

**Anna Domaszewska-Szostek**

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

**Promotor:**

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

**Zespół Epigenetyki Człowieka  
INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ  
IM. M. MOSSAKOWSKIEGO  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK**

**Warszawa 2012**

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, urazach 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”. 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) oraz (allo- i ksenogeniczne) antygeny przeszczepu tkanki czy narządu powodują natychmiastową odpowiedź komórkowo-humoralną tkanki limfoidalnej. 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 chłonnych 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 są głównymi komórkami naskórka pełniącymi 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.

Keratynocyty podlegają stałemu procesowi proliferacji i różnicowania. 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. Innym źródłem sygnałów jest mechaniczne uszkodzenie struktury naskórka oraz działanie antygeny bakteryjnego, wirusowego lub grzybiczego. Keratynocyty wydzielają szereg czynników wzrostu i cytokin oraz peptydów antybakteryjnych działających w układzie autokrynnym. Szereg z tych czynników humoralnych dyfunduje do płynu tkankowego skóry właściwej i tkanki podskórnej, który po wpłynięciu do naczyń limfatycznych określany jest mianem limfy .

Mechanizm regulacji proliferacji i różnicowania keratynocytów człowieka jest badany przede wszystkim w warunkach *in vitro*, stąd to co dzieje się *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 specyficznym na proces proliferacji i różnicowania keratynocytów. Niewielka jest też wiedza o tym, w jakich przyżyciowych warunkach komórki warstwy podstawnej naskórka aktywnie wyrażają receptory dla cytokin i czynników wzrostu.

Wyjaśnienie wymienionych zagadnień pozwoliłoby na opracowanie metod pobudzania lub hamowania proliferacji keratynocytów w warunkach klinicznych, np. w ranach lub hiperkeratozach czy też w obrzęku limfatycznym, którego integralną komponentą jest nadmierna proliferacja keratynocytów. Ponadto, umożliwiłoby to efektywniejszą hodowlę keratynocytów *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 keratynocytów, 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 płynu tkankowego/limfy w skórze i tkance podskórnej człowieka (obrzęk limfatyczny, ang. obstructive lymphedema), którego jednym z następstw jest nadmierna proliferacja keratynocytów. Przeniesienie procesu proliferacji i różnicowania keratynocytów do hodowli z zastosowaniem płynu tkankowego/limfy, 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 keratynocytów w płynie tkankowym/limfie człowieka, pobieranych ze skóry chorych z zastojem limfatycznym oraz zdrowych wolontariuszy.

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 płynie tkankowym/limfie?
2. Czy zawarte w płynie tkankowym/limfie: interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina-6 (IL-6), czynnik martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), czynnik wzrostu keratynocytów (KGF) oraz czynnik wzrostu nowotworu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) mają wpływ na proliferację i różnicowanie keratynocytów?
3. Jaki wpływ ma płyn tkankowy/limfa na ekspresję markerów dla tzw. komórek macierzystych naskórka (p63 i CD29) ?
4. Jak płyn tkankowy/limfa wpływa na ekspresję markerów proliferacji (Ki67, PCNA), markerów aktywacji (cytokeratyna 6, cytokeratyna 16, cytokeratyna 17) i markerów różnicowania (cytokeratyna 1, cytokeratyna 10, cytokeratyna 14, filagryna, inwolukryna) keratynocytów?

Badania moje wykazały, że:

1. Przyrost całkowitej liczby keratynocytów w hodowli w płynie tkankowym/limfie był wyższy w porównaniu do hodowli w medium kontrolnym.
2. Po hodowli keratynocytów izolowanych ze skóry podudzia w płynie tkankowym/limfie obserwowano wyższy odsetek dzielących się keratynocytów oraz komórek z warstwy podstawnej, a także mniej komórek zróżnicowanych z warstwy podstawnej w porównaniu do hodowli w medium kontrolnym.
3. Odsetek keratynocytów wyrażających markery charakteryzujące tzw. komórki macierzyste naskórka: p63 i CD29, a także markery proliferacji: PCNA i Ki67 był znacznie wyższy po hodowli w płynie tkankowym/limfie w porównaniu do hodowli w medium.
4. Po neutralizacji IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  oraz KGF w płynie tkankowym/limfie, a także zablokowaniu receptorów dla tych cytokin i czynników wzrostu na keratynocytach, obserwowano spadek odsetka dzielących się komórek i wzrost procenta komórek zróżnicowanych. Blokowanie TGF- $\beta$  i jego receptorów nie

miało statystycznie znamiennego wpływu na podziały i różnicowanie keratynocytów.

5. Po hodowli w płynie tkankowym/limfie stwierdzono wzrost odsetka aktywowanych keratynocytów wyrażających: cytokeratynę 6, cytokeratynę 16 oraz cytokeratynę 17.
6. Ekspresja białek charakteryzujących dojrzałe keratynocyty, takich jak: cytokeratyna 10, cytokeratyna 14, filagryna oraz inwolukryna była niższa po hodowli w płynie tkankowym/limfie.

Uzyskane wyniki pozwalają wyciągnąć następujące 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 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i KGF. Ich neutralizacja oraz blokowanie receptorów na keratynocytach potwierdziły tę obserwację. TGF- $\beta$  nie wykazywał takich właściwości.
3. Zwiększonej proliferacji towarzyszyła podwyższona ekspresja markerów komórek macierzystych naskórka: p63 i CD29.
4. Zwiększona proliferacja/aktywacja była wyrażona przez podwyższoną ekspresję markerów (Ki67, PCNA, cytokeratyna 6, cytokeratyna 16 i cytokeratyna 17) i zmniejszoną ekspresję markerów różnicowania (cytokeratyna 10, cytokeratyna 14, filagryna i inwolukryna).
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 działaniem 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.

Wyniki mojej pracy nad zagadnieniami dotyczącymi keratynocytów i układu limfatycznego zawarłam w następujących artykułach:

- 1. Domaszewska A, Olszewski WL.** *Dermal keratinocytes- protective, mechanical, biochemical and immune functions related to grafting.* Ann Transpl. 2006;11(4):45-52.
- 2. Domaszewska A, M. Moscicka, M. Zaleska, W. L. Olszewski.** *The stimulating effect of human skin tissue fluid/lymph on cultured keratinocytes.* Lymphology 2008; 41:397-39.
- 3. Domaszewska-Szostek A, M. Zaleska, W. L. Olszewski.** *The influence of tissue fluid/lymph cytokines and growth factors on human keratinocytes proliferation and differentiation.* Transplant Proc. 2009;41(8):3269-71.
- 4. Stanczyk M, Olszewski WL, Gewartowska M, Domaszewska-Szostek A.** *Lack of functioning lymphatics and accumulation of tissue fluid/lymph in interstitial "lakes" in colon cancer tissue.* Lymphology. 2010; 43(4):158-67.
- 5. Olszewski WL, Ćwikła J, Zaleska M, Domaszewska-Szostek A, Grądalski T, Szopińska S.** *Where do lymph and tissue fluid flow during intermittent pneumatic massage of lower limbs with obstructive lymphedema.* Phlebolympology 2011;19(4):188-195.
- 6. Olszewski WL, Ćwikła J, Zaleska M, Domaszewska-Szostek A, Grądalski T, Szopińska S.** *Pathways of lymph and tissue fluid flow during intermittent pneumatic massage of lower limbs with obstructive lymphedema.* Lymphology 2011; 44(2):54:64.
- 7. Olszewski WL, Ćwikła J, Zaleska M, Domaszewska-Szostek A, Grądalski T, Szopińska S.** *Lymphoscintigraphy of lymph and tissue fluid flow during intermittent pneumatic massage of lower limbs with obstructive lymphedema.* The European Journal of Lymphology and Related Problems (in press).