

Received: 2009.08.27
Accepted: 2009.09.28
Published: 2009.10.15

Biologia komórek macierzystych naskórka oraz ich znaczenie w medycynie*

Biology of epidermal stem cells: Impact on medicine

Michał Pikuła, Piotr Trzonkowski

Zakład Immunologii Klinicznej i Transplantologii, Gdański Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Naskórek stanowi tkankę ulegającą ciągłej odnowie i regeneracji. Począwszy od warstwy podstawnej, aż po warstwę rogową, zbudowany jest głównie z keratynocytów, będących na różnym etapie różnicowania. Keratynocyty odgrywają zasadniczą rolę w utrzymaniu bariery naskórkowej, a także w procesach immunologicznych skóry. Utrzymanie odpowiedniej równowagi i odnowy naskórka możliwe jest dzięki właściwościom regeneracyjnym komórek macierzystych, dających początek zróżnicowanym keratynocytom. Komórki macierzyste naskórka biorą również udział w procesie gojenia się ran, a także w patogenezie nowotworów skóry. Komórki macierzyste naskórka są umiejscowione w warstwie podstawnej naskórka oraz w regionie wybrzuszenia mieszków włosowego i w jego macierzy germinacyjnej. Komórki te wyróżniają wydłużony cykl komórkowy, wysoki potencjał proliferacyjny oraz nieograniczona zdolność do samoodnowy. Komórki macierzyste naskórka hodowane w odpowiednich warunkach ulegają aktywacji i ekspansji *in vitro*. Wyhodowane ludzkie keratynocyty i komórki macierzyste naskórka mogą być następnie przeszczepiane w postaci opatrunków biologicznych w celu leczenia oparzeń, chronicznych owrzodzeń oraz różnych chorób skóry. Komórki macierzyste naskórka stanowią również cel terapii genowej, a zarazem materiał do testowania nowych leków. W pracy omówiono cechy charakterystyczne komórek macierzystych naskórka oraz mechanizmy regulujące ich proliferację i różnicowanie. Przedstawiono także możliwości wykorzystania tych komórek w medycynie.

Słowa kluczowe:

komórki macierzyste naskórka • skóra • terapia komórkowa

Summary

The epidermis is a self-renewing tissue which regenerates constantly. It consists mainly of keratinocytes of various degree of differentiation, from the proliferative basal layer to the terminally differentiated horny layer. Keratinocytes are specialized cells responsible for cohesion, barrier functions, and immunological reactions. The maintenance of homeostasis in the epidermis is possible via the self-renewing ability of the epidermal stem-cell population, which gives rise to differentiated keratinocytes. It is believed that epidermal stem cells play an important role in cellular regeneration, wound healing, and the pathogenesis of skin cancers. Epidermal stem cells reside in the basal layer of the epidermis, the bulge region of the hair follicle, and the germinal hair follicle matrix. Epidermal stem cells are relatively quiescent, slow-cycling cells defined by their great proliferative potential and unlimited capacity for self-renewal. Adult human epidermal stem cells can be activated and expanded *in vitro* under appropriate conditions. Cultured human keratinocytes and epidermal stem cells may be then transplanted as a biological dressing in burn injuries, chronic wounds, and various skin diseases. Additionally, epidermal stem cells have become a target for gene thera-

* Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w latach 2008–2009 jako projekt badawczy nr N N403 089335.

py and drug testing. In this review the fundamental characteristics of epidermal stem cells and the signaling pathways involved in the regulation of their proliferation and differentiation are discussed. The possibilities of using epidermal stem cells in medicine are also presented.

Key words: epidermal stem cells • skin • cell therapy

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=896590>

Word count: 3221

Tables: –

Figures: –

References: 76

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

Wykaz skrótów: **EGF** – czynnik wzrostu naskórka (epidermal growth factor); **HGF** – czynnik wzrostu hepatocytów (hepatocyte growth factor); **KGf** – czynnik wzrostu keratynocytów (keratinocyte growth factor); **PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (platelet-derived growth factor); **TGF- β** – transformujący czynnik wzrostu β (transforming growth factor β); **TNF- α** – czynnik martwicy nowotworów α (tumor necrosis factor α); **VEGF** – naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (vascular endothelial growth factor).

WSTĘP

Komórki macierzyste naskórka ze względu na stosunkowo łatwą dostępność i duże znaczenie praktyczne stanowią od wielu lat obiekt intensywnych badań. Naskórek jest nablönkiem pochodzenia ektodermalnego, którego podstawową funkcją jest ochrona organizmu przed działaniem czynników zewnętrznych – dotyczy to zwłaszcza substancji toksycznych, drobnoustrojów oraz promieniowania świetlnego. Naskórek bierze także udział w regulacji gospodarki wodnej organizmu oraz wchodzi w skład skórny systemu immunologicznego (skin immune system – SIS) [32,65]. Tkankę tę budują przede wszystkim keratynocyty, tworzące kolejne jej warstwy. W naskórku znajdują się również melanocyty, komórki dendrytyczne, komórki Merkela, limfocyty T oraz komórki macierzyste. Naskórek jest tkanką, która ulega ciągłej wymianie i odnowie uwarunkowanej właśnie obecnością komórek macierzystych, zwanych również komórkami pnia (stem cells) [7,46]. Komórki te znajdują się w warstwie podstawnej naskórka (stratum basale), w regionie wybrzuszenia (bulge region) przy ujściu gruczołu łojowego oraz w macierzy germinacyjnej mieszki włosowego [19,42,69]. Komórki macierzyste naskórka budzą duże zainteresowanie w związku z możliwościami wykorzystania ich w medycynie, zwłaszcza w leczeniu trudno gojących się ran, a także w badaniach farmakologicznych leków i kosmetyków [3,4,25,57]. Praca przedstawia aktualny stan wiedzy na temat biologii komórek macierzystych naskórka oraz możliwości ich zastosowania w medycynie i naukach pokrewnych.

WŁAŚCIWOŚCI KOMÓREK MACIERZYSTYCH NASKÓRKA

Komórki macierzyste naskórka wyróżnia przede wszystkim: zdolność samoodnowy, wysoki potencjał proliferacyjny, wydłużony cykl komórkowy oraz stan uśpienia metabolicznego [4]. Uważa się, że komórka macierzysta naskórka

dzieli się asymetrycznie, dając początek jednej komórce przejściowo namnażającej się (transit amplifying cell), która ulega dalej różnicowaniu oraz jednej komórce macierzystej. Ten sposób podziału zapewnia utrzymanie stałej liczby komórek macierzystych w tkance, a tym samym jej ciągłą odnowę [8]. Komórki macierzyste naskórka wyróżnia, jak już wspomniano, wydłużony cykl komórkowy, co przekłada się na obniżoną dynamikę ich podziałów komórkowych [9]. Różnicę widać wyraźnie przy porównaniu proliferacji komórek macierzystych oraz przejściowo namnażających się [55]. Wydaje się, iż wydłużony cykl komórkowy ma za zadanie ochraniać genom komórek macierzystych przed uszkodzeniami lub mutacjami, które mogą powstawać podczas replikacji DNA [56]. Komórki macierzyste, będąc w stanie uśpienia, rzadko podejmują podziały komórkowe, jednak pod wpływem bodźca, np. uszkodzenia skóry lub po przeniesieniu do hodowli, ulegają aktywacji oraz podziałom komórkowym [4]. Uważa się, iż aktywacja ta jest odpowiedzialna za stopniowe obniżanie potencjału proliferacyjnego omawianych komórek w warunkach *in vitro*. Wiele uwagi przywiązuje się do badań ekspresji genów w komórkach macierzystych naskórka. Wykazano, że w komórkach tych, w odróżnieniu od dojrzałych keratynocytów, dochodzi do nadekspresji genów – głównie kodujących czynniki regulujące cykl komórkowy (białka p27, p57, p15, cykliny D1, D2, kinazy zależne od cyklin, Wnt/ β -katenina) [8,11]. Część z tych genów jest wspólna dla wielu typów komórek macierzystych, np. hematopoetycznych, neuronalnych czy embrionalnych. Dowodzi to, iż za pewne unikalne właściwości różnych typów komórek macierzystych są odpowiedzialne wspólne mechanizmy kontrolujące ich zachowanie [7]. Wciąż dyskutowana jest plastyczność komórek macierzystych naskórka. Dotychczas istnieje niewiele prac potwierdzających możliwość różnicowania tych komórek w kierunku innym niż wytwory naskórka. Wykazano jednak, że po odpowiedniej stymulacji komórki macierzyste naskórka mogą wykazy-

wać ekspresję antygenów charakterystycznych dla embrionalnych komórek macierzystych oraz komórek linii hematopoetycznej [5]. Ostatnie doświadczenia prowadzone na zwierzętach wykazały również, że istnieje możliwość rekonstrukcji rogowki za pomocą przeszczepianych autologicznych komórek macierzystych naskórka [73].

MARKERY KOMÓREK MACIERZYSTYCH NASKÓRKA

Znajomość charakterystycznych markerów komórek macierzystych jest bardzo ważna nie tylko z punktu widzenia nauk podstawowych, ale również klinicznych; izolacja komórek na podstawie danego markera ma bowiem istotne znaczenie w terapii komórkowej. Mimo wielu lat badań, wciąż są poszukiwane i analizowane nowe wyznaczniki komórek macierzystych naskórka.

β 1-integryna

Integryny są to heterodimeryczne glikoproteiny przytwierdzające keratynocyty warstwy podstawnej naskórka do błony podstawnej. Za wyznacznik komórek macierzystych naskórka uważa się przede wszystkim wysoką ekspresję β 1-integryny [53,71]. Glikoproteina ta zapewnia odpowiednie rozmieszczenie komórek macierzystych, a także sprawia, iż komórki te są silnie przytwierdzone do podłoża niż komórki przejściowo namnażające się, podlegające migracji w kierunku wyższych warstw naskórka [18,53]. Interakcje komórki z macierzą zewnątrzkomórkową za pomocą integryn wpływają również na wiele procesów wewnątrzkomórkowych. 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. Udowodniono także, iż blokada receptorów β 1-integryny powoduje apoptozę komórek naskórka – głównie przez obniżenie w nich poziomu białka Bcl-2 [4]. Wysoka ekspresja integryn na powierzchni komórek macierzystych naskórka sprawia, iż komórki te silnie przylegają do podłoża. Stanowi to podstawę jednej z metod izolacji tych komórek w technice tzw. szybkiego przylegania do podłoża [33].

Białko p63

Białko p63 należy do rodziny czynników transkrypcyjnych białka supresorowego p53. Zwierzęta pozbawione genu kodującego białko p63 nie wykształcają w pełni zorganizowanego naskórka, a tylko jego pojedynczą warstwę. Ponadto, keratynocyty tych zwierząt nie wykazują syntezy markerów typowych dla komórek nabłonkowych (keratyny K5 i K14). Są dwie główne izoformy białka p63 (TA oraz Δ N), które pełnią odmienne funkcje w komórkach naskórka. W warstwie podstawnej naskórka występuje głównie izoforma Δ Np63 α . Wykazano, iż blokuje ona różnicowanie keratynocytów indukowane np. jonami wapnia [35]. Białko to umożliwia również utrzymanie wysokiego potencjału proliferacyjnego komórek macierzystych naskórka oraz keratynocytów. Wykazano też, że izoforma Δ Np63 α ulega nadekspresji w komórkach nowotworowych, prowadząc do zahamowania ich apoptozy [34]. Obecnie przyjmuje się, że białko Δ Np63 α może służyć jako swoisty marker

komórek macierzystych naskórka [30]. Natomiast postać TA białka p63 jest odpowiedzialna za prawidłowe różnicowanie i stratyfikację keratynocytów [36].

Pozostałe markery

Obecnie prowadzi się poszukiwania kolejnych potencjalnych wyznaczników komórek macierzystych naskórka. Jednym z nich jest surwiwina – białko zaangażowane w regulację apoptozy oraz podziały komórkowe keratynocytów i komórek macierzystych naskórka [41]. Wykazano, iż występuje ono w dużym stężeniu w komórkach macierzystych naskórka, natomiast jego poziom obniża się w komórkach ulegających różnicowaniu. Dotyczyło to przede wszystkim izoform surwiwiny 2B oraz Δ Ex3. Uważa się, że białko to może stanowić element protekcji komórek, zapobiegając ich różnicowaniu i apoptozie [43]. Na uwagę zasługują również próby wykorzystania jako wyznaczników stopnia różnicowania komórek naskórka białek strukturalnych tworzących desmosomy. Przykładem może tu być desmogleina, której niska ekspresja na powierzchni keratynocytów koreluje z wysokim potencjałem proliferacyjnym tych komórek. Desmogleina może zatem posłużyć jako element selekcji negatywnej podczas izolacji komórek macierzystych naskórka [70]. Podejmowane są także próby wykorzystania jako markera omawianych komórek receptora CD90. Ekspresja tego receptora zachodzi w komórkach nisko różnicowanych, tworzących *in vitro* kolonie, natomiast obniża się wraz z kolejnymi pasażami komórek [48]. Innymi kandydatami na markery komórek macierzystych naskórka są jeszcze m.in. białko powierzchniowe CD34, czynnik Tcf-3 oraz cytokeratyna 15. W oparciu o doświadczenia z hematopoetycznymi komórkami macierzystymi podejmowane są także próby izolacji komórek macierzystych naskórka z wykorzystaniem barwnika Hoechst 33342. Komórki macierzyste, wykazujące niską fluorescencję po zastosowaniu tego barwnika, stanowią około 1% komórek izolowanych z naskórka ludzkiego (side population). Populacja ta wykazuje *in vitro* wysoki potencjał proliferacyjny oraz daje możliwość odtworzenia naskórka w hodowli. Profil transkrypcyjny tych komórek wykazywał nadekspresję 37 genów w porównaniu z pozostałymi keratynocytami; dotyczyło to głównie genów zaangażowanych w regulację transkrypcji oraz sygnalizację międzykomórkową [37,67,60]. Należy jednak dodać, iż istnieją także doniesienia wskazujące, iż opisana populacja komórek (side population) nie wykazuje typowych cech komórek macierzystych naskórka, np. wysokiej ekspresji beta-1 integryny [68]. Wydaje się więc, że badania z zastosowaniem barwnika Hoechst 33342 muszą być kontynuowane i powinny uwzględnić również dobrze poznane markery komórek macierzystych naskórka. Na uwagę zasługują również próby wykorzystania rodaminu 123 (Rh123) – barwnika metabolicznego, którego niewielka akumulacja w powiązaniu z wysoką ekspresją β 1-integryny umożliwia izolację z naskórka komórek o właściwościach komórek macierzystych [13].

Mimo wielu badań, identyfikacja populacji komórek macierzystych oraz precyzyjne znalezienie ich markerów pozostają wciąż problematyczne. Należy w tym miejscu zaznaczyć, iż według niektórych badaczy, w naskórku istnieje stan dynamicznej równowagi między komórkami macierzystymi i komórkami przejściowo namnażającymi się.

Według tej teorii, komórki macierzyste mogą przechodzić odwracalnie w komórki przejściowo namnażające się. Utrzymanie tej delikatnej równowagi miałyby być kontrolowane przez wiele czynników pochodzących z mikrośrodowiska tych komórek [47,50].

REGULACJA PROLIFERACJI I RÓŻNICOWANIA

Rozwój oraz prawidłowe funkcjonowanie naskórka zależą przede wszystkim od złożonej równowagi między procesami proliferacji i różnicowania keratynocytów oraz ich progenitorów. Istnieje wiele czynników i wewnątrzkomórkowych szlaków zaangażowanych w regulację proliferacji i różnicowania komórek macierzystych naskórka. Ważną rolę przypisuje się tu glikoproteinom Wnt, które są wydzielane przez komórki naskórka. Aktywują one głównie β -kateniny, biorące udział w rozwoju embrionalnym, jak i w procesach nowotworzenia. β -katenina przy braku aktywacji Wnt przemieszcza się do cytoplazmy, ulega fosforylacji, ubikwitynacji, a następnie degradacji. W przypadku aktywacji opisanej sygnalizacji fosforylacja β -kateniny jest zahamowana, co prowadzi do jej kumulacji w cytoplazmie w postaci stabilnej. W konsekwencji β -katenina przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie wiąże się z czynnikami transkrypcyjnymi Tcf/Lef, wpływając na ekspresję genów i powodując m.in. wytwarzanie czynnika transkrypcyjnego c-Myc. Jest on niezbędny do przejścia komórek z fazy G₁ do fazy S cyklu komórkowego [11]. Jednocześnie c-Myc indukuje wyjście komórek macierzystych ze stanu niezróżnicowanego. Nadekspresja c-Myc prowadzi do hiperprolifracji keratynocytów, co może się odbywać kosztem zmniejszania rezerwuaru komórek macierzystych w naskórku [17,20]. Innym ważnym regulatorem proliferacji komórek macierzystych naskórka jest morfogen – białko Shh (sonic Hedgehog). Pełni ono główną rolę w embriogenezie i morfogenezie, m.in. mieszków włosowych oraz naskórka, a także bierze udział w patogenezie nowotworów. Białko Shh ma swój udział w utrzymaniu komórek macierzystych w ich fenotypie niezróżnicowanym oraz w regulacji proliferacji tych komórek [76]. Sygnał pochodzący od białka Shh jest przekazywany do komórki za pośrednictwem receptora transbłonowego z rodziny Ptc. Następnym etapem sygnalizacji jest wytwarzanie czynników transkrypcyjnych Gli, wpływających na ekspresję wielu genów, m.in. zaangażowanych w regulację cyklu komórkowego, czego skutkiem jest indukcja proliferacji komórek. Nadekspresja białek z rodziny Gli (głównie Gli2) może prowadzić do zapoczątkowania procesu nowotworzenia i powstania raka podstawnomórkowego [23,45]. Sygnalizacja z udziałem Shh jest modulowana przez wiele czynników wewnątrzkomórkowych (β -katenina, p63) oraz zewnątrzkomórkowych (EGF) [10,31]. Istotną rolę w biologii komórek macierzystych naskórka przypisuje się również sygnalizacji z udziałem receptorów Notch. Receptory te to silnie konserwowane ewolucyjnie struktury transbłonowe, których ligandami są białka Jagged oraz Delta. Po ich aktywacji następuje proteolityczne cięcie, dzięki czemu dochodzi do uwolnienia wewnątrzkomórkowej domeny receptora (NICD), jej translokacji do jądra komórkowego i wiązania z odpowiednimi białkami wiążącymi DNA [7]. Sygnalizacja z udziałem receptorów Notch jest aktywna zarówno podczas embriogenezy naskórka, jak i w dojrzałym naskórku. Warunkuje ona prawidłowe różnicowanie komórek macierzystych i wykształcenie naskór-

ka, mieszków włosowych oraz gruczołów łojowych [38]. Wraz z zapoczątkowaniem dojrzewania naskórka obserwuje się spadek ekspresji białek Notch w warstwie podstawnej naskórka, a ich obecność ogranicza się głównie do jego warstwy kolczystej. Nadekspresja komponenty NICD receptora Notch w hodowanych keratynocytach prowadzi do hamowania ich proliferacji wskutek m.in. wzrostu ekspresji białka p21 [50]. Wykazano natomiast, że spadek poziomu białek Notch prowadzi do hiperplazji naskórka oraz ułatwia powstawanie nowotworów skóry inicjowanych związkami kancerogennymi. Wykazano, iż wiele czynników transkrypcyjnych, zmieniając ekspresję genów, wpływa na zachowanie komórek macierzystych naskórka. Jednym z nich jest Oct-4, który odpowiada za utrzymanie stanu niezróżnicowania różnych typów komórek macierzystych, w tym komórek macierzystych naskórka. Czynnikiem ten odpowiada również za zachowanie pluripotencji macierzystych komórek embrionalnych. Udowodniono także, iż transfekcja keratynocytów genem Oct-4 powoduje ich odróżnicowanie w komórki o cechach komórek macierzystych naskórka [24]. Badania zespołu prof. Watt wykazały, że jednym z czynników odpowiedzialnych za utrzymanie komórek macierzystych w ich stanie „uśpienia” jest też białko Lrig1. Nadekspresja Lrig1 w komórkach naskórka hamowała ich proliferację, natomiast zahamowanie syntezy tego białka przez siRNA powodowało m.in. wzrost ekspresji receptorów EGF oraz indukcję proliferacji [29]. Wśród innych istotnych czynników wpływających na proliferację, różnicowanie i apoptozę komórek macierzystych naskórka należy również wymienić pRb, p107, p130 oraz NF- κ B [11,12,62,66].

EKSPANSJA KOMÓREK MACIERZYSTYCH NASKÓRKA *IN VITRO*

Hodowla i ekspansja komórek macierzystych naskórka wymagają na wstępie izolacji ze skóry metodami enzymatycznymi, a następnie ich selekcji technikami bardziej swoistymi. Podczas selekcji komórek macierzystych są wykorzystywane ich markery, opisane wcześniej. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu metody cytometrii przepływowej (cytometr sortujący), immunomagnetyczne oraz metody oparte na technice tzw. szybkiego przylegania do podłoża, np. kolagenowego [13,33,55,75]. Znalezienie efektywnych sposobów namnażania różnych typów tzw. dojrzałych komórek macierzystych (adult stem cells) sprawia wciąż wiele trudności. Istotą odpowiedniego namnażania tych komórek jest ich proliferacja, bez jednoczesnej indukcji różnicowania [52]. Badania z użyciem analizy klonalnej ujawniły, że izolowane komórki warstwy podstawnej naskórka mogą *in vitro* dawać początek trzem rodzajom klonów: holoklonom, meroklonom i paraklonom. Uważa się, iż holoklony tworzone są przez właściwe komórki macierzyste, dające początek siostrzanym klonom o podobnej morfologii i potencjale proliferacyjnym. Meroklony tworzone są natomiast przez komórki przejściowo namnażające się. Komórki te, mimo szybszej proliferacji, tworzą mniejszą liczbę kolonii *in vitro* niż komórki macierzyste, ulegając wcześniej procesowi różnicowania. Paraklony wyróżnia natomiast najniższy potencjał proliferacyjny oraz wysoki stopień zróżnicowania [52,61]. Efekty stopniowego różnicowania keratynocytów obserwowane w trakcie hodowli nazywane są inwersją klonalną [74]. Polega ona na stopniowym zastępowaniu holoklonów, meroklonami i paraklonami. Poszukuje się zatem czynników, któ-

re nie indukują inwersji klonalnej, a które pozwalają na utrzymanie dużej liczby komórek macierzystych naskórka *in vitro*. W hodowli komórek macierzystych naskórka niezwykle istotny jest dobór odpowiedniego medium oraz powierzchni hodowlanej. Wykorzystywane są zarówno media z dodatkiem surowicy, jak i bezsurowicze – dodatkowo suplementowane wybranymi czynnikami wzrostu. Spośród tych czynników nadzieję budzą m.in. EGF, HGF, KGF oraz TGF- β [13,16]. Stosowane są także różnego rodzaju powierzchnie hodowlane – powlekanie składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej, a także powierzchnie zawierające inaktywowane fibroblasty [52]. Zadawalające wyniki przyniosło również wykorzystanie włókna jako powierzchni do namnażania komórek macierzystych i keratynocytów. Zastosowanie tego substratu powodowało hamowanie inwersji klonalnej w hodowanych keratynocytach i stymulowało proliferację komórek macierzystych naskórka. Wyniki te wydają się obiecujące ze względu na wykorzystywanie włókna w tworzeniu substytutów skórnych [21,44]. Istnieją również próby wpływania na fenotyp keratynocytów poprzez modyfikacje genetyczne, polegające głównie na nadekspresji lub wyciszeniu odpowiednich genów. Przykładem tego typu działań może być nadekspresja kinazy zależnej od cyklin – Cdk4, która hamowała starzenie replikacyjne keratynocytów oraz zwiększała proporcję komórek macierzystych w hodowli [59]. Należy jednak zwrócić uwagę, że komórki macierzyste wyróżniają się w hodowli *in vitro* wolniejszym wzrostem w porównaniu z komórkami częściowo zróżnicowanymi [55,71]. Może to skutkować dłuższym czasem hodowli niezbędnym do uzyskania odpowiedniej liczby komórek, np. do przeszczepu.

ZNACZENIE KOMÓREK MACIERZYSTYCH NASKÓRKA W MEDYCYNIE

Udział w gojeniu się ran

Gojenie się rany to złożony proces, który jest uwarunkowany obecnością wielu rodzajów komórek. Istotną rolę odgrywają w nim zarówno komórki macierzyste naskórka, jak i częściowo zróżnicowane keratynocyty. Komórki te podczas gojenia się rany ulegają procesom aktywacji, migracji oraz proliferacji [46]. Uważa się, iż w stanie fizjologicznym za odnowę naskórka są odpowiedzialne komórki macierzyste umiejscowione wyłącznie w warstwie podstawnej naskórka. Natomiast po uszkodzeniu skóry, w jej regeneracji biorą udział zarówno komórki macierzyste warstwy podstawnej naskórka, jak i regionu wybrzuszenia mieszków włosa („pęczka”) [39]. Podczas gojenia się rany, na jej obrzeżach obserwuje się zwiększoną liczbę komórek z wysoką ekspresją białek charakterystycznych dla komórek macierzystych naskórka. Liczba takich komórek wzrasta wraz z obkurczaniem się rany, a następnie po odnowieniu naskórka ulega obniżeniu. Szczególną rolę w tym procesie przypisuje się komórkom regionu „pęczka”; komórki te migrują, proliferują, a następnie różnicują w dojrzale keratynocyty. Uważa się jednak, że komórki regionu wybrzuszenia są odpowiedzialne tylko za tzw. ostre gojenie rany. Po zakończeniu tego procesu nie wykazuje się bowiem ich obecności w zregenerowanym naskórku [28]. Wiele uwagi poświęca się patofizjologii chronicznego gojenia się ran, w którym dochodzi do aktywacji komórek macierzystych, jednak bez jednoczesnej ich prawidłowej migracji, różnicowania i stratyfikacji. Uważa się, iż podczas tych procesów może dochodzić do zmniejszania się

populacji komórek macierzystych w rejonie trudno gojącej się rany i przyczyniać się do pogorszenia jej parametrów gojenia [6,46].

Kancerogeneza

Komórki naskórka należą do komórek, które w sposób szczególny narażone są na działanie czynników szkodliwych, takich jak promieniowanie UV, związki kancerogenne czy zakażenia wirusowe. W związku z tym, częściej niż w innych komórkach, w ich materiale genetycznym może dochodzić do mutacji onkogennych [49]. Jednak dzięki ciągłej odnowie naskórka komórki mające mutacje są stopniowo eliminowane. W ten sposób, wyłącznie komórki długo rezydujące w naskórku, czyli komórki macierzyste, mogą zakumulować wystarczającą ilość mutacji do powstania nowotworu [22,51]. Przemiana nowotworowa komórek naskórka jest związana z mutacjami w obrębie wielu genów m.in. *p53*, *K-ras*, *p14* [15]. Dowodzi się także, iż w obrębie nowotworu istnieją komórki macierzyste nowotworu odpowiedzialne za jego rozrost. Komórki te mogą wywodzić się ze zdrowych komórek macierzystych, jak i z komórek zróżnicowanych, które nabyły właściwości niekontrolowanej proliferacji wskutek akumulacji mutacji onkogennych. Wydaje się, iż komórki macierzyste nowotworu w sposób decydujący wpływają na progresję nowotworu, jego rozsiaranie oraz odpowiedź na leczenie. Ten rodzaj komórek macierzystych może wykorzystywać podobne mechanizmy samoodnowy i proliferacji jak zdrowe komórki macierzyste. W tym kontekście badania nad biologią komórek macierzystych naskórka mają dodatkowo istotne implikacje kliniczne [4,54].

Przeszczepy komórek

Przeszczepy keratynocytów i komórek macierzystych naskórka wyhodowanych *in vitro* stanowią jedno z najważniejszych osiągnięć ostatnich lat w leczeniu oparzeń, owrzodzeń oraz innych trudno gojących się ran [3]. Do wykorzystania komórek naskórka do przeszczepów obecność komórek macierzystych ma podwójne znaczenie. Komórki macierzyste naskórka podczas hodowli *in vitro* intensywnie proliferują, zapewniając tym samym uzyskanie odpowiedniej liczby komórek do przeszczepu lub wytworzenie właściwej powierzchni substytutu skórnoego. Ponadto, odpowiednia liczba komórek macierzystych oraz ich stopień zróżnicowania warunkują późniejsze prawidłowe przyjęcie przeszczepionych komórek oraz gojenie się rany [40,57,64]. Komórki mogą być podawane pacjentom w postaci zawiesiny, naskórka lub złożonego substytutu skórnoego. W celu ułatwienia przyjęcia się przeszczepu i poprawy gojenia rany stosuje się takie substraty jak włókno, kolagen lub różne rodzaje żeli opatrunkowych łącznie z komórkami [26,27,44]. Po zastosowaniu tego typu substytutów skórnych na rozległe rany zarówno u zwierząt, jak i u ludzi uzyskano polepszenie warunków gojenia się rany bez tendencji do tworzenia blizn przerostowych. Obserwacje skóry zregenerowanej za pomocą hodowanych keratynocytów wykazały brak zmian przednowotworowych, natomiast tylko w rzadkich przypadkach notowano nadmierne złuszczenie przyjętego naskórka lub tworzenie się pęcherzy [2,21,72]. Autologiczne przeszczepy wyhodowanych *in vitro* komórek naskórka wydają się obiecującą metodą leczenia ran ze względu na pobieranie w tym celu małej

ilości skóry (niewielkie pole dawcze) do dalszej hodowli oraz brak możliwości odrzutu przeszczepu.

Terapia genowa

Komórki macierzyste naskórka stanowią atrakcyjny cel terapii genowej, ponieważ są stosunkowo łatwo dostępne oraz mogą stanowić tzw. miejsce ektopowe wydzielania białek *in vivo*. Badania ostatnich lat, prowadzone głównie na zwierzętach, przynoszą obiecujące efekty stosowania tej metody. Trwają próby wykorzystania terapii genowej w leczeniu przede wszystkim schorzeń skóry wywołanych mutacją w pojedynczym genie, np. w pęcherzowym oddzieleniu naskórka odmiany dystroficznej (defekt genu *COL7A*) [14]. Trwają również próby wprowadzania do komórek genów kodujących czynniki wzrostu. Komórki tak zmodyfikowane i przeszczepione na trudno gojące się rany mają przyspieszyć ich gojenie, np. przez wydzielanie większej ilości czynników wzrostu (PDGF-A, VEGF). Ostatnie doniesienia wskazują również, iż możliwa jest efektywna transdukcja komórek naskórka genem kodującym erytropoetynę. Stworzony z użyciem tak zmienionych komórek substytut skóry, efektywnie wytwarzał ludzką erytropoetynę [63]. Wspomniane technologie wymagają jednak wciąż optymalizacji, m.in. w zakresie uzyskiwania długotrwałej ekspresji wprowadzonego genu, umiejętnej hodowli komórek macierzystych *in vitro* oraz uwzględnienia aspektów bezpieczeństwa terapii [1,4].

Badania toksykologiczne

Hodowle komórek macierzystych naskórka oraz keratynocytów mogą służyć także jako dogodny materiał do testo-

wania *in vitro* leków i kosmetyków. Zaletą tej metody jest możliwość dokładnego określenia wpływu danego związku na komórki, w tym mechanizmu działania oraz szansa zmniejszenia liczby testów *in vivo*. Naskórek uzyskany *in vitro* dzięki hodowli komórek macierzystych stanowi także dogodny model bariery do przenikania substancji aktywnych farmakologicznie. Wiadomo, iż głównym ograniczeniem w przenikaniu leków przez skórę jest istnienie bariery naskórkowej. Możliwość użycia modelu takiej bariery ma duże znaczenie ze względu na badania kliniczne oraz do nowych kosmetyków oraz leków podawanych przezskórnie [7,26,58].

PODSUMOWANIE

Komórki macierzyste naskórka od wielu lat stanowią obiekt intensywnej badań naukowych. Dzięki temu wiedza na temat ich biologii wciąż się poszerza, zwłaszcza dotyczy to wewnątrzkomórkowych czynników regulujących ich proliferację i różnicowanie. Dodatkowo, znajomość markerów komórek macierzystych naskórka w połączeniu z zastosowaniem nowoczesnych technik biologii pozwala na ich izolację, efektywne namnażanie *in vitro* i zastosowanie kliniczne. Komórki macierzyste oraz dojrzałe keratynocyty mogą być z powodzeniem wykorzystywane w leczeniu trudno gojących się ran, np. owrzodzeń lub oparzeń. Komórki te stanowią także dogodny materiał do testowania leków lub kosmetyków. Badania nad komórkami macierzystymi naskórka powinny być jednak kontynuowane ze względu na wciąż niepełną wiedzę na ich temat oraz możliwe szerokie zastosowanie praktyczne.

PIŚMIENICTWO

- [1] Andreadis S.T.: Gene transfer to epidermal stem cells: implications for tissue engineering. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 2004; 4: 783–800
- [2] Atiyeh B.S., Costagliola M.: Cultured epithelial autograft (CEA) in burn treatment: three decades later. *Burns*, 2007; 33: 405–413
- [3] Bannasch H., Fohn M., Unterberg T., Bach A.D., Weyand B., Stark G.B.: Skin tissue engineering. *Clin. Plast. Surg.*, 2003; 30: 573–579
- [4] Barthel R., Aberdam D.: Epidermal stem cells. *J EADV*, 2005; 19: 405–413
- [5] Bickenbach J.R., Stern M.M.: Plasticity of epidermal stem cells: survival in various environments. *Stem Cell Rev.*, 2005; 1: 71–77
- [6] Blakytyn R., Jude E.: The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabet. Med.*, 2006; 23: 594–608
- [7] Blanpain C., Fuchs E.: Epidermal stem cells of the skin. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2006; 22: 339–373
- [8] Blanpain C., Lowry W.E., Geoghegan A., Polak L., Fuchs E.: Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*, 2004; 118: 635–648
- [9] Braun K.M., Niemann C., Jensen U.B., Sundberg J.P., Silva-Vargas V., Watt F.M.: Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: Visualisation of label-retaining cells in whole mounts of mouse epidermis. *Development*, 2003; 130: 5241–5255
- [10] Caserta T.M., Kommagani R., Yuan Z., Robbins D.J., Mercer C.A., Kadakia M.P.: p63 overexpression induces the expression of Sonic Hedgehog. *Mol. Cancer Res.*, 2006; 4: 759–768
- [11] Dai X., Segre J.A.: Transcriptional control of epidermal specification and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2004; 14: 485–491
- [12] Dajee M., Lazarov M., Zhang J.Y., Cai T., Green C.L., Russell A.J.: NF- κ B blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature*, 2003; 421: 639–643
- [13] Drukała J., Majka M., Ratajczak M.: Postępy w metodach izolacji i namnażania komórek macierzystych naskórka ludzkiego. *Post. Biol. Kom.*, 2003; Suppl. 21: 37–48
- [14] Ferrari S., Pellegrini G., Matsui T., Mavilio F., De Luca M.: Gene therapy in combination with tissue engineering to treat epidermolysis bullosa. *Expert. Opin. Biol. Ther.*, 2007; 6: 367–378
- [15] Finlan L.E., Hupp T.R.: Epidermal stem cells and cancer stem cells: Insights into cancer and potential therapeutic strategies. *Eur. J. Cancer*, 2006; 42: 1283–1292
- [16] Fortunel N.O., Hatzfeld J.A., Rosemary P., Ferraris C., Monier M., Haydont V., Longuet J., Brethon B., Lim B., Castiel I., Schmidt R., Hatzfeld A.: Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: Promotion of extensive amplification by low TGF- β 1 concentrations. *J. Cell Sci.*, 2003; 116: 4043–4052
- [17] Frye M., Gardner C., Li E.R., Arnold I., Watt F.M.: Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development*, 2003; 130: 2793–2808
- [18] Fuchs E.: Scratching the surface of skin development. *Nature*, 2007; 445: 834–842
- [19] Fuchs E., Tumber T., Guasch G.: Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, 2004; 116: 769–778
- [20] Gebhardt A., Frye M., Herold S., Benitah S.A., Braun K., Samans B., Watt F.M., Elsässer H.P., Eilers M.: Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J. Cell Biol.*, 2006; 172: 139–149
- [21] Geer D.J., Andreadis S.T.: A novel role of fibrin in epidermal healing: plasminogen-mediated migration and selective detachment of differentiated keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 2003; 121: 1210–1216
- [22] Gerdes M.J., Yuspa S.H.: The contribution of epidermal stem cells to skin cancer. *Stem Cell Rev.*, 2005; 1: 225–231
- [23] Grachtchouk V., Grachtchouk M., Lowe L., Johnson T., Wei L., Wang A., de Sauvage F., Dlugosz A.A.: The magnitude of hedgehog signaling activity defines skin tumor phenotype. *EMBO J.*, 2003; 22: 2741–2751

- [24] Grinnell K.L., Yang B., Eckert R.L., Bickenbach J.R.: De-differentiation of mouse interfollicular keratinocytes by the embryonic transcription factor Oct-4. *J. Invest. Dermatol.*, 2007; 127: 372–380
- [25] Havlickova B., Břrů T., Mescalchin A., Arenberger P., Paus R.: Towards optimization of an organotypic assay system that imitates human hair follicle-like epithelial-mesenchymal interactions. *Br. J. Dermatol.*, 2004; 151: 753–765
- [26] Horch R.E., Kopp J., Kneser U., Beier J., Bach A.D.: Tissue engineering of cultured skin substitutes. *J. Cell. Mol. Med.*, 2005; 9: 592–608
- [27] Hu K., Dai Y., Hu Q., Li J., Yuan J., Li J.: An experimental study on the repair of full skin loss of nude mice with composite graft of epidermal stem cells. *Burns*, 2006; 32: 416–422
- [28] Ito M., Liu Y., Yang Z., Nguyen J., Liang F., Morris R.J., Cotsarelis G.: Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat. Med.*, 2005; 11: 1351–1354
- [29] Jensen K.B., Watt F.M.: Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: Lrig1 is a regulator of stem cell quiescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 11958–11963
- [30] Kai-Hong J., Jun X., Kai-Meng H., Ying W., Hou-Qi L.: P63 expression pattern during rat epidermis morphogenesis and the role of p63 as a marker for epidermal stem cells. *J. Cutan. Pathol.*, 2007; 34: 154–159
- [31] Kasper M., Schnidar H., Neill G.W., Hanneder M., Klingler S., Blaas L., Schmid C., Hauser-Kronberger C., Regl G., Philpott M.P., Aberger F.: Selective modulation of Hedgehog/GLI target gene expression by epidermal growth factor signaling in human keratinocytes. *Mol. Cell Biol.*, 2006; 26: 6283–6298
- [32] Kaur P., Li A., Redvers R., Bertoncello I.: Keratinocyte stem cell assays: an evolving science. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 2004; 9: 238–247
- [33] Kim D.S., Cho H.J., Choi H.R., Kwon S.B., Park K.C.: Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents. *Cell Mol. Life Sci.*, 2004; 61: 2774–2781
- [34] King K.E., Ponnamperna R.M., Allen C., Lu H., Duggal P., Chen Z., Waes C., Weinberg W.: The p53 homologue $\Delta Np63A$ interacts with the Nuclear Factor-KB pathway to modulate epithelial cell growth. *Cancer Res.*, 2008; 68: 5122–5131
- [35] King K.E., Ponnamperna R.M., Yamashita T., Tokino T., Lee L.A., Young M.F., Weinberg W.C.: $\Delta Np63\alpha$ functions as both a positive and a negative transcriptional regulator and blocks *in vitro* differentiation of murine keratinocytes. *Oncogene*, 2003; 22: 3635–3644
- [36] Koster M.I., Kim S., Mills A.A., DeMayo F.J., Roop D.R.: p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.*, 2004; 18: 126–131
- [37] Larderet G., Fortunel N.O., Vaigot P., Cegalerba M., Maltère P., Zobiri O., Gidrol X., Waksman G., Martin M.T.: Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells*, 2006; 24: 965–974
- [38] Lefort K., Dotto G.P.: Notch signaling in the integrated control of keratinocyte growth/differentiation and tumor suppression. *Semin. Cancer Biol.*, 2004; 14: 374–386
- [39] Levy V., Lindon C., Zheng Y., Harfe B.D., Morgan B.A.: Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J.*, 2007; 21: 1358–1366
- [40] Li A., Pouliot N., Redvers R., Kaur P.: Extensive tissue-regeneration capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny. *J. Clin. Invest.*, 2004; 113: 390–400
- [41] Li F.: Survivin Study: What is the next wave? *J. Cell Physiol.*, 2003; 197: 8–29
- [42] Li L., Xie T.: Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2005; 21: 605–631
- [43] Marconi A., Dallaglio K., Lotti R., Vaschieri C., Truzzi F., Fantini F., Pincelli C.: Survivin identifies keratinocyte stem cells and is down-regulated by anti- $\beta 1$ integrin during anoikis. *Stem Cells*, 2007; 25: 149–155
- [44] Mazlyam A.L., Aminuddin B.S., Fuzina N.H., Norhayati M.M., Fauziah O., Isa M.R., Saim L., Ruszymah B.H.: Reconstruction of living bilayer human skin equivalent utilizing human fibrin as a scaffold. *Burns*, 2007; 33: 355–363
- [45] Mill P., Mo R., Fu H., Grachtchouk M., Kim P.C., Dlugosz A.A., Hui C.C.: Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development. *Genes Dev.*, 2003; 17: 282–294
- [46] Morasso M., Tomic-Canic M.: Epidermal stem cells: the cradle of epidermal determination, differentiation and wound healing. *Biol. Cell*, 2005; 97: 173–183
- [47] Muffler S., Stark H.J., Amoros M., Falkowska-Hansen B., Boehnke K., Bühring H.J., Marmé A., Bickenbach J.R., Boukamp P.: A stable niche supports long-term maintenance of human epidermal stem cells in organotypic cultures. *Stem Cells*, 2008; 26: 2506–2515
- [48] Nakamura Y., Muguruma Y., Yahata T., Miyatake G., Sakai D., Mochida J., Hotta T., Ando K.: Expression of CD90 on keratinocyte stem/progenitor cells. *Br. J. Dermatol.*, 2006; 154: 1062–1070
- [49] Nijhof J.G., van Pelt C., Mulder A.A., Mitchell D.L., Mullenders L.H., De Gruijl F.R.: Epidermal stem and progenitor cells in murine epidermis accumulate UV damage despite NER proficiency. *Carcinogenesis*, 2006; 28: 792–800
- [50] Okuyama R., Lefort K., Dotto G.P.: A dynamic model of keratinocyte stem cell renewal and differentiation: role of the p21/WAF1/Cip1 and Notch1 signaling pathways. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 2004; 9: 248–252
- [51] Owens D.M., Watt F.M.: Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 444–451
- [52] Papini S., Cecchetti D., Campani D., Fitzgerald W., Grivel J.C., Chen S., Margolis L., Revoltella R.P.: Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. *Stem Cells*, 2003; 21: 481–494
- [53] Parks W.C.: What is the $\alpha 2\beta 1$ integrin doing in the epidermis? *J. Invest. Dermatol.*, 2007; 127: 264–266
- [54] Perez-Losada J., Balmain A.: Stem-cell hierarchy in skin cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003; 3: 434–443
- [55] Pikuła M., Trzonkowski P., Kondej K., Jaśkiewicz J., Myśliwski A.: Characterization of human epidermal stem cells (ICH Congress, Gdańsk 2008). *Folia Histochem. Cytobiol.*, 2008; 46: 87
- [56] Potten C.S.: Keratinocyte stem cells, label-retaining cells and possible genome protection mechanisms. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 2004; 9: 183–195
- [57] Pouliot N., Redvers R.P., Ellis S., Saunders N.A., Kaur P.: Optimization of a transplant model to assess skin reconstitution from stem cell-enriched primary human keratinocyte populations. *Exp. Dermatol.*, 2005; 14: 60–69
- [58] Poumay Y., Coquette A.: Modelling the human epidermis *in vitro*: Tools for basic and applied research. *Arch. Dermatol. Res.*, 2007; 298: 361–369
- [59] Ramirez R.D., Herbert B., Vaughan M.B., Zou Y., Gandia K., Morales C.P., Wright W.E., Shay J.W.: Bypass of telomere-dependent replicative senescence (M1) upon overexpression of Cdk4 in normal human epithelial cells. *Oncogene*, 2003; 22: 433–444
- [60] Redvers R.P., Li A., Kaur P.: Side population in adult murine epidermis exhibits phenotypic and functional characteristics of keratinocyte stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 13168–13173
- [61] Roh C., Tao Q., Photopoulos C., Lyle S.: *In vitro* differences between keratinocyte stem cells and transit-amplifying cells of the human hair follicle. *J. Invest. Dermatol.*, 2005; 125: 1099–1105
- [62] Ruiz S., Santos M., Segrelles C., Leis H., Jorcano J.L., Berns A., Paramio J.M., Vooijs M.: Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development*, 2004; 131: 2737–2748
- [63] Scheidemann F., Löser M., Niedermeier A., Kromminga A., Therrien J.P., Vogel J., Pfütznern W.: The skin as a biofactory for systemic secretion of erythropoietin: potential of genetically modified keratinocytes and fibroblasts. *Exp. Dermatol.* 2008; 17: 481–488
- [64] Schneider T.E., Barland C., Alex A.M., Mancianti M.L., Lu Y., Cleaver J.E., Lawrence H.J., Ghadially R.: Measuring stem cell frequency in epidermis: A quantitative *in vivo* functional assay for long-term repopulating cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 11412–11417
- [65] Segre J.: Complex redundancy to build a simple epidermal permeability barrier. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2003; 15: 776–782
- [66] Sil A.K., Maeda S., Sono Y., Roop D.B., Karin M.: I κ B kinase- α acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature*, 2004; 428: 660–664
- [67] Terunuma A., Jackson K.L., Kapoor V., Telford W.G., Vogel J.C.: Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells. *J. Invest. Dermatol.*, 2003; 121: 1095–1103
- [68] Triel C., Vestergaard M.E., Bolund L., Jensen T.G., Jensen U.B.: Side population cells in human and mouse epidermis lack stem cell characteristics. *Exp. Cell Res.*, 2004; 295: 79–90
- [69] Tumber T., Guasch G., Greco V., Blanpain C., Lowry W.E., Rendl M., Fuchs E.: Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science*, 2004; 303: 359–363

- [70] Wan H., Stone M.G., Simpson C.: Desmosomal proteins, including desmoglein 3, serve as novel negative markers for epidermal stem cell containing population of keratinocytes. *J. Cell Sci.*, 2003; 16: 4239–4248
- [71] Webb A., Li A., Kaur P.: Location and phenotype of human adult keratinocyte stem cells of the skin. *Differentiation*, 2004; 72: 387–395
- [72] Wisser D., Steffes J.: Skin replacement with a collagen based dermal substitute, autologous keratinocytes and fibroblasts in burn trauma. *Burns*, 2003; 29: 375–380
- [73] Yang X., Moldovan N.I., Zhao Q., Mi S., Zhou Z., Chen D., Gao Z., Tong D., Dou Z.: Reconstruction of damaged cornea by autologous transplantation of epidermal adult stem cells. *Mol. Vis.*, 2008; 14: 1064–1070
- [74] Youn S.W., Kim D.S., Cho H.J., Jeon S.E., Bae I.H., Yoon H.J., Park K.C.: Cellular senescence induced loss of stem cell proportion in the skin *in vitro*. *J. Dermatol. Sci.*, 2004; 35: 113–123
- [75] Zhou J.X., Chen S.Y., Liu W.M., Cao Y.J., Duan E.K.: Enrichment and identification of human 'fetal' epidermal stem cells. *Hum. Reprod.*, 2004; 19: 968–974
- [76] Zhou J.X., Jia L.W., Liu W.M., Miao C.L., Liu S., Cao Y.J., Duan E.K.: Role of sonic hedgehog in maintaining a pool of proliferating stem cells in the human fetal epidermis. *Hum. Reprod.*, 2006; 21: 1698–1704

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.