

## Kmenová buňka epidermis

Plzáková Z.<sup>1,2</sup>, Smetana K., Jr.<sup>1,2</sup>, Štork J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Anatomický ústav 1. LF UK, Praha,  
přednosta prof. MUDr. Miloš Grim, DrSc.

<sup>2</sup>Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, 2. LF UK, Praha,  
přednosta prof. MUDr. Eva Syková, DrSc.

<sup>3</sup>Dermatovenerologická klinika 1. LF UK, Praha,  
přednosta prof. MUDr. J. Štork, CSc.

### Souhrn

#### Kmenová buňka epidermis

Článek shrnuje soudobé poznatky o kmenové buňce epidermis. Zaměřuje se na její fenotypovou charakteristiku, potenciální lokalizaci, chování *in vitro* a význam při vzniku epidermálních nádorů.

**Klíčová slova:** kmenové buňky – přechodně se dělicí buňky – proliferace – diferenciaci – senescence – buněčná terapie

### Summary

#### Epidermal Stem Cell

The article summarizes current knowledge on epidermal stem cell with focus on its phenotypic characteristic, putative localization, *in vitro* behaviour and significance in epidermal tumor development.

**Key words:** stem cells – transit amplifying cells – proliferation – differentiation – senescence – cell therapy

## CHARAKTERISTIKA A PŮVOD KMENOVÝCH BUNĚK

Velký zájem o kmenové buňky (KB) je v poslední době podložen nadějí, že by mohly být využity k rekonstrukci poškozených tkání. Na tomto procesu by se mohly podílet jako zdroj nových buněk, nebo by produkci růstových faktorů mohly reaktivovat endogenní kmenové buňky nacházející se v místě poškození. KB jsou schopny sebeobnovy a zároveň produkce diferencovaných potomků obvykle nazývaných progenitorové buňky. Nomenklatura kmenových buněk není jednotná, ale v principu lze říci, že rozeznáváme kmenové buňky embryonální a kmenové buňky vyskytující se ve tkáních dospělého jedince. Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní a lze je laboratorně připravit z vnitřní

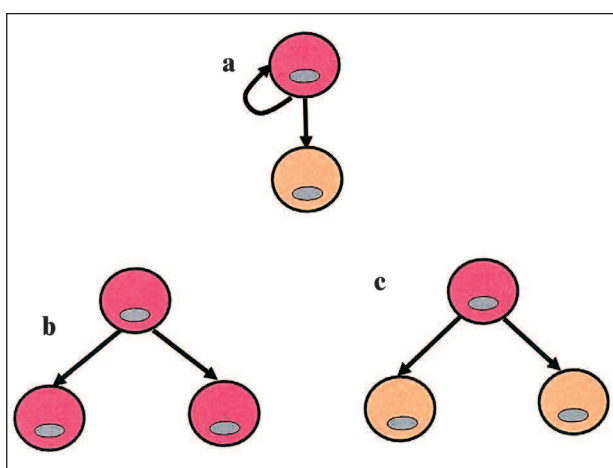
buněčné masy blastocysty. Místo a doba vzniku KB dospělého organismu nejsou v průběhu ontogeneze zárodku dosud přesně definovány. V dospělém organismu mají KB schopnost dělit se po dobu jeho existence. Na rozdíl od pluripotentních embryonálních KB (schopných dát vznik všem typům buněk jedince) jsou „dospělé“ KB multipotentní (zdroj omezeného počtu buněčných typů) či monopotentní (zdroj jediného buněčného typu). Jejich funkční vlastnosti včetně „kmenovosti“ jsou výrazně ovlivněny mikroprostředím, v němž se nalézají. Toto mikroprostředí je pro daný typ kmenové buňky specifické a nazývá se „niche“. Je známo, že niche zahrnuje komplex vzájemných buněčných a molekulárních interakcí důležitých pro správné fungování KB (19). Vzhledem k možnému využití KB v rekonstrukční medicíně a domněnce, že řada typů nádorů vychází z těchto buněk, je intenzivně studována regulace funkce jednotlivých typů KB na molekulární úrovni spolu s cíleným pátráním

Část výsledků prezentovaných v této studii byla podporována Grantovou agenturou ČR, projekt číslo 304/04/0171 a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR, projekt číslo MSM002162086.

po specifických fenotypových znacích typických pro jednotlivé typy KB. Pouze detailní znalost KB totiž umožní jejich efektivní využití v lékařství.

## EPIDERMIS A KMENOVÉ BUŇKY

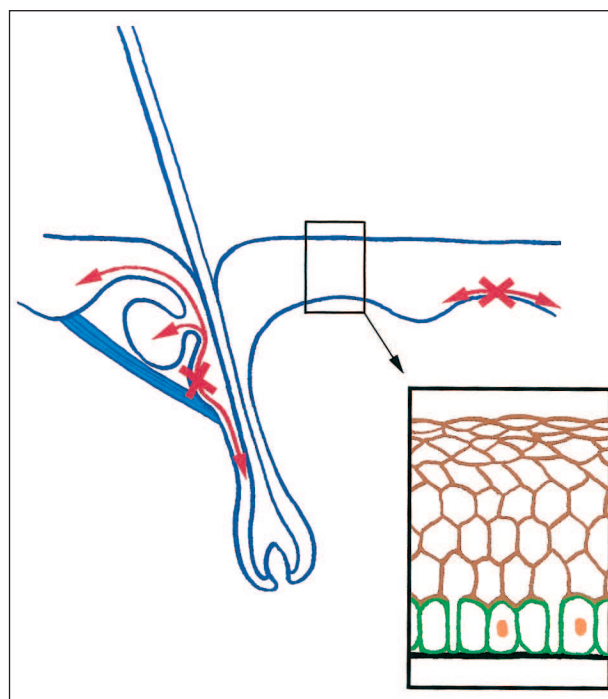
Kůže savců (včetně lidské) se skládá z epidermis, dermis, tela subcutanea a kožních adnex (vlas, nehet, mazová žláza, potní žláza). Vzhledem k zaměření tohoto přehledu se bude následující text zabývat především epidermis a vlasovým folikulem. Epidermis tvoří vrstevnatý rohovější dlaždicobuněčný epitel, oddělený od hlubších vrstev kůže bazální membránou. Vlasové folikuly jsou tvořeny invaginací povrchové epidermis. Interfolikulární epidermis (IFE) obsahuje čtyři až pět buněčných vrstev: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum corneum* a v pokožce dlaní a chodidel nacházející se *stratum lucidum*. Jednotlivé vrstvy jsou přesně vymezeny typickou morfologií, biologickými vlastnostmi a funkcí buněk. Lze je definovat jako stadia diferenciace, kterými keratinocyty procházejí, od *stratum basale* po *stratum corneum* odlupující se z povrchu epidermis. Metabolicky aktivní keratinocyty jsou přítomny pouze v prvních třech vrstvách. Z hlediska proliferační aktivity keratinocytů lze epidermis rozdělit na vrstvu bazální a vrstvu suprabazální. Za normálních okolností jediné bazální vrstva obsahuje dělicí se keratinocyty a je zdrojem obnovy epidermis. Část buněk bazální vrstvy je však již proliferačně neaktivní. Tyto buňky jsou na začátku procesu terminální diferenciace, oddělují se od bazální membrány a posouvají suprabazálně do *stratum spinosum*. Interfolikulární epidermis se neustále obnovuje a během tohoto procesu dochází k náhradě odumřelých



Obr. 1. Za fyziologického stavu je dělení KBE s největší pravděpodobností asymetrické (a). Za zvláštních stavů může dojít k symetrické mitóze: z původní KBE vzniknou další dvě KBE a počet kmenových buněk se zvyšuje (b), anebo vznikají dvě PDB a počet kmenových buněk klesá (c). Červeně – kmenová buňka epidermis, žlutě – přechodně se dělicí buňka.

a odlupujících se buněk *stratum corneum*. Vlasové folikuly a s nimi i samotný vlas procházejí opakovanými cykly růstu, regrese a klidu, které jsou u některých živočichů synchronizovány a ovlivněny ročním obdobím (línání divoče žijících savců). Na správném fungování vlasového folikulu se kromě epidermis významně podílí i dermis v podobě hustě prokrvené vlasové papily.

Zdrojem nových keratinocytů jsou kmenové buňky epidermis (KBE), které však nejsou jedinými dělicími se keratinocyty. Zatím není jasné, jestli se KBE dělí symetricky nebo asymetricky (32). Za normálních fyziologických podmínek je mitóza KBE s největší pravděpodobností asymetrická. Asymetrickým dělením KBE vzniká nová kmenová buňka a tzv. přechodně se dělicí buňka (PDB) (obr. 1). V proliferační aktivitě těchto buněk existuje výrazný rozdíl. KBE má pomalý buněčný cyklus a dělí se tedy zřídka. Tuto schopnost si však zachovává po celou dobu existence organismu, kdy umožňuje neustálou obnovu epidermis. Naopak PDB se dělí velmi rychle. Její proliferační aktivita je omezena několika buněčnými cykly (3–6 cyklů). PDB v konečném důsledku stojí na začátku terminální diferenciace. Její potomky lze již považovat za postmitotické buňky opouštějící bazální



Obr. 2. Kmenové buňky (červený křížek) v IFE jsou monopotentní a za normálních okolností jsou pouze zdrojem keratinocytů. Kmenové buňky (červený křížek) ve výdutí vlasového folikulu jsou multipotentní. Jsou zdrojem pro keratinocyty vlasu i interfolikulární epidermis, tak pro buňky mazové žlázy.

Ve výřezu: zeleně –  $\beta$ -integrinový řetězec pozitivní v keratinocytech bazální vrstvy, hnědě – CK10 marker pro diferencované keratinocyty, žlutá jádra – dělicí se keratinocyty. Buňky opouštějící bazální vrstvu mají ve spodní části pozitivní  $\beta_1$ -integrinový řetězec, horní část zasahuje suprabazálně a jeví známky diferenciace.

vrstvu. Lze tedy shrnout, že stratum basale obsahuje KBE a jejich dceřiné buňky PDB, jejichž dceřiné buňky se oddělují od bazální membrány a posouvají se suprabazálně. Buňky epidermis se tedy posouvají nejdříve laterálně a později vertikálně. U modelu myši epidermis tak bylo zjištěno, že epidermis je složena z jakýchsi sloupců buněk představujících klon konkrétní kmenové buňky. Údaje o přesné poloze KBE v IFE se liší. Podle jedněch jsou v oblasti vrcholu dermální papily, podle jiných na nejnižším místě mezi dvěma papilami (23, 13). KBE byly rovněž nalezeny ve ztluštění (bulge) zevní epitelové pochvy vlasového folikulu mezi vyústěním mazové žlázy a úponem musculus arrector pili (5). Podle některých autorů představuje tato lokalizace hlavní zásobárnu KBE v lidském těle (obr. 2). Kromě KBE se v této oblasti nacházejí i multipotentní kmenové buňky, které vycestovaly z neurální lišty (36). Jejich podíl na vytváření niche (viz dříve) jako unikátního mikroprostředí nutného pro správné fungování KBE je pravděpodobný, i když nebyl dosud prokázán.

## IDENTIFIKACE KMENOVÉ BUŇKY EPIDERMIS

Snaha o identifikaci a fenotypovou charakteristiku KBE trvá prakticky tři desetiletí. Následující shrnutí je stručným přehledem dosavadních poznatků.

Mapování proliferační aktivity keratinocytů bazální vrstvy u myši pomocí značeného  $^3\text{H}$ -thymidinu a/nebo 5-brom-2'-deoxyuridinu (BrdU) vedlo k rozlišení populací s různou délkou buněčného cyklu. Oba značené prekurzory se inkorporují do nově se tvořící DNA a při dalších děleních se postupně z buněk „ředí“. Značku tedy nejdéle udrží ty buňky, které mají nejpomalejší buněčný cyklus a nazývají se label-retaining cells – buňky zadržující značku (BZZ). V IFE tak byly nalezeny i buňky s pomalým cyklem – předpokládané kmenové buňky i buňky rychle se dělící nazvané PDB. Část myši epidermis pocházející z jedné kmenové buňky byla nazvána epidermální proliferací jednotka (31). Později bylo zjištěno že významná část BZZ je lokalizována v permanentní části vlasového folikulu – v oblasti tzv. ztluštění, které se nachází pod ústím mazové žlázy. Buněčné populace obsahující BZZ *in vitro* mají vysokou klonogenní kapacitu. Nicméně protože zadržení značky je pouze ukazatel proliferací anamnézy buňky, nelze klást rovnítko mezi pojmy BZZ a KB. Je však zřejmé, že populace BZZ bude obsahovat i buňky kmenové.

### Znaky

Jiným znakem KBE může být vysoká exprese adhezivní molekuly  $\beta_1$  řetězce integrinového receptoru, který je součástí hemidesmosmů zabezpečujících adhezi bazálních keratinocytů na bazální membránu. Toto pevné ukot-

vení se zdá být jedním z faktorů udržujících buňky v kmenovém stavu (13, 14). Za další potencionální znak KBE je považován i vysoký výskyt  $\alpha_6$  řetězce integrinového receptoru, rovněž typický pro bazální vrstvu. Obdobně jako  $\beta_1$  však není znakem specifickým a samotný je spíše známkou adheze. Přesněji lze potencionální KBE označit kombinací vysoké exprese  $\alpha_6$  integrinu a nízké exprese transferinového receptoru. Tyto buňky se *in vivo* dělí pomalu a *in vitro* tvoří dlouze žijící kolonie (12).

KBE jsou charakterizovány mimo jiné expresí specifických intermediárních filament – cytokeratinů tvořících cytoskelet epitelových buněk. Výskyt určitých typů cytokeratinů je typický pro diferenční stupeň buněk epidermis, a proto je jejich imunohistochemický průkaz široce využíván v buněčné biologii epitelů a diagnostice. Například přítomnost heterodimeru cytokeratinu 5 a 14 je specifická pro bazální vrstvy epidermis a cytokeratinu 1 a 10 pro suprabazální keratinocyty (7). Pro vlasový folikul jsou typické cytokeratiny 6, 16 a 17. Některé cytokeratiny se nacházejí pouze v malém počtu buněk. Mezi takové se řadí i cytokeratin 19, nejmenší z rodiny cytokeratinů, který je ve fetální kůži přítomen v celé bazální vrstvě (23). V kůži dospělého člověka je cytokeratin 19 lokalizován pouze ve vnější epitelové pochvě vlasového folikulu tam, kde leží BZZ. V interfolikulární epidermis je jeho výskyt postnatálně velmi omezen (37). Oblasti jeho exprese ve vlasovém folikulu závisí na fázi cyklu vlasu (4). Buňky exprimující cytokeratin 19 jsou zároveň vysoce pozitivní pro  $\alpha_3\beta_1$  integrin, jejich počet se snižuje s věkem jedince a jsou přítomny v kultuře keratinocytů v množství přímo úměrném životnosti této kultury (22). Tato fakta naznačují, že CK 19 patří k vysoce pravděpodobným znakům KBE. Dalším cytokeratinem nacházejícím se omezeně v bazální vrstvě epidermis je cytokeratin 15. Tento cytokeratin je rovněž exprimován buňkami zevní epitelové pochvy vlasového folikulu. Přesná lokalizace pozitivních buněk ve vlasovém folikulu je však ovlivněna typem použité protilátky. Ve vlasových folikulech se většinou nacházejí v zevní epitelové pochvě v oblastech nad bulbem (27, 41). Přítomnost určitých cytokeratinů je podmíněna specifickým stavem buňky charakterizovaným adhezí, proliferací či diferenciací. Výsledky některých studií však naznačují, že daná cytokeratinová síť může dokonce funkční stav buňky přímo ovlivňovat (34).

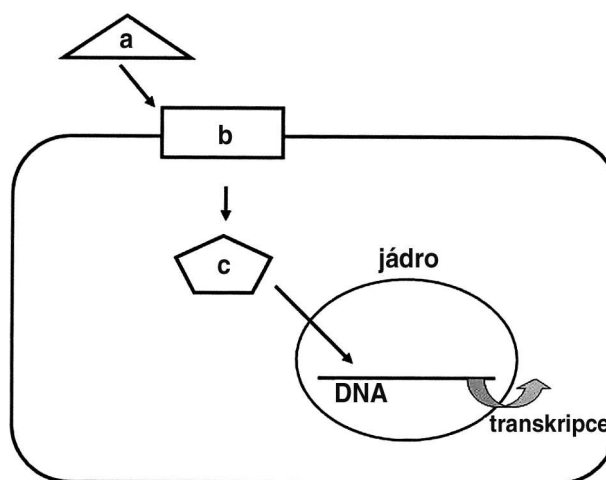
Dalším možným znakem KBE je protein  $\Delta\text{Np}63\alpha$ . Je to jedna ze sestřihových variant p63 genu. Tento gen je svou strukturou homologní s genem pro p53, který je jedním z nejvýznamnějších antionkogenů blokujících buněčnou replikaci při poškození DNA. Mutace p53 byly zjištěny v celé řadě nádorů, včetně kožních bazocelulárních a spinocelulárních karcinomů. Produkty p63 genu existují v různých izotypech, jejichž funkce mohou být stejné (TAp63), avšak i protichůdné ( $\Delta\text{Np}63$ ) k funkci p53. Vážou se na DNA v místě p53-DNA vazebných míst a ovlivňují promotory p53 cílových genů.  $\Delta\text{Np}63$  se váže

např. na promotor pro p21, který je znám jako blokátor buněčného cyklu. Tím může inhibovat terminální diferenciaci a podporovat buněčné dělení. Za normálních podmínek je vysoká pozitivita pro p63 v embryonálním ektodermu a v jádrech buněk bazální vrstvy epitelových tkání včetně kůže a ústní sliznice. Poslední práce ukazují, že TAp63 varianta je potřebná pro zahájení programu stratifikace epitelu v embryonálním vývoji, zatímco  $\Delta$ Np63 varianta je rozhodující při inhibici terminální diferenciace zralé epidermis (17). Imunohistochemické analýzy ukazují přítomnost  $\Delta$ Np63 v jádrech bazálních progenitorových buněk epidermis, vlasových folikulů a v buňkách potních žláz. Jeho exprese mizí při migraci buněk z bazální vrstvy a jejich terminální diferenciaci. Tomu nasvědčují i další experimentální výsledky *in vitro*, například přítomnost  $\Delta$ Np63 v klonech připisovaných KBE anebo snížení proliferačního potenciálu keratinocytů a jejich následná terminální diferenciace po snížení exprese  $\Delta$ Np63, či zastavení terminální diferenciace keratinocytů navozené vápníkem (15, 29, 42). Mutace p63 vedou k celé řadě epidermálních dysplazií spojených s abnormalitami končetin, vlasů, zubů, nehtů a potních a prsních žláz. U lidí jde o poruchy s autosomálně dominantní dědičností (ankyloblefaron ektodermální dysplazie a rozštěp/Hay-Wells syndrom, acro-dermato-ungual-lacrimatooth syndrom, limb-mammary syndrom a split hand/split foot malformace) (10, 15).

Definované cukerné epitopy jsou jedním ze základních stavebních kamenů buněk a tkání. Vzhledem k tomu, že tyto sacharidy a jejich receptory (endogenní lektiny) jsou zapojeny do řady biologicky zásadních dějů (mezibuněčné interakce, adheze buněk, proliferace, apoptóza, sestřih pre-mRNA), byla věnována pozornost i možným glykofenotypovým rysům KBE. Bylo zjištěno, že KBE či buňky jim blízké exprimují v jádrech endogenní lektin galektin-1 a epitopy rozpoznávané tímto galektinem (11, 16, 33). Jejich zapojení do sestřihu pre-mRNA je velmi pravděpodobné. Navíc se zdá, že proliferující buňky stratum basale včetně buněk kmenových obsahují na svých površích oligosacharidové řetězce s terminálně vázanou kyselinou N-acetylneuraminovou v pozici  $\alpha$ 2,6 (9).

## SIGNÁLNÍ DRÁHY REGULUJÍCÍ SEBEOBNOVU A DALŠÍ PŘEDURČENÍ KMENOVÝCH BUNĚK

Buněčné funkce jsou regulovány celou řadou signálních drah (obr. 3). Některé z nich jsou důležité pro sebeobnovu kmenových buněk neboli zajištění jejich asymetrického dělení. Mutace signálních molekul a jejich receptorů v těchto dráhách jsou spojeny s celou řadou nádorů, včetně kožních. Role v osudu KBE byla zatím prokázána u následujících signálních drah:



Obr. 3. Zjednodušené schéma signálních drah ovlivňujících osud KBE: a – extracelulární signální molekula, b – transmembránový receptor, c – intracelulární signální molekula. Extracelulární signální molekula vazbou na transmembránový receptor aktivuje řetěz buněčných dějů, jejichž výsledkem je vazba specifického transkripčního faktoru na DNA v jádře buňky a transkripce cílových genů.

### Rodina Wnt proteinů

Molekula Wnt se váže na transmembránový frizzled receptor, a tím zahajuje sérii dějů, které vedou k translokaci molekul  $\beta$ -kateninu do jádra, kde po vazbě na transkripční faktor LEF-1 aktivuje transkripci řady cílových genů, mimo jiné např. cyklinu D1 a c-myc. Kultivované keratinocyty s vyšším proliferačním potenciálem mají vyšší obsah  $\beta$ -kateninu, než ty s nižší proliferační aktivitou (2). Za přítomnosti zvýšené hladiny  $\beta$ -kateninu dochází v experimentu u postnatální laboratorní myši k tvorbě nových vlasových folikulů, naopak při jeho snížených hladinách se tvoří cysty v IFE obsahující buňky mazových žláz. Při kompletní inhibici Wnt signální kaskády dochází k inhibici tvorby vlasových folikulů. U transgenních myši s nadexpresí vznikají tumory s folikulární diferenciací (pilomatrixomy, trichofolikulomy), v případě blokování signální dráhy vznikají tumory s diferenciací ve směru buněk mazových žláz, event. rohovějících buněk. Jsou také popsány mutace aktivující  $\beta$ -katenin u lidských pilomatrixomů. Hladina exprese  $\beta$ -kateninu tedy určuje, která buněčná linie se bude diferencovat v normální epidermis i v nádorově transformované tkáni (26).

### Shh

Sonic hedgehog (Shh) je u lidí nejčastěji exprimovaná signální molekula mezi hedgehog homology. Váže se na transmembránový receptor PATCHED, který interakcí s dalším transmembránovým proteinem Smo brání aktivaci transkripčního faktoru Gli. Vazbou Shh se tato inhibice ruší a prostřednictvím Gli se aktivují geny z rodiny TGF- $\beta$ , Wnt a PATCHED. Výsledkem je kromě jiného aktivace buněčné proliferace a diferenciace, kde jedním s mechanismů je aktivace cyklinu B1 a FOXM1 genu,

což má zejména význam pro proliferaci a transformaci buněk (39). V současné době se zdůrazňuje význam mutace členů této signální kaskády v etiopatogenezi bazocelulárních karcinomů v rámci Gorlina-Goltzova syndromu i u sporadických bazaliomů.

### Notch

Notch je membránový receptor aktivovaný transmembránovým proteinem delta na sousedních buňkách. Tato mezibuněčná komunikační kaskáda slouží k regulaci rovnováhy mezi počtem KBE a PDB. Delta rovněž hraje roli ve vzájemných interakcích mezi keratinocyty (21).

### c-Myc

Gen pro transkripční faktor c-Myc patří do rodiny onkogenů myc. c-Myc je exprimován v rychle proliferujících buňkách, jeho exprese klesá s diferenciací. Protein c-Myc tvoří heterodimery s proteiny rodiny Max/Mad, které vazbou na specifické promotorové sekvence DNA aktivují (c-myc/Max) anebo blokuji (c-myc/Mad, Max/Mad) transkripci cílových genů. V epidermis je c-Myc přítomen ve vysoké koncentraci v bazální vrstvě a s diferenciací jeho exprese klesá a naopak stoupá exprese Mad. c-Myc navozuje diferenciaci u KBE (navozuje přechod KBE → PDB) *in vitro*. Deregulace jeho exprese u KBE *in vivo* inhibuje jejich sebeobnovu, navozuje diferenciaci přednostně směrem k mazovým žlázám a epidermis, na úkor vlasových folikulů. Transgenní myš s hyperexpresí c-Myc u bazálních keratinocytů trpí poruchou hojení ran a ulceracemi, protože mizí zásoba KBE (8, 40). Na druhé straně u postmitotických keratinocytů c-Myc navozuje další proliferaci a narušuje jejich diferenciaci. Aktivace c-myc v epidermis dospělé myši navodí diferenciaci směrem k buňkám mazových žláz a to i v interfolikulární epidermis (3). Jakým mechanismem dochází k těmto dějům, zatím není přesně známo. Bylo však zjištěno, že c-Myc hraje roli v přechodu z G<sub>1</sub> do S fáze buněčného cyklu, kdy kromě jiných genů aktivuje i cyklin D2 a cyklin dependentní kinázu 4, které se podílejí na zahájení buněčného dělení. c-myc je pod kontrolou mnoha regulačních mechanismů. Jeho aktivace probíhá Wnt signální kaskádou nebo pomocí růstových faktorů a mitogenů. Inhibice je ovlivněna kaskádou TGF-β. TGF-β mimo jiné produkují i terminálně diferencované keratinocyty, čímž mohou působit proti klonální expanzi KBE (10, 30). V experimentech u myši s prodlouženou aktivací c-myc byla zjištěna i proliferace původně postmitotických keratinocytů suprabazálních vrstev, která vedla k tvorbě preneoplastických lezí, obdobných lidským prekancerózám (28).

## KMENOVÝ POTENCIÁL KBE

Jak vyplývá z předchozích údajů, jsou KBE lokalizované v IFE s největší pravděpodobností monopotentní

(vznik keratinocytů IFE), i když za experimentálních podmínek z nich mohou vznikat i buňky mazové žlázy a dokonce i vlas. KBE ze ztlustění vlasového folikulu je naproti tomu zdrojem jak buněk pro vznik vlasového folikulu, tak pro vznik buněk mazové žlázy a keratinocytů IFE. Tyto buňky představují zálohu pro regeneraci plošně poškozené epidermis. Jejich relativně hluboké ložení je rovněž pojistkou proti významnému poškození těchto buněk např. UV zářením (viz obr. 1).

KB vlasového ztlustění myších sinusových chlupů migrují do dolního segmentu vlasového folikulu a jsou zdrojem buněk vlasové matrix a posléze epiteliálních struktur vlasové pochvy a vlastního vlasového stvolu za spolupůsobení prostředí dermální papily. U člověka není tato migrace nutná, protože dermální papila je na konci telogenu v přímém kontaktu s oblastí ztlustění. Interfolikulární epidermis a mazová žláza vznikají z těch KB, které migrují ze ztlustění do horní části vlasového folikulu (25).

Multipotenci KBE ze ztlustění vlasového folikulu u myši definitivně potvrzuje i práce, která mapuje jejich osud pomocí genového konstruktů s využitím promotoru pro keratin 15 a dokazuje, že se podílejí nejenom na tvorbě všech epiteliálních struktur vlasového folikulu, ale i na genezi IFE a mazové žlázy. Tyto keratinocyty z dospělé myši jsou schopny vytvořit všechny vyjmenované struktury také po kontaktu s neonatální dermis. Autoři dále identifikují řadu genů hyperexprimovaných u KBE. Genová analýza mimo jiné potvrzuje, že vlasový folikul je imunologicky privilegovanou strukturou, tj. je zde snižena exprese genů pro HLA. Stěžejní význam této práce tkví v zavedení postupu izolace KBE, čímž umožňuje jejich další charakteristiku *in vivo* i *in vitro* a otevírá možnosti potencionálního ovlivnění onemocnění vlasu a IFE farmakologickou nebo genetickou cestou (24).

Kmenové buňky z epidermis novorozenech myši dokonce vykazují vlastnosti buněk pluripotentních, protože po injekci těchto označených buněk do myši blastocysty a následné implantaci embrya do dělohy byly nalezeny potomci těchto buněk ve většině tkání takto vzniklého jedince (20).

## CHOVÁNÍ KBE IN VITRO

Lidské keratinocyty vyžadují pro kultivaci přítomnost podpůrných buněk (feeder cells), což jsou fibroblasty se zastavenou proliferací. Tyto podpůrné buňky umožní primární adhezi keratinocytů tak důležitou pro jejich další růst. Podpůrné buňky lze nahradit adsorpcí specifických proadhezivních molekul (18) či použitím speciálních medií. Kultury lidských keratinocytů obsahují KBE i PDB. Přítomnost KBE udržuje životnost kultury. Také *in vitro* je patrná proliferační heterogenita keratinocytů. Některé buňky vytvářejí velké, dobře se dělicí kolonie, jiné se rozdělí pouze několikrát a nastoupí terminální diferenciaci (abortivní kolonie). Podle velikosti kolonií

a tvorby terminálních kolonií lze proliferující keratinocyty rozdělit do tří klonálních kategorií: holoklony, meroklony a paraklony (1). Holoklony tvoří keratinocyty s nejvyšší proliferací kapacitou. Klony bez proliferací kapacity, tvořící abortivní kolonie, jsou paraklony a intermediární typ se nazývá meroklon. Pouze populace buněk obsahující KBE je zdrojem holoklonů. Při dlouhodobé kultivaci dochází ke splývání kolonií a tvorbě souvislé vrstvy keratinocytů, z níž se následně vytváří vícevrstevný epitel. Jeho buňky normálně diferencují a podobají se interfolikulární epidermis.

V primární kultuře je životnost keratinocytů omezená, což je podmíněno omezeným počtem buněčných cyklů přestovaných buněk. Počet KBE se s věkem kultury snižuje, takže *in vitro* mají na rozdíl od organismu tyto buňky omezený počet dělení, což lze vysvětlit skutečností, že nejsme dosud schopni vytvořit *in vitro* fungující niche. Je zajímavé, že kultura buněk izolovaných z vlasového folikulu se vydrží dít mnohem déle než kultura připravená z IFE. Zatímco kultura buněk z IFE končí svůj růst ve stadiu terminální diferenciaci, kultura z vlasového folikulu ve stadiu proliferací senescence (11).

---

## KBE A VZNIK NÁDORŮ EPIDERMIS

---

Nádorová transformace je podmíněná poruchou mechanismů regulujících buněčné dělení, či schopnost apoptózy. Někdy jde o přímý zásah do genetické informace, jindy o poruchu regulace transkripce jednotlivých genů. Epidermis je tkáň vystavenou permanentně četným zevním vlivům. Kancerogenita některých z nich je všeobecně známá (UV záření). Ke vzniku nádoru však nestačí poškození jedné terminálně diferencované buňky, která bude v případě epidermis časně odloučena. Nádorová transformace spíše vzniká dlouhodobým, či opakovaným působením a často je proces kancerogeneze mnohostupňový (iniciace, transformace). Tomuto působení mohou být vystaveni pouze dlouhodobí rezidenti epidermis, jakými jsou KBE, event. PDB. KBE jsou navíc díky neukončenému dělení ideálním objektem vzniku onkogenních mutací. Důkazem toho, že maligní nádory vznikají především působením na KBE, jsou četné pokusy s transaktivací (onko)genů typu ras, c-myc,  $\beta$ -kateninu atd., jak již bylo zmíněno v kapitolech jim věnovaných. To, jaký typ nádorů vzniká, je podmíněno nejenom proliferací stavem buňky, na kterou změny působí (diferencovaný keratinocyt  $\rightarrow$  papilomy, proliferující keratinocyt  $\rightarrow$  karcinomy), ale i typem genetické léze a jeho působením na kmenové buňky (mutace: Shh  $\rightarrow$  bazaliomy, Ras  $\rightarrow$  spinocelulární karcinom,  $\beta$ -katenin  $\rightarrow$  nádory s diferenciací vlasového folikulu) (26, 30).

---

## KBE A DERMATOLOGIE

---

Jak bylo ukázáno v předchozím textu, existence KBE

je podmínkou pro obnovu pokožky za fyziologických podmínek a její regeneraci po rozsáhlém poškození. Rovněž vlasový cyklus je závislý na správném fungování KBE. Je tedy jasné, že KBE představují významný zdroj pro současnou a budoucí dermatologii. Zlepšení našich znalostí o těchto buňkách, zejména o jejich fenotypu a regulaci stability jejich „kmenovosti“, by umožnily jejich izolaci a expanzi *in vitro*. Mohly by tak být připraveny nové technologie umožňující racionální terapii kožních defektů traumatického i metabolického původu. Velmi nadějně by mohlo být využití KBE při léčbě některých typů alopecií. Kožní karcinomy jsou s největší pravděpodobností onemocněním KBE, popř. PDB, kde mutace specifických genů zapojených do regulačních kaskád KBE ovlivňují biologické vlastnosti těchto nádorů. Tyto nádory by tak mohly být léčeny pomocí genové terapie, i když tato možnost je zatím velmi daleko. KBE, které dnes představují zejména objekt společného biomedicínského a klinického výzkumu, budou jistě v blízké budoucnosti využívány i klinicky v ordinaci kožního lékaře.

### Poděkování

Autoři děkují Mgr. Janu Kacvinskému za grafické provedení obrázku 2 a Prof. MUDr. Miloši Grimovi, DrSc., a Prof. MVDr. Janu Motlíkovi, DrSc., za přečtení rukopisu.

---

## LITERATURA

---

- BARRANDON, Y., GREEN, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, p. 2302–2306.
- BRALTN KM., WATT FM. Epidermal label-retaining cells: background and recent applications. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2004, 9, p. 196–201.
- BRAUN, KM., NIEMANN, C., JENSEN, UB., SUNDBERG, JP., SILVA-VARGAS, V., WATT, FM. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: Visualisation of label-retaining cells in whole mounts of mouse epidermis. *Development*, 2003, 130, p. 5241–5255.
- COMMO, S., GAILLARD, O., BERNARD, BA. The human hair follicle contains two distinct K 19 positive compartments in the outer root sheath: a unifying hypothesis or stem cell reservoir? *Differentiation*, 2000, 66, p. 157–164.
- COTSARELIS, G., SUN, TT., LAVKER, RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell*, 1990, 61, p. 1329–1337.
- FERRARIS C., BERNARD BA., DHOUILLY D. Adult epidermal keratinocytes are endowed with pilosebaceous forming abilities. *Int J Dev Biol*, 1997, 41, p. 491–498.
- FUCHS, E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol*, 111, 1990, p. 2807–2814.
- GANDARILLAS, A., WATT, FM. c-myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev*, 1997, 11, p. 2869–2882.
- HOLÍKOVÁ, Z., HRDLÍČKOVÁ, E., PLZÁK, J.,

- SMETANA, K., JR., BETKA, J., DVOŘÁNKOVÁ, B., EXNER, M., WASANO, K., ANDRÉ, S., KALTNER, H., MOTLÍK, J., HERCOGOVÁ, J., KODET, R., GABIUS, HJ. Defining the glyco-phenotype of squamous epithelia using plant and mammalian lectins. Differentiation-dependent expression of  $\alpha$ 2,6- and  $\alpha$ 2,3-linked N-acetylneuraminic acid in squamous epithelia and carcinomas, and its differential effect on binding of the endogenous lectins galectins-1 and -3. *APMIS*, 2002, 110, p. 845–856.
10. HONEYCUTT, KA., KOSTER, MI., ROOP, DM. Genes involved in stem cell fate decisions and commitment to differentiation play a role in skin disease. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2004, 9, p. 261–268.
  11. CHOVANEC, M., SMETANA K., JR., DVOŘÁNKOVÁ, B., PLZÁKOVÁ, Z., ANDRÉ, S., GABIUS, HJ. Decrease of nuclear reactivity to growth-regulatory galectin-1 in senescent human keratinocytes and detection of non-uniform staining profile alteration upon prolonged culture for galectin-1 and -3. *Anat Histol Embryol*, 2004, 33, p. 1–7.
  12. JANES, SM., LOWELL S., HUTTER, C. Epidermal stem cells *J Pathol*, 2002, 197, p. 479–491.
  13. JENSEN, UB., LOWELL S., WATT, FM. The spatial relationship between stem cells and their progeny in the basal layer of human epidermis: a new view based on whole-mount labelling and lineage analysis. *Development*, 1999, 126, p. 2409–2418.
  14. JONES, PH., HARPER, S., WATT, FM. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell*, 1995, 80, p. 83–93.
  15. KING, KE., PONNAMPERUMA, RM., YAMASHITA, T., TOKINO, T., LEE, LA., YOUNG, MF., WEINBERG, WC.  $\Delta$ Np63 functions as both a positive and a negative transcriptional regulator and blocks *in vitro* differentiation of murine keratinocytes. *Oncogene*, 2003, 5, p. 3635–3644.
  16. KLÍMA, J., SMETANA, K., JR., MOTLÍK, J., PLZÁKOVÁ, Z., LIU, FT., ŠTORK, J., KALTNER, H., CHOVANEC, M., DVOŘÁNKOVÁ, B., ANDRÉ, S., GABIUS, H.J. Comparative phenotypic characterization of keratinocytes originating from hair follicles. *J Mol Histol*, in press.
  17. KOSTER, MI., KIM, S., MILLS, AA., DEMAYO, FJ., ROOP, DJ. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev*, 2004, 18, p. 126–131.
  18. LABSKÝ, J., DVOŘÁNKOVÁ, B., SMETANA, K., JR., HOLÍKOVÁ, Z., BROŽ L., GABIUS, HJ. Mannosides as crucial part of bioactive supports for cultivation of human epidermal keratinocytes without feeder cells. *Biomaterials*, 2003, 24, p. 863–872.
  19. LANZA, R., GEARHART, J., HOGAN, B., MELTON, D., PEDERSEN, R., THOMSON, J., WEST, M. *Handbook of stem cells*, Elsevier, Amsterdam, 2004, p. 27–30.
  20. LIANG, L., BICKENBACH, JR. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells*, 2002, 20, p. 21–33.
  21. LOWELL, S., JONES, P., LE ROUX, I., DUNNE, J., WATT, FM. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem cell clusters. *Curr Biol*, 2000, 10, p. 491–500.
  22. MICHEL, M., TÖRÖK, N., GODBOOUT, MJ., LUSSIER, M., GAUDREAU, P., KOYAL, A., GERMAIN, L. Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells *in vivo* and *in vitro*: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci*, 1996, 109, p. 1017–1028.
  23. MORRIS, RJ., POTTEN CS. Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells *in vitro*. *Cell Proliferation*, 1994, 27, p. 279–289.
  24. MORRIS, RJ., LIU, Y., MARLES, L., ZAIXIN, Y., TREMPUS, C., SHULAN, L., LIN, JS., SAWICKI, JA., COTSARELIS G. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nature Biotechnology*, 2004, 22, p. 411–417.
  25. OSHIMA, H., ROCHAT, A., KEDZIA, C., KOBAYASHI, K., BARRANDON, Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*, 2001, 104, p. 233–245.
  26. OWENS, DM., WATT, FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nature Rev Canc*, 2003, 3, p. 444–451.
  27. OZAWA, M., AIBA, S., KUROSAWA, M., TAGAMI, H. Ber-EP4 antigen is a marker for a cell population related to the secondary hair germ. *Exp Dermatol*, 2004, 13, p. 401–405.
  28. PELENGARIS, S., LITTLEWOOD, T., KHAN, M., ELIA, G., EVAN, G. Reversible activation of c-Myc in skin: Induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell*, 1999, 3, p. 565–577.
  29. PELLEGRINI, G., DELLAMBRA, E., GOLISANO, O., MARTINELLI, E., FANTOZZI, I., BONDANZA, S., PONTIE, D., MCKEON, F., DELUCA, M. p63 identities keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 2001, 98, p. 3156–3161.
  30. PEREZ-LOSADA, J., BALMAIN, A. Stem cell-hierarchy in skin cancer. *Nature Rev Canc*, 2003, 3, p. 434–443.
  31. POTTEN, CS., MORRIS, RJ. Epithelial stem cells *in vivo*. *J Cell Sci Suppl*, 1988, 10, p. 45–62.
  32. POTTEN, CS., BOOTH C. Keratinocyte stem cells: commentary. *J Invest Dermatol*, 2002, 119, p. 888–899.
  33. PURKRÁBKOVÁ, T., SMETANA, K., JR., DVOŘÁNKOVÁ, B., HOLÍKOVÁ, Z., BÖCK, C., LENSCH, M., ANDRÉ, S., PYTLÍK, R., LIU, FT., KLÍMA, J., SMETANA, K., MOTLÍK, J., GABIUS, HJ. New aspects of galectin functionality in nuclei of cultured bone marrow stroma and epidermal cells: biotinylated galectins as tool to detect specific binding sites. *Biol Cell*, 2003, 95, p. 535–545.
  34. REICHEL, J., FURSTENBERGER, G., MAGIN, TM. Loss of keratin 10 leads to MAP kinase activation, increased keratinocyte turnover and decreased tumor formation in mice. *J Invest Dermatol*, 2004, 123, p. 973–981.
  35. REYNOLDS, AJ., JAHODA, CA. Cultured dermal papilla cells induce follicle formation and hair growth by transdifferentiation of an adult epidermis. *Development*, 1992, 115, p. 587–593.
  36. SIEBER-BLUM, M., GRIM, M., HU, YF., SZEDER, V. Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. *Dev Dyn*, 2004, 231, p. 258–269.
  37. STASIAK, PC., PURKIS, PE., LEIGH, IM., LANE, EB. Keratin 19: predicted amino acid sequence and broad tissue distribution suggest it evolved from keratinocyte keratins. *OJ Invest Dermatol*, 1989, 92, p. 707–716.
  38. TANNISHTHA, R., KORTISON, SJ., CLARKE, MF., WEISSMAN, IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414, p. 105–111.

39. TEH, MT., WONG, ST., NEIL, GW., GHALI, LR., PHILPOTT MP., QUINN, AG. FOXM1 is a down target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res*, 2002, 62, p. 4773–4780.
40. WAIKEL, RL., KAWACHI, Y., WAIKEL, PA., WANG XJ., ROOP, DR. Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nature Genet*, 2001, 28, p. 165–168.
41. WASEEM, A., DOGAN, B., TIDMAN, N., ALAM, Y., PURKIS, P., JACKSON, S., LALLI, A., MACHESNEY, M., LEIGH, IM. Keratin 15 expression in stratified epithe-

lia: downregulation in activated keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 1999, 112, p. 362–369.

Došlo do redakce: 11. 3. 2005

MUDr. Zuzana Plzaková. PhD.

Anatomický ústav 1. LF UK

U Nemocnice 3

128 00 Praha 2

E-mail: Zuzana.Plzakova@lf1.cuni.cz



## XXXI. ANGIOLOGICKÉ DNY 2006

Kongresové centrum Praha, 23.–25. 2. 2006



### HLAVNÍ TÉMA: Cévní onemocnění a jejich patogeneze, diagnostika, prevence a terapie

**Vybraná témata a vyzvané přednášky:** Ateroskleróza jako systémové onemocnění - Neinvazivní a invazivní diagnostické postupy u cévních pacientů - Rizikové faktory aterosklerózy - Prevence kardiovaskulárních komplikací - Protilipidová léčba u pacientů s onemocněním periferních tepen - Doporučení pro léčbu pacientů s intermitentními klaudikacemi - Kritická končetinová ischemie - Diabetická noha - Současný stav léčby aneuryzma aorty - Cerebrovaskulární onemocnění - Pokroky v intervenční angiologii - Plicní hypertenze - Nové léky u žilní tromboembolické nemoci - Prevence žilní trombózy u interních a chirurgických pacientů - Trombotické postižení povrchových žil - Primární varixy a posttrombotický syndrom - Chronická žilní insuficience a bérkové vředy - Moderní přístupy u pacientů s lymfedémem - Kompresivní léčba - Změny mikrocirkulace za klinických stavů - Duplexní sonografie tepen a žil - Raynaudův syndrom - Práce angiologické sestry

### MÍSTO KONÁNÍ

Kongresové centrum Praha, 5. května 65, 140 21 Praha 4

### JEDNACÍ JAZYKY

Čeština a angličtina bez tlumočení

### ODBORNÝ GARANT KONFERENCE A PŘEDSEDA ČESKÉ ANGIOLOGICKÉ SPOLEČNOSTI

MUDr. Karel Roztočil, CSc., IKEM, Vídeňská 1958, 140 21 Praha 4

### SEKRETARIÁT (PŘIHLÁŠKY A INFORMACE)

AMCA, spol. s r.o.

Academic and Medical Conference Agency

Mgr. Eva Uhrová

Újezd 40

118 01 Praha 1

Tel: 257 007 629

731 496 060/062

Fax: 257 007 622

E-mail: uhrova@amca.cz

Příhlášku k účasti lze také zaslat on-line z internetové adresy: [www.angiologie.cz](http://www.angiologie.cz).

Snížené registrační poplatky pro střední zdravotnický personál, lékaře do 30 let, studenty a seniory.

### VÝSTAVA

Výstava odborných firem bude umístěna v předsálí a bude probíhat po dobu kongresu.

### UBYTOVÁNÍ

Ubytování lze zajistit prostřednictvím sekretariátu konference.

**Konference má postgraduální charakter a je garantována ČLK jako akce kontinuálního vzdělávání.  
Účastníci obdrží certifikát o účasti.**

**Zdravotní sestry obdrží certifikát s daným počtem kreditů podle vyhlášky č. 423/2004 Sb. § 3**