

WYKORZYSTANIE HODOWANYCH *IN VITRO* KOMÓREK SKÓRY LUDZKIEJ W TRANSPLANTOLOGII – MECHANIZM GOJENIA RAN

Skóra stanowi barierę ochronną organizmu. Utrata jej integralności na skutek uszkodzenia mechanicznego, chemicznego lub termicznego może prowadzić do zaburzenia homeostazy a nawet śmierci organizmu, spowodowanej zakażeniem, utratą elektrolitów lub zatruciem toksynami. Pierwszym celem w leczeniu ran jest szybkie ich zamknięcie. W przypadku ran rozległych nie można zastosować konwencjonalnych metod leczenia polegających na autoprzyszczepach, konieczne jest wykorzystanie opatrunków biologicznych spełniających funkcje bariery ochronnej. Ich podstawową wadą jest czasowe działanie. Alternatywę dla opatrunków biologicznych stanowią substytuty naskórka i pełnej grubości skóry.

Rewolucyjnym postępowaniem inżynierii tkankowej jest zmiana podejścia do naprawy uszkodzonych tkanek i przeszczepów poprzez wytworzenie zastępczych tkanek, które pozostają biointeraktywne po implantacji przejmując funkcje fizjologiczne a także strukturę uszkodzonej tkanki lub organu.

Pierwsze próby hodowli keratynocytów przypadają na lata sześćdziesiąte. Stosowane wówczas techniki polegały na umieszczeniu fragmentu skóry w naczyniu hodowlanym, tak aby powierzchnia skóry właściwej przylegała do ścian naczynia, i inkubacji w określonej pożywce. Naskórek obrastał fragment tkanki, przyczepiał się do ścianek naczynia i ulegał uwarstwianiu. Metody te były stosunkowo mało wydajne, nie pozwalały na produkowanie dużych ilości materiału przydatnego do przeszczepu, ponadto często dochodziło do przerostu keratynocytów fibroblastami.

W 1975 roku, Rheinwald i Green opracowali nową technikę pozwalającą na masową produkcję keratynocytów. Ta metoda hodowli z wykorzystaniem warstwy odżywczej fibroblastów 3T3 pozwala na otrzymanie z 1 cm² wycinka skóry, komórek zajmujących powierzchnię porównywalną z powierzchnią ciała dorosłego człowieka.

Keratynocyty można również hodować bez udziału warstwy odżywczej stosując odpowiednie, ściśle zdefiniowane pożywki zawierające niezbędne składniki pokarmowe i czynniki wzrostu. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, stwierdzono już wielokrotnie, że komórki naskórka odbudowują w pełni wykształcony naskórek w hodowli *in vitro*.

Naskórek ludzki w warstwie podstawnej zawiera komórki macierzyste, które podczas podziałów zachowują stałą liczbę i dają początek populacji przejściowo namnażających się komórek. Te charakteryzują się wysokim potencjałem proliferacyjnym tylko przez określony

czas, po którym komórki różnicują się. Populacja tych komórek ma decydujące znaczenie w procesie gojenia ran. Jest zatem oczywiste że, aby móc wykorzystywać keratynocyty hodowane *in vitro* do transplantacji, należy stworzyć środowisko hodowlane pozwalające utrzymać komórki macierzyste w hodowli.

Komórki macierzyste naskórka można wyselekcjonować spośród hodowanych komórek naskórka na podstawie wysokiego poziomu ekspresji b1-integrzyn i szybkiej (ok. 20 min) adhezji do podłoża kolagenowego lub fibronektyny. Komórki te formują największe kolonie. Proliferyjące keratynocyty, które przyczepiają się znacznie wolniej, należą do populacji przejściowo namnażających się komórek. Po około 5 podziałach wchodzi one w etap ostatecznego różnicowania. Proliferyacja w naskórku jest ograniczona do warstwy bazalnej komórek przyczepionych do błony podstawnej. Na podstawie analizy klonalnej można wyróżnić 3 typy klonów keratynocytów: holo- para- i meroklony. Wciąż nie są znane markery molekularne poszczególnych typów, możliwa jest natomiast identyfikacja retrospektywna komórek macierzystych naskórka na podstawie liczby i przeznaczenia ich potomstwa.

Najbardziej oczywistym zastosowaniem autoprzeszczepów hodowanych *in vitro* jest leczenie rozległych oparzeń, mogą być one jednak z powodzeniem stosowane także w leczeniu innego rodzaju ubytków skórnych powstałych na skutek przewlekłych, troficznych owrzodzeń, usuwaniu zmian patologicznych w obrębie skóry, leczeniu bielactwa, pęcherzowego oddzielania naskórka i innych. Pierwsze doświadczenia z 1981 roku dowiodły, że wyhodowane, autologiczne komórki naskórka mogą być używane jako trwałe pokrycie rany u pacjentów z oparzeniami trzeciego stopnia.

Autoprzeszczepy hodowane obecnie stosuje się w wielu ośrodkach na świecie. Uzyskane wyniki doświadczeń pozwoliły usprawnić wykorzystywane techniki hodowli. Zauważono, że skuteczność autoprzeszczepu w znacznej mierze zależy od typu rany, stanu łoża rany, oraz od tego, w jakim stopniu rana narażona jest na zakażenia bakteryjne, ucisk i tarcie. Na podstawie wieloletnich badań prowadzonych przez O'Connor i wsp. wywnioskowano, że istotny wpływ na przyjęcie hodowanego przeszczepu ma miejsce, gdzie znajduje się rana. Niektóre obszary ciała, jak: klatka piersiowa, brzuch, przednia część nóg, przedramiona i twarz, podatne są na leczenie za pomocą autoprzeszczepów, natomiast plecy, pośladki i tylna część ud, czyli obszary narażone na rozciąganie, dają dużo gorsze rezultaty. De Luca i współpracownicy udokumentowali istotny wpływ wieku pacjenta na wyniki terapii. Spośród 58 pacjentów leczonych z powodu oparzeń, procent przyjęcia przeszczepów u osób poniżej 18 roku życia wynosił 48%, podczas gdy u starszych sięgał zaledwie 28%. Na podstawie wieloletnich doświadczeń wywnioskowano, że główną przyczyną niepowodzenia terapii z

zastosowaniem przeszczepów skóry są infekcje. Opracowane do roku 1991 dane potwierdziły, iż można uzyskać lepsze rezultaty, gdy stosuje się odpowiednio dobrane antyseptyki oraz gdy przeszczep umieszcza się na wcześniej oczyszczonej ranie. Szczególnie wysoki procent przyjęcia przeszczepów (90%) obserwuje się, gdy przed pokryciem rany wyhodowanym autoprzeszczepem, stosuje się martwe keratynocyty allogeniczne.

W 1989 roku Compton i wsp. przedstawili wyniki rozległych badań nad regeneracją oparzonej skóry leczonej z zastosowaniem hodowanych autoprzeszczepów. Przed transplantacją, hodowany naskórek odznacza się niejednorodną budową. W przeciągu 3-4 tygodni następuje odbudowa połączenia naskórek-skóra właściwa, ale pełna regeneracja włókien kotwiczących uzyskiwana jest dopiero po roku.

Jedną z niedogodności związanych z stosowaniem wyhodowanych autoprzeszczepów jest stosunkowo długi okres oczekiwania na odpowiednią ilość komórek namnażających się w hodowli. Rozwiązaniem tego problemu okazało się zastosowanie w terapii hodowanych keratynocytów allogenicznych. Po raz pierwszy zastosowano je w 1983 roku - w leczeniu oparzeń. Obecnie, w terapii trudno gojących się ran troficznych, stosuje się alloprzeszczepy pochodzące z komórek wyizolowanych z napletków niemowląt. Nawet w przypadku owrzodzeń nie podatnych na leczenie innymi metodami, po zastosowaniu allogenicznych keratynocytów uzyskiwano odbudowę naskórka.

Po przeprowadzeniu wnikliwych badań wykazano, że allogeniczne keratynocyty nie stanowią permanentnego pokrycia rany i z czasem wypierane są przez komórki gospodarza. Stanowią zatem tymczasowe pokrycie rany stymulujące proces regeneracji naskórka.

Konstruowanie substytutów skóry o pełnej grubości

Hodowany naskórek jest cienki i delikatny, a jego zastosowanie jest znacznie efektywniejsze, kiedy przeszczepia się go na podłoże dermalne. Świadczy to o istotnej roli składników skóry właściwej w procesie gojenia się ran. Stymulują one adhezję i migrację keratynocytów, ich wzrost i różnicowanie (Alloderm).

Jako ekwiwalentu skóry właściwej stosowano początkowo allografty skóry traktowane chemicznie w celu usunięcia immunogennych składników komórkowych. Później, skonstruowano syntetyczny, uproszczony analog skóry właściwej, składający się z kolagenu bydłęcego i siarczanu chondroityny (Integra) z zewnętrzną warstwą silikonową, stanowiącą rzeczywistą barierę ochronną. Analog ten jest biodegradowalny i stanowi świetne podłoże do nałożenia autoprzeszczepów siatkowych lub hodowanego naskórka.

Inną możliwością uzyskania odpowiednika skóry właściwej jest użycie bioresorbowalnej siatki, na którą wysiewa się fibroblasty, hodowane następnie w minibioreaktorach (Dermagraft). Proliferyjące fibroblasty syntetyzują i wydzielają kolagen oraz czynniki wzrostu, przebudowując jednocześnie całą konstrukcję. Badania nad stworzeniem optymalnego ekwiwalentu skóry doprowadziły do powstania substytutu pełnej grubości skóry złożonego z naskórka i skóry właściwej. Konstruowany jest on z keratynocytów i fibroblastów zasiedlających macierz kolagenową. Składnik dermalny formowany jest *in vitro* przez zmieszanie kolagenu bydłęcego, fibroblastów ludzkich, surowicy i pożywki hodowlanej. Na warstwę dermalną wylewa się zawiesinę keratynocytów. Po kilku dniach hodowli na granicy faz pożywka-powietrze formuje się uwarstwiony naskórek.

Przeszczepy komórkowe i terapia genowa

Specyficzne właściwości anatomiczne i biologiczne skóry czynią ją ważnym organem docelowym w stosowaniu terapii genowej. Konstrukty tkankowe są już z powodzeniem stosowane w gojeniu ran troficznych. Wciąż ulepsza się biomateriały będące rusztowaniem dla komórek tworzących razem z nim substytut skóry. Efektywność takich konstruktów może zostać znacznie zwiększona przez zastosowanie metod terapii genowej tym bardziej, że geny wielu typów ran wiążą się z defektami genetycznymi.

Współczesne badania skupiają się na przyspieszeniu gojenia ran przez stymulację procesów molekularnych. Terapia genowa oferuje całkowicie nową drogę leczenia ran chronicznych. Rozwój metod wprowadzania genów do komórki zwiększył nadzieję na możliwość leczenia chorób z zastosowaniem terapii genowej. W 1987r. Morgan i wsp. wykazali, że ludzkie keratynocyty mogą być genetycznie modyfikowane poprzez zastosowanie transferu retrowiralnego. Wykazano m.in., że keratynocyty mogą być trwale transfekowane genem ludzkiego hormonu wzrostu. Zaletami terapii genowej są: jej trwałość, systemowa lub lokalna regulacja ekspresji genów i brak skutków ubocznych jej stosowania. Wciąż pracuje się nad zwiększeniem wydajności i specyficzności transfekcji.

Na obecnym etapie rozwoju inżynierii komórkowej, istnieje możliwość połączenia technik hodowli autogennych komórek *in vitro* i ich transfekcji, a następnie transplantacji. Zdolność do proliferacji *in vitro* keratynocytów ludzkich czyni je dobrym obiektem do manipulacji genetycznych i terapii genowych.

Obecnie wiadomo, że macierzyste komórki epidermalne mogą być trwale transfekowane konstrukcjami retrowirusów. W celu poprawienia jakości złożonego przeszczepu substytutu

skórnego, do jego konstrukcji wykorzystano m.in. genetycznie zmodyfikowane keratynocyty ludzkie charakteryzujące się podwyższoną ekspresją PDGF-A. Stwierdzono, że bezkomórkowy odpowiednik dermalny w obecności transfekowanych komórek naskórka znacznie szybciej zasiedlany jest fibroblastami i komórkami endotelialnymi. Zaobserwowano zwiększoną produkcję kolagenów I i IV w jego obrębie.

Stosowanie złożonych substytutów skórnych jest często niemożliwe z powodu złego ukrwienia podłoża, na które nakłada się przeszczep. Powoduje to istotne wydłużenie czasu waskularyzacji substytutu, a często jego odrzucenie. Genetyczne modyfikacje ekwiwalentów skóry hodowanych w celu polepszenia unaczynienia powinny teoretycznie przyspieszyć gojenie ran. Udowodniono tę hipotezę stosując do konstruowania ekwiwalentu keratynocyty ludzkie transfekowane retrowirusem zawierającym gen kodujący VEGF. Wykazano, że w takim substytucie skórnym znacznie szybciej dochodzi do unaczynienia skóry właściwej, co znacznie poprawia i przyspiesza proces gojenia ran.

Lamellar ichtiosis jest schorzeniem związanym z nieprawidłowym zróżnicowaniem naskórka i związanym z tym upośledzeniem jego funkcji. Związane jest z delecją genu kodującego transglutaminazę-1, której aktywność jest niezbędna w procesie różnicowania keratynocytów. Wykonano transfer ludzkiego genu kodującego ten enzym do hodowanych *in vitro* keratynocytów pobranych od pacjentów z lamellar ichtiosis. Po namnożeniu komórek *in vitro* oraz ich transplantacji choremu pacjentowi, zaobserwowano odtworzenie architektury i funkcji naskórka, o czym świadczyło pojawienie się markera różnicowania – filaggryny w warstwach ziarnistej i zrogowaciałych.

Hemofilia B, manifestująca się zaburzeniem krzepnięcia krwi związana jest z delecją genu kodującego czynnik IX kaskady krzepnięcia. Wykazano, że transfer tego genu do ludzkich keratynocytów hodowanych *in vitro* i przeszczepionych myszom z delecją tego genu powoduje pojawienie się czynnika IX we krwi już po tygodniu od dokonanej transplantacji.

W ostatnich latach ukazało się wiele doniesień o defektach genów kodujących białka odpowiedzialne za właściwe połączenie naskórka ze skórą właściwą. Te błędy genetyczne manifestują się występowaniem opisanych schorzeń skórnych, np. epidermolysis bullosa (EB) – defekt połączeń hemidesmosomalnych (mutacje genów kodujących cytokeratyny 5/14) w warstwie keratynocytów bazalnych łączących się z błoną podstawną. Stwierdzono też, że uszkodzenia na poziomie keratynizacji wynikają z defektów ekspresji genów w zróżnicowanych warstwach naskórka, jak np.: ichtiosis bullosa of Simeus – defekt w warstwie granularnej (mutacja w genie kodującym cytokeratynę 2e), epidermolytic palmoplanar

keratoderma (mutacja w genie kodującym cytokeratynę 9), epidermolytic hyperkeratosis (mutacje w genach kodujących cytokeratyny 1 i 10), nieepidermolytyczna palmoplanarna keratoderma (mutacja w genie kodującym cytokeratynę 6), czy też rodzinna pachyonychia congenita (mutacje w genach kodujących cytokeratyny 16 i 17). Schorzenia te wydają się być dobrymi kandydatami do prób zastosowania terapii genowej w obrębie naskórka.

W ramach badań nad terapią genową dąży się do optymalizacji wydajności bezpośredniego dostarczania genów *in vivo*, specyficznego dostarczania genów do komórek naskórka (w szczególności macierzystych keratynocytów), osiągnięcia trwałej ekspresji genów i możliwości regulacji ich ekspresji *in vivo*.

Na obecnym etapie rozwoju inżynierii komórkowej istnieje możliwość wytwarzania biologicznych substytutów naskórka i pełnej grubości skóry. Wykazano, że są one skutecznym opatrunkiem biologicznym nie tylko zabezpieczającym ranę, ale również stymulującym procesy regeneracji tkanek. Ich zastosowanie przynosi zadowalające efekty lecznicze i kosmetyczne. Połączenie technik hodowli autogennych komórek macierzystych *in vitro* i ich transfekcji, a następnie ich transplantacji daje nowe możliwości poprawiania skuteczności i jakości konstruowanych ekwiwalentów skóry. Wstępne doniesienia pokazały, że mogą się one także okazać nieocenionym źródłem w leczeniu schorzeń skórnych i ogólnosystemowych o podłożu genetycznym.

Osiągnięcia w dziedzinie biologii molekularnej i inżynierii tkankowej przyczyniły się do lepszego poznania złożonego procesu gojenia rany. Zastosowanie czynników wzrostowych i terapii genowej okazało się być skuteczne w wielu przypadkach klinicznych. Dalsze badania i lepsze zrozumienie procesu gojenia i regeneracji tkanek pozwoli w przyszłości stworzyć algorytm postępowania dla różnego typu ran, schorzeń i ubytków tkankowych.

ZAKRES MATERIAŁU OBOWIĄZUJĄCY DO ZAJĘĆ:

BUDOWA SKÓRY

TYPY KOMÓREK WYSTĘPUJĄCE W SKÓRZE

MACIERZ ŁĄCZNOTKANKOWA

FUNKCJE SKÓRY

MECHANIZM GOJENIA RAN