta 1$ -integryny, $\alpha 6$ -integryny, czynnika transkrypcyjnego p63 i Delta 1. Mają one także wyższą ekspresję β -kateniny cytoplazmatycznej w stosunku do β kateniny związanej z kadherynami błon komórkowych [124].

Integrynom, jako receptorom białek macierzy zewnątrzkomórkowej, przypisuje się ogromne znaczenie w regulacji homeostazy skóry. Są one heterodimerycznymi glikoproteinami, przytwierdzającymi KC warstwy podstawnej naskórka do błony podstawnej [55]. β 1-integryna jest jednym z markerów komórek macierzystych naskórka. Glikoproteina ta zapewnia odpowiednie rozmieszczenie komórek macierzystych, a także sprawia, że komórki są silniej przytwierdzone do podłoża, niż komórki przejściowo namnażające się i migrujące w kierunku wyższych warstw naskórka. Wraz z utratą kontaktu komórek macierzystych z błoną podstawną i zapoczątkowaniem procesu ich różnicowania, obserwuje się zahamowanie syntezy β 1-integryny na powierzchni tych komórek. Towarzyszy temu również zahamowanie proliferacji komórek i zmiana ekspresji wielu genów, w tym kodujących białka Ras oraz c-Myc [6]. Udowodniono także, że zablokowanie receptorów β 1-integryny powoduje apoptozę komórek naskórka – głównie poprzez obniżenie w nich stężenia białka Bcl-2 [124]. Właściwości adhezyjne integryn utrzymują odpowiedni wzór rozmieszczenia komórek macierzystych w warstwie podstawnej naskórka i uważa się, że odgrywają one również istotną rolę w regulacji różnicowania KC. β 1-integryny występują na powierzchni KC z warstwy podstawnej naskórka, a więc także komórek macierzystych zlokalizowanych w charakterystycznych niszach (w przedziałach międzymieszkowych, w macierzy terminalnej mieszka włosowego oraz w górnym rejonie mieszka włosowego, w małym wybrzuszeniu, w okolicy ujścia gruczołu łojowego). Proces opuszczania przedziału komórek macierzystych wiąże się z odłączeniem się komórek od błony podstawnej i stopniowym podjęciem migracji w kierunku powierzchniowych warstw naskórka. Zmiany te związane są ze spadkiem ekspresji β 1-integryny [6, 44, 99, 124]. W stanie hiperprolifracji może dochodzić do jej wyrażania w warstwie kolczystej. W pracy Haase i wsp. wykazano, że aktywacja MAPK jest skorelowana z ekspresją integryn [56]. Konstytutywna aktywacja MAPK powoduje proliferację KC, tym samym opóźniając proces ich różnicowania [56].

Czynnik transkrypcyjny p63 należy do rodziny, do której należą także białka p53 i p73. W naskórku ludzkim, mieszkach włosowych i hodowanych KC, białko p63 ulega ekspresji w jądrach komórek zachowujących zdolność proliferacyjną. Badania dowodzą, że w trakcie różnicowania spada ekspresja tego białka. [29]. W pracy Lardered i wsp. po raz pierwszy opisano izolację keratynocytów należących do tzw. ang. Side Population. Wykazano, że KC SP (Side Population Keratinocyte) mają zdolność do wyrzutu barwnika fluorescencyjnego Hoechst podobną do komórek macierzystych, pochodzących ze szpiku. Stanowią one 0,16 % populacji i są komórkami niezróżnicowanymi [77].

W hodowli, proliferujące KC charakteryzują się aktywnym cyklem komórkowym, który prowadzi do podziałów komórkowych pod kontrolą cyklin takich, jak cyklina D1, kinaz zależnych od cyklin, jak również ich inhibitorów [139]. Stymulacja mitogenna uruchamia kaskadę procesów biochemicznych, prowadzących do zwiększenia ekspresji genu cykliny D1. Cykl komórkowy KC jest głównie regulowany w fazie G1. Głównymi kinazami zależnymi od cyklin są cdk4, cdk6 i cdk2. Kinazy ulegają aktywacji, wiążąc się z właściwymi cyklinami. Cyklina D (D1, D2 i D3) wiąże się z cdk4/6 podczas, gdy cykliny E i A z cdk2 [23]. W komórkach spoczynkowych białka te ulegają fosforylacji i tworzą kompleksy z czynnikami transkrypcyjnymi z rodziny E2F [78]. Podczas fazy G1 białka Rb, p107 i p130 są fosforylowane przez kinazy cdk4/6 i cdk2, co objawia się uwolnieniem czynników transkrypcyjnych i syntezą białek związanych z cyklem komórkowym, takich jak np. cyklina A. Aktywność kinaz zależnych od cyklin jest także regulowana przez dwie rodziny specyficznych inhibitorów. Pierwsza z nich, nazywana Cip/Kip, przyłącza się do kompleksów cdk4/6-cyklina D, cdk2-cyklina E/A. Druga rodzina - INK4 wiąże się wyłącznie z kompleksami cdk4/6-cyklina. W warunkach prawidłowych, białko p21 łączy się w nieaktywne kompleksy z dimerem cyklina E-cdk2, co prowadzi do zatrzymania cyklu komórkowego; stąd wniosek, że obniżony poziom inhibitora zatrzymuje zdolność proliferacji KC [139].

Białko p21 w zależności od stężenia może działać jako czynnik pobudzający lub hamujący cykl komórkowy. Oprócz inhibicji kompleksu cyklina E-cdk2, białko to może także hamować kompleks cyklina D-cdk4/cdk6, który, jak wiadomo jest silnym promotorem cyklu komórkowego [78].

3 CEL PRACY

Celem pracy było wykazanie, które cytokiny i czynniki wzrostu płynu tkankowego/limfy skóry człowieka wpływają specyficznie na:

- a) proliferację keratynocytów,
- b) ich różnicowanie ,
- c) ekspresję markerów uznanych za charakterystyczne dla komórek macierzystych naskórka

PYTANIA

1. Jakie zmiany fenotypowe zachodzą w ludzkich keratynocytach z poszczególnych warstw naskórka w czasie hodowli w PT/L?
2. Czy zawarte w PT/L: IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF i TGF- β mają wpływ na proliferację i różnicowanie keratynocytów?
3. Jaki wpływ ma PT/L na ekspresję markerów dla tzw. komórek macierzystych naskórka (p63 i CD29) ?
4. Jak PT/L wpływa na ekspresję markerów proliferacji/aktywacji keratynocytów, jak: Ki67, PCNA, CK6, CK16, CK17 i markerów różnicowania, jak CK1, CK10, CK14, filagryny, inwolukryny?

4 MATERIAŁ

4.1 Keratynocyty

Skórę do izolacji KC pobierano od chorych z klinicznie i wizualizacyjnie (limfoscyntygrafia, CT, MRI) udokumentowanym pozapalnym, pourazowym i pochirurgicznym zastojem limfy. U dawców materiału nie stwierdzano klinicznie i laboratoryjnie miejscowych i ogólnych stanów zapalnych. Skóra była pobierana z okolicy podudzia kończyn dolnych. Grupę kontrolną stanowili dawcy skóry operowani z powodu problemów ortopedycznych (bez zastoju limfatycznego).

4.2 Płyn tkankowy/limfa i surowica

PT/L pobierano z tkanek lub kaniulowanych naczyń limfatycznych w czasie programowych operacji zespożeń limfatyczno-żylnych lub przeciętych w czasie operacji plastycznych naczyń u chorych z obrzękiem limfatycznym. Po odwirowaniu przy 1500 obrotów na minutę i przefiltrowaniu przez filtr antybakteryjny PT/L przechowywano w temperaturze -20°C . U dawców PT/L nie stwierdzano klinicznie i laboratoryjnie miejscowych i ogólnych stanów zapalnych. Od dawców PT/L pobierano krew obwodową i izolowano surowicę. Grupę kontrolną stanowił PT/L uzyskany od wolontariuszy uczestniczących w badaniach tzw. wstecznego transportu cholesterolu z tkanek do płynu tkankowego i krwi. Stężenie IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF, TGF- β w PT/L i surowicy stosowanej do hodowli pochodzącej od chorych z obrzękiem limfatycznym i zdrowych osób przedstawia tabela 4.

Tabela 4. Przeciętne stężenie IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β w PT/L i w surowicy stosowanej do hodowli pochodzącej od chorych z obrzękiem limfatycznym i osób zdrowych [wg 115 oraz niepublikowane]

Cytokina/czynnik wzrostu	Stężenie cytokiny/czynnika wzrostu w PT/L zdrowego człowieka	Stężenie cytokiny/czynnika wzrostu w PT/L chorego z zastojem limfatycznym	Stężenie cytokiny/czynnika wzrostu surowicy zdrowego człowieka	Stężenie cytokiny/czynnika wzrostu w surowicy chorego z zastojem limfatycznym
IL-1 β	14,4pg/ ml	4,4 pg/ ml	3,4 pg/ml	10,3 pg/ml
IL-6	9,2 pg/ ml	11,5 pg/ ml	2,9 pg/ml	5,4 pg/ml
TNF α	4,3 pg/ ml	1,7 pg/ ml	1,9 pg/ml	7,5 pg/ml
KGF	27,5 pg/ ml	140 pg/ ml	7,5 pg/ml	12,5 pg/ml

Material

TGF- β	0,5 ng/ml	0,48 ng/ml	7,3 ng/ml	18,5 ng/ml
--------------	-----------	------------	-----------	------------

4.3 Model badawczy

KC izolowane ze skóry kończyn dolnych były hodowane w płynie tkankowym/ limfie zawierającej naturalne IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β .

Wszystkie badania zostały wykonane za zgodą Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym KB 168/2009. Tabela 5. przedstawia grupy doświadczalne.

Tabela 5. Grupy doświadczalne

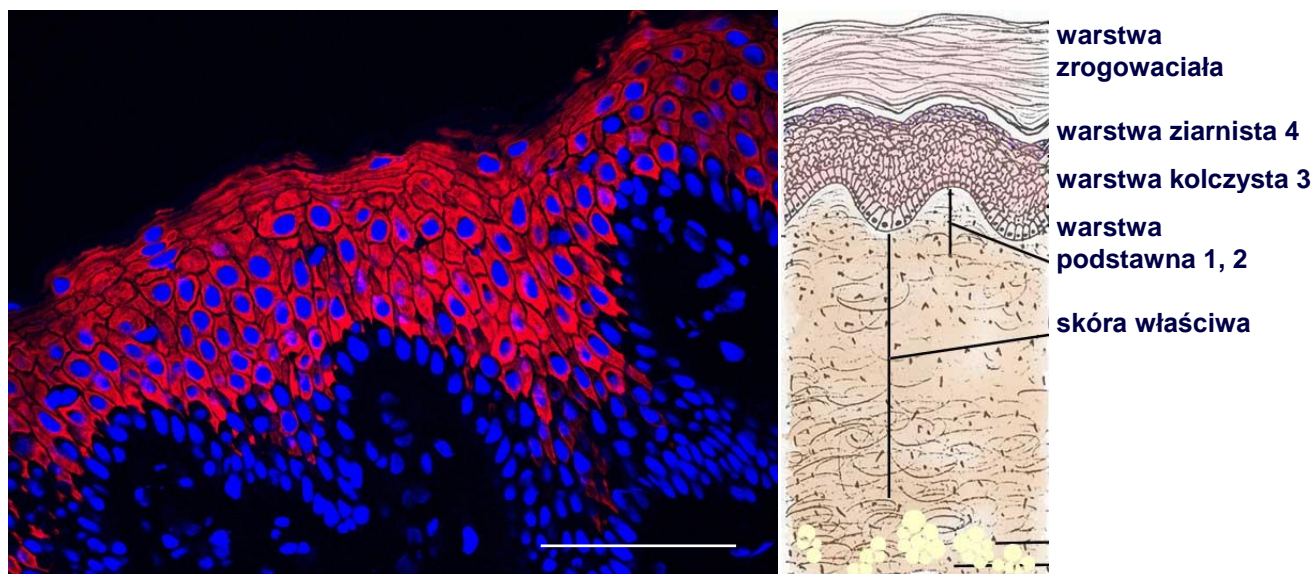
	Keratynocyty (KC)	MEDIUM HODOWLANE	BADANE PARAMETRY
1	KC izolowane ze skóry podudzia (limfedema) (n=5)	PT/L (limfedema)	* Całkowity przyrost liczby KC *Zmiany ilościowe KC poszczególnych warstw naskórka *Zmiany ilościowe KC wyrażających markery komórek macierzystych: p63 i CD29 oraz markery proliferacji KC: Ki67 i PCNA *Zmiany ilościowe KC wyrażających CK1, CK6, CK10, CK14, CK16, CK17, filagrynę, inwolukrynę (charakterystycznych dla stopnia zróżnicowania)
		PT/L (normalna)	
		20% surowica	
		RPMI+5%FCS	
2	KC izolowane ze skóry podudzia (normalne) (n=5)	PT/L (limfedema)	* Całkowity przyrost liczby KC *Zmiany ilościowe KC poszczególnych warstw naskórka *Zmiany ilościowe KC wyrażających markery komórek macierzystych: p63 i CD29 oraz markery proliferacji KC: Ki67 i PCNA *Zmiany ilościowe KC wyrażających CK1, CK6, CK10, CK14, CK16, CK17, filagrynę, inwolukrynę (charakterystycznych dla stopnia zróżnicowania)

3	KC izolowane ze skóry podudzia (limfedema) (n=5)	PT/L (limfedema)+przeciwciało neutralizujące IL-1 β	*Całkowity przyrost liczby KC * Zmiany ilościowe KC poszczególnych warstw naskórka
		PT/L (limfedema)+przeciwciało neutralizujące IL-6	
		PT/L (limfedema)+przeciwciało neutralizujące TNF- α	
		PT/L (limfedema)+przeciwciało neutralizujące KGF	
		PT/L (limfedema)+przeciwciało neutralizujące TGF- β	
4	KC (limfedema) +przeciwciało blokujące IL-1R	PT/L (limfedema) (n=5)	*Całkowity przyrost liczby KC * Zmiany ilościowe KC poszczególnych warstw naskórka
	KC (limfedema) +przeciwciało blokujące IL-6R		
	KC (limfedema) +przeciwciało blokujące TNFR		
	KC (limfedema) + przeciwciało blokujące KGFR		
	KC(limfedema) +przeciwciało blokujące TGFR		

5 METODY


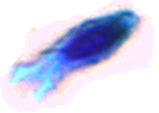

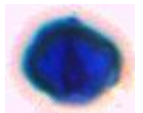
5.1 Izolacja keratynocytów i ich charakterystyka fenotypowa przed hodowlą

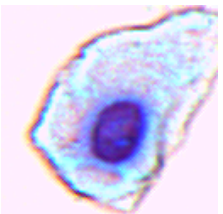
Fragmety skóry ludzkiej po usunięciu tkanki tłuszczowej i przepłukaniu PBS z dodatkiem antybiotyków i środków grzybobójczych [penicylina (100µg/ml), streptomycyna (100 µg/ml), fungizon (0,25µg/ml)], były trawione przez 24 godziny w 0,3 M roztworze trypsyny (trypsyna z trzustki bydlęcej; aktywność: 10.000 jednostek/mg, Merck) z 0,025% EDTA. Następnie naskórek był oddzielany i przez 1 godzinę płukany w PBS bez wapnia i magnezu, z dodatkiem antybiotyków i środków grzybobójczych. Komórki były rozdzielane mechanicznie przy użyciu sitka (Sigma, Steinheim, Niemcy). KC były dwukrotnie płukane w PBS przez wirowanie 10 minut przy 1500 rpm. Żywotność komórek była sprawdzana za pomocą zestawu do badania żywotności i cytotoksyczności komórek (Viability/Cytotoxicity Assay Kit for Live and Dead cells Biotium, Hayward, CA, USA). Uzyskane w warunkach jałowych KC były wysiewane w stężeniu $0,5 \times 10^6$ komórek/ml w sześciodołkowej płytce płaskodennej (Becton Dickinson, Belgia). Żywe komórki były rozróżniane przez określenie aktywności wewnątrzkomórkowej esterazy przekształcającej, nie wykazującą fluorescencji, kalceinę AM w intensywnie fluorescencyjną kalceinę. Kalceina pozostaje w komórkach żywych, nadając im intensywnie jednolitą zieloną fluorescencję (ex/Em 495nm/515 nm). Drugi barwnik EthD-III wnika do komórek z uszkodzoną błoną komórkową, gdzie po związaniu z kwasami nukleinowymi przechodzi 40-krotne wzmocnienie fluorescencji, co objawia się czerwoną fluorescencją w komórkach martwych. Komórki były przepłukiwane dwukrotnie w roztworze PBS w celu zahamowania aktywności esterazy. Obserwacje fluorescencji prowadzono w mikroskopie odwróconym (Olympus IX FLA, Japonia). Do liczenia komórek oraz ich pola powierzchni użyto programu Cell (Olympus, Japonia). Morfologia komórek była określana po wybarwieniu preparatów metodą May-Grunwald Giemsa. Preparaty po wysuszeniu utrwalano w czystym alkoholu metylowym przez 15 minut a następnie barwiono 5 minut w roztworze May-Grunwalda i 15 minut w roztworze Giemsy.



Rycina 2. Obraz naskórka i warstw KC wg stopnia zróżnicowania. Ekspresja antygenu **CK10** przez KC. Na niebiesko zostały wybarwione jądra komórkowe (**Hoechst**). Skala=100µm.

Tabela 6. Morfologiczna charakterystyka KC izolowanych z poszczególnych warstw naskórka [wg 27]

Rodzaj komórki	Charakterystyka
<p>Komórki mitotyczne</p> 	<p>Komórki w fazie cytokinezy, z widoczną bruzdą podziałową; o wielkości komórek okrągłych z warstwy podstawnej.</p>
<p>Komórki z warstwy podstawnej 1</p> 	<p>Typ komórek o wydłużonym kształcie; komórki wyrażające markery komórek macierzystych naskórka p63 i CD29. Średnie pole powierzchni komórki wynosi $212 \pm 7,5 \mu\text{m}^2$.</p>
<p>Komórki z warstwy podstawnej 2</p> 	<p>Typ komórek o regularnym, okrągłym kształcie; komórki wyrażające markery komórek macierzystych naskórka p63 i CD29. Średnie pole powierzchni komórki wynosi $95,89 \pm 5 \mu\text{m}^2$.</p>
<p>Komórki z warstwy kolczystej 3</p> 	<p>W komórkach tej warstwy dochodzi do syntezy cytokeratyn takich, jak: CK1, CK10 oraz białek: filagryny i inwolukryny, a także odkładania w cytoplazmie pęczków filamentów pośrednich cytokeratynowych. Średnie pole powierzchni komórki wynosi $307,4 \pm 12 \mu\text{m}^2$.</p>

<p>Komórki z warstwy ziarnistej 4</p> 	<p>W komórkach warstwy ziarnistej dochodzi do najintensywniejszego różnicowania KC, które przejawia się zagęszczaniem pęczków filamentów cytokeratyny oraz pojawieniem się w cytoplazmie ziaren keratohialiny. Komórki te może cechować zanik jądra komórkowego. Średnie pole powierzchni komórki wynosi $1356,33 \pm 9 \mu\text{m}^2$.</p>
---	--

*pole powierzchni komórek obliczano w programie Cell (Olympus, Japonia) pod powiększeniem 400x (n=10)

5.2 Określenie liczbowego przyrostu keratynocytów

KC (wyjściowo wysiane w liczbie $0,5 \times 10^6/\text{ml}$) liczono w komorze Bürkera w 1, 7 i 14 dniu hodowli. KC liczono przy powiększeniu 400x w mikroskopie świetlnym, stosując regułę dwóch boków.

5.3 Hodowla keratynocytów w płynie tkankowym / limfie, 20 % surowicy, medium RPMI oraz określenie ich morfologii

KC (l) i (n) były wysiewane w ilości $0,5 \times 10^6$ komórek/ml do sześciodołkowej płytki płaskodennej (Becton Dickinson, Belgia). Przed dodaniem do hodowli, PT/L (l) (n) i surowica (l) były filtrowane przez filtr sterylizacyjny (Millex-GP Filter Unit, Millipore). Surowica (l) była rozcieńczana w stosunku 1:4 w PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} i w dalszej części pracy będzie określana jako 20 % S. Jako kontrole prowadzono hodowle w medium RPMI 1640 z dodatkiem 5% FCS, które w dalszej części pracy będzie określane jako RPMI. Hodowle prowadzono przez 14 dni w temperaturze 37°C w obecności 5 % CO_2 , w inkubatorze NU-4950 (NuAire, USA); media hodowlane były zmieniane w hodowli co 3 dni.

Po 1, 7 i 14 dniu hodowli określano liczbę komórek. KC były umieszczane na szkiełkach podstawowych podczas ich wirowania w cytowirówce Cytospin 3 (Shandon). Morfologię KC określano w preparatach barwionych metodą May-Grunwald Giemsa i liczono odsetek komórek według ustalonego kryterium (% komórek dzielących się, komórek z warstwy podstawnej 1, 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4). W dalszej części pracy KC były znakowane na obecność markerów dla tzw. komórek macierzystych naskórka: p63 i CD29, markerów proliferacji: Ki67 i PCNA, oraz białek charakteryzujących KC na poszczególnych etapach różnicowania: CK1, CK6, CK10, CK14, CK16, CK17, filagryny i inwolukryny.

5.4 Identyfikacja fenotypowa keratynocytów po izolacji, hodowli w płynie tkankowym/limfie, 20 % surowicy oraz medium RPMI

KC (l) i (n) były umieszczane na szkiełkach podstawowych podczas ich wirowania w cytowirówce Cytospin 3 (Shandon). Po wysuszeniu preparaty były utrwalane w świeżo przygotowanym 4% paraformaldehydzie w PBS przez 15 minut i płukane trzykrotnie w PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} . W przypadku , gdy analiza immunocytochemiczna dotyczyła antygenów wewnątrzjądrowych preparaty poddano procesowi permabilizacji błon 1 % Tritonem X-100 w PBS przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty były inkubowane 60 minut z mieszaniną blokującą, w skład której wchodziła 5 % albumina w PBS. Po upływie 60 minut mieszaninę blokującą usuwano i nakładano przeciwciało I rzędowe, rozcieńczone w mieszaninie blokującej. Kontrolę stanowiły preparaty znakowane z pominięciem inkubacji z pierwszorzędownym przeciwciałem. Listę użytych przeciwciał przedstawia tabela 7.

Tabela 7. Lista stosowanych przeciwciał

Antygen	Monoklonalne/ Poliklonalne	Pochodzenie	Podklasa	Rozcieńczenie	Numer katalogowy
p63	M	Mysz	IgG1	1:50	sc-8431 (*)
CD29 (β integryna)	M	Mysz	IgG1	1:50	sc-9970 (*)
Ki67	M	Mysz	IgG1	1:50	M 7240 (**)
PCNA	M	Mysz	IgG1	1:50	sc-25280 (*)
Cytokeratyna 1	M	Mysz	IgG1	1:50	sc-65999 (*)
Cytokeratyna 6	M	Mysz	IgG1	1:50	sc-58735 (*)
Cytokeratyna 10	M	Mysz	IgG1	1:50	M 7002 (**)
Cytokeratyna 14	M	Mysz	IgG2a	1:50	sc-53253 (*)
Cytokeratyna 16	M	Mysz	IgG1	1:50	sc-53255 (*)
Cytokeratyna 17	M	Mysz	IgG1	1:40	M 7046 (**)
Filagryna	M	Mysz	IgG1	1:50	sc-66192 (*)
Inwolukryna	M	Mysz	IgG1	1:50	sc-21748 (*)

* Santa Cruz Biotechnology

** DakoCytomation

Inkubację z przeciwciałami prowadzono przez całą noc w wilgotnej komorze, w temperaturze 4°C. Po inkubacji preparaty płukano trzy razy po 5 minut w PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} . Następnie na 30 minut nakładano drugorzędowe przeciwciało związane z fluorochromem Alexa Fluor 633 (królicze anty-mysie IgG, Invitrogen, Oregon, USA) w rozcieńczeniu 1:500 i umieszczano w ciemni.

Metody

Jądra komórek barwiono 5 μ M roztworem barwnika Hoechst 33258 w PBS przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie preparaty płukano 3 razy po 5 minut w PBS i zaklejano z użyciem medium do utrwalania komórek wyznakowanych fluorescencyjnie (Dako Cytomation Fluorescent Mounting Medium, DakoCytomation, Glostrup, Dania). Do analizy wykorzystywany był mikroskop konfokalny Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss) wyposażony w lasery: helowo-neonowy oraz laser argonowy. Zdjęcia zostały wykonane w programie Zeiss LSM 510 v. 3,2.

5.5 Neutralizacja wybranych cytokin i czynników wzrostu w hodowli keratynocytów

IL-1 β , IL-6, TNF α , KGF oraz TGF- β były neutralizowane w PT/L (1) za pomocą przeciwciał neutralizujących (R&D Systems Europe, Anglia). Przeciwciała monoklonalne przeciwko ludzkim: IL-1 β , IL-6, TNF- α , FGF-7/KGF oraz TGF- β dodano do PT/L (1) w stężeniu 1 μ g/ml, na okres 1 godziny, w temperaturze 37°C przed dodaniem KC (1). Stężenie przeciwciała neutralizującego zostało obliczone wg krzywej dawki połowicznej neutralizacji (Neutralization Dose 50), przy której następuje 50% zahamowanie aktywności danej cytokiny. Proces neutralizacji cytokin w PT / L (1) był potwierdzony za pomocą testu ELISA, w którym nie wykryto badanych cytokin/czynników wzrostu po ich zneutralizowaniu. W limfie po neutralizacji IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β prowadzono 14 dniowe hodowle KC. Po 1, 7 i 14 dniu hodowli określano całkowitą liczbę komórek oraz wykonywano preparaty cytospinowe. Morfologię komórek określano w preparatach barwionych metodą May-Grunwald Giemsa i liczono KC wg ustalonego kryterium (% komórek dzielących się, z warstwy podstawnej 1, 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4). Listę użytych przeciwciał do neutralizacji wybranych cytokin i czynników wzrostu przedstawia tabela 8.

Tabela 8. Lista stosowanych przeciwciał neutralizujących

Przeciwciało przeciw antygenowi	Monoklonalne/ Poliklonalne	Pochodzenie	Podklasa	Numer katalogowy
Anty IL-1 β	M	Mysz	IgG1	MAB201 (*)
Anty IL-6	M	Mysz	IgG1	MAB206 (*)
Anty TNF- α	M	Mysz	IgG1	MAB210 (*)
Anty KGF	M	Mysz	IgG	MAB251 (*)
Anty TGF- β	M	Mysz	IgG1	MAB1835 (*)

*R&D Systems

5.6 Blokowanie receptorów dla wybranych cytokin i czynników wzrostu na keratynocytach

Receptory dla IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β poddano blokowaniu za pomocą mysich przeciwciał mono i poliklonalnych: anty IL-1 β R, anty IL-6R, anty TNFR, anty KGFR i anty TGF- β R (R&D Systems Europe, Anglia). Stężenie przeciwciała obliczono według krzywej dawki połowicznej neutralizacji (Neutralization Dose 50), przy której następuje 50% zablokowanie aktywności danego receptora. Inkubacja z przeciwciałem, którego stężenie wynosiło 2x ND 50 trwała 1 godzinę w temperaturze 37°C. Następnie prowadzono hodowle KC w PT/L. Po 1, 7 i 14 dniu hodowli określano całkowitą liczbę komórek oraz wykonywano preparaty cytospinowe. Morfologię komórek określano w preparatach barwionych metodą May-Grunwald Giemsa, a komórki liczono wg ustalonego kryterium. Listę przeciwciał użytych do blokowania receptorów na KC przedstawia tabela 9.

Tabela 9. Lista stosowanych przeciwciał blokujących receptory

Przeciwciało blokujące receptor	Monoklonalne/ Poliklonalne	Pochodzenie	Podklasa	Numer katalogowy
Anty IL-1 β R	P	Koza	IgG	AF269 (*)
Anty IL-6R	M	Mysz	IgG1	MAB227 (*)
Anty TNFR	M	Mysz	IgG1	MAB225 (*)
Anty KGFR	M	Mysz	IgG1	MAB665 (*)
Anty TGF- β R	P	Koza	IgG	AF-241-NA (*)

*R&D Systems

5.7 Analiza statystyczna

W celu ustalenia odsetka komórek o określonej morfologii/fenotypie zliczano w 5 doświadczeniach co najmniej po 100 komórek o danym kształcie/pozytywnych pod względem danego antygenu. W przypadku analizy immunocytochemicznej uzyskany wynik był odnoszony względem wszystkich żywych komórek, których jądra zostały wybarwione barwnikiem Hoechst. Dane zostały przedstawione w postaci średniej i odchylenia standardowego. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy pomocy testów nieparametrycznych - Wilcoxon (w przypadku porównywania pomiarów pochodzących od jednego chorego) oraz Manna-Whitneya (dla pomiarów niepowiązanych). Istotność statystyczną otrzymanych wyników przyjęto dla $p \leq 0,05$. Obliczenia wykonane zostały przy pomocy programu R 2.9.2 (R Development Core Team (2009): A language and

Metody

environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

6 WYNIKI

6.1 Liczba keratynocytów (I) po 1, 7 i 14 dniu hodowli w płynie tkankowym/limfie (I), (n) oraz medium RPMI

Tabela 10. Liczba KC (I) po 1, 7 i 14 dniu hodowli w PT/L (I), (n), RPMI; (liczba KC $\times 10^6 \pm SD$, n=5)

DZIEŃ \ MEDIUM	0	1		7		14
PT/L (I)	0,50x10 ⁶	0,71 x 10 ⁶ ± 0,18	*	0,86 x 10 ⁶ ± 0,27	NS	0,99 x 10 ⁶ ± 0,26
PT/L (n)	0,50x10 ⁶	0,65 x 10 ⁶ ± 0,08	*	0,8 x 10 ⁶ ± 0,22	NS	1,10 x 10 ⁶ ± 0,56
RPMI	0,50x10 ⁶	0,57 x 10 ⁶ ± 0,14	NS	0,55 x 10 ⁶ ± 0,05	NS	0,68 x 10 ⁶ ± 0,13

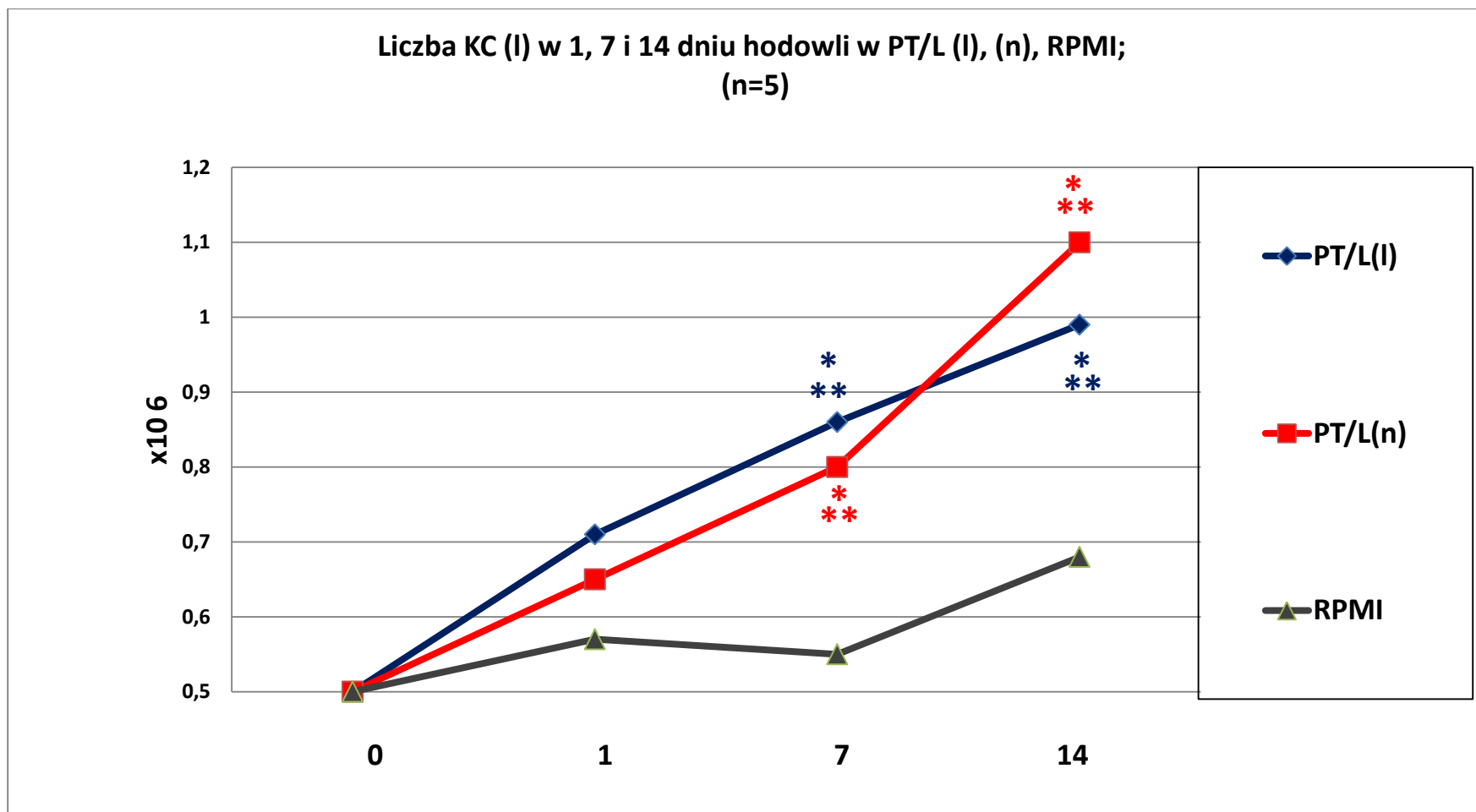
*1 dzień vs 7 dzień vs 14 dzień hodowli, p≤0,05

** PT/L (I) vs oraz PT/L (n) vs RPMI, p≤0,05

NS- brak istotności statystycznej

(I) limfedema, (n) normalny

Przyrost liczby KC (I) po hodowli (7d) w PT/L (I) był istotnie statystycznie wyższy w stosunku do dnia 1 ($0,86 \times 10^6$ vs $0,71 \times 10^6$) oraz dnia 14 ($0,99 \times 10^6$ vs $0,71 \times 10^6$ vs). Liczba KC (I) po hodowli w PT/L (n) różniła się istotnie statystycznie pomiędzy dniem 1 a 7 ($0,65 \times 10^6$ vs $0,8 \times 10^6$). Przyrost liczby KC (I) po hodowli w PT/L (I) i (n) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do hodowli w medium RPMI w dniu 7 i 14. Różnica w ilości KC (I) hodowanych (7d) w PT/L (I) w porównaniu do medium RPMI wynosiła $0,86 \times 10^6$ vs $0,55 \times 10^6$; w przypadku hodowli do dnia 14 różnica w ilości komórek wynosiła $0,99 \times 10^6$ vs $0,68 \times 10^6$. W przypadku KC (I) hodowanych w PT/L (n) także obserwowano wzrost liczby komórek w porównaniu do medium RPMI. W dniu 7 różnica w ilości KC wynosiła $0,8 \times 10^6$ vs $0,55 \times 10^6$, natomiast w dniu 14 $1,10 \times 10^6$ vs $0,68 \times 10^6$.



Rycina 3. Liczba KC (I) po 1, 7 i 14 dniu hodowli w PT/L (I), (n), RPMI; (n=5)

*1 dzień vs 7 dzień vs 14 dzień hodowli, $p \leq 0,05$

**PT/L (I), (n) vs RPMI, $p \leq 0,05$

6.2 Procentowy przyrost keratynocytów (I) w płynie tkankowym/limfie (I), (n) oraz medium RPMI w 1, 7 i 14 dniu hodowli

Tabela 11. Procentowy przyrost KC (I) w PT/L (I), (n), RPMI w 1, 7 i 14 dniu w hodowli (% ± SD, n=5)

DZIEŃ MEDIUM	1		7		14
	PT/L (I)	142% ± 25,3	*	** 172% ± 31,4	NS
PT/L (n)	130% ± 12,3	*	** 160% ± 27,5	NS	** 220% ± 50,1
RPMI	114% ± 24,6	NS	110% ± 9,1	NS	136% ± 20,1

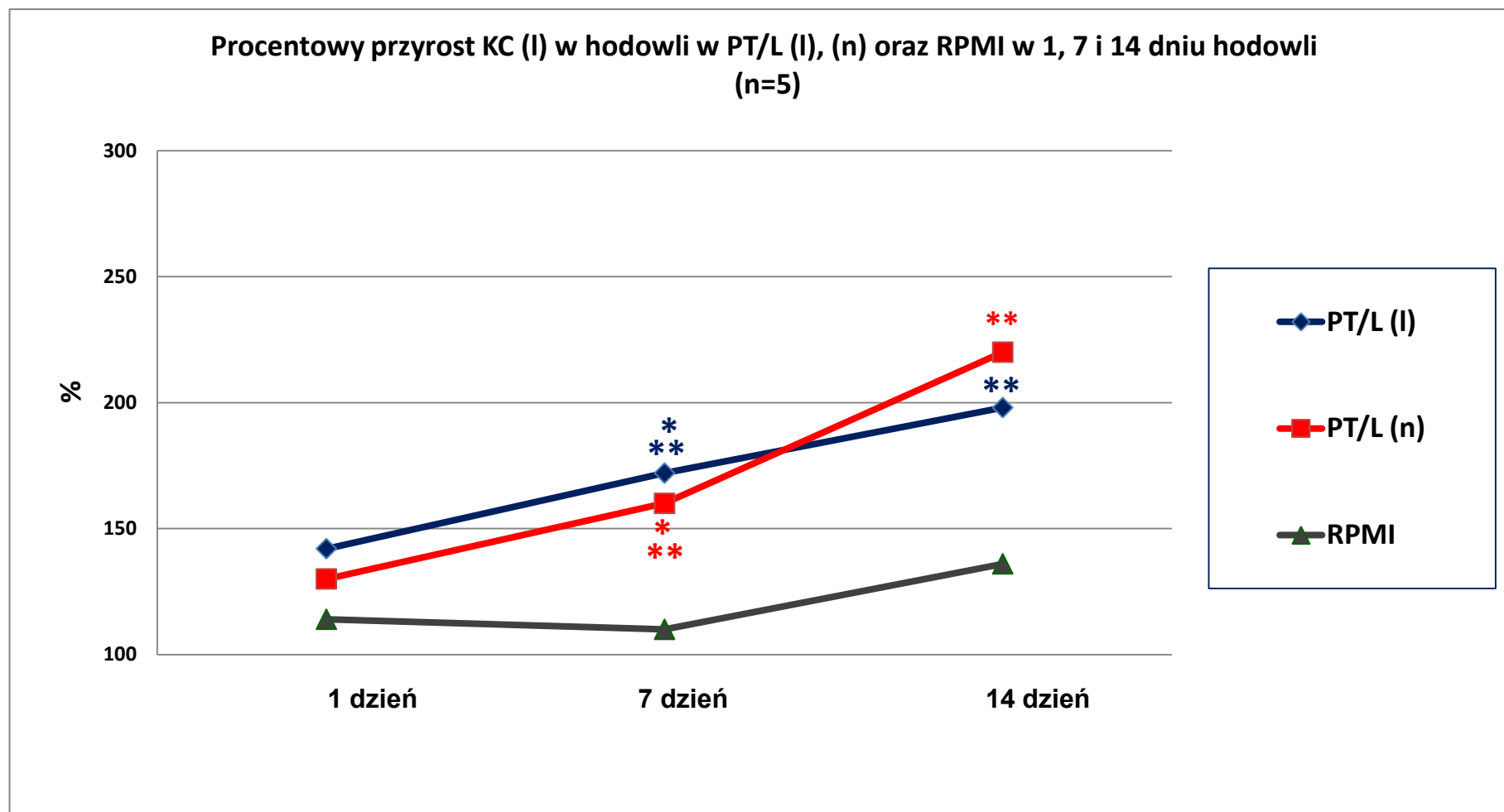
*1dzień vs 7 dzień vs 14 dzień hodowli, p≤0,05

** PT/L (I), (n) vs RPMI, p≤0,05

NS - brak istotności statystycznej

(I) limfedema, (n) normalny

Procentowy przyrost KC (I) po hodowli (7d) w PT/L (I) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do dnia 1 (172 % vs 142 %) oraz dnia 14 (198 % vs 142 %). Procent KC (I) po hodowli w PT/L (n) różnił się istotnie statystycznie pomiędzy dniem 1 a 7 (130 % vs 160 %). Procent KC (I) po hodowli w PT/L (I) i (n) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do hodowli w medium RPMI w dniu 7 i 14. Różnica w odsetku wynosiła 172 % vs 110 % dla KC (I) hodowanych (7d) w PT/L (I) w porównaniu do medium RPMI; natomiast w przypadku dnia 14 198 % vs 136 %. W przypadku KC (I) hodowanych w PT/L (n) różnica w procencie komórek w porównaniu do medium RPMI w dniu 7 wynosiła (160 % vs 110 %) natomiast w dniu 14 (220 % vs 136 %).




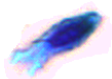

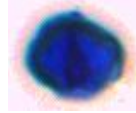
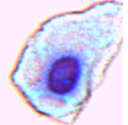
Rycina 4. Procentowy przyrost KC (I) w PT/L (I), (n), RPMI w 1, 7 i 14 dniu w hodowli (n=5)

*1 dzień vs 7 dzień vs 14 dzień hodowli, $p \leq 0,05$

**PT/L (I), (n) vs RPMI, $p \leq 0,05$

6.3 Ilościowa charakterystyka keratynocytów (l) i (n) poszczególnych warstw naskórka po izolacji oraz po 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (l), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI

Tabela 12. Ilościowa charakterystyka KC poszczególnych warstw naskórka po hodowli (7d) w PT/L (l), (n), 20%S i RPMI; (% ± SD, n=5)

KC	MEDIUM	KC	KC z warstwy:			
		dzielące się 	podstawnej 1 	podstawnej 2 	kolczystej 3 	ziarnistej 4 
KC (l)	po izolacji	4,2 ± 0,8	32,0 ± 2,2	34,4 ± 3,5	17,8 ± 1,2	11,6 ± 2,0
KC (n)	po izolacji	2,9 ± 1,0	34,0 ± 5,0	35,0 ± 7,0	16,0 ± 2,2	11,5 ± 3,0
KC (l)	PT/L (l)	* 9,2 ± 1,5	* 42,2 ± 2,9	20,8 ± 2,2	* 14,0 ± 1,2	13,8 ± 1,5
KC (n)	PT/L (l)	* 11,2 ± 1,5	* 33,0 ± 3,2	21,8 ± 3,9	* 29,2 ± 1,8	4,8 ± 2,9
KC (l)	PT/L (n)	* 8,8 ± 1,7	* 57,8 ± 5,9	20,4 ± 4,2	* 7,4 ± 2,3	5,6 ± 2,1
KC (l)	20%S	* 3,3 ± 0,3	* 46,3 ± 6,2	25,1 ± 5,7	* 18,4 ± 1,8	7,0 ± 3,1
KC (l)	RPMI	6,8 ± 2,3	27,0 ± 4,1	26,4 ± 4,9	33,4 ± 5,5	6,4 ± 3,0

*PT/L (l), (n), 20%S vs RPMI, p≤0,05

(l) limfedema, (n) normalny

Po izolacji odsetek dzielących się KC (l) w stosunku do KC (n) był wyższy (4,2 % vs 2,9 %). Procent KC (l) i (n) z warstwy podstawnej 1 wynosił (32,0 % vs 34,0 %), warstwy podstawnej 2 (34,4 % vs 35,0 %), warstwy kolczystej 3 (17,8 % vs 16,0 %), ziarnistej 4 (11,6 % vs 11,5 %). Nie stwierdzono różnic statystycznych pomiędzy KC (l) i (n).

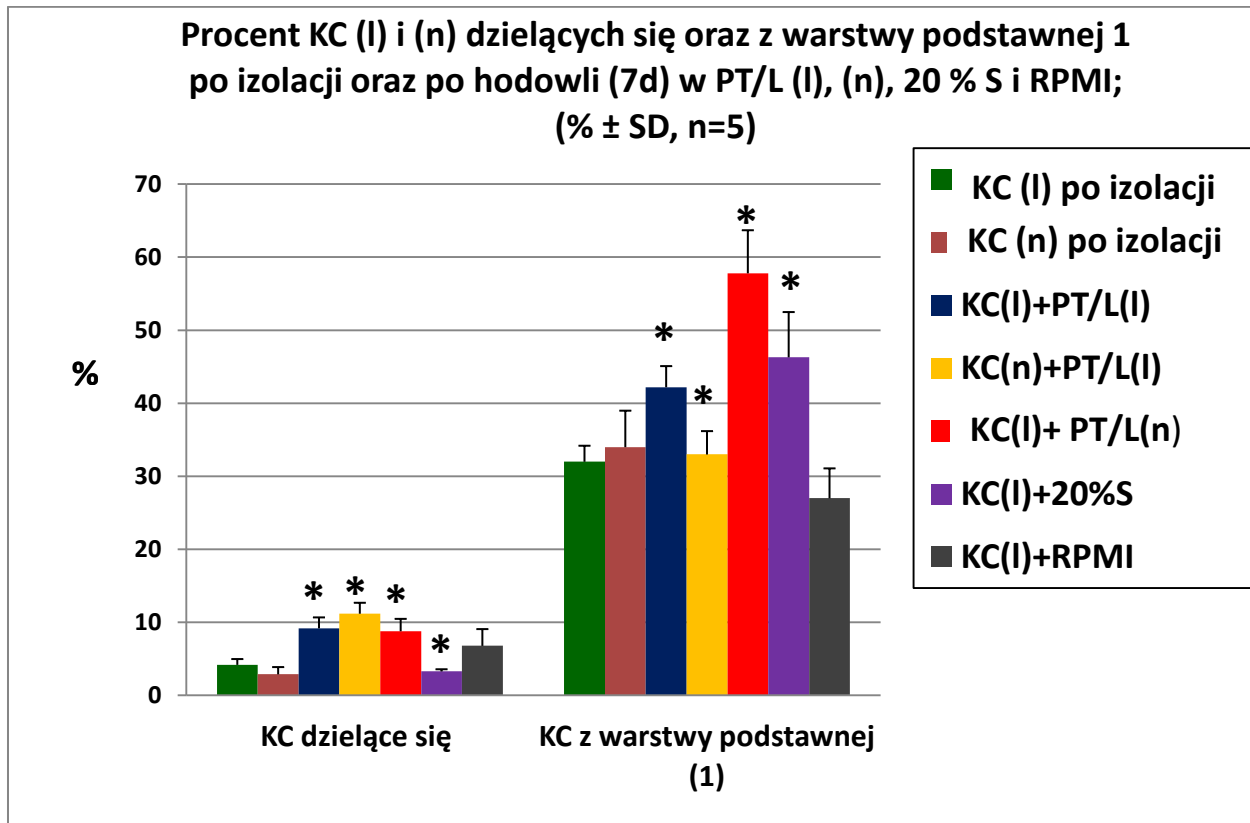
Odsetek dzielących się KC (l) po hodowli w PT/L (l) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do KC (l) po hodowli w medium RPMI (9,2 % vs 6,8 %). Procent KC (l) z warstwy podstawnej 1 wynosił 42,2 % i był istotnie statystycznie wyższy od procenta KC (l) hodowanych (7d) w medium RPMI, który wynosił 27,0 %. W przypadku KC (l)

z warstwy podstawnej 2 hodowanych w PT/L (l) różnica w stosunku do KC (l) po hodowli w RPMI wynosiła 20,8 % vs 26,4 %. Odsetek KC (l) z warstwy kolczystej 3 po hodowli w PT/L (l) był istotnie statystycznie niższy od KC po hodowli w RPMI i wynosił 14,0 % vs 33,4 %. W przypadku KC (l) z warstwy ziarnistej 4 hodowanych w PT/L (l) vs RPMI odsetek ten wynosił 13,8 % vs 6,4 %.

Odsetek KC (n) dzielących się po hodowli w PT/L (l) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do KC (l) po hodowli w medium RPMI (11,2 % vs 6,8 %). Procent KC (n) z warstwy podstawnej 1 wynosił 33,0 % i był istotnie statystycznie wyższy od procenta KC (l) hodowanych (7d) w medium RPMI, który wynosił 27,0 %. W przypadku KC (n) z warstwy podstawnej 2 hodowanych w PT/L (l) różnica w stosunku do KC (l) po hodowli w RPMI wynosiła 21,8 % vs 26,4 %. Różnica w odsetku KC (n) z warstwy kolczystej 3 po hodowli w PT/L (l) do KC (l) hodowanych w RPMI wynosiła 29,2 % vs 33,4 %. W przypadku KC (n) z warstwy ziarnistej (4) hodowanych w PT/L (l) vs RPMI odsetek ten wynosił 4,8 % vs 6,4 %.

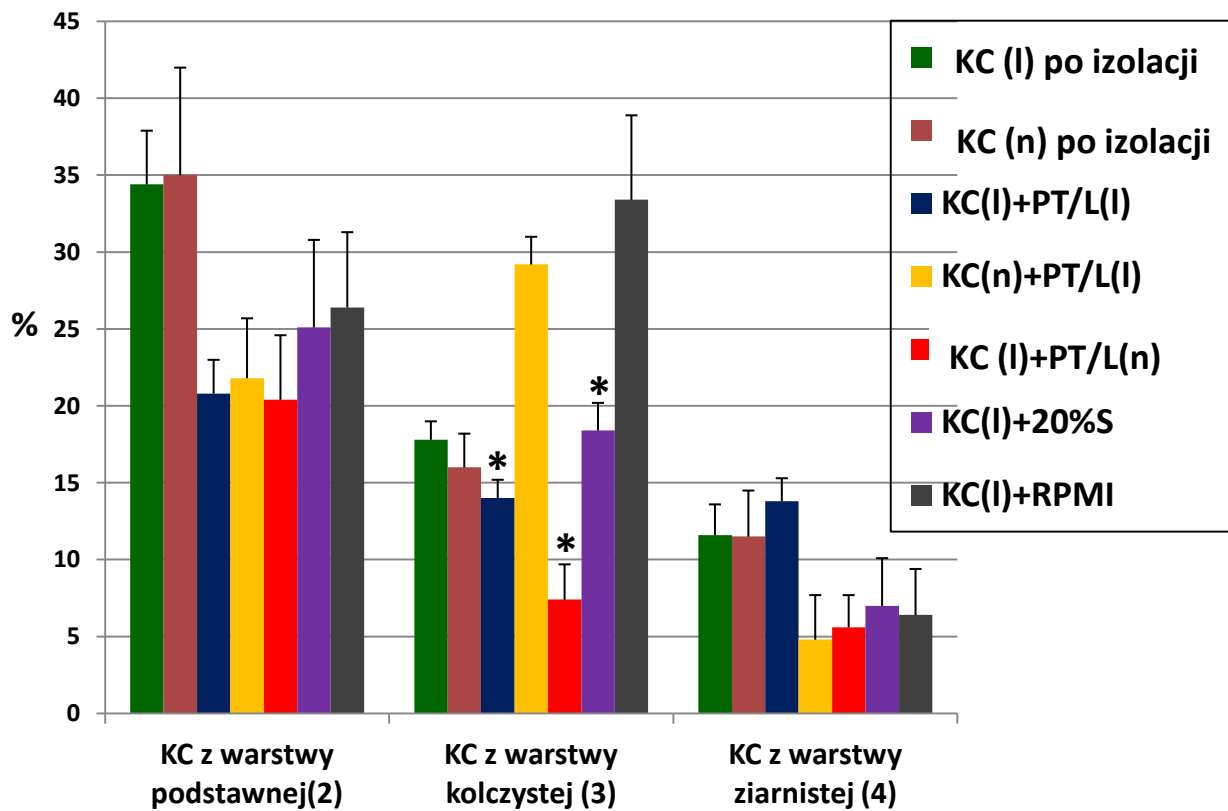
Odsetek KC (l) dzielących się po hodowli w PT/L (n) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do hodowli w medium RPMI (8,8 % vs 6,8 %). Procent KC (l) z warstwy podstawnej 1 wynosił 57,8 % i był istotnie statystycznie wyższy od procenta KC (l) hodowanych (7d) w medium RPMI, który wynosił 27,0 %. W przypadku KC (l) z warstwy podstawnej 2 hodowanych w PT/L (n) różnica w stosunku do KC (l) po hodowli w RPMI wynosiła 20,4 % vs 26,4 %. Odsetek KC (l) z warstwy kolczystej 3 po hodowli w PT/L (n) był istotnie statystycznie niższy od KC (l) po hodowli w RPMI i wynosił 7,4 % vs 33,4 %. W przypadku KC (l) z warstwy ziarnistej (4) hodowanych w PT/L (n) vs RPMI odsetek ten wynosił 5,6 % vs 6,4%.

Odsetek KC (l) dzielących się po hodowli w 20% S był istotnie statystycznie niższy w porównaniu do KC (l) po hodowli w medium RPMI (3,3 % vs 6,8 %). Procent KC (l) z warstwy podstawnej 1 hodowanych w 20% S wynosił 46,3 % i był istotnie statystycznie wyższy od procenta KC (l) hodowanych (7d) w medium RPMI, który wynosił 27,0 %. W przypadku KC (l) z warstwy podstawnej 2 hodowanych w 20 % S różnica w stosunku do KC (l) po hodowli w RPMI wynosiła 25,1 % vs 26,4 %. Odsetek KC (l) z warstwy kolczystej 3 po hodowli w 20 % S był istotnie statystycznie niższy od KC (l) po hodowli w RPMI i wynosił 18,4 % vs 33,4 %. W przypadku KC (l) z warstwy ziarnistej 4 hodowanych w 20% S vs RPMI odsetek ten wynosił 7,0 % vs 6,4%.



Rycina 5. Ilościowa charakterystyka KC (I), (n) dzielących się oraz z warstwy podstawnej 1 po izolacji oraz po hodowli (7d) w PT/L (I), (n), 20 % S i RPMI; (% ± SD, n=5)
 *PT/L (I), (n), 20 % S vs RPMI, $p \leq 0,05$

Procent KC (I), (n) z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4 po izolacji oraz po hodowli w PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI; (% ± SD, n=5)



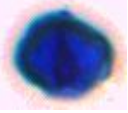
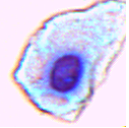


Rycina 6. Ilościowa charakterystyka KC (I), (n) z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4 po izolacji oraz hodowli (7d) w PT/L (I), (n), 20 % S i RPMI; (% ± SD, n=5)

*PT/L (I), (n), 20 %S vs RPMI, $p \leq 0,05$

6.4 Różnicowanie keratynocytów z poszczególnych warstw naskórka po 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (I), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI wyrażane w stosunku do warstwy podstawnej 1

Tabela 13. Różnicowanie KC z poszczególnych warstw naskórka po hodowli (7d) w PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI wyrażane w stosunku do warstwy podstawnej 1; (% ± SD, n=5)

KC	MEDIUM	KC z warstwy:			
		podstawnej 1 	podstawnej 2 	kolczystej 3 	ziarnistej 4 
KC (I)	PT/L (I)	100	* 49,3±4,5 **	* 33,2±2,8 **	* 32,7±3,5
KC (n)	PT/L (I)	100	* 66,1±11,8 **	* 88,5±5,4 **	14,5±8,7
KC (I)	PT/L (n)	100	* 35,3±7,2 **	* 12,8±3,9 **	9,7±3,6
KC (I)	20%S	100	* 54,2±12,3 **	* 39,7±3,8 **	15,1±6,6
KC (I)	RPMI	100	97,8±18,1	123,7±20,3	23,7±11,1

*PT/L (I), (n), 20 % S vs RPMI, p≤0,05

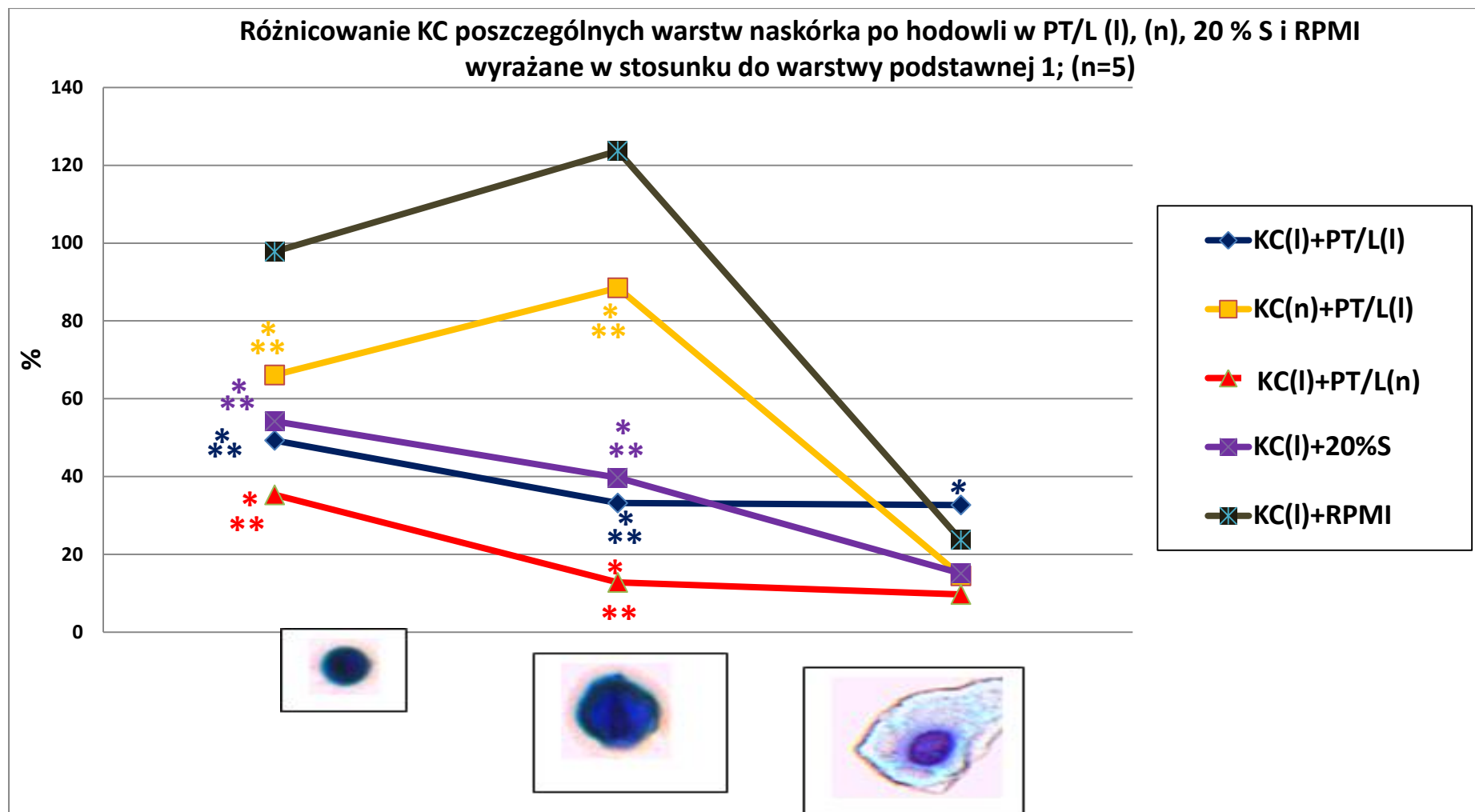
**KC (I), (n) z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3, ziarnistej 4 vs KC (I), (n) z warstwy podstawnej 1, p≤0,05

(I) limfedema, (n) normalny

Po hodowli KC (I), (n) w PT/L (I), (n) oraz 20 % S stwierdzono istotny statystycznie spadek procenta zróżnicowanych KC z warstwy podstawnej 2 oraz z warstwy kolczystej 3 w stosunku do zróżnicowanych KC (I) po hodowli w medium RPMI. Odsetek zróżnicowanych KC (I) po hodowli w PT/L (I) był istotnie statystycznie niższy w porównaniu do procenta zróżnicowanych KC (I) po hodowli w medium RPMI. W hodowli KC (I) w PT/L (I) stwierdzono istotny statystycznie spadek procenta zróżnicowanych KC z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4 w stosunku do KC z warstwy podstawnej 1. W przypadku KC (n) i (I) hodowanych w PT/L (I), (n) i 20 % S stwierdzono istotnie

Wyniki

statystycznie niższy procent komórek zróżnicowanych w porównaniu do KC z warstwy podstawnej 1. W hodowli KC (I) w medium RPMI stwierdzono 97,8 % KC (I) zróżnicowanych z warstwy podstawnej 2 oraz 123,7 % zróżnicowanych KC (I) z warstwy kolczystej 3 w stosunku do KC z warstwy podstawnej 1.



Rycina 7. Różnicowanie KC z poszczególnych warstw naskórka po hodowli (7d) w PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI wyrażane w stosunku do warstwy podstawnej 1; (n=5)

*PT/L (I), (n), 20 % S vs RPMI, $p \leq 0,05$

**KC (I), (n) z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3, ziarnistej 4 vs KC (I), (n) z warstwy podstawnej 1, $p \leq 0,05$

6.5 Ekspresja markerów tzw. komórek macierzystych keratynocytów (I) po izolacji oraz po 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (I), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI

Tabela 14. Ekspresja markerów tzw. komórek macierzystych KC (I) hodowanych (7d) w PT/L (I), (n), 20 % S i RPMI (% ± SD, n=5)

	KC (I) po izolacji	Hodowla KC(I) w:			
		PT/L (I)	PT/L (n)	20 % S	RPMI
p63	1,7 ± 1,5	* 48,0 ± 6,0 **	* 54,3 ± 10,5 **	* 29,0 ± 5,2 **	8,0 ± 1,0
CD29	36,0 ± 3,0	* 52,7 ± 7,1 **	* 51,3 ± 17,0 **	* 41,7 ± 3,2	31,6 ± 11,8

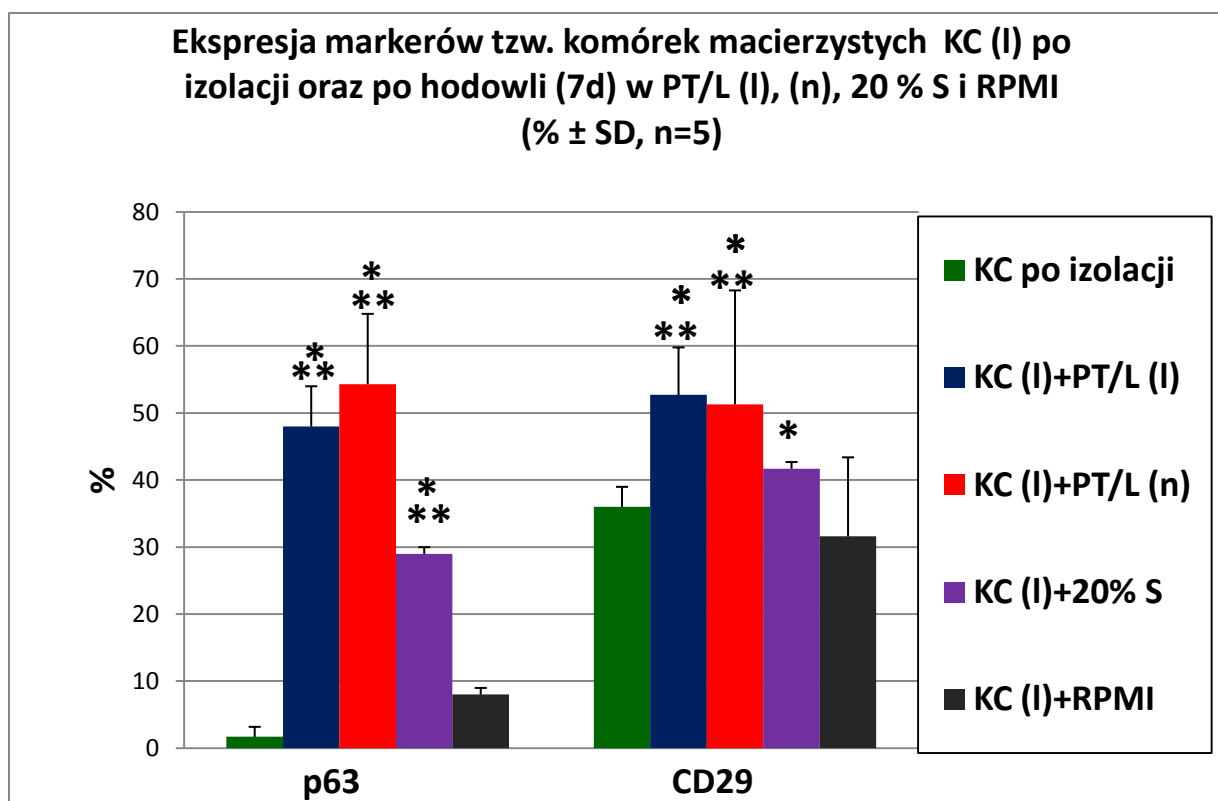
*PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI vs KC po izolacji, p≤0,05

**PT/L (I), (n), 20 % S vs RPMI, p≤0,05

(I) limfedema, (n) normalny

Odsetek KC (I) wyrażających białko jądrowe p63 po 7 dniowej hodowli w PT/L (I) był istotnie statystycznie wyższy od odsetka po hodowli w medium RPMI (48,0 % vs 8,0 %) oraz w stosunku do KC po izolacji (48,0 % vs 1,7 %). W przypadku KC (I) hodowanych w PT/L (n) procent pozytywnych komórek był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do KC po hodowli w RPMI (54,3 % vs 8,0 %) oraz po izolacji (54,3 % vs 1,7 %). Odsetek KC (I) po hodowli w 20% S był istotnie statystycznie wyższy w stosunku do hodowli w medium RPMI (29,0 % vs 8,0 %) oraz po izolacji (29,0 % vs 1,7 %).

Odsetek KC (I) wyrażających CD29 po hodowli w PT/L (I) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do hodowli w standardowym medium (52,7 % vs 31,6 %), a także w stosunku do KC (I) po izolacji (52,7 % vs 36,0 %). Procent CD 29 pozytywnych KC (I) po hodowli w PT/L (n) był także istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do hodowli w medium RPMI (51,3 % vs 31,6 %) oraz w stosunku do KC (I) po izolacji (51,3 % vs 36,0 %). Po hodowli KC (I) w 20% S odsetek komórek CD 29 pozytywnych był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do KC (I) po izolacji.

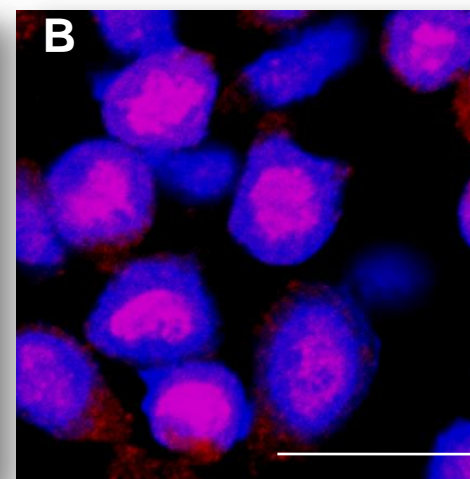
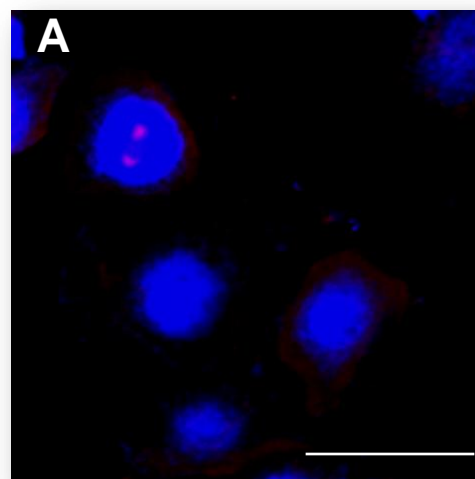


Rycina 8. Ekspresja markerów tzw. komórek macierzystych KC (I) po izolacji oraz po hodowli (7d) w PT/L (I), (n), 20 % S i RPMI (% ± SD, n=5)

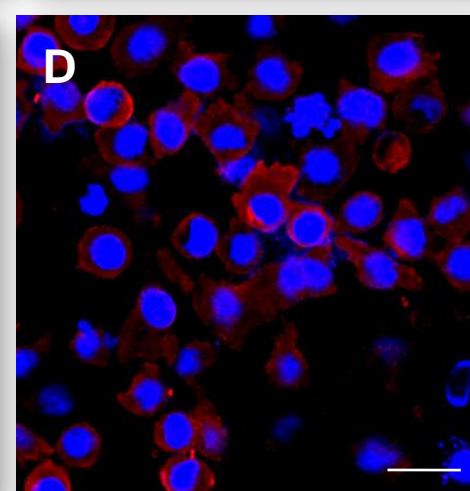
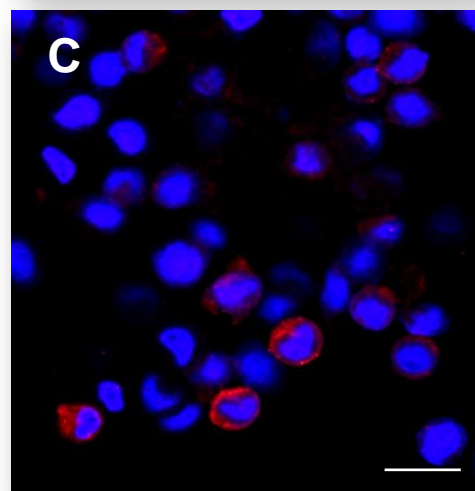
*PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI vs KC po izolacji, $p \leq 0,05$

**PT/L (I), (n), 20 % S vs RPMI, $p \leq 0,05$

EKSPRESJA
p63
PRZEZ KC (I) PO
HODOWLI W:
A. RPMI
B. PT/L (I)



EKSPRESJA
CD 29
PRZEZ KC PO
HODOWLI W:
C. RPMI
D. PT/L (I)



Rycina 9. Ekspresja antygenów **p63** i **CD29** przez KC (I) po hodowli 7dniowej hodowli w PT/L (I) i RPMI. Na niebiesko zostały wybarwione jądra komórkowe (**Hoechst**). Skala=20 μ m.

6.6 Ekspresja markerów proliferacji keratynocytów (I) po izolacji oraz po 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (I), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI

Tabela 15 Ekspresja markerów proliferacji KC (I) po izolacji oraz po hodowli (7d) w PT/L (I), (n), 20 % S i RPMI (% ± SD, n=5)

	KC (I) po izolacji	Hodowla KC (I) w:			
		PT/L (I)	PT/L (n)	20 % S	RPMI
PCNA	30,3 ± 4,0	* 62,7 ± 8,3 **	* 50,3 ± 7,7 **	42,0 ± 27,1	38,3 ± 5,1
Ki67	18,7 ± 3,6	* 57,0 ± 6,6 **	* 50,0 ± 3,5 **	17,3 ± 2,5	23,7 ± 4,9

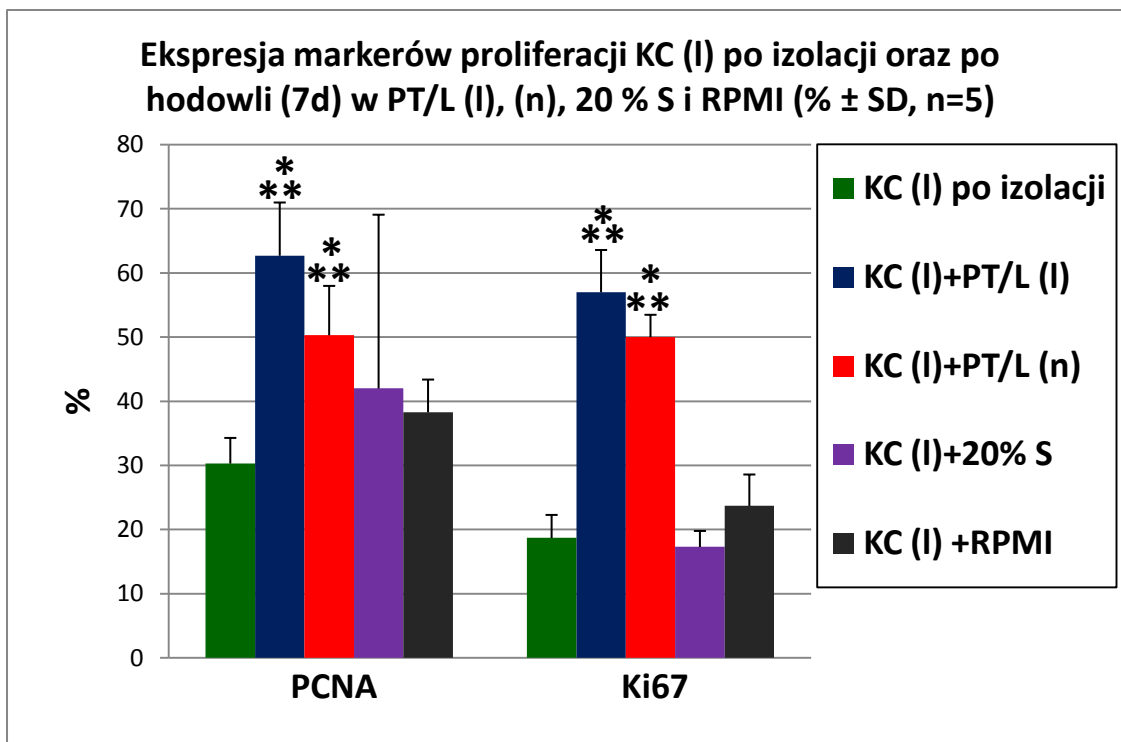
*PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI vs KC po izolacji, p≤0,05

**PT/L (I), (n), 20 % S vs RPMI, p≤0,05

(I) limfedema, (n) normalny

Odsetek KC (I) wyrażających marker jądrowy PCNA po hodowli (7d) w PT/L (I) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do KC (I) po izolacji (62,7 % vs 30,3 %) oraz po hodowli w medium RPMI (62,7 % vs 38,3 %). W przypadku KC (I) hodowanych (7d) w PT/L (n) procent PCNA pozytywnych komórek był także istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do KC (I) po izolacji (50,3 % vs 30,3 %) oraz po hodowli w medium RPMI (50,3 % vs 38,3 %). Odsetek KC (I) wyrażających PCNA po hodowli (7d) w 20 % S był wyższy zarówno w stosunku do KC (I) po izolacji (42,0 % vs 30,3 %), jak i do hodowli w medium RPMI (42,0 % vs 38,3 %), ale nie było to istotne statystycznie.

Odsetek KC (I) wyrażających Ki67 po hodowli (7d) w PT/L (I) był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do KC (I) po izolacji (57,0 % vs 18,7 %) oraz po hodowli w medium RPMI (57,0 % vs 23,7 %). W przypadku KC (I) hodowanych (7d) w PT/L (n) procent Ki67 pozytywnych komórek był także istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do KC (I) po izolacji (50,0 % vs 18,7 %) oraz po hodowli w medium RPMI (50,0 % vs 23,7 %). Odsetek KC (I) wyrażających Ki67 po hodowli (7d) w 20 % S był nieznacznie niższy zarówno w stosunku do KC (I) po izolacji (17,3 % vs 18,7 %) oraz po hodowli w RPMI (17,3 % vs 23,7 %).

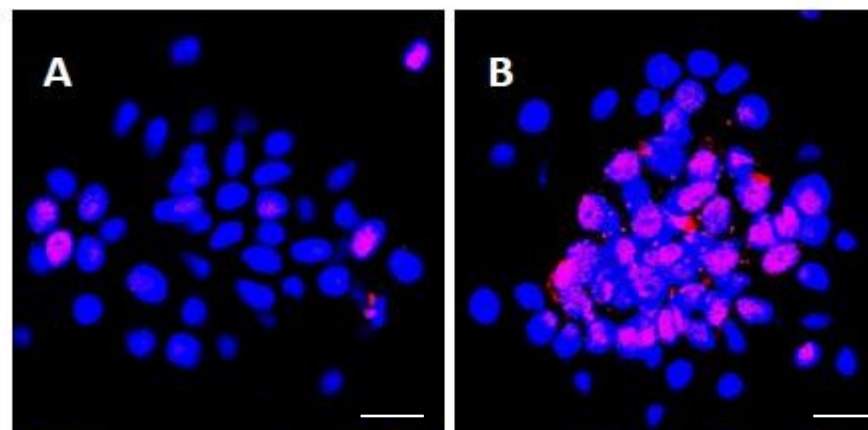


Rycina 10. Ekspresja markerów proliferacji KC (I) hodowanych (7d) w PT/L (I), (n), 20 % S i RPMI (% ± SD, n=5)

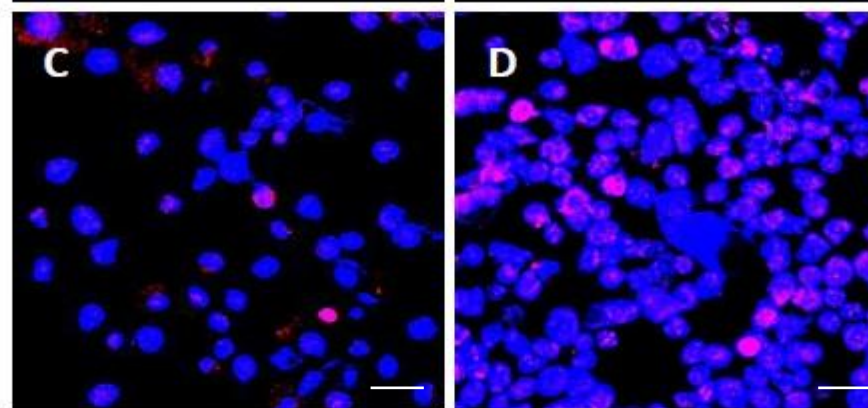
*PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI vs KC po izolacji, $p \leq 0,05$

**PT/L (I), (n), 20 % S vs RPMI, $p \leq 0,05$

EKSPRESJA
Ki67
PRZEZ KC (I) PO
HODOWLI W:
A. RPMI
B. PT/L (I)






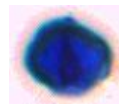
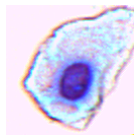
EKSPRESJA
PCNA
PRZEZ KC (I) PO
HODOWLI W:
C. RPMI
D. PT/L (I)



Rycina 11. Ekspresja antygenów **Ki67** oraz **PCNA** przez KC (I) po 7 dniowej hodowli w PT/L(I) i RPMI. Na niebiesko zostały wybarwione jądra komórkowe (**Hoechst**).Skala 20 μ m.

6.7 Ilościowa charakterystyka keratynocytów poszczególnych warstw naskórka po hodowli (7d) w płynie tkankowym/limfie (I) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β

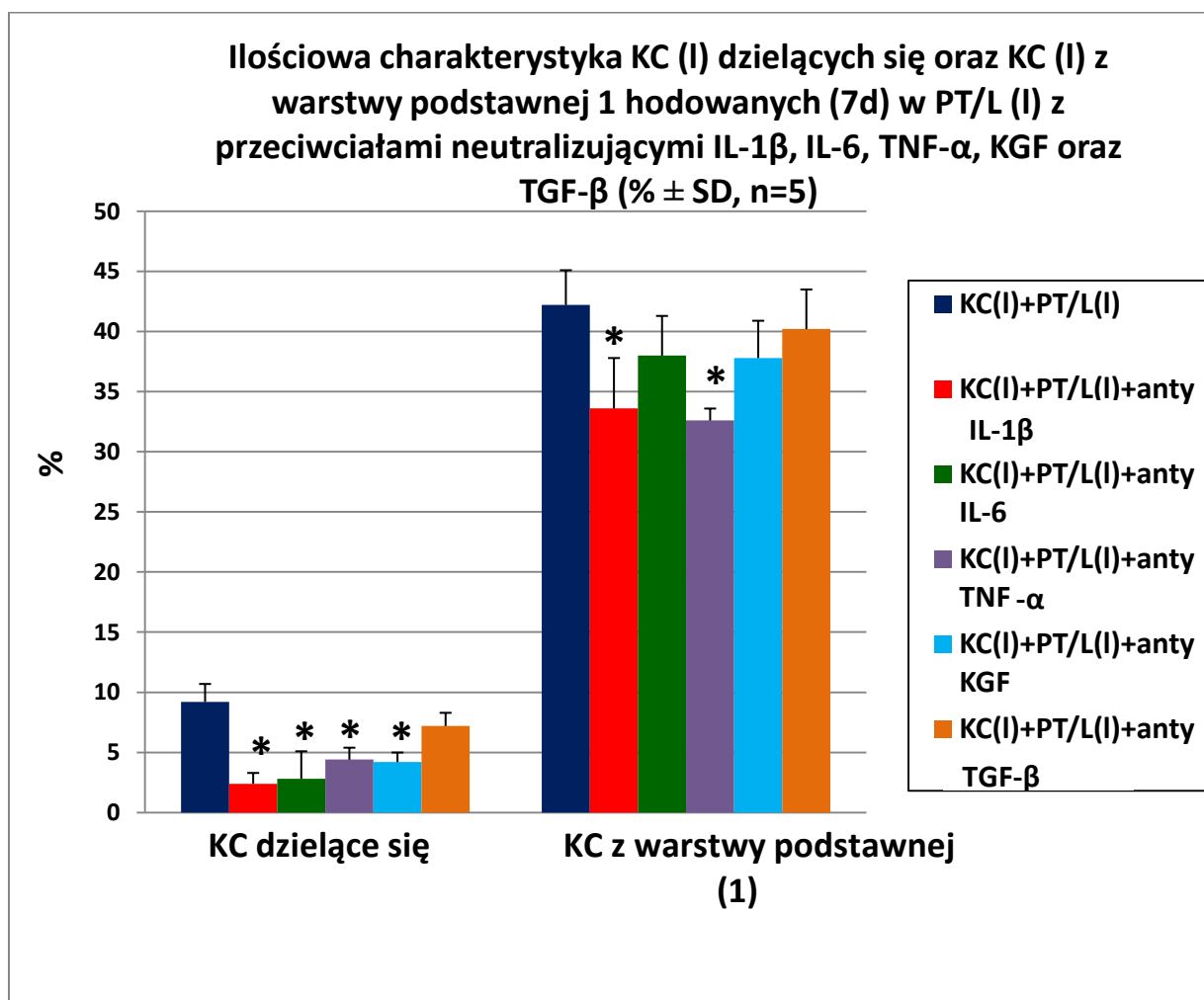
Tabela 16. Ilościowa charakterystyka KC poszczególnych warstw naskórka po hodowli (7d) w PT/L (I) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β (% \pm SD, n=5)

KC	MEDIUM	KC	KC z warstwy:				
		dzielące się 	podstawnej 1 	podstawnej 2 	kolczystej 3 	ziarnistej 4 	
KC(I)	PT/L (I) bez neutralizacji	9,2 \pm 1,5	42,2 \pm 2,9	20,8 \pm 2,2	14,0 \pm 1,2	13,8 \pm 1,5	
KC(I)	PT/L (I) +anty IL-1 β	2,4 \pm 0,9	33,6 \pm 4,2	28,4 \pm 1,9	18,6 \pm 1,7	17,0 \pm 4,5	
KC(I)	PT/L (I) +anty IL-6	2,8 \pm 2,3	38,0 \pm 3,3	30,2 \pm 1,6	18,4 \pm 1,8	10,6 \pm 2,1	
KC(I)	PT/L (I) +anty TNF- α	4,4 \pm 0,9	32,6 \pm 1,1	33,6 \pm 1,5	17,6 \pm 2,9	11,8 \pm 1,6	
KC(I)	PT/L (I) +anty KGF	4,2 \pm 0,8	37,8 \pm 3,1	25,4 \pm 2,2	18,8 \pm 2,9	13,8 \pm 1,3	
KC(I)	PT/L (I) +anty TGF- β	7,2 \pm 1,1	40,2 \pm 3,3	14,2 \pm 1,9	22,2 \pm 1,3	16,2 \pm 1,9	

*KC hodowane w PT/L (I) po neutralizacji vs KC (I) bez neutralizacji, p \leq 0,05 (I) limfedema

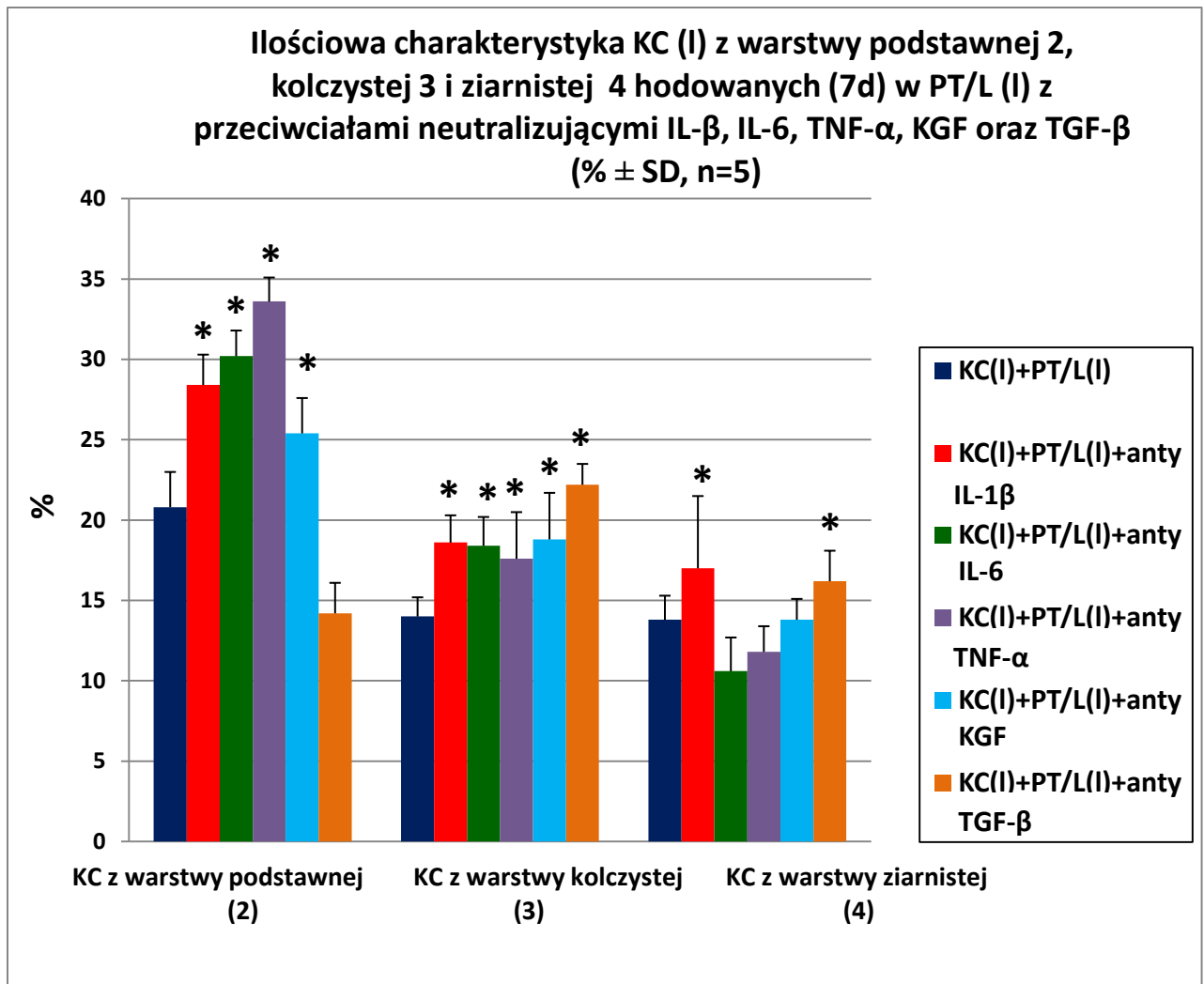
Po neutralizacji IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz KGF w PT/L stwierdzono istotny statystycznie spadek odsetka dzielących się KC. Największą różnicę zaobserwowano po neutralizacji IL-1 β (2,4 % vs 9,2 %) oraz IL-6 (2,8 % vs 9,2 %), natomiast najmniejszą różnicę stwierdzono po neutralizacji TGF- β (7,2 % vs 9,2 %). Neutralizacja badanych cytokin i czynników wzrostu przyczyniła się do spadku odsetka KC z warstwy podstawnej 1. W przypadku neutralizacji IL-1 β oraz TNF- α różnica ta była istotna statystycznie.

Neutralizacja IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz KGF przyczyniła się do istotnie statystycznego wzrostu odsetka KC z warstwy podstawnej 2. Po neutralizacji TGF- β obserwowano natomiast spadek ich odsetka (14,2 % vs 20,8 %). Po neutralizacji wszystkich badanych cytokin i czynników wzrostu stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka KC z warstwy kolczystej 3. W przypadku KC z warstwy ziarnistej po neutralizacji IL-1 β oraz TGF- β stwierdzono istotny statystycznie wzrost ich procenta, natomiast efekt przeciwny wywołała neutralizacja IL-6 oraz TNF- α . Po neutralizacji KGF nie zaobserwowano zmian w liczbie KC z warstwy ziarnistej.



Rycina 12. Ilościowa charakterystyka KC (I) dzielących się oraz KC (I) z warstwy podstawnej 1 po hodowli (7d) w PT/L (I) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β (% \pm SD, n=5)

*KC hodowane w PT/L (I) po neutralizacji vs KC (I) bez neutralizacji, p \leq 0,05



Rycina 13. Ilościowa charakterystyka KC (I) z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4 po hodowli (7d) w PT/L (I) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β (% \pm SD, n=5)

*KC hodowane w PT/L (I) po neutralizacji vs KC (I) bez neutralizacji, p \leq 0,05

6.8 Procentowa zmiana liczby keratynocytów w płynie tkankowym/limfie (I) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β w 1, 7 i 14 dniu hodowli

Tabela 17. Procentowa zmiana liczby KC w PT/L (I) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β w 1, 7 i 14 dniu hodowli (% \pm SD, n=5)

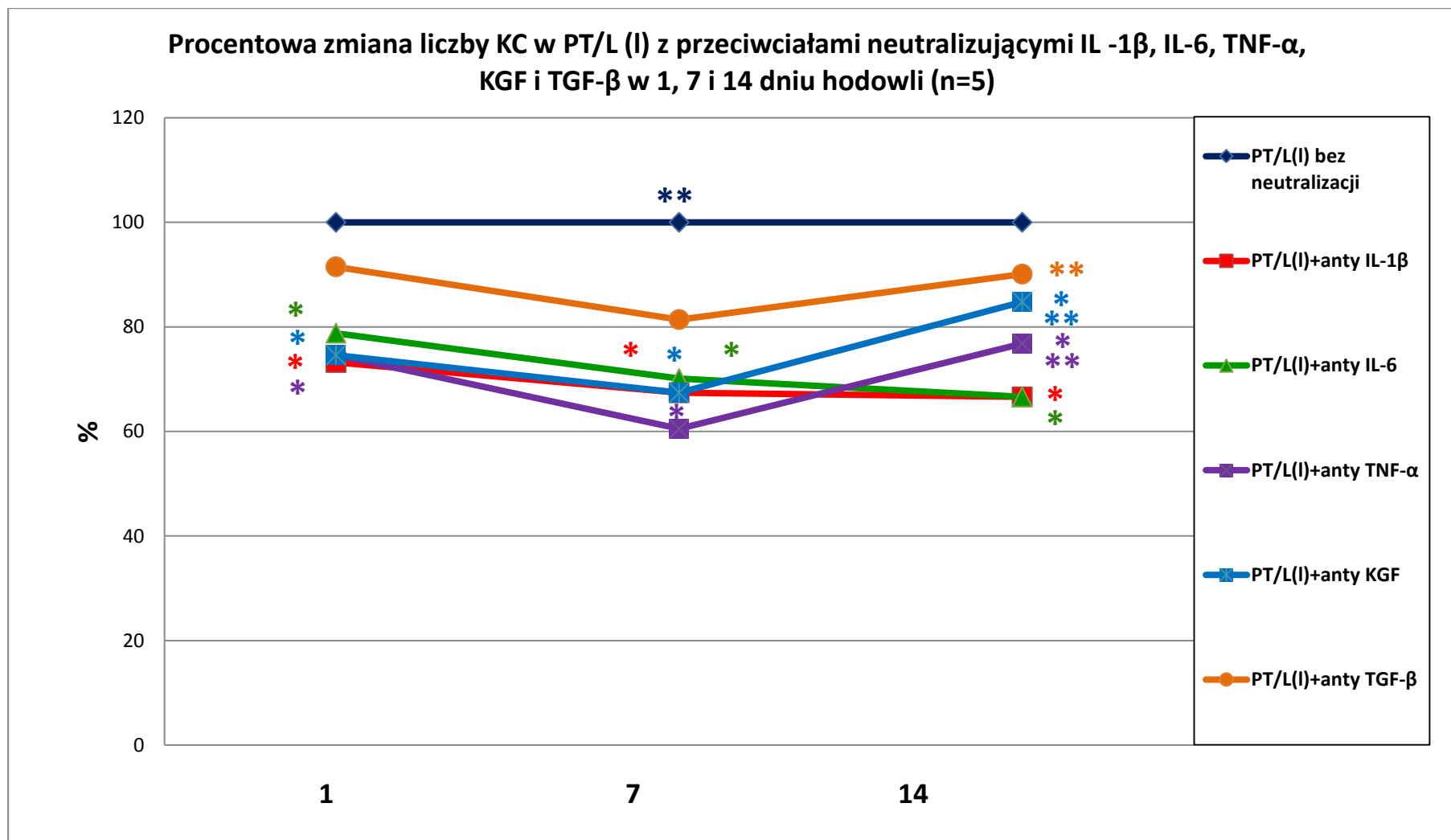
MEDIUM \ DZIEŃ	1		7		14
	PT/L (I) bez neutralizacji	100	**	100	NS
PT/L (I)+ anty IL-1 β	* 73,2 \pm 10,6	NS	* 67,4 \pm 10,9	NS	* 66,6 \pm 7,4
PT/L (I)+anty IL-6	* 78,8 \pm 17,1	NS	* 70,1 \pm 19,6	NS	* 66,6 \pm 15,1
PT/L (I)+anty TNF α	* 74,6 \pm 13,5	NS	* 60,5 \pm 5,5	**	* 76,8 \pm 17,8
PT/L (I)+anty KGF	* 74,6 \pm 11,7	NS	* 67,4 \pm 8,7	**	* 84,8 \pm 13,4
PT/L (I)+anty TGF- β	91,5 \pm 30,1	NS	81,4 \pm 17,1	**	90,1 \pm 28,2

* PT/L (I) + przeciwciała neutralizujące vs PT/L (I) bez neutralizacji, $p \leq 0,05$

**1 i 7 dzień vs 14 dzień hodowli, $p \leq 0,05$

NS brak istotności statystycznej (I) limfedema

Po neutralizacji IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF stwierdzono istotny statystycznie spadek liczby KC w 1, 7 i 14 dniu hodowli w porównaniu do hodowli w PT/L (I) (bez neutralizacji). Nie zaobserwowano istotnych zmian po neutralizacji TGF- β . Po neutralizacji TNF- α , KGF oraz TGF- β stwierdzono istotną statystycznie różnicę w liczbie KC pomiędzy dniem 7 i 14.





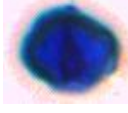
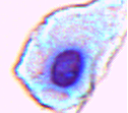
Rycina 14. Procentowa zmiana liczby KC po hodowli w PT/L (I) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF i TGF- β w 1, 7 i 14 dniu hodowli (n=5)

*PT/L (I) +przeciwciała neutralizujące vs PT/L (I) bez neutralizacji, p \leq 0,05

**1 i 7 dzień vs 14 dzień hodowli, p \leq 0,05

6.9 Różnicowanie keratynocytów po hodowli (7d) w płynie tkankowym/limfie (I) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β wyrażane w stosunku do keratynocytów (I) z warstwy podstawnej 1

Tabela 18. Różnicowanie KC hodowanych (7d) w PT/L (I) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β wyrażane w stosunku do KC z warstwy podstawnej 1 (% \pm SD, n=5)

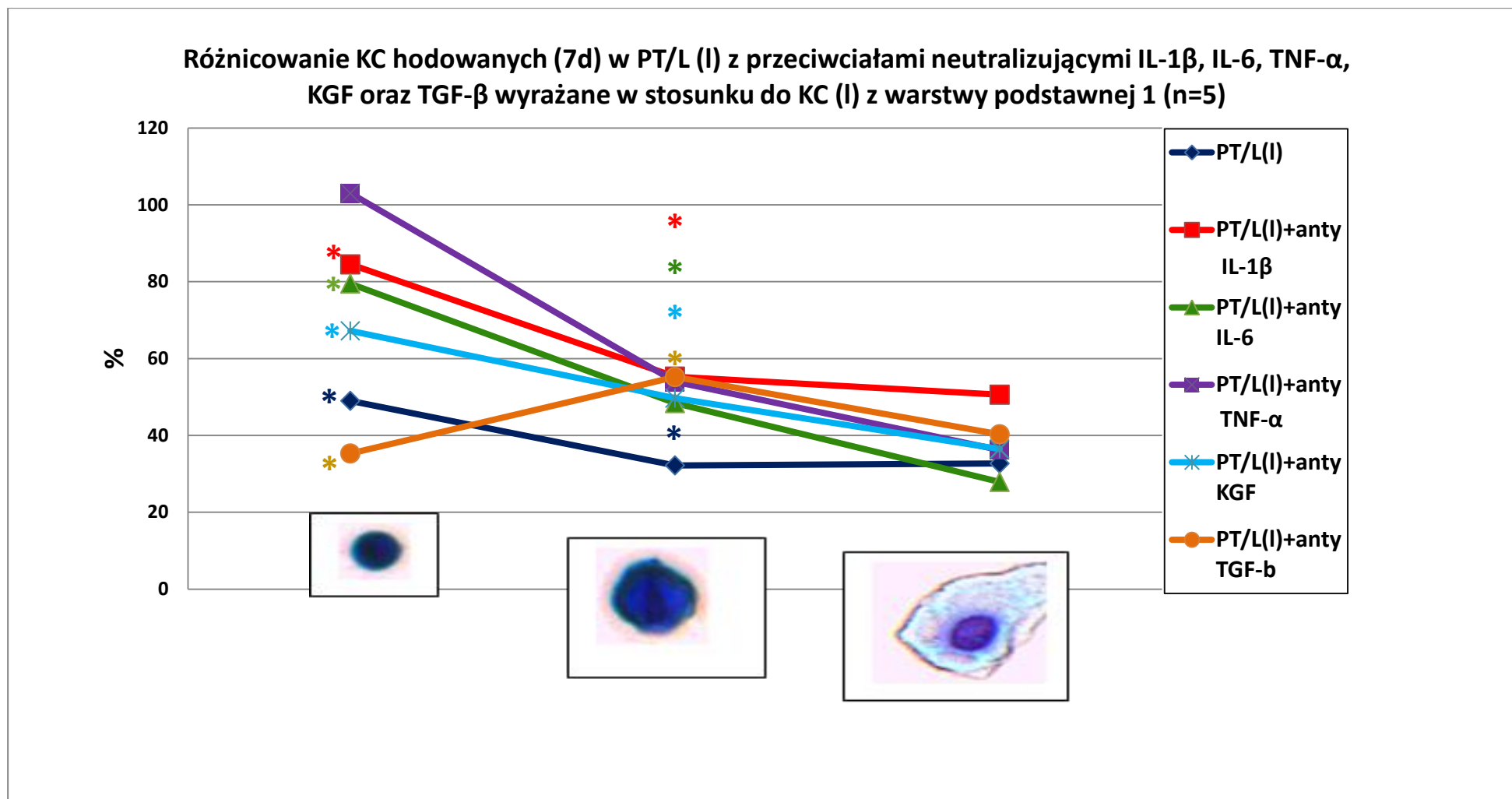
KC	MEDIUM	KC z warstwy:			
		podstawnej 1	podstawnej 2	kolczystej 3	ziarnistej 4
					
KC(I)	PT/L (I) bez neutralizacji	100	* 49,0 \pm 5,2	* 32,2 \pm 2,8	32,7 \pm 3,5
KC(I)	PT/L (I) +anty IL-1 β	100	* 84,5 \pm 5,6	* 55,3 \pm 5,0	50,6 \pm 13,4
KC(I)	PT/L (I)+ anty IL-6	100	* 79,5 \pm 4,2	* 48,4 \pm 4,7	27,9 \pm 5,5
KC(I)	PT/L (I) +anty TNF- α	100	103,0 \pm 4,6	54,0 \pm 8,9	36,2 \pm 4,9
KC(I)	PT/L (I) +anty KGF	100	* 67,2 \pm 5,8	* 49,7 \pm 7,6	36,5 \pm 3,4
KC(I)	PT/L (I) +anty TGF- β	100	* 35,3 \pm 4,7	* 55,2 \pm 3,2	40,3 \pm 4,7

*KC z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4 vs KC z warstwy podstawnej 1, p \leq 0,05 (I) limfedema

Po hodowli KC (I) w PT/L (I) oraz neutralizacji IL-1 β , IL-6, KGF i TGF- β stwierdzono, za wyjątkiem neutralizacji TNF- α , istotny statystycznie, niższy odsetek zróżnicowanych KC (I) z warstwy podstawnej 2 oraz warstwy kolczystej 3. W przypadku

Wyniki

warstwy ziarnistej 4 stwierdzono także niższy odsetek zróżnicowanych KC (I) w porównaniu do warstwy podstawnej 1.




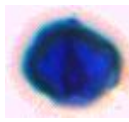
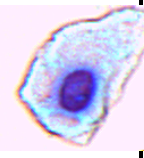


Rycina 15. Różnicowanie KC hodowanych (7d) w PT/L (I) z przeciwciałami neutralizującymi IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF i TGF- β wyrażane w stosunku do KC z warstwy podstawnej 1 (n=5)

*KC z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3, ziarnistej 4 vs KC z warstwy podstawnej 1, p<0,05

6.10 Blokowanie receptorów IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGF- β R na keratynocytach (I) w 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (I)

Tabela 19. Blokowanie receptorów IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGF- β R na KC (I) w hodowli (7d); (% \pm SD, n=5)

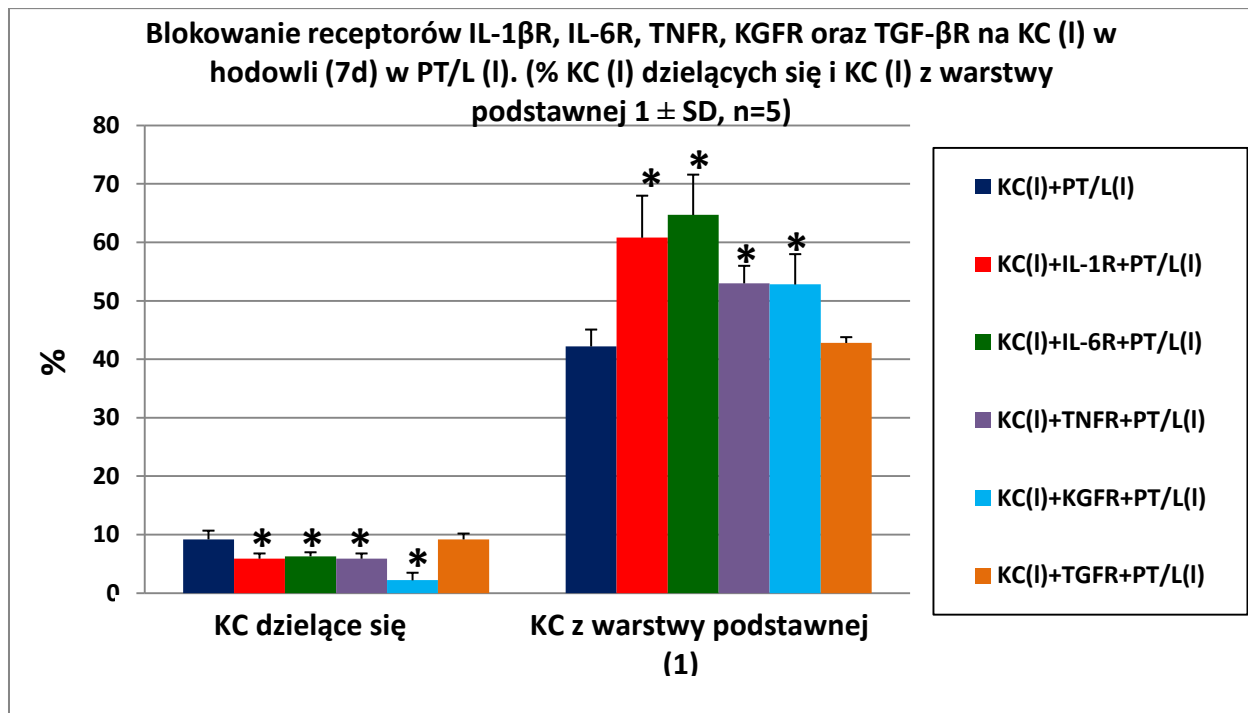
KC	MEDIUM	KC	KC z warstwy:			
		dzielące się 	podstawnej 1 	podstawnej 2 	kolczystej 3 	ziarnistej 4 
KC(I) bez blokowania	PT/L (I)	9,2 \pm 1,5	42,2 \pm 2,9	20,8 \pm 2,2	14,0 \pm 1,2	13,8 \pm 1,5
KC(I)+anty IL1R	PT/L (I)	* 5,9 \pm 0,9	* 60,8 \pm 7,2	17,3 \pm 5,9	* 10,4 \pm 1,5	* 5,9 \pm 1,9
KC(I)+anty IL-6R	PT/L (I)	* 6,3 \pm 0,7	* 64,7 \pm 6,9	15,1 \pm 4,8	* 9,1 \pm 2,3	* 4,8 \pm 1,6
KC(I)+anty TNFR	PT/L (I)	* 5,9 \pm 0,9	* 53,0 \pm 3,0	22,0 \pm 4,3	* 9,7 \pm 2,8	* 9,3 \pm 3,1
KC(I)+anty KGFR	PT/L (I)	* 2,2 \pm 1,3	* 52,8 \pm 5,2	25,1 \pm 4,8	13,1 \pm 4,5	* 6,7 \pm 2,1
KC(I)+anty TGF β R	PT/L (I)	9,2 \pm 2,4	42,8 \pm 7,9	* 29,4 \pm 8,1	12,1 \pm 4,3	* 6,5 \pm 4,0

*KC(I) +IL-1R, IL-6R, TNFR, KGFR, TGF β R +PT/L (I) vs KC(I)+ (I) bez blokowania, p \leq 0,05 (I) limfedema

Po zablokowaniu receptorów dla IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz KGF na KC (I) i dalszej hodowli w PT/L (I) stwierdzono istotny statystycznie spadek odsetka dzielących się KC. Największą różnicę stwierdzono po zablokowaniu receptora dla KGF (2,2 % vs 9,2 %). Po zablokowaniu receptora dla TGF- β nie stwierdzono żadnej różnicy (9,2 % vs 9,2 %). Procent KC z warstwy podstawnej 1 po zablokowaniu receptorów dla IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz KGF był istotnie statystycznie wyższy w porównaniu do KC po hodowli w PT/L bez blokowania receptorów. W przypadku KC z warstwy podstawnej 2, po zablokowaniu receptorów dla IL -

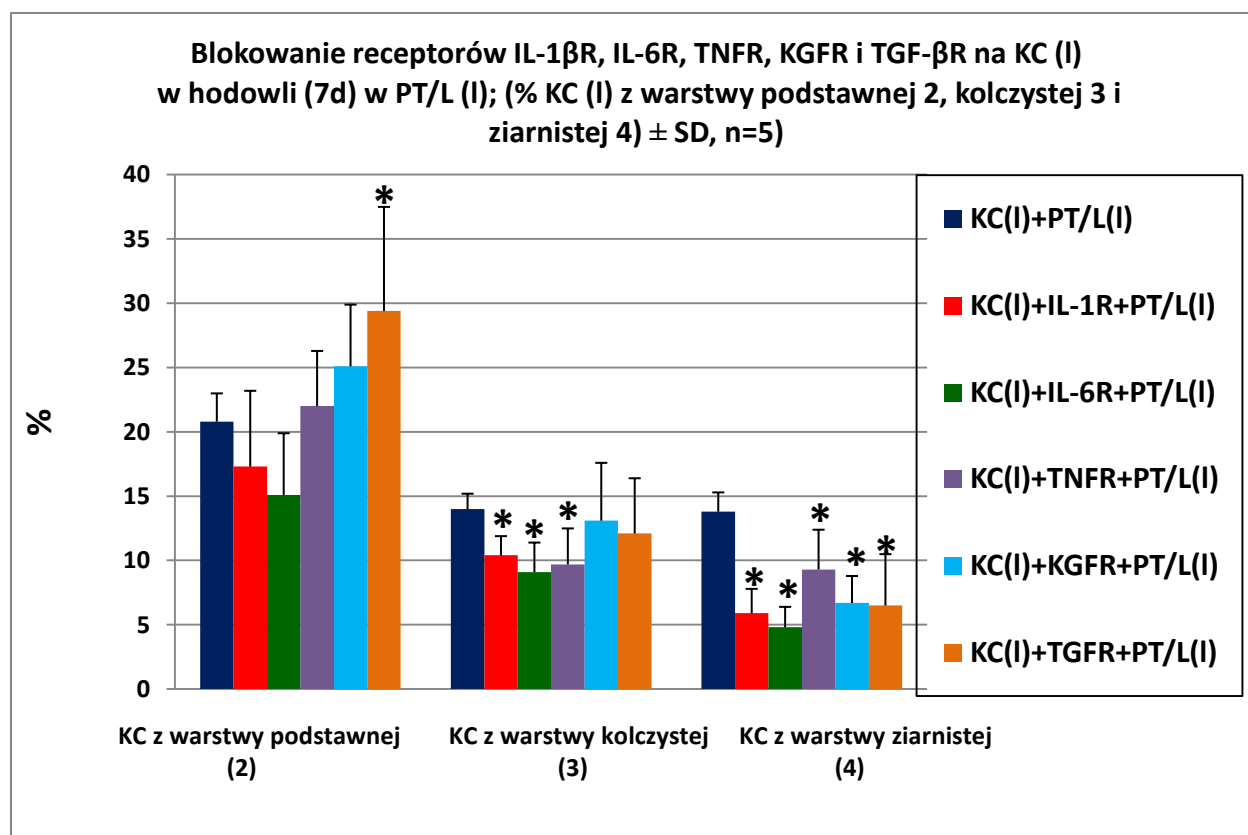
Wyniki

IL-1 β oraz IL-6 stwierdzono spadek ich odsetka w porównaniu do hodowli KC w PT/L bez blokowania; odwrotna sytuacja miała miejsce po zablokowaniu receptorów dla TNF- α , KGF oraz TGF- β . Procent KC (I) z warstwy kolczystej 3 był istotnie statystycznie niższy po zablokowaniu IL-1R, IL-6R oraz TNFR. Po zablokowaniu receptorów dla wszystkich badanych cytokin i czynników wzrostu stwierdzono istotny statystycznie spadek odsetka KC z warstwy ziarnistej.



Rycina 16. Blokowanie receptorów IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGF- β R na KC (I) w hodowli (7d); (% KC (I) dzielących się i KC (I) z warstwy podstawnej (1) \pm SD, n=5)

*KC (I) +IL-1R, IL-6R, TNFR, KGFR, TGF- β R + PT / L (I) vs KC (I)+PT / L (I) bez blokowania, p \leq 0,05



Rycina 17. Blokowanie receptorów IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR, TGF- β R na KC (I) w hodowli (7d) w PT/L (I); (%KC (I) z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3, ziarnistej 4 \pm SD, n=5)

*KC (I) +IL-1R, IL-6R, TNFR, KGFR, TGFR +PT / L (I) vs KC (I)+PT/L (I) bez blokowania, $p \leq 0,05$

6.11 Procentowa zmiana liczby keratynocytów (I) po zablokowaniu receptorów IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGFR w 1, 7 i 14 dniu hodowli w płynie tkankowym/limfie (I)

Tabela 20. Procentowa zmiana liczby KC po zablokowaniu receptorów IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR, TGFR w 1, 7 i 14 dniu hodowli w PT/L (I) (% \pm SD, n=5)

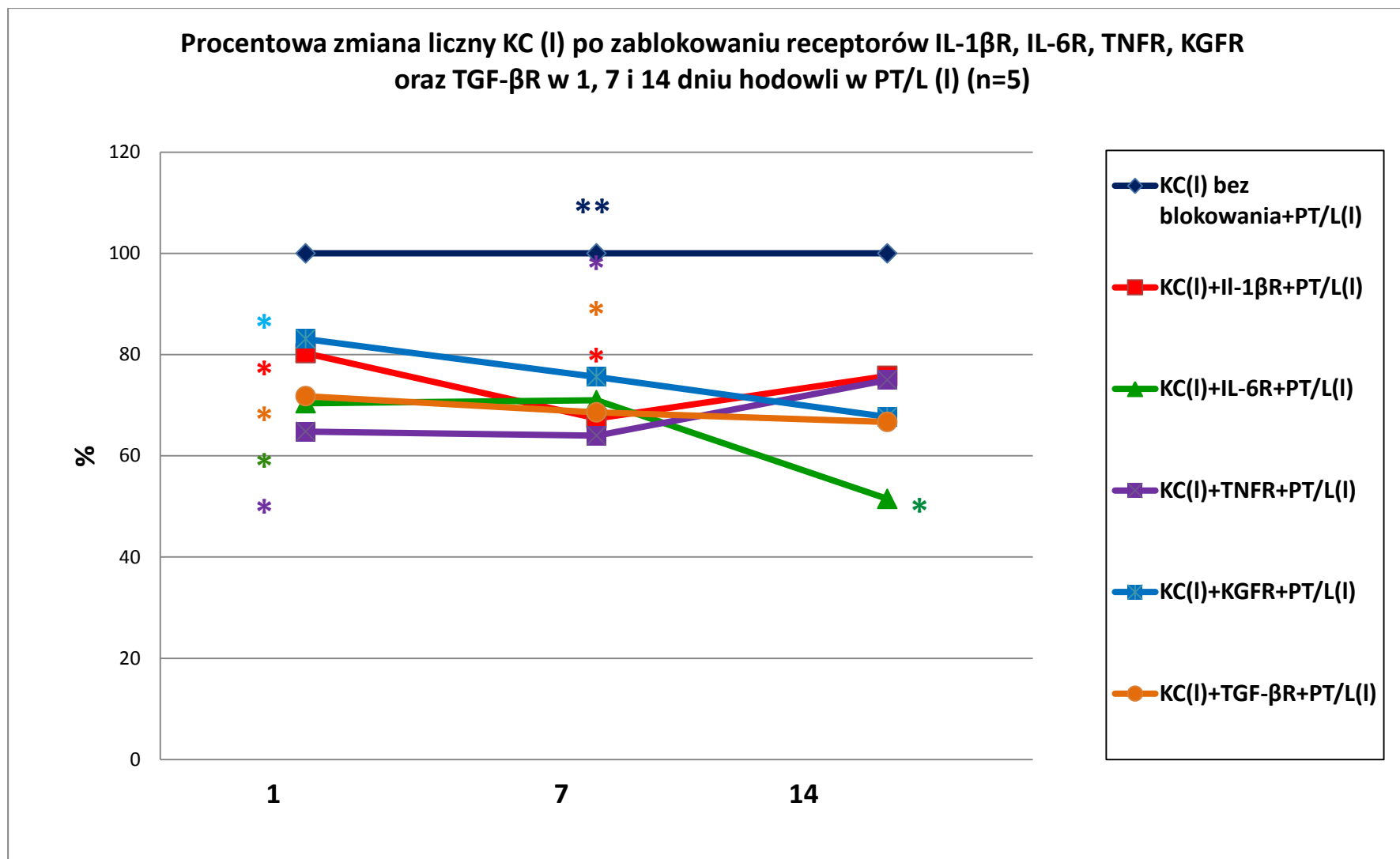
MEDIUM	DZIEŃ		1		7		14	
KC (I) bez blokowania+PT/L (I)			100	**	100	NS		100
KC(I)+anty IL-1 β R+PT/L(I)	*		80,3 \pm 11,0	NS	67,4 \pm 13,0	NS		75,8 \pm 23,5
KC(I)+anty IL6R+PT/L (I)	*		70,4 \pm 25,2	NS	71,0 \pm 17,1	NS		51,5 \pm 19,7
KC(I)+anty TNFR+PT/L (I)	*		64,8 \pm 12,1	NS	64,0 \pm 9,6	NS		75,0 \pm 18,9
KC(I)+anty KGFR+PT/L (I)	*		83,1 \pm 11,8	NS	75,6 \pm 18,6	NS		67,7 \pm 15,7
KC(I)+anty TGFR+PT/L (I)	*		71,8 \pm 19,3	NS	68,6 \pm 13,7	NS		66,7 \pm 19,8

*KC (I)+anty IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR, TGFR +PT/L (I) vs KC (I)+PT / L (I), p \leq 0,05

**1 i 7 dzień vs 14 dzień hodowli, p \leq 0,05

NS brak istotności statystycznej (I) limfedema

Po zablokowaniu receptorów dla IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF i TGF- β stwierdzono istotny statystycznie spadek procentowego przyrostu KC po 1 dniu hodowli w porównaniu do KC (I) bez blokowania. W dniu 7 stwierdzono istotny statystycznie spadek przyrostu KC po zablokowaniu receptora dla IL-1 β , TNF- α oraz TGF- β . W dniu 14 nastąpił istotny statystycznie spadek przyrostu KC po zablokowaniu receptora dla IL-6 oraz TNF- α .





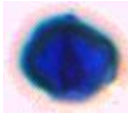
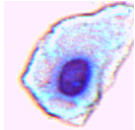
Rycina 18. Procentowa zmiana liczby KC (I) po zablokowaniu receptorów IL-1R, IL-6R, TNFR, KGFR, TGF β R w 1, 7 i 14 dniu hodowli w PT/L (I) (% \pm SD, n=5)

*KC (I) +anty IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR, TGF β R +PT/L (I) vs KC (I)+PT/L (I), p \leq 0,05

**1 i 7 dzień vs 14 dzień hodowli, p \leq 0,05

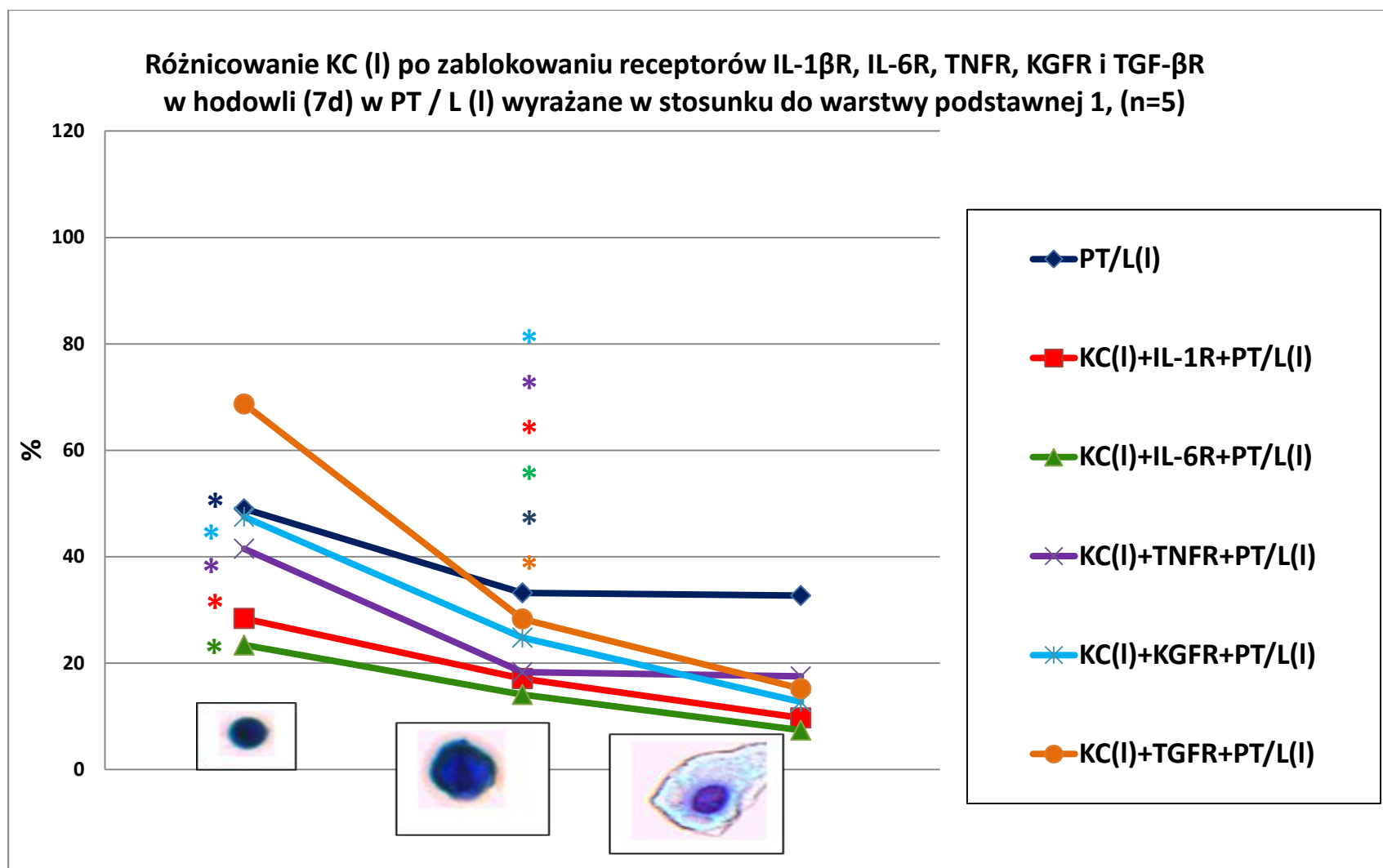
6.12 Różnicowanie keratynocytów (I) po zablokowaniu IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGF- β R w 7 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (I) wyrażane w stosunku do keratynocytów (I) z warstwy podstawnej 1

Tabela 21. Różnicowanie KC (I) po zablokowaniu IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGF- β R w hodowli (7d) w PT/L (I) wyrażane w stosunku do KC (I) z warstwy podstawnej 1 (% \pm SD, n=5)

KC	MEDIUM	KC z warstwy:			
		podstawnej 1	podstawnej 2	kolczystej 3	ziarnistej 4
					
KC(I) bez blokowania	PT/L (I)	100	* 49,0 \pm 5,2	* 32,2 \pm 2,8	32,7 \pm 3,5
KC(I)+anty IL-1 β R	PT/L (I)	100	* 28,4 \pm 9,6	* 17,1 \pm 2,5	9,7 \pm 3,1
KC(I)+anty IL-6R	PT/L (I)	100	* 23,4 \pm 7,4	* 14,1 \pm 3,6	7,4 \pm 2,5
KC(I)+anty TNFR	PT/L (I)	100	* 41,5 \pm 8,1	* 18,3 \pm 5,3	17,5 \pm 5,8
KC(I)+anty KGFR	PT/L (I)	100	* 47,5 \pm 9,1	* 24,8 \pm 8,5	12,7 \pm 3,9
KC(I)+anty TGF β R	PT/L (I)	100	68,7 \pm 18,9	* 28,3 \pm 10,1	15,2 \pm 9,3

*KC z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4 vs KC z warstwy podstawnej 1, p \leq 0,05 (I) limfedema

Po hodowli KC (I) w PT/L (I) i zablokowaniu IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGF- β R na KC (I) stwierdzono niższy procent zróżnicowanych KC (I) z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4 w odniesieniu do KC z warstwy podstawnej 1.



Rycina 19. Różnicowanie KC (I) po zablokowaniu IL-1 β R, IL-6R, TNFR, KGFR oraz TGF- β R w hodowli (7d) w PT/L (I) wyrażane w stosunku do KC (I) z warstwy podstawnej 1, (n=5)

*KC z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4 vs KC z warstwy podstawnej 1, p<0,05

6.13 Ekspresja markerów różnicowania keratynocytów (I) po 14 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (I), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI

Tabela 22. Ekspresja markerów różnicowania KC (I) po hodowli (14d) w PT/L (I), (n), 20 % S i RPMI; (% \pm SD, n=5)

Antygen	KC po izolacji	Hodowla KC (I) w:			
		PT/L (I)	PT/L (n)	20 % S	RPMI
CK1	31,7 \pm 7,0	* 21,7 \pm 1,7	* 20,3 \pm 4,2	17,9 \pm 2,1	14,5 \pm 2,5
CK10	59,2 \pm 3,2	* 52,0 \pm 2,6	* 42,2 \pm 1,8	50,7 \pm 4,3	77,6 \pm 10,1
CK14	68,9 \pm 3,9	* 50,5 \pm 14,3	* 52,3 \pm 6,8	56,0 \pm 2,0	63,6 \pm 2,2
filagryna	26,1 \pm 5,6	* 19,7 \pm 3,8	* 17,9 \pm 3,9	17,3 \pm 10,0	38,7 \pm 5,7
inwolukryna	19,2 \pm 1,1	18,8 \pm 4,5	25,9 \pm 7,8	20,0 \pm 7,5	45,3 \pm 11,7

*PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI vs KC po izolacji, $p \leq 0,05$
(I) limfedema, (n) normalny

Po hodowli KC (I) w PT/L (I), PT/L (n), 20 % S oraz medium RPMI stwierdzono istotny statystycznie spadek odsetka komórek wyrażających CK1 w porównaniu do KC (I) po izolacji.

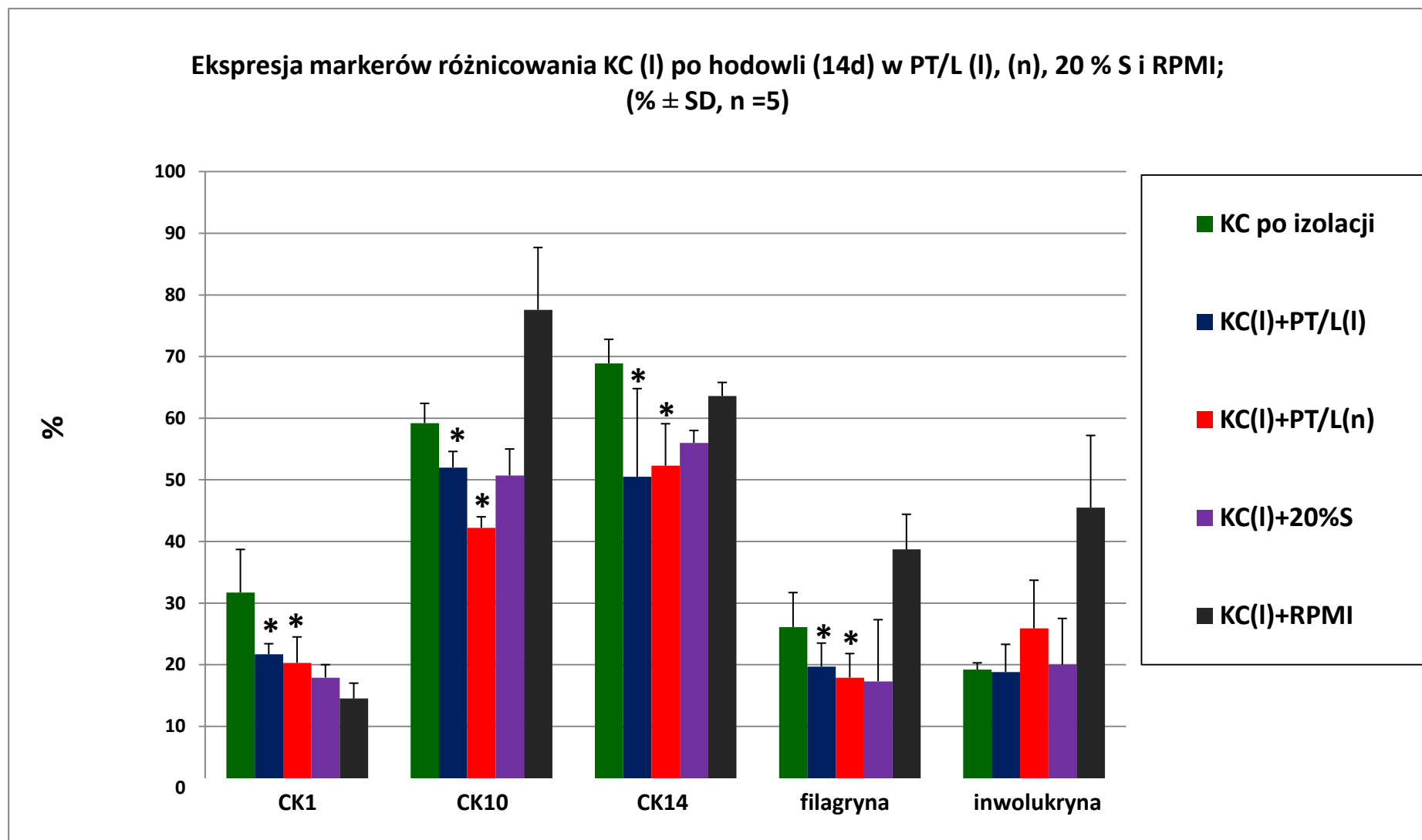
CK10 była wyrażana w niższym procencie przez KC (I) po hodowli PT/L (I), (n) ($p \leq 0,05$), 20 % S oraz w wyższym po hodowli w medium RPMI w porównaniu do komórek po izolacji.

Po hodowli KC (I) w PT/L (I), (n) stwierdzono istotny statystycznie spadek odsetka komórek wyrażających CK14.

Filagryna była wyrażana w niższym procencie przez KC (I) po hodowli w PT/L (I), (n) ($p \leq 0,05$) oraz 20 % S natomiast w wyższym po hodowli w medium RPMI w porównaniu do KC wyrażających ten antygen po izolacji.

Wyniki

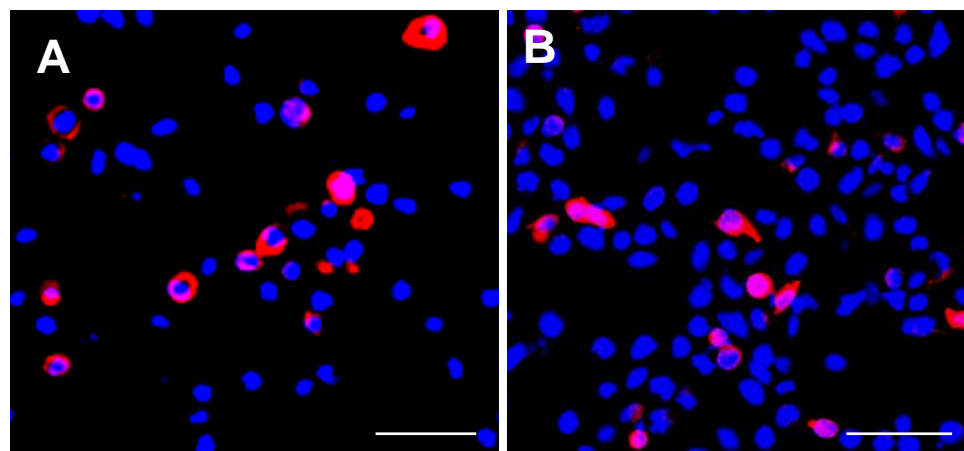
Odsetek KC (I) wyrażających inwolukrynę po hodowli w PT/L (I), (n) oraz 20 % S nie różnił się istotnie w porównaniu do KC (I) po izolacji, natomiast stwierdzono wyższe wyrażanie tego białka przez KC (I) po hodowli w medium RPMI (45,3 % vs 19,2 %).



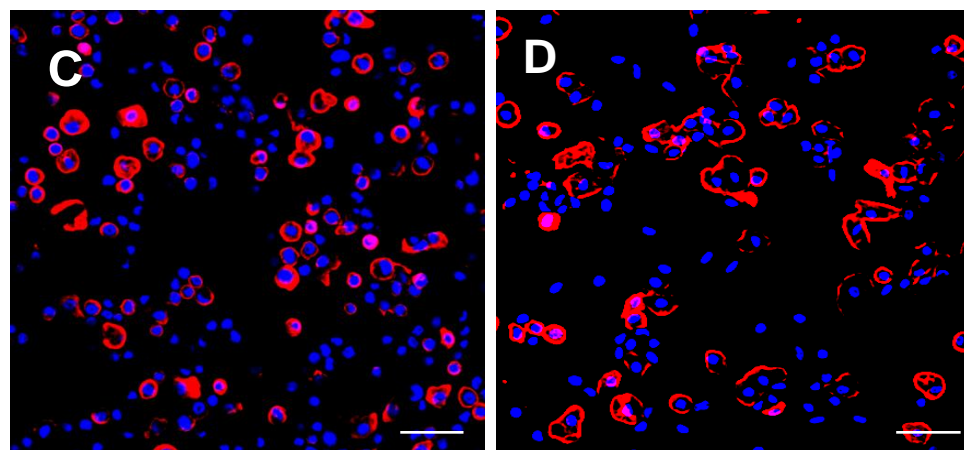
Rycina 20. Ekspresja markerów różnicowania KC (I) po hodowli (14d) w PT/L (I), (n), 20 % S i RPMI; (% ± SD, n=5)

*PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI vs KC po izolacji, p≤0,05

**EKSPRESJA CK 1
PRZEZ KC (I) PO
HODOWLI W:
A. RPMI
B. PT/L (I)**

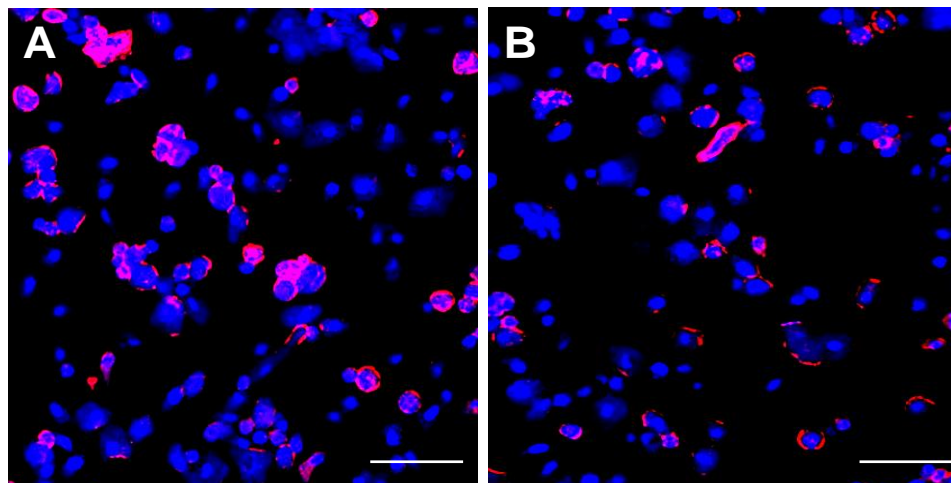


**EKSPRESJA CK 10
NA KC PO
HODOWLI W:
C. RPMI
D. PT/L (I)**



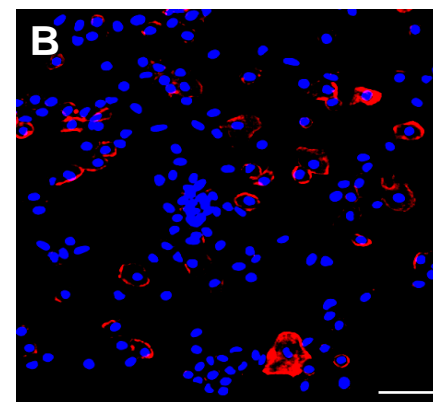
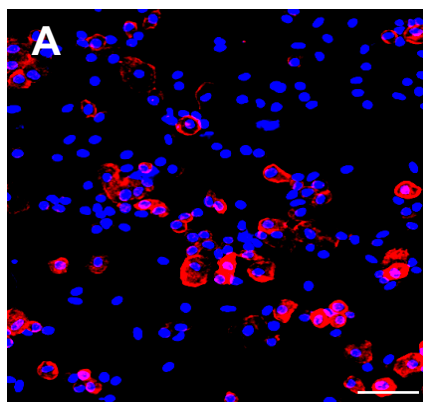
Rycina 21. Ekspresja antygenów **CK1** i **CK10** przez KC (I) po 14 dniowej hodowli w PT/L (I) i RPMI. Na niebiesko zostały wybarwione jądra komórkowe (**Hoechst**). Skala=50µm.

EKSPRESJA CK 14
PRZEZ KC (I) PO
HODOWLI W:
A. RPMI
B. PT/L (I)

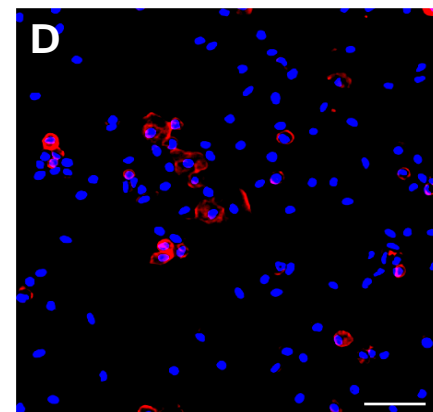
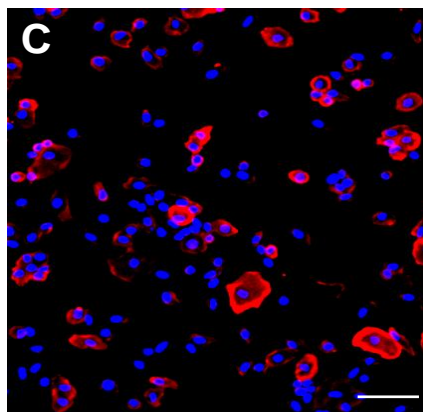


Rycina 22. Ekspresja antygenu **CK14** przez KC po 14 dniowej hodowli w PT/L (I) i RPMI. Na niebiesko zostały wybarwione jądra komórkowe (**Hoechst**).Skala=50µm.

EKSPRESJA
FILAGRYNY
PRZEZ KC (I) PO
HODOWLI W:
A. RPMI
B. PT/L (I)



EKSPRESJA
INWOLUKRYNY
PRZEZ KC (I) PO
HODOWLI W:
C. RPMI
D. PT/L (I)



Rycina 23. Ekspresja antygenów **filagryny i involucryny** przez KC po 14 dniowej hodowli w PT/L (I) i RPMI. Na niebiesko zostały wybarwione jądra komórkowe (**Hoechst**). Skala=50µm.

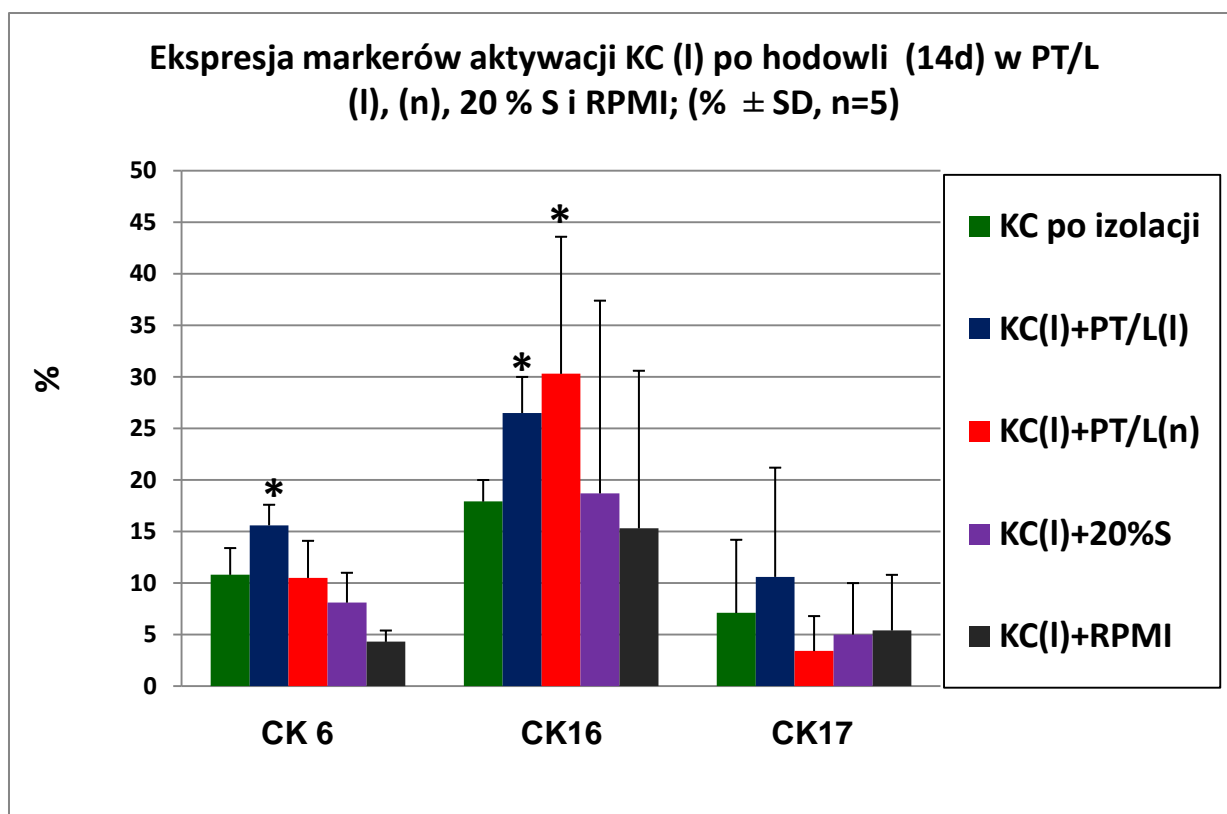
6.14 Ekspresja markerów aktywacji keratynocytów (I) po 14 dniowej hodowli w płynie tkankowym/limfie (I), (n), 20 % surowicy oraz medium RPMI

Tabela 23. Ekspresja markerów aktywacji KC (I) po hodowli (14d) w PT/L (I), (n), 20 % S oraz RPMI;(% ± SD, n=5)

Antygen	KC (I) po izolacji	Hodowla KC (I) w:			
		PT / L(I)	PT / L(n)	20 % S	RPMI
CK6	10,8 ± 2,6	* 15,6 ± 2,0	10,5 ± 3,6	8,1 ± 2,9	4,3 ± 1,1
CK16	17,9 ± 2,1	* 26,5 ± 3,5	* 30,3 ± 13,3	18,7 ± 4,2	15,3 ± 1,5
CK17	7,1 ± 1,4	10,6 ± 4,0	3,4 ± 0,8	5,0 ± 3,5	5,4 ± 1,5

*PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI vs KC po izolacji, p≤0,05
(I) limfedema, (n) normalny

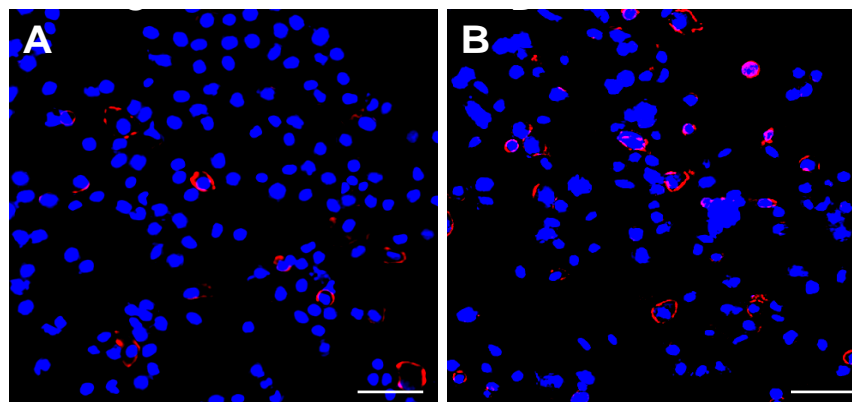
Po hodowli KC (I) w PT/L (I) stwierdzono istotny statystycznie wzrost odsetka komórek wyrażających CK6 w porównaniu do KC (I) po izolacji. Istotny statystycznie wzrost KC (I) wyrażających CK16 stwierdzono po hodowli w PT/L (I) oraz PT/L (n) w porównaniu do kontroli. CK 17 była wyrażana przez większy odsetek KC (I) po hodowli w PT/L (I) w porównaniu do KC (I) po izolacji.



Rycina 24. Ekspresja markerów aktywacji KC po hodowli (14d) w PT / L (I), (n), 20 % S i RPMI; (% ± SD, n=5)

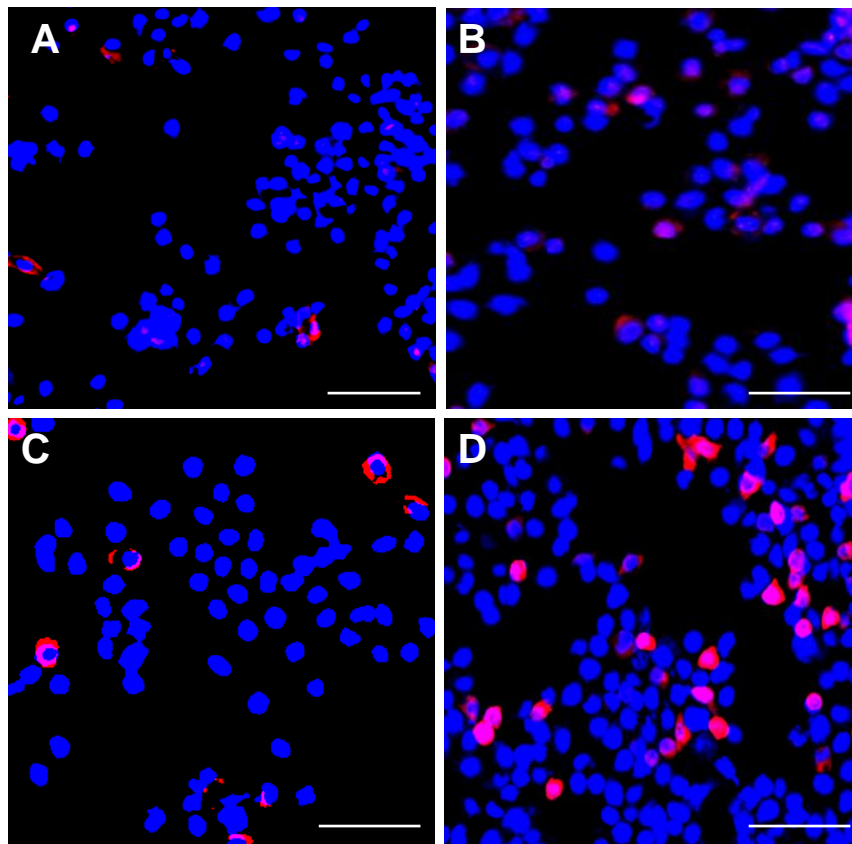
*PT/L (I), (n), 20 % S, RPMI vs KC po izolacji, $p \leq 0,05$

EKSPRESJA CK 6
PRZEZ KC (I) PO
HODOWLI W:
A. RPMI
B. PT/L (I)



Rycina 25. Ekspresja antygenu **CK6** przez KC(I) po 14 dniowej hodowli w PT/L (I) i RPMI. Na niebiesko zostały wybarwione jądra komórkowe (**Hoechst**).Skala=50µm.

EKSPRESJA CK 16
PRZEZ KC PO
HODOWLI W:
A. RPMI
B. PT/L (I)



Rycina 26. Ekspresja antygenów **CK16 i CK17** przez KC po 14 dniowej hodowli w PT/L i RPMI. Na niebiesko zostały wybarwione jądra komórkowe (**Hoechst**). Skala=50 μ m.

7 PODSUMOWANIE WYNIKÓW

Główne obserwacje w mojej pracy to:

1. Przyrost całkowitej liczby KC w hodowli w PT/L był wyższy w porównaniu do hodowli w medium kontrolnym.
2. Po hodowli KC izolowanych ze skóry podudzia w PT/L obserwowano wyższy odsetek dzielących się KC oraz komórek z warstwy podstawnej 1, a także mniej komórek zróżnicowanych z warstwy podstawnej 2 w porównaniu do hodowli w medium kontrolnym.
3. Odsetek KC wyrażających markery charakteryzujące tzw. macierzyste komórki naskórka p63 i CD29, a także markery proliferacji PCNA i Ki67 był znacznie wyższy po hodowli w PT/L w porównaniu do hodowli w medium.
4. Po neutralizacji IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz KGF w PT/L, a także zablokowaniu receptorów dla tych cytokin i czynników wzrostu na KC, obserwowano spadek odsetka dzielących się KC i wzrost procenta komórek zróżnicowanych. Blokowanie TGF- β i jego receptorów nie miało statystycznie znamiennego wpływu na podziały i różnicowanie KC.
5. Po hodowli w PT/L stwierdzono wzrost odsetka aktywowanych KC wyrażających CK6, CK16 oraz CK17.
6. Ekspresja białek charakteryzujących dojrzałe KC, jak CK10, CK14, filagryna oraz inwolukryna była niższa po hodowli w PT/L.

8 DYSKUSJA

U chorych z zastojem limfatycznym, dochodzi do nadmiernej proliferacji komórek naskórka kończyn, a tym samym zwiększenia jego grubości. Jest to zapewne spowodowane działaniem licznych czynników regulacyjnych, które znajdują się w PT/L gromadzącym się w przestrzeniach międzykomórkowych pod naskórkiem. Limfa zawiera wszystkie białka występujące w osoczu krwi oraz dodatkowo pewną ilość białek syntetyzowanych w tkankach. W badaniach prowadzonych przez Olszewskiego i wsp. zaobserwowano obecność wielu czynników wzrostu i cytokin w PT/L pochodzącym od chorych z zastojem limfatycznym, jak i osób zdrowych [105, 107, 108, 109, 110, 112, 114, 116, 117, 118].

W celu odtworzenia sytuacji stanu klinicznego prowadziłam hodowle KC w PT/L pochodzącym od chorych z zastojem limfatycznym oraz zdrowych wolontariuszy. Nie znalazłam w literaturze naukowej danych dotyczących hodowli KC w ludzkim PT/L. Jedyne znalezione prace doświadczalne dotyczyły hodowli transformowanych komórek BALB/3t3 w limfie oraz surowicy [127], a także hodowli fibroblastów w owczej limfie oraz osoczu [28]. Hodowla KC w standardowych mediach nie odpowiada sytuacji klinicznej. Media te służą badaniom poszczególnych cytokin i innych syntetyzowanych białek i zawierają substancje będące stymulatorami, jak np. KGF [45] lub kortyzon [70]. Ponadto media te nie zawierają surowicy [145]. Opisywane w literaturze hodowle KC są także prowadzone na tzw. feeder layer [9], czyli warstwie odżywczej składającej się z naświetlonych fibroblastów lub kolagenu, ułatwiających przyczepienie się do podłoża. W moim modelu badawczym celowo nie stosowałam 'feeder layer', aby nie ograniczyć hodowli wyłącznie do KC pochodzących z warstwy podstawnej, które posiadają największą zdolność adhezji.

Skład chemiczny płynu tkankowego/limfy w znacznym stopniu różni się od składu osocza. Limfa jest produktem dyfuzji i filtracji składników osocza. Dodatkowo jest wzbogacona w produkty komórek danej tkanki oraz limfocyty i komórki dendrytyczne wywędrujące do tkanki z krwi. Skład limfy jest uzależniony od poziomu filtracji kapilarnej, w tym przepuszczalności ściany kapilarnych naczyń krwionośnych oraz stanu metabolicznego komórek parenchymalnych danej tkanki [115].

W większości moich hodowli dawcą KC i PT/L była ta sama osoba. Jednak w części hodowli komórki pochodziły od innej osoby niż dawca PT/L. Był to układ allogeniczny. Trzeba podkreślić, że żaden z dawców KC i PT/L nie otrzymywał uprzednio przetoczeń krwi

ani nie było wśród nich wieloródek. Jak wiadomo z badań transplantologicznych miano przeciwciał anty HLA klasy I i II w surowicy u takich osobników jest na poziomie bliskim zera. W płynie tkankowym, który zawiera ok. 20% białek osocza takie miano byłoby jeszcze niższe. Można więc zakładać, iż hodowane KC nie mogły ulec lizie w mechanizmie cytotoksyczności przeciwciała - zależnej. Trzy testy tego typu wykonane z PT/L i limfocytami nie wykazały takiej cytotoksyczności.

KC do badań były izolowane z naskórka pobieranego od chorych z klinicznie i wizualizacyjnie udokumentowanym pozapalnym, pourazowym i/lub pochirurgicznym zastojem PT/L. Skóra była pobierana z okolicy podudzia. Grupę kontrolną stanowili dawcy skóry operowani z powodu problemów ortopedycznych z niezmienioną skórą podudzi (bez zastojów limfatycznego).

Naskórek zawiera komórki o różnej wielkości i stopniu zróżnicowania. Proces różnicowania komórek naskórka jest wieloetapowym procesem biologicznym, w wyniku którego dochodzi do wykształcenia na powierzchni naskórka warstwy zrogowaciałej [142]. Zaczyna się on po podziale mitotycznym KC (czyli już w warstwie podstawnej), które, różnicując się, tworzą warstwę kolczystą, ziarnistą i ostatecznie wytwarzają warstwę zrogowaciałą. Dlatego jako parametr różnicowania porównywałam procent okrągłych KC z warstwy podstawnej 2, kolczystej 3 i ziarnistej 4 z komórkami z warstwy podstawnej 1.

Po hodowli KC (l - limfedema) i (n - normalne) izolowanych z fragmentu skóry podudzia w PT/L (l) obserwowałam wyższy procent komórek dzielących się w porównaniu do standardowego medium. Obserwacja ta wskazywała na to, że PT/L (l) działa na KC mitogennie. W przypadku KC (l) z warstwy podstawnej 1 obserwowałam wzrost ich odsetka w stosunku do hodowli w medium RPMI, jak również obniżenie odsetka komórek zróżnicowanych z warstwy podstawnej 2.

Hodowla w PT/L (l) przyniosła wyższy odsetek dzielących się KC w porównaniu do hodowli w PT/L normalnym. Być może było to skutkiem różnic stężeń cytokin i czynników wzrostu PT/L chorych z zastojem limfatycznym w porównaniu z normą [115].

W przypadku hodowli KC w 20 % surowicy obserwowałam znacznie niższy procent komórek dzielących się w stosunku do hodowli w PT/L. Surowica nie działała pobudzająco na KC, a procent KC w fazie mitozy był niższy także w porównaniu do medium RPMI. Z powyższej obserwacji wynika, że surowica, aczkolwiek zawierająca te same cytokiny

i czynniki wzrostu co PT/L, być może nie zawierała innych specyficznych dla KC białek regulacyjnych, co więcej – możliwe, że posiadała białka hamujące.

Strefa komórek proliferujących w naskórku znajduje się głównie w warstwie podstawnej, w której znajdować się mogą zarówno komórki macierzyste, jak i komórki "przejściowo namnażające się". W warunkach fizjologicznych stopień proliferacji zależy głównie od komórek namnażających się przejściowo, które wywodzą się z komórek macierzystych. Wpływ wybranych przeze mnie cytokin/czynników wzrostu PT/L na KC oceniałam zmianami w ekspresji markerów proliferacji komórek (PCNA, Ki67) oraz białek charakteryzujących ludzkie komórki macierzyste naskórka (p63, CD29). Ekspresja białka p63 w jądrach KC (I) po hodowli w PT/L (I) była wyższa w porównaniu do hodowli w medium RPMI a także w porównaniu do hodowli w 20% surowicy. Odsetek KC wyrażających CD29 po hodowli w limfedematycznym PT/L był także wyższy w porównaniu do hodowli w standardowym medium. Natomiast po hodowli w 20 % surowicy odsetek ten był niższy w porównaniu do PT/L (I).

W przypadku markerów proliferacji obserwowałam znaczący wzrost procenta KC wyrażających PCNA i Ki67 po hodowli w PT/L w stosunku do hodowli w medium RPMI oraz 20 % surowicy. Badania te potwierdzają założoną hipotezę, że PT/L działa pobudzająco na podziały KC, a także przyczynia się do wzmożonej ekspresji markerów, które, wg literatury, charakteryzują komórki macierzyste naskórka [65, 83, 98]. Nie jest jednak wiadome, czy należą one do populacji komórek TA, które po podziale przechodzą na drogę różnicowania, czy do komórek macierzystych naskórka.

Powstaje pytanie, które z czynników wzrostu i cytokin zawartych w PT/L mogły wpływać na markery charakteryzujące komórki macierzyste naskórka i proliferacji. Do podstawowych cytokin, które mogą wpływać na proces proliferacji KC zaliczamy: IL-1, TNF- α oraz IL-6. Ponadto, czynniki wzrostu takie, jak: EGF, KGF, IGF, FGF, VEGF, TGF [88].

Aby sprawdzić, która z cytokin, lub która grupa cytokin wpływa na regulację proliferacji i różnicowania KC, niezbędne było przeprowadzenie hodowli KC w PT/L po ich neutralizacji. Z białek wykrywanych w PT/L wybrałam IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF oraz TGF- β . Wg danych literaturowych mogą one regulować zarówno procesy proliferacji, jak i różnicowania KC [27, 46, 79].

W trakcie trwania 14 dniowej hodowli badałam przyrost całkowitej liczby KC. W przypadku KC hodowanych w PT/L przyrost był wyższy niż po hodowli w medium RPMI,

natomiast neutralizacja badanych cytokin i czynników wzrostu przyczyniła się do spadku liczby KC.

Po neutralizacji badanych cytokin i czynników wzrostu w PT/L, zaobserwowałam istotne statystycznie obniżenie procenta mitotycznych KC. Największy spadek miał miejsce po neutralizacji IL-1 β oraz IL-6. Neutralizacja TGF- β nie przyczyniła się do istotnego spadku procenta dzielących się KC. Jednocześnie po neutralizacji IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz KGF zaobserwowano wzrost procenta komórek okrągłych z warstwy podstawnej 1. Z obserwacji tej wynika, że badane cytokiny i czynniki wzrostu, poza TGF- β , wpływają stymulująco na procesy podziałowe KC.

Większość prac dotyczących regulacji proliferacji KC pod wpływem cytokin i czynników wzrostu dotyczą procesów nie pochodzących ze środowiska komórkowego, jak PT/L. Badano głównie cytokiny dodawane do medium hodowlanego. I tak, wg Yano i wsp., IL-1 indukowała ekspresję IL-8 i GRO- α w skórze, aktywując KC, melanocyty, fibroblasty i komórki śródbłonna [147]. Po uwolnieniu IL-1, KC indukowały produkcję czynników wzrostu w fibroblastach (KGF oraz GM-CSF), silnie pobudzających proliferację KC [19, 88, 90]. Ponadto IL-1 uwalniana przez KC działała w sposób autokryny w stosunku do znajdujących się w sąsiedztwie KC, aktywując je. Stan taki pobudzał KC do migracji, hiperprolifracji i produkcji czynników wzrostu. IL-1 może indukować fosforylację i aktywację receptora dla EGF oraz kinaz transdukcji sygnału JNK, p38 i AKT [136]. Hernández-Quintero wykazał, że IL-6 pobudza proliferację ludzkich KC i reorganizację cytoszkieletu keratynowego w hodowli [57]. W kolejnej publikacji dotyczącej IL-6 Badache i wsp. wykazali, że indukcja MAPK przez tę cytokinę w dużej mierze zależy od EGF [10]. Widoczna jest więc ogromna współzależność funkcjonalna cytokin i czynników wzrostu.

Czynnikiem pobudzającym syntezę i aktywację cytokin może być antygen bakteryjny. W przypadku TNF- α Aufiero i wsp. wykazali, że jego ekspresja jest indukowana przez *Staphylococcus aureus*, a sama infekcja przyczynia się do indukcji TNFR1 [8]. Ezechuk i wsp. dowiedli, że toksyny oraz białko A z tej samej bakterii powodują uwalnianie TNF- α przez KC [32]. Bashir i wsp. podkreślili w swoich pracach wzrost ekspresji mRNA dla TNF- α w KC po indukcji IL-1 i TNF- α [12, 13]. Badania Fransson i wsp. wskazały na brak wpływu TNF- α na proliferację i różnicowanie KC w zdrowej i łuszczycowej skórze [38]. Danych tych nie potwierdziły zarówno moje obserwacje, z których wynika, że po neutralizacji TNF- α dochodzi do spadku procenta komórek mitotycznych, jak i prace Griffits i wsp., Kondo i wsp.

oraz Uyemura i wsp. [50, 69, 134]. Badania Myers i wsp. potwierdziły hipotezę, że zmiany morfologiczne i aktywacja komórek progenitorowych są uzależnione od ekspresji cytokin i czynników wzrostu, głównie: IL-1 β , IL-6, TGF- α , TGF- β i KGF [100]. W pracy Cheng i wsp. wykazano wpływ KGF na wzrost ekspresji białka p63 w KC, które pobudza ich proliferację poprzez hamowanie transkrypcji p21 [20]. Z kolei Andreadis i wsp. wykazali, że KGF powoduje wzrost ekspresji Ki67 w warstwie podstawnej [5]. Indukuje on także ekspresję integrzyn $\alpha 5\beta 1$ oraz hamuje ekspresję cytokeratyny 10 i transglutaminazy. Badania Koria i wsp. potwierdziły wpływ KGF na ekspresję integrzyn $\alpha 5\beta 1$ [71]. Ponadto, KGF opóźnia proces różnicowania KC. W pracy Meng i wsp. wykazano, że TGF- β promuje adhezję do fibronektyny i migrację KC poprzez regulację ekspresji genów dla integrzyn [94].

Moje wyniki potwierdziły obserwację Leivo i wsp., iż TGF- β ma właściwości antyproliferacyjne i pobudza różnicowanie KC w hodowli [81]. Gandarillas i wsp. także potwierdzili, że TGF- β hamuje proliferację KC poprzez obniżenie ekspresji c-Myc, wprowadzając komórki na drogę różnicowania [44]. W moich badaniach, po neutralizacji TGF- β w PT/L komórek zróżnicowanych z warstwy podstawnej było mniej, przy większej liczbie zróżnicowanych KC z warstwy kolczystej.

Blokowanie receptorów KC dla cytokin i czynników wzrostu spowodowało w moich badaniach spadek liczby hodowanych KC we wszystkich badanych przypadkach. Największą różnicę odnotowałam po zablokowaniu receptora dla IL-6.

Groves i wsp. wykazali, że odpowiedź KC na IL-1 może być regulowana poziomem ekspresji receptora IL-1R, zatem odpowiedź KC na IL-1 może być regulowana nie tylko zmiennym poziomem liganadu, ale także zmienną ekspresją powierzchniowego receptora [53]. Wg Leivo i wsp. w zdrowej skórze TGF β R I i TGF β R II są wyrażane w warstwie podstawnej oraz w warstwie kolczystej [81], a ich ekspresja może być indukowana przez IL-6 [86]. W pracy Luckett-Chastain i wsp. autorzy wskazali, że IL-6 ma zdolność do modulacji ekspresji TGF- β i TGF- β R w skórze [86]. Obserwacja ta wskazała na rolę TGF- β i IL-6 w stanach patologicznych związanych z włóknieniem.

KGFR wg Finch i wsp. jest zlokalizowany w warstwie podstawnej [34]. Ekspresja receptora dla TNF- α jest regulowana przez TNF- α . Trefzer i wsp. wykazali, że stymulacja TNF- α po początkowym obniżeniu ekspresji receptora ostatecznie powodowała wzrost jego ekspresji [133]. W moich badaniach blokowanie receptorów dla IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz KGF przy użyciu przeciwciał monoklonalnych przyniosło statystycznie istotny spadek

procenta dzielących się KC. Wyniki te były podobne do tych otrzymanych po neutralizacji cytokin i czynników wzrostu w PT/L. Różnica ta była największa po zablokowaniu receptora dla KGF. Natomiast po zablokowaniu receptora dla TGF- β nie zaobserwowałam żadnej różnicy. Blokowanie receptorów dla IL-1 β , IL-6 oraz TNF- α miało także wpływ na różnicowanie KC z warstwy podstawnej. W przypadku neutralizacji TGF- β liczba zróżnicowanych KC z warstwy podstawnej była wyższa niż bez blokowania receptorów.

Po hodowli w PT/L, procent KC wyrażających CK6 był najwyższy po hodowli w PT/L w porównaniu do KC po hodowli w standardowym medium oraz 20 % surowicy. CK 6 jest wyrażana przez proliferujące KC. Jej wysoka w porównaniu do kontroli ekspresja, potwierdza wcześniejsze obserwacje dotyczące pobudzającego wpływu PT/L na KC. Ponadto zaobserwowałam wzrost procenta KC wyrażających CK16 oraz CK17 w porównaniu do hodowli w medium kontrolnym oraz w stosunku do hodowli w 20 % surowicy. Obie cytokeratyny charakteryzują także KC w stanie aktywacji. Wyniki te korelowały ze wzrostem procenta komórek dzielących się oraz KC z warstwy podstawnej 1.

Ekspresja CK10, CK14, filagryny i inwolukryny była niższa w przypadku KC hodowanych w PT/L, w porównaniu do KC po hodowli w medium RPMI. CK10 jest wyrażana przez KC z wyższych warstw naskórka, które są w trakcie procesu różnicowania. Filagryna i inwolukryna są wyrażane przez dojrzałe, zróżnicowane KC. Ich niższa ekspresja po hodowli w PT/L w porównaniu do standardowego medium wskazuje dodatkowo, że PT/L działa hamująco na proces różnicowania.

Koch i wsp. w swojej pracy zaproponowali koncepcję, że keratyny mogą wpływać na proliferację KC [67]. Badania Fuchs i wsp. dowiodły, że ekspresja CK10 zapobiega progresji cyklu komórkowego KC z warstwy podstawnej [39]. Wykazano także, że ekspresja CK16 może przywracać zatrzymany przez CK10 cykl komórkowy [122]. Przeprowadzone badania wyłoniły sekwencję zdarzeń, w której cytokeratyny wyrażane przez komórki TA indukują ekspresję CK10, która z kolei hamuje progresję cyklu komórkowego i kieruje komórki na drogę różnicowania. W pracy Santos i wsp. wykazano, że ekspresja tej cytokeratyny jest znacznie obniżona w sytuacji, gdy dochodzi do hiperprolifracji, jak np. w nowotworach [129]. W tej samej pracy autorzy zaproponowali mechanizm, w którym CK10 przyczynia się do wytwarzania TNF- α , który ma wpływ na ekspresję genów dla IL-1 oraz IL-6 [129].

Wśród genów indukowanych przez IL-1, są geny dla CK6 oraz CK16 [68]. Praca Liu Wei i wsp. wykazała wpływ IL-1 β na wzrost wyrażania CK16, CK17 oraz β -integryny, dzięki

neutralizacji IL-1 β . Badaczka zasugerowała, że być może IL-1 β powoduje wzrost ekspresji CK16 i CK17 poprzez IL-6, która jest indukowana przez IL-1 β [138]. W pracy Krueger i wsp. wykazano, że IL-6 pobudza proliferację KC *in vitro* [72]. Jej wytwarzanie jest ściśle skorelowane z ekspresją i syntezą CK6 i CK16 [57]. W pracy Komine i wsp. wykazano, że TNF- α indukuje ekspresję CK6 na poziomie transkrypcji [68]. Badania nad bardzo wysokim stężeniem TGF- β wykazały, że jego wpływ na ekspresję CK1, CK10 oraz filagryny może być hamujący, jednocześnie może wzmacniać ekspresję CK6 i CK16 [89].

Cytowane badania potwierdziły moje obserwacje, iż kinetyka proliferacji była odwrotnie proporcjonalna do różnicowania. Przedstawione dane z literatury obrazują wpływ poszczególnych cytokin i czynników wzrostu na KC w hodowli *in vitro* w modelu, w którym wzbogacano media poszczególnymi cytokinami. W zastosowanym przeze mnie naturalnym modelu, odzwierciedlającym warunki *in vivo*, wszystkie cytokiny i czynniki wzrostu były w proporcjach (stężeniach), jak w PT/L zastoinowej lub normalnej. Wszystkie one mogą mieć addytywne, jak i przeciwstawne właściwości. Hodowla KC w PT/L daje więc głębszy wgląd w procesy zachodzące *in vivo*. Uzyskane obserwacje wskazują na funkcjonalną współzależność białek regulujących proliferację i dojrzewanie KC, zarówno w odpowiedzi na sygnały antygenowe z zewnątrz, jak i na stałe, ewolucyjnie wytworzone usuwanie powierzchniowych warstw KC. Aby ten wgląd był jeszcze szerszy niezbędne jest badanie także innych cytokin i czynników wzrostu, które są obecne w płynie tkankowym i limfie.

9 WNIOSKI

1. Płyn tkankowy/limfa zwiększały proliferację keratynocytów.
2. Cytokinami i czynnikami wzrostu odpowiedzialnymi za podwyższoną proliferację keratynocytów oraz ograniczenie procesu ich różnicowania były: IL-1 β , IL-6, TNF- α i KGF. Ich neutralizacja oraz blokowanie receptorów na KC potwierdziły tą obserwację. Nie wykazywał takich właściwości TGF- β .
3. Zwiększonej proliferacji towarzyszyła podwyższona ekspresja markerów tzw. komórek macierzystych p63 i CD29.
4. Zwiększona proliferacja/aktywacja była wyrażona przez podwyższoną ekspresję markerów Ki67, PCNA, CK6, CK16 i CK17 i zmniejszoną ekspresję markerów różnicowania CK10, CK14, filagryny i inwolukryny.
5. Brak różnic w poziomie proliferacji pomiędzy keratynocytami z kończyn z zastojem limfy i normalnych świadczył o tym, iż tempo proliferacji i różnicowania nie było wynikiem zmian patologicznych w samej komórce, a głównie wpływem samych cytokin/czynników wzrostu.
6. Uzyskane obserwacje dają podstawę do farmakologicznych prób miejscowej inaktywacji badanych cytokin i czynników wzrostu dla zahamowania patologicznego procesu rozrostu keratynocytów u człowieka.

10 PIŚMIENICTWO

1. Aberg KM, Man MQ, Gallo RL, Ganz T, Crumrine D, Brown BE, Choi EH, Kim DK, Schroder JM, Feingold KR, Elias PM. Co-Regulation and interdependence of the mammalian epidermal permeability antimicrobial barriers. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(4):917-25.
2. Aiba-Kojima E, Tsuno NH, Inoue K, Matsumoto D, Shigeura T, Sato T, Suga H, Kato H, Nagase T, Gonda K, Koshima I, Takahashi K, Yoshimura K. Characterization of wound drainage fluids as a source of soluble factors associated with wound healing: comparison with platelet - rich plasma and potential use in cell culture. *Wound Repair Regen.* 2007; 15(4):511-20.
3. Alitalo K, Kuismanen E, Myllylä R, Kiistala U, Asko-Seljavaara S, Vaheri A. Extracellular matrix proteins of human epidermal keratinocytes and feeder 3T3 cells. *J Cell Biol.* 1982; 94(3):497-505.
4. Amjad SB, Carachi R, Edward M. Keratinocyte regulation of TGF- β and connective tissue growth factor expression: a role in suppression of scar tissue formation. *Wound Repair Regen.* 2007; 15(5):748-55.
5. Andreadis ST, Hamoen KE, Yarmush ML, Morgan JR. Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system. *FASEB J.* 2001; 15 (6):898-906.
6. Arnold I, Watt FM. c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny. *Curr Biol.* 2001; 17; 11(8):558-68.
7. auf dem Keller U, Huber M, Beyer TA, Kümin A, Siemes C, Braun S, Bugnon P, Mitropoulos V, Johnson DA, Johnson JA, Hohl D, Werner S. Nrf transcription factors in keratinocytes are essential for skin tumor prevention but not for wound healing. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(10):3773-84.
8. Aufiero B, Guo M, Young C, Duanmu Z, Talwar H, Lee HK, Murakawa GJ. *Staphylococcus aureus* induces the expression of tumor necrosis factor-alpha in primary human keratinocytes. *Int J Dermatol.* 2007; 46(7):687-94.
9. Auxenfans C, Thépot A, Justin V, Hautefeuille A, Shahabeddin L, Damour O, Hainaut P. Characterisation of human fibroblasts as keratinocyte feeder layer using p63 isoforms status. *Biomed Mater Eng.* 2009; 19(4-5):365-72.

10. Badache A, Hynes NE. Interleukin 6 inhibits proliferation and, in cooperation with an epidermal growth factor receptor autocrine loop, increases migration of T47D breast cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61(1):383-91.
11. Barrandon Y, Greek H. Cell size as a determinant of the clone – forming ability of human keratinocytes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1985; 82 (16): 5390-4.
12. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. TNF-alpha production in the skin. *Arch Dermatol Res.* 2009; 301(1):87-91.
13. Bashir MM, Sharma MR, Werth VP. UVB and proinflammatory cytokines synergistically activate TNF-alpha production in keratinocytes through enhanced gene transcription. *J Invest Dermatol.* 2009; 129(4):994-1001.
14. Bhavsar AP, Guttman JA, Finlay BB. Manipulation of host – cell pathways by bacterial pathogens. *Nature.* 2007; 449(7164):827-34.
15. Blanton RA, Kupper TS, McDougall JK, Dower S. Regulation of interleukin 1 and its receptor in human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 1989; 86(4):1273-7.
16. Breuhahn K, Mann A, Müller G, Wilhelmi A, Schirmacher P, Enk A, Blessing M. Epidermal overexpression of Granulocyte – Macrophage Colony - Stimulating Factor induces both keratinocyte proliferation and apoptosis. *Cell Growth Differ.* 2000; 11(2):111-21.
17. Bruckner-Tuderman L, Winberg JO, Anton-Lamprecht I, Schnyder UW, Gedde-Dahl T Jr. Anchoring fibrils, collagen VII, and neutral metalloproteases in recessive dystrophic epidermolysis bullosa inversa. *J Invest Dermatol.* 1992; 99(5):550-8.
18. Burgeson RE. Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1993; 101(3):252-5.
19. Chedid M, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA, Regulation of keratinocyte growth factor gene expression by interleukin 1. *J Biol Chem.* 1994; 269(14):10753-7.
20. Cheng CC, Wang DY, Kao MH, Chen JK., The growth-promoting effect of KGF on limbal epithelial cells is mediated by upregulation of DeltaNp63alpha through the p38 pathway. *J Cell Sci.* 2009; 122(24):4473-80.
21. Clark RA. Fibronectin matrix deposition and fibronectin receptor expression in healing and normal skin. *J Invest Dermatol.* 1990; 94(6):128S-134S.
22. Coffey RJ Jr, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, Pittelkow MR. Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *Nature.* 1987; 328(6133):817-20.
23. Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* 2002; 299(1-2):35-55.

24. Debets R, Hegmans JP, Croughs P, Troost RJ, Prins JB, Benner R, Prens EP. The IL-1 system in psoriatic skin: IL-1 antagonist sphere of influence in lesional psoriatic epidermis. *J Immunol.* 1997; 158(6):2955-63.
25. Dlugosz AA, Cheng C, Denning MF, Dempsey PJ, Coffey RJ Jr, Yuspa SH. Keratinocyte growth factor receptor ligands induce transforming growth factor alpha expression and activate the epidermal growth factor receptor signaling pathway in cultured epidermal keratinocytes. *Cell Growth Differ.* 1995; 5(12):1283-92.
26. Domaszewska A, Olszewski WL. Dermal keratinocytes-protective mechanical, biochemical and immune functions related to grafting. *Ann Transplant.* 2006; 11(4):45 - 52.
27. Domaszewska-Szostek A, Zaleska M, Olszewski WL. The influence of tissue fluid/lymph cytokines and growth factors on human keratinocyte proliferation and differentiation. *Transplant Proc.* 2009; 41(8):3269-71.
28. Drake RE, Teague RA, Gabel JC, Effect of sheep plasma and lymph on fibroblast proliferation. *Am J Physiol.* 1998; 274:561-3.
29. Drukała J. Cell cocultures in skin reconstruction for clinical applications. *Post Biol Kom.* 2001; 28 (16): 97-110.
30. Eckert RL. Structure, Function, and Differentiation of the Keratinocyte. *Physiol Rev.* 1989, 69(4):1316-46.
31. Eller MS, Yaar M, Ostrom K, Harkness DD, Gilchrist BA. A role for interleukin-1 in epidermal differentiation: regulation by expression of functional versus decoy receptors. *J Cell Sci.* 1995; 108 (8):2741-6.
32. Ezechuk YV, Leung DY, Middleton MH, Bina P, Reiser R, Norris DA, Staphylococcal toxins and protein A differentially induce cytotoxicity and release of tumor necrosis factor- α from human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1996; 107 (4): 603-9.
33. Feliciani C, Gupta AK, Saucier DN. Keratinocytes and cytokine /growth factors. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7 (4): 300-318.
34. Finch PW, Murphy F, Cardinale I, Krueger JG. Altered expression of keratinocyte growth factor and its receptor in psoriasis. *Am J Pathol.* 1997; 151(6):1619-28.
35. Florin L, Maas-Szabowski N, Werner S, Szabowski A, Angel P. Increased keratinocyte proliferation by JUN - dependent expression of PTN and SDF in fibroblasts, *J Cell Sci.* 2005; 118 (9):1981-1989.

36. Forsberg S, Ostman A, Rollman O, Regeneration of human epidermis on acellular dermmis is impeded by small – molecule inhibitors of EGF receptor tyrosine kinase. Arch Dermatol Res. 2008; 300(9):505-16.
37. Fournier B, Philpott DJ Recognition of *Staphylococcus aureus* by innate immune system. Clin Microbiol Rev. 2005; 18(3):521-40.
38. Fransson J. Tumour Necrosis Factor- α Does Not Influence Proliferation and Differentiation of Healthy and Psoriatic Keratinocytes in a Skin-equivalent Model. Acta Derm Venereol. 2000; 80 (6):416 - 420.
39. Fuchs E, Green H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell. 1980; 19(4):1033-42.
40. Fuchs E, Raghavan S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. Nat Rev Genet. 2002; 3(3):199-209.
41. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors:stem cells and their niche. Cell. 2004; 19;116(6):769-78.
42. Galkowska H, Olszewski WL, Wojewódzka U, Mijal J, Filipiuk E. Expression of apoptosis and cell cycle-related proteins in epidermis of venous leg and diabetic foot ulcers. Surgery. 2003; 134 (2): 213-20.
43. Galkowska H, Wojewódzka U, Olszewski WL. Chemokines, cytokines, and growth factors in keratinocytes and dermal endothelial cells in the margin of chronic diabetic foot ulcers. Wound Repair Regen. 2006; 14(5):558-65.
44. Gandarillas A, Watt FM. c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. Genes Dev. 1997; 11 (21): 2869-2882.
45. Gnedeva KIu, Chermnykh ES, Voroteliak EA, Vasil'ev AV, Terskikh VV. Effect of growth factors on morphogenesis of human keratinocytes in vitro. Izv Akad Nauk Ser Biol. 2009; (3):368-72.
46. Gniadecki R. Regulation of Keratinocyte Proliferation, Gen Pharmac.1998, 30(5) 619-622.
47. Green KJ, Gaudry CA. Are desmosomes more than tethers for intermediate filaments? Nat Rev Mol Cell Biol. 2000; 1(3):208-16.
48. Grewe M, Gyufko K, Budnik A, Ruzicka T, Olaizola-Horn S, Berneburg M, Interleukin-1 receptors type I and type II are differentially regulated in human keratinocytes by ultraviolet B radiation. J Invest Dermatol. 1996; 107(6):865-70.

49. Griffiths CE, Nickoloff BJ. Keratinocyte intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression precedes dermal T lymphocytic infiltration in allergic contact dermatitis (Rhus dermatitis). *Am J Pathol.* 1989; 135(6):1045-53.
50. Griffiths TW, Griffiths CE, Voorhees JJ. Immunopathogenesis and immunotherapy of psoriasis. *Dermatol Clin.* 1995; 13(4):739-49.
51. Grinnell F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation.. *J Cell Sci.* 1992;101:1-5.
52. Grone A. Keratinocytes and cytokines. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 88(1-2):1-12.
53. Groves RW, Sherman L, Mizutani H, Dower SK, Kupper TS. Detection of interleukin-1 receptors in human epidermis. Induction of the type II receptor after organ culture and in psoriasis. *Am J Pathol.* 1994; 145(5):1048-56.
54. Grzybowski J, Zaborowski P. Teoretyczne i praktyczne podstawy infekcjologii. 2007; Instytut Problemów Ochrony Zdrowia.
55. Guo M, Kim LT, Akiyama SK, Gralnick HR, Yamada KM, Grinnell F. Altered processing of integrin receptors during keratinocyte activation. *Exp Cell Res.* 1991; 195(2):315-22.
56. Haase I, Hobbs RM, Romero MR, Broad S, Watt FM. A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. *J Clin Invest.* 2001; 108(4):527-36.
57. Hernández-Quintero M, Kuri-Harcuch W, González Robles A, Castro-Muñozledo F. Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res.* 2006; 325(1):77-90.
58. Hoffman DL, Salter JD, Brookes PS. Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292(1):H101-8.
59. Ito A, Takizawa Y, Masashige S, Honda H, Hata K, Ueda M, Kuno N, Itakura A, Kobayashi T. Proliferation and stratification of keratinocyte on cultured amniotic epithelial cells for tissue engineering. *J Biosci Bioeng.* 2003; 95(6):589-93.
60. Jamora C, Fuchs E. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol.* 2002; 4(4):101-8.
61. Jiang CK, Magnaldo T, Ohtsuki M, Freedberg IM, Bernerd F, Blumenberg M. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce

- the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(14):6786-90.
62. Jiang CK, Tomić-Canić M, Lucas DJ, Simon M, Blumenberg M. TGF beta promotes the basal phenotype of epidermal keratinocytes: transcriptional induction of K5 and K14 keratin genes. *Growth Factors*. 1995; 12(2):87-97.
63. Kanda N, Watanabe S. IL-12, IL-23, and IL-27 enhance human β -defensin-2 production in human keratinocytes. *Eur J Immunol*. 2008; 38(5): 1287-96.
64. Kapuśniak V. Keratinization of epidermal cells. *Medycyna Wet*; 2006, 62 (1).
65. Kaur P. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J Invest Dermatol*. 2006; 126(7):1450-8.
66. Kim S, Kim SH. Antagonistic effect of EGF on FAK phosphorylation/dephosphorylation in a cell. *Cell Biochem Funct*. 2008; 26(5):539-47.
67. Koch PJ, Roop DR. The role of keratins in epidermal development and homeostasis-going beyond the obvious. *J Invest Dermatol*. 2004; 123(5).
68. Komine M, Rao LS, Freedberg IM, Simon M, Milisavljevic V, Blumenberg M. Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2001; 116(2):330-8.
69. Komine M, Rao LS, Kaneko T, Tomić-Canić M, Tamaki K, Freedberg IM, Blumenberg M. Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6 keratin synthesis through a transcriptional complex containing NFkappa B and C/EBPbeta. *J Biol Chem*. 2000; 275(41):32077-88.
70. Kondo S. The roles of keratinocyte-derived cytokines in the epidermis and their possible responses to UVA-irradiation. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 1999; 4(2):177-83.
71. Koria P, Andreadis ST. KGF promotes integrin alpha5 expression through CCAAT/enhancer-binding protein-beta. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 293(3):C1020-31.
72. Krueger J, Ray A, Tamm I, Sehgal PB. Expression and function of interleukin-6 in epithelial cells. *J Cell Biochem*. 1991; 45(4):327-34.
73. Krutmann J, Trefzer U. Modulation of the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in human keratinocytes by ultraviolet (UV) radiation. *Springer Semin Immunopathol*. 1992; 13(3-4):333-44.

74. Kubo M, Norris DA, Howell SE, Ryan SR, Clark RA. Human keratinocytes synthesize, secrete, and deposit fibronectin in the pericellular matrix. *J Invest Dermatol.* 1984; 82(6):580-6.
75. Kupper TS. The activated keratinocyte: a model for inducible cytokine production by non-bone marrow-derived cells in cutaneous inflammatory and immune responses. *J Invest Dermatol.* 1990; 94 (6):146S-150S.
76. Kutsch CL, Norris DA, Arend WP. Tumor necrosis factor-alpha induces interleukin-1 alpha and interleukin-1 receptor antagonist production by cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1993; 101(1):79-85.
77. Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltère P, Zobiri O, Gidrol X, Waksman G, Martin MT. 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(4):965-74.
78. Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(25):13473-5.
79. Leigh IM, Lane B, Watt FM. *The keratinocyte handbook.* 1994; Cambridge University 1994.
80. Leigh IM, Navsaria H, Purkis PE, McKay IA, Bowden PE, Riddle PN. Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *Br J Dermatol.* 1995; 133(4):501-11.
81. Leivo T, Leivo I, Kariniemi AL, Keski-Oja J, Virtanen I. Down-regulation of transforming growth factor-beta receptors I and II is seen in lesional but not non-lesional psoriatic epidermis. *Br J Dermatol.* 1998; 138(1):57-62.
82. Levick J R. Revision of the Starling principle: new views of tissue fluid balance. *J Physiol.* 2004; 557(3):704-704.
83. Levy V, Lindon C, Zheng Y, Harfe BD, Morgan BA. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J.* 2007; 21(7):1358-66.
84. Li Y, Fan J, Chen M, Li W, Woodley DT. Transforming Growth Factor-Alpha: A Major Human Serum Factor that Promotes Human Keratinocyte Migration. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(9): 2096-2105.
85. Lisby S, Ralfkiaer E, Rothlein R, Vejlsgaard GL. Intercellular adhesion molecule-I (ICAM-I) expression correlated to inflammation. *Br J Dermatol.* 1989; 120(4):479-84.

86. Lockett-Chastain LR, Gallucci RM. Interleukin (IL)-6 modulates transforming growth factor-beta expression in skin and dermal fibroblasts from IL-6-deficient mice. *Br J Dermatol.* 2009; 161(2):237-48.
87. Ma S, Rao L, Freedberg IM, Blumenberg M. Transcriptional control of CK5, CK6, CK14, and CK17 keratin genes by AP-1 and NF-kappaB family members. *Gene Expr.* 1997; 6(6):361-70.
88. Maas-Szabowski N, Fusenig NE. Interleukin-1-induced growth factor expression in postmitotic and resting fibroblasts. *J Invest Dermatol.* 1996; 107(6):849-55.
89. Man XY, Yang XH, Cai SQ, Bu ZY, Zheng M. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on keratinocytes in psoriasis: regulated by calcium independent of VEGF. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(2): 649-660.
90. Mann A, Breuhahn K, Schimacher 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(6): 1382-90.
91. Marinkovich MP, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE. The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J Cell Biol.* 1992; 119(3):695-703.
92. Marionnet C, Pierrard C, Vioux-Chagnoleau C, Sok J, Asselineau D, Bernerd F, Interaction between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of demal epidermal junctions in a model of reconstructed skin. *J Invest Dermatol* 2006; (126), 971-979.
93. Mauviel A, Temime N, Charron D, Loyau G, Pujol JP. Induction of interleukin-1 beta production in human dermal fibroblasts by interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha. Involvement of protein kinase-dependent and adenylate cyclase-dependent regulatory pathways. *J Cell Biochem.* 1991; 47(2):174-83.
94. Meng F, Cheng X, Yang L, Hou N, Yang X, Meng A. Accelerated re-epithelialization in Dpr2-deficient mice is associated with enhanced response to TGFbeta signaling. *J Cell Sci.* 2008; 121(17):2904-12.
95. Menzies BE, Kenoyer A. *Staphylococcus aureus* infection of epidermal keratinocytes promotes expression of innate antimicrobial peptides. *Infect immune* 2005; 73(8): 5241-5244.

96. Miller LS, Modlin RL. Human keratinocyte Toll-like receptors promote distinct immune responses. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(2):262-3.
97. Miller LS. Toll-like receptors in skin. *Adv Dermatol.* 2008;24:71-87.
98. Morasso MI, Tomic-Canic M.. Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol Cell.* 2005; 97(3):173-83.
99. Muller E J, Williamson L, Kolly C, Suter MM. Outside–in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? *J Invest Dermatol.* 2008; 128(3):501-16.
100. Myers SR, Leigh IM, Navsaria H. Epidermal repair results from activation of follicular and epidermal progenitor keratinocytes mediated by a growth factor cascade. *Wound Repair Regen.* 2007; 15(5):693-701.
101. Nickoloff BJ, Turka LA. Keratinocytes: key immunocytes of the integument. *Am J Pathol.* 1993; 143(2):325-31.
102. Nizet V, Ohtake T, Lauth X, Trowbridge J, Rudisill J, Dorschner RA, Pestonjamas V, Piraino J, Huttner K, Gallo RL. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature.* 2001; 414 (6862): 454-7.
103. Nizet V. Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens, *Curr Issues Mol Biol.* 2006; 8(1):11-26.
104. O'Keefe EJ, Woodley DT, Falk RJ, Gammon WR, Briggaman RA. Production of fibronectin by epithelium in a skin equivalent. *J Invest Dermatol.* 1987; 88(5):634-9.
105. Olszewski WL, Engeset A, Łukasiewicz H. Immunoglobulins, complement and lysozyme in leg lymph of normal men. *Scand J Clin Lab Invest.* 1977; 37(8):669-74.
106. Olszewski WL, Engeset A, Romaniuk A, Grzelak I, Ziółkowska A. Immune cells in peripheral lymph and skin of patients with obstructive lymphedema. *Lymphology.* 1990; 23(1):23-33.
107. Olszewski WL, Engeset A, Sokołowski J. Lymph flow and protein in the normal male leg during lying, getting up, and walking. *Lymphology.* 1977; 10(3):178-83.
108. Olszewski WL, Engeset A. Capillary transport of immunoglobulins and complement proteins to the interstitial fluid and lymph. *Arch Immunol Ther Exp.* 1978; 26(1-6):57-65.
109. Olszewski WL, Engeset A. Immune proteins, enzymes and electrolytes in human peripheral lymph. *Lymphology.* 1978; 11(4):156-64.

110. Olszewski WL, Grzelak I, Ziółkowska A, Engeset A. Epidermal cell thymocyte activity factor/interleukin 1 (ETAF/IL)-like activity in lymph drained from normal human skin. *Lymphology*. 1988; 21(2):118-23.
111. Olszewski WL, Grzelak I, Ziółkowska A, Engeset A. Immune cell traffic from blood through the normal human skin to lymphatics. *Clin Dermatol*. 1995; 13(5):473-83.
112. Olszewski WL, Jamal S, Łukomska B, Manokaran G, Grzelak I. Immune proteins in peripheral tissue fluid-lymph in patients with filarial lymphedema of the lower limbs. *Lymphology*. 1992; 25(4):166-71.
113. Olszewski WL, Jamal S, Manokaran G, Łukomska B, Kubicka U. Skin changes in filarial and non-filarial lymphoedema of the lower extremities. *Trop Med Parasitol*. 1993; 44(1):40-4.
114. Olszewski WL, Loe K, Engeset A. Immune proteins and other biochemical constituents of peripheral lymph in patients with malignancy and postirradiation lymphedema. *Lymphology*. 1978; 11(4):174-80.
115. Olszewski WL. *Lymph stasis, Pathophysiology, diagnosis, and treatment*. 1991. CRC Press.
116. Olszewski WL. Pathological aspect of lymphedema of human limbs: lymph protein composition. *Lymphat Res Biol*. 2003; 1(3):235-43.
117. Olszewski WL, Pazdur J, Kubasiewicz E, Zaleska M, Cooke CJ, Miller NE. Lymph draining from foot joints in rheumatoid arthritis provides insight into local cytokine and chemokine production and transport to lymph nodes. *Arthritis Rheum*. 2001; 44(3):541-9.
118. Olszewski WL. Collection and physiological measurements of peripheral lymph and interstitial fluid in man. *Lymphology*. 1977; 10(2):137-45.
119. Olszewski WL. Immune proteins, cell interactions and immunoregulatory hormones: lymph versus blood. *Lymphology*. 1987; 20(4):239-43.
120. Olszewski WL. Lymphatics, lymph and lymphoid cells: an integrated immune system. *Eur Surg Res*. 1986; 18(3-4):264-70.
121. Olszewski WL. The lymphatic system in body homeostasis: physiological conditions. *Lymphat Res Biol*. 2003; 1(1):11-21.
122. Paramio JM. A role for phosphorylation in the dynamics of keratin intermediate filaments. *Eur J Cell Biol*. 1999; 78(1):33-43.
123. Pastore S, Mascia F, Mariani V, Girolomoni G. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J Invest Dermatol*. 2008; 128(6):1365-74.

124. Piśuła M, Trzonkowski P. Biology of epidermal stem cells: impact on medicine. *Postepy Hig Med Dosw.* 2009; 15;63:449-56.
125. Rauschmayr T, Groves RW, Kupper TS. Keratinocyte expression of the type 2 interleukin 1 receptor mediates local and specific inhibition of interleukin 1-mediated inflammation. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94(11):5814-9.
126. Rilla K, Lammi MJ, Sironen R, Törrönen K, Luukkonen M, Hascall VC, Midura RJ, Hyttinen M, Pelkonen J, Tammi M, Tammi R. Changed lamellipodial extension, adhesion plaques and migration in epidermal keratinocytes containing constitutively expressed sense and antisense hyaluronan synthase 2 (Has2) genes. *J Cell Sci.* 2002; 115(18):3633-43.
127. Rubin H, Nomura T. Use of lymph in cell culture to model hormonal and nutritional constraints on tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 1987; 47(18):4924-31.
128. Ryyänen J, Sollberg S, Olsen DR, Uitto J. Transforming growth factor-beta up-regulates type VII collagen gene expression in normal and transformed epidermal keratinocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 180(2):673-80.
129. Santos M, Paramio JM, Bravo A, Ramirez A, Jorcano JL. The expression of keratin 10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2002; 277(21):19122-30.
130. Schaubert J, Gallo RL. Expanding the roles of antimicrobial peptides in skin: alarming and arming keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2007; 127(3):594-604.
131. Teumer J, Greek Y. Divergent evolution of part of the involucrin gene in the hominoids: unique intragenic duplication in the gorilla and human. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1989; 86: 1283-6.
132. Tomic-Canic M, Komine M, Freedberg IM, Blumenberg M. Epidermal signal transduction and transcription factor activation in activated keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 1998; 17(3):167-81.
133. Trefzer U, Brockhaus M, Loetscher H, Parlow F, Kapp A, Schöpf E, Krutmann J. 55-kd tumor necrosis factor receptor is expressed by human keratinocytes and plays a pivotal role in regulation of human keratinocyte ICAM-1 expression. *J Invest Dermatol.* 1991; 97(5):911-6.
134. Uyemura K, Yamamura M, Fivenson DF, Modlin RL, Nickoloff BJ. The cytokine network in lesional and lesion-free psoriatic skin is characterized by a T-helper type 1 cell-mediated response. *J Invest Dermatol.* 1993;101(5):701-5.

135. Vollberg TM Sr, George MD, Jetten AM. Induction of extracellular matrix gene expression in normal human keratinocytes by transforming growth factor beta is altered by cellular differentiation. *Exp Cell Res.* 1991;193(1):93-100.
136. Wan YS, Wang ZQ, Voorhees J, Fisher G. EGF receptor crosstalks with cytokine receptors leading to the activation of c-Jun kinase in response to UV irradiation in human keratinocytes. *Cell Signal.* 2001;13(2):139-44.
137. Watt FM. Stem cell fate and patterning in mammalian epidermis. *Curr Opin Genet Dev.* 2001; 11(4):410-7.
138. Wei L, Debets R, Hegmans JJ, Benner R, Prens EP. IL-1 beta and IFN-gamma induce the regenerative epidermal phenotype of psoriasis in the transwell skin organ culture system. IFN-gamma up-regulates the expression of keratin 17 and keratinocyte transglutaminase via endogenous IL-1 production. *J Pathol.* 1999; 187(3):358-64.
139. Weinberg WC, Denning MF. p21Waf1 control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13(6):453-64.
140. Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83(3) : 835-70.
141. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte – fibroblast interaction in wound healing, *J Invest Dermatol* 2007; 172(5): 998-1008
142. Wessells NK. Differentiation of epidermis and epidermal derivatives. *N Engl J Med.* 1967; 277(1):21-33.
143. Wikner NE, Persichitte KA, Baskin JB, Nielsen LD, Clark RA. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin by human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 1988 ;91(3):207-12.
144. Wilke MK, Hsu BM, Wilke JJ, Pittelkow MR, Scott RE. Biologic mechanism for the regulation of normal human keratinocyte proliferation and differentiation. *Am J Pathol.* 1988; 131(1): 171–181.
145. Wilke MS, Furcht LT. Human keratinocytes adhere to a unique heparin-binding peptide sequence within the triple helical region of type IV collagen. *J Invest Dermatol.* 1990;95(3):264-70.
146. Yano S, Banno T, Walsh R, Blumenberg M. Transcriptional responses of human epidermal keratinocytes to cytokine interleukin-1. *J Cell Physiol.* 2008; 214(1):1-13.
147. Yano S, Banno T, Walsh R, Blumenberg M. Transcriptional responses of human epidermal keratinocytes to cytokine interleukin-1. *J Cell Physiol.* 2008; 214(1):1-13.

148. Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature*. 2008; 452 (7184):225-9.
149. Zhang L, Pelech SL, Mayrand D, Grenier D, Heino J, Uitto VJ, Bacterial heat shock protein-60 increases epithelial cell proliferation through the ERK1/2 MAP kinases, *Exp Cell Res*. 2001; 266(1):11-20.

11 STRESZCZENIE

Mechanizm proliferacji i różnicowania keratynocytów w zastoju limfatycznym kończyn dolnych – wpływ cytokin i czynników wzrostu płynu tkankowego/limfy

Jedną z częstszych chorób człowieka budzącą coraz większe zainteresowanie immunologów jest tzw. obrzęk limfatyczny kończyn i narządów. Według statystyk WHO liczba chorych z tego rodzaju patologią wynosi 300 milionów.

Obrzęk limfatyczny kończyn i narządów jest objawem zastoju płynu tkankowego i limfy w tkankach w następstwie uszkodzenia dróg odpływu do regionalnych węzłów chłonnych.

Układ limfatyczny, którego anatomia to przestrzeń międzykomórkowa, sieć naczyń limfatycznych, narządy limfoidalne oraz rozproszona tkanka chłonna, a także krążące komórki odpornościowe, sprawuje funkcję strażnika genetycznego „self” ustroju [120, 121]. Wszelkie sygnały obwodowe z tkanek, takie jak wniknięcie i rozpoznanie obcego antygeny (bakterie, wirusy, grzyby, cząstki nieorganiczne-ciało obce), jak i odsłonięte własne antygeny tkankowe i komórkowe (uraz, autoagresja) i wreszcie (allo- i ksenogeniczne) antygeny przeszczepu powodują natychmiastową odpowiedź komórkowo-humoralną tkanki limfoidalnej [111]. Masa antygeny wnikającego do naczyń limfatycznych, jego immunogenność i oporność na degradację odgrywają rolę w procesie zużycia i uszkodzenia układu limfatycznego. Następstwem uszkodzenia jest zastój w krążeniu płynu tkankowego i limfy, a więc klinicznie obrzęk oraz szereg zaburzeń funkcji komórkowych drenowanej tkanki. W przypadku skóry, w szczególności kończyn dochodzi do zmian funkcji keratynocytów oraz fibroblastów. Efektem tego jest hiperkeratoza (*hyperkeratosis*) i włóknienie (*fibrosis*). Mechanizm przebiegu tych procesów *in vivo* pozostaje niejasny, ponieważ uczestniczy w nim wiele współzależnych czynników komórkowych i humoralnych. Przedmiotem niniejszej pracy było badanie czynników humoralnych środowiska międzykomórkowego skóry (płynu tkankowego/limfy) na proliferację i różnicowanie keratynocytów skóry kończyn dolnych u chorych z zastojem limfy.

Keratynocyty (KC) są głównymi komórkami naskórka pełniące rolę bariery środowiskowej oddzielającej wewnątrz ustroju od otoczenia. Bariera ta pełni następujące funkcje: a) mechaniczną - chroniącą przed urazami głębokich tkanek, b) anty-penetracyjną dla mikroorganizmów oraz c) środowiskową dla bakterii kolonizujących naskórek, głównie mieszki włosowe oraz gruczoły łojowe i potowe.

KC podlegają stałemu procesowi proliferacji i różnicowania [30]. Sygnały regulujące te procesy pochodzą ze skóry właściwej (*dermis*), w tym z jej komórek mezenchymalnych,

a także z czynników humoralnych dostarczanych do naskórka drogą krwionośną [41]. Innym źródłem sygnałów jest mechaniczne uszkodzenie struktury naskórka oraz działanie antygeny bakteryjnego, wirusowego lub grzybiczego [1, 26]. Same KC wydzielają szereg czynników wzrostu i cytokin oraz peptydów antybakteryjnych działających w układzie autokrynnym [33, 103]. Szereg z tych czynników humoralnych dyfunduje do płynu tkankowego skóry właściwej i tkanki podskórnej, który po wpłynięciu do naczyń limfatycznych określany jest mianem limfy [115, 116].

Mechanizm regulacji proliferacji i różnicowania KC *in vivo* pod wpływem czynników wzrostu i cytokin jest u człowieka słabo poznany. Wynika to z ograniczonej wiedzy dotyczącej rodzaju i liczby czynników humoralnych zawartych w płynie tkankowym skóry. Niewiele wiadomo, w jaki sposób działają one na komórki macierzyste keratynocytów (o słabo dotychczas zdefiniowanym fenotypie) czy też na tzw. komórki namnażające się przejściowo (ang. transit amplifying cells, TA). Nie wiadomo także, która z cytokin lub jaka grupa cytokin i czynników wzrostu wpływa specyficznie na proces ich proliferacji i różnicowania. Niewielka jest też wiedza o tym, w jakich przyżyciowych warunkach KC warstwy podstawnej naskórka aktywnie wyrażają receptory dla cytokin i czynników wzrostu.

Wyjaśnienie tych zagadnień pozwoliłoby na opracowanie metod pobudzania lub hamowania proliferacji KC w warunkach klinicznych, np. w ranach lub hiperkeratozach czy też w obrzęku limfatycznym, którego integralną komponentą jest nadmierna proliferacja KC. Ponadto umożliwiłoby to efektywniejszą hodowlę KC *in vitro* dla celów transplantologicznych.

Powstaje zatem pytanie, które czynniki wzrostu i cytokiny znajdujące się w płynie tkankowym/ limfie skóry człowieka, pobudzają proliferację i różnicowanie KC, oraz które z komórek proliferujących mogą należeć do populacji o fenotypie uznanym obecnie za charakterystyczny dla komórek macierzystych naskórka. Aby proces ten mógł być obserwowany, niezbędny był naturalny model. Okazał się nim zastój PT/L w skórze i tkance podskórnej człowieka (obrzęk limfatyczny, ang. obstructive lymphedema), którego jednym z następstw jest nadmierna proliferacja KC. Przeniesienie procesu proliferacji i różnicowania KC do hodowli z zastosowaniem PT/L, pozwoliłoby na śledzenie procesu proliferacji i różnicowania oraz na wyciągnięcie wniosków o wartości klinicznej

Celem badań, stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej, była odpowiedź na pytania:

1. Jakie zmiany fenotypowe zachodzą w ludzkich keratynocytach z poszczególnych warstw naskórka w czasie hodowli w PT/L?

2. Czy zawarte w PT/L IL-1 β , IL-6, TNF- α , KGF i TGF- β mają wpływ na proliferację i różnicowanie keratynocytów?
3. Jaki wpływ ma PT/L na ekspresję markerów dla tzw. komórek macierzystych naskórka (p63 i CD29) ?
4. Jak PT/L wpływa na ekspresję markerów proliferacji/aktywacji keratynocytów, jak Ki67, PCNA, CK6, CK16, CK17 i markerów różnicowania, jak CK1, CK10, CK14, filagryny, inwolukryny?

Wyniki moich badań wykazały, że:

1. Przyrost całkowitej liczby KC w hodowli w PT/L był wyższy w porównaniu do hodowli w medium kontrolnym.
2. Po hodowli KC izolowanych ze skóry podudzia w PT/L obserwowano wyższy odsetek dzielących się KC oraz komórek z warstwy podstawnej 1, a także mniej komórek zróżnicowanych z warstwy podstawnej 2.
3. Odsetek KC wyrażających markery charakteryzujące tzw. macierzyste komórki naskórka p63 i CD29, a także markery proliferacji PCNA i Ki67 był znacznie wyższy po hodowli w PT/L w porównaniu do hodowli w medium.
4. Po neutralizacji IL-1 β , IL-6, TNF- α oraz KGF w PT/L, a także zablokowaniu receptorów dla tych cytokin i czynników wzrostu na KC, obserwowano spadek odsetka dzielących się KC i wzrost procenta komórek zróżnicowanych. Blokowanie TGF- β i jego receptorów nie miało statystycznie znamiennego wpływu na podziały i różnicowanie KC.
5. Po hodowli w PT/L stwierdzono wzrost odsetka aktywowanych KC wyrażających CK6, CK16 oraz CK17.
6. Ekspresja białek charakteryzujących dojrzałe KC, jak CK10, CK14, filagryna oraz inwolukryna była niższa po hodowli w PT/L.

W świetle uzyskanych wyników można wnioskować, że keratynocyty hodowane w płynie tkankowym/limfie proliferowały intensywniej niż w standardowym medium.

Zawarte w płynie tkankowym/limfie cytokiny i czynniki wzrostu, jak: IL-1 β , IL-6, TNF- α i KGF były odpowiedzialne za podwyższoną proliferację keratynocytów i ograniczenie procesu różnicowania. Wskazały na to: neutralizacja wymienionych cytokin oraz blokowanie ich receptorów na KC. Nie wykazywał takich właściwości TGF- β .

Ponadto, hodowla keratynocytów w płynie tkankowym/limfie powodowała zwiększoną ekspresję markerów tzw. komórek macierzystych p63 i CD29 oraz zwiększoną ekspresję

markerów proliferacji/aktywacji Ki67, PCNA, CK6, CK16 i CK17 i zmniejszoną ekspresję markerów różnicowania CK10, CK14, filagryny i inwolukryny.

Dodatkowo, nie stwierdzono różnic w poziomie proliferacji pomiędzy keratynocytami z kończyn z zastojem limfy i normalnych, co świadczyło o tym, iż tempo proliferacji i różnicowania nie były wynikiem zmian patologicznych w samej komórce.

Uzyskane obserwacje dają podstawę do farmakologicznych prób miejscowej inaktywacji badanych cytokin i czynników wzrostu dla zahamowania patologicznego procesu rozrostu keratynocytów u człowieka.

Przedstawione dane z literatury obrazują wpływ poszczególnych cytokin i czynników wzrostu na KC w hodowli *in vitro*. W warunkach *in vivo* KC, a zwłaszcza ich warstwa podstawna, znajdują się w środowisku płynu tkankowego zawierającego zarówno badane przeze mnie, jak i nie badane, czynniki humoralne. Wszystkie one mogą mieć addytywne, jak i przeciwstawne właściwości. Hodowla KC w płynie tkankowym daje więc głębszy wgląd w procesy zachodzące *in vivo*. Uzyskane obserwacje wskazują na funkcjonalną współzależność białek regulujących proliferację i dojrzewanie KC, zarówno w odpowiedzi na sygnały antygenowe z zewnątrz, jak i na stałe, ewolucyjnie wytworzone usuwanie powierzchniowych warstw KC. Aby ten wgląd był jeszcze szerszy niezbędne jest badanie także innych cytokin i czynników wzrostu, które są obecne w płynie tkankowym i limfie.