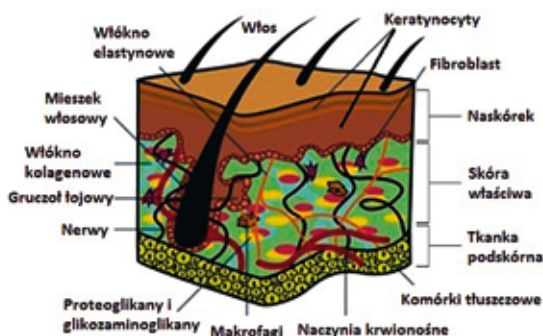


CZAS, KTÓRY LECZY RANY, CZYLI O POWSTAWANIU BLIZN U CZŁOWIEKA

Olga Zastawny (Kraków)

Skóra jest zespołem tkanek budujących elastyczną powłokę ciała chroniącą wnętrze organizmu człowieka przed działaniem czynników środowiska zewnętrznego. Jest to oczywista i najbardziej widoczna funkcja skóry. Jednak dzięki swej złożonej strukturze narząd ten pełni wiele innych różnorodnych zadań, takich jak: termoregulacja, percepcja dotyku, reakcje odpornościowe oraz utrzymanie szeroko pojętej homeostazy. Stąd gojenie ran to niezwykle istotny proces nakierowany na przywrócenie funkcji i odbudowę struktury skóry. U dorosłego człowieka odbudowa uszkodzeń skóry przebiega z wytworzeniem blizny, a więc proces gojenia ran nie jest równoznaczny z pełną regeneracją. Aby zrozumieć naturę i znaczenie powstawania blizn należy dobrze poznać budowę skóry i charakterystykę komórek w niej występujących.

Skóra składa się z trzech warstw, które w swej morfologii różnią się znacząco. Są to naskórek, skóra właściwa i tkanka podskórna – warstwa zbudowana przede wszystkim z komórek tłuszczowych (adipocytów), w której zlokalizowana jest gęsta sieć naczyń krwionośnych (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat budowy skóry człowieka.

Naskórek stanowi najbardziej zewnętrzną część skóry i jest siedliskiem kilku typów komórek. Najliczniejszy z nich stanowią keratynocyty – komórki nabłonkowe. Poza keratynocytami w naskórku występują melanocyty – komórki barwnikowe wytwarzające odpowiedzialną za pigmentację skóry i włosów melaninę, a także komórki dendrytyczne, nazywane komórkami Langerhansa, biorące udział w odpowiedzi immunologicznej organizmu.

Podczas dojrzewania (różnicowania) keratynocytów komórki te ulegają stratyfikacji. Warstwa położona

najwyżej zbudowana jest z komórek obumarłych, pozbawionych jąder komórkowych i mocno zrogowaciałych. Rogowacenie to jest wynikiem odkładania białka – keratyny, które przyjmuje postać płytek. Warstwa ta, nazywana warstwą zrogowaciałą, podlega złuszczeniu, jednak jest stale uzupełniana przez komórki przemieszczające się z niższych warstw – ziarnistej i kolczystej. Jedynie warstwa bazalna – podstawna, położona najniżej, zachowuje zdolność do podziałów mitotycznych i jest odpowiedzialna za uzupełnianie puli komórek, które uległy złuszczeniu.

Pomiędzy naskórkiem a skórą właściwą występuje struktura określana mianem błony podstawnej. Jest ona zbudowana z wielu różnych rodzajów białek, przede wszystkim laminin oraz kolagenu typu IV. Keratynocyty są połączone z lamininami błony podstawnej za pomocą białek receptorowych – integrzyn, które występują w ich błonie komórkowej.

Komórki występujące w naskórku są bardzo ściśle upakowane. Keratynocyty przylegają do siebie i łączą się ze sobą za pośrednictwem wielu typów wyspecjalizowanych połączeń międzykomórkowych. Tym samym macierz (substancja) zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*, ECM), czyli zestaw białek i innych cząsteczek występujących w tkance poza obrębem komórek, jest w naskórku bardzo uboga.

W skórze właściwej natomiast substancja zewnątrzkomórkowa jest niezwykle obfita. Ma to znaczenie praktyczne i służy przenoszeniu sił mechanicznych, nadaje skórze sprężystość i pozwala jej pełnić swoją funkcję. Taka struktura skóry właściwej sprawia, że zasiedlające ją komórki są mocno rozproszone. Główni rezydenci tej tkanki – fibroblasty – to komórki odpowiedzialne za wytwarzanie komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej, przede wszystkim włóknistego białka – kolagenu. To właśnie to białko nadaje elastyczny charakter skórze, a także jest odpowiedzialne za wytrzymałość mechaniczną innych typów tkanki łącznej: chrząstki, ścięgien czy kości.

Kolagen jest białkiem zbudowanym z trzech wydłużonych podjednostek, które nawijają się wokół siebie tworząc trójniciową strukturę nazywaną superhelisą. Cząsteczki kolagenu są bardzo mocno upakowane i tworzą długie „nitki” – włókienka kolagenowe, które mogą łączyć się ze sobą w większe jednostki,

w wyniku czego powstaje włókno kolagenowe. Fibroblasty wydzielają kolagen w formie prekursorowej, określanej mianem prokolagenu. Dopiero na zewnątrz komórki białko to poddawane jest specjalnej obróbce enzymatycznej i ulega agregacji, ponieważ powstanie tak dużej struktury białkowej wewnątrz komórki nieuchronnie prowadziło do jej zniszczenia.

Istnieje wiele typów kolagenu, które różnią się w swojej budowie oraz spełnianej funkcji. Różne rodzaje kolagenu zasilają odmienne tkanki i struktury. Przykładowo w skład błony podstawnej oddzielającej naskórek od skóry właściwej wchodzi kolagen typu IV, o czym wspomniano wcześniej. Natomiast substancję międzykomórkową skóry właściwej tworzy przede wszystkim kolagen typu I.

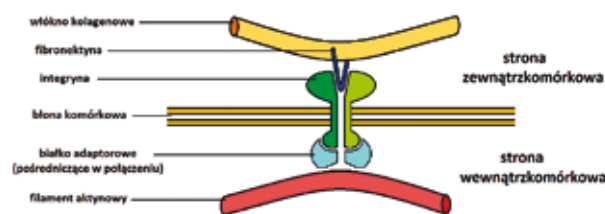
Odminną grupę cząsteczek licznie występujących w macierzy zewnątrzkomórkowej skóry właściwej stanowią proteoglikany powstałe w skutek połączenia białka z wieloma cząsteczkami glikozaminoglikanów (rodzaj złożonych polisacharydów) – wiele podłużnych cząsteczek glikozaminoglikanów łączy się z rdzeniem białkowym tworząc olbrzymie „szczotkowate” agregaty. Proteoglikany wykazują silnie hydrofilowe właściwości. Wiążąc cząsteczki wody nadają skórze elastyczność i sprawiają, że jest ona odporna na ściskanie. Proteoglikany mogą łączyć się również z długimi cząsteczkami kwasu hialuronowego (który również należy do grupy glikozaminoglikanów) tworząc jeszcze większe, rozgałęzione struktury.

Składniki macierzy zewnątrzkomórkowej są cały czas produkowane i degradowane, co sprawia, że włóknista sieć ECM jest strukturą bardzo labilną. Zdolność komórek do rozkładania komponentów substancji zewnątrzkomórkowej odgrywa nadrzędną rolę w wielu procesach, takich jak gojenie ran i niestety, także powstawanie nowotworów, ponieważ komórki tym sposobem ułatwiają sobie migrację pomiędzy gęsto upakowanymi włóknami. Enzymy zdolne do rozcinania białek zewnątrzkomórkowych noszą wspólną nazwę proteinaz matriks. Wśród nich istotną grupę stanowią metaloproteinazy (MMP) zdolne do trawienia między innymi kolagenu. Grupa tkankowych inhibitorów metaloproteinaz TIMPs hamuje ich enzymatyczną aktywność i może prowadzić do zaburzeń balansu pomiędzy depozycją a degradacją składników ECM, na przykład w przebiegu patologii związanych z bliznowaceniem.

Fibroblasty przemieszczają się wzdłuż włókien kolagenu jak po torach, co oznacza, że komórki muszą się w jakiś sposób łączyć z tym białkiem. Takie połączenie rzeczywiście ma miejsce, jednak komórki nie wiążą się z kolagenem w sposób bezpośredni, a za pomocą innego komponentu macierzy

zewnątrzkomórkowej – białka fibronektyny. Fibronektyna rozpoznaje białka receptorowe występujące w błonie komórkowej fibroblastów, integryny – jest to ta sama grupa białek, która zapewnia przyleganie keratynocytów do błony podstawnej, i łączy się z nimi, tym samym zapewniając fibroblastom przyleganie do włókien kolagenu. Integryny zbudowane są z dwóch podjednostek określanych jako podjednostka α i β . Podjednostki te nie są jednakowej budowy, co oznacza, że integryny pod względem budowy są heterodimerami.

Po stronie wnętrza komórki integryny są związane z tak zwanymi filamentami aktynowymi, składnikami cytoszkieletu komórki. Tworzą go różne białka strukturalne nadające komórce kształt i zapewniające zdolność do aktywnego ruchu. Połączenie integryn z mocnymi i sprężystymi filamentami aktynowymi przenosi naprężenia mechaniczne powstałe w trakcie oddziaływań komórki ze środowiskiem zewnętrznym na cytoszkielet. Zapobiega to tym samym wyrwaniu integryn z błony komórkowej, która jest delikatną i niezbyt rozciągliwą strukturą. Sposób połączenia komórek z włóknem kolagenowym został przedstawiony na Rycinie 2.



Ryc. 2. Sposób połączenia komórek, na przykład fibroblastów, z włóknami kolagenowymi. W połączeniu pośredniczą liczne białka, takie jak fibronektyna, która wiąże kolagen po stronie zewnątrzkomórkowej, transbłonowe białka receptorowe – integryny oraz białka adaptorowe łączące integryny z filamentem aktynowym po wewnątrzkomórkowej, cytoplazmatycznej stronie. Na ilustracji podjednostki α i β integryny zostały oznaczone odmiennymi kolorami. Wykonanie: Olga Zastawny; na podstawie: Alberts et al., 2009.

Zdolność fibroblastów i innych komórek do pełzania wzdłuż włókien substancji zewnątrzkomórkowej jest niezwykle istotna w procesie gojenia ran skórnych. Nieodłącznym etapem naprawy uszkodzonej tkanki jest akumulacja licznych komórek różnego typu w miejscu uszkodzenia.

W przypadku gojenia ran skórnych u ludzi w chwili po zranieniu dochodzi do aktywacji stanu zapalnego obejmującego ranę i tkanki do niej przylegające. Stanowi on pierwszy z trzech głównych etapów wyróżnianych podczas gojenia uszkodzeń skóry.

Rozerwane naczynia krwionośne aktywują kaskadę krzepnięcia, w czasie której rozpuszczony w osoczu fibrynogen zamienia się we włóknik (fibrinę) i tworzy gęsto usieciowany skrzep. Stanowi on pierwsze,

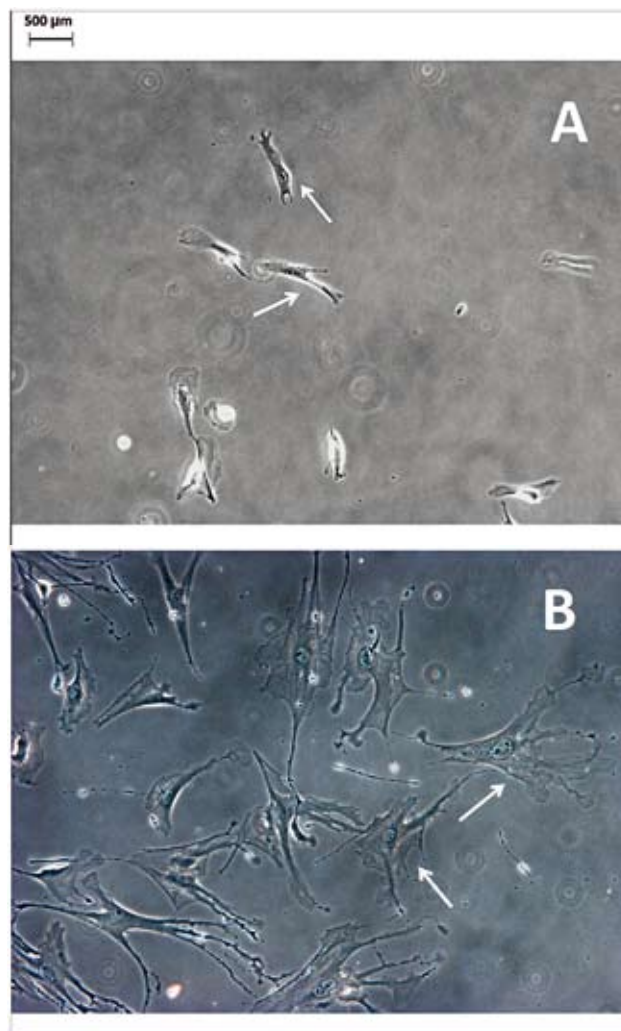
prymitywne podłoże dla migrujących komórek. Płytki krwi agregują w obrębie skrzepu pomagając zahamować krwawienia. Właśnie wtedy też w miejsce zranienia napływają liczne komórki układu immunologicznego, których zadaniem jest pokierować dalszym przebiegiem procesu zapalnego. Pierwszą linię obrony stanowią neutrofile, czyli rodzaj leukocytów specjalizujący się w pochłanianiu i neutralizacji – fagocytozie bakterii, które zdążyły przedostać się do wnętrza organizmu. Nieco później ich miejsce zajmują makrofagi, które skupiają się na usuwaniu resztek uszkodzonych komórek i pozostałych bakterii, oczyszczając tym samym pole do działania dla innych komórek. Ponadto uwalniają one liczne mediatory prozapalne, jak histamina powodująca rozszerzenie nieuszkodzonych naczyń krwionośnych znajdujących się w obrębie rany. Dlatego też obserwowany jest obrzęk, zaczerwienienie i zwiększenie ciepłoty w miejscu objętym zapaleniem. Z kolei napływające limfocyty rozpoczynają wzmożoną produkcję cytokin – czynników, które wpływają na migrację, namnażanie i aktywację wielu typów komórek.

Wtedy rozpoczyna się kolejna faza procesu gojenia – faza proliferacyjna nazywana również fazą fibroplastyczną. W tym czasie powstaje tkanka określana mianem ziarniny. Jest to bardzo bogato unaczyniona struktura składająca się przede wszystkim z kolagenu i innych składników macierzy zewnątrzkomórkowej.

Fibroblasty zaalarmowane o toczącym się stanie zapalnym przez komórki układu immunologicznego migrują za pośrednictwem włókien kolagenowych w kierunku rany i tam intensywnie się namnażają (proliferują), a następnie przekształcają się (różnicują) w niezwykle aktywne, ruchliwe i kurczliwe miofibroblasty. Miofibroblasty są znacznie większe niż ich prekursorzy, a ich najbardziej charakterystyczną cechą jest zdolność do produkcji kurczliwego białka – α -aktyny mięśni gładkich (α SMA). Białko to, obecne również, jak wskazuje jego nazwa, w komórkach mięśni gładkich, formuje tak zwane włókna naprężeniowe. Obecność takich struktur w miofibroblastach sprawia, że komórki te nabierają zdolności kurczliwych. Miofibroblasty przyczyniają się do zmniejszenia szerokości rany poprzez aktywne „ściągnięcie” jej brzegów do środka. Porównanie morfologii fibroblastów i miofibroblastów, a także kurczliwe struktury włókien naprężeniowych zostały przedstawione na Rycinie 3 i Rycinie 4.

Miofibroblasty są również odpowiedzialne za wzmożoną depozycję składników ECM. Produkcja zewnątrzkomórkowych białek i proteoglikanów znacznie przewyższa proces ich degradacji, dzięki czemu możliwe jest wypełnienie ubytku oraz odbudowa

struktury. Miofibroblasty odkładają znaczne ilości kolagenu, który stanowi matrycę i rusztowanie rany. Początkowo jest to kolagen typu III, występujący głównie w ziarninie, później w dojrzałej bliznie jest on w większości (choć niecałkowicie) zastępowany przez kolagen typu I. Jednakże zdolność miofibroblastów do organizacji włókien kolagenu nie pozwala

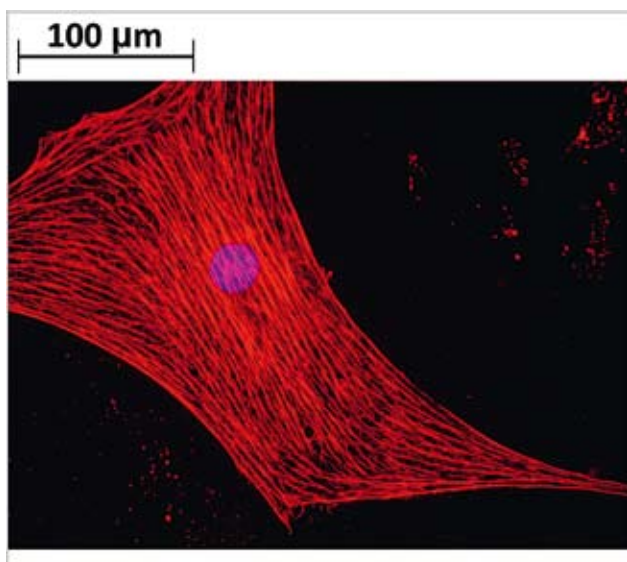


Ryc. 3. Fibroblasty i ich zaktywowane formy – miofibroblasty różnią się między sobą pod względem cech fenotypowych i spełniają odmienne funkcje w organizmie. Na zdjęciach przedstawiono fibroblasty (A) oraz miofibroblasty (B) wyizolowane z mysiej skóry i hodowane w warunkach *in vitro*. Wybrane, indywidualne komórki zostały oznaczone strzałkami. Obydwie grupy komórek różnią się między sobą pod względem morfologii: wielkości i kształtu. Zaktywowane miofibroblasty rozpoczynają ekspresję wielu białek, które są nieobecne w ich formach prekursorowych. Obrazy komórek uzyskano przy zastosowaniu mikroskopii kontrastowo – fazowej. Zdjęcie: Olga Zastawny.

na prawidłowe ukształtowanie i pełną regenerację tkanki. O ile w skórze nieuszkodzonej włókna kolagenu przypominają swoim ułożeniem sieć (często porównywaną do wzoru spotykanego w wiklinowych koszykach), tak w bliznie są one odkładane niemal równolegle względem siebie, są również znacznie cieńsze. Ze względu na zmieniony wzór przebiegu włókien, blizny są o wiele mniej rozciągliwe

i elastyczne w porównaniu z nieuszkodzoną skórą. Często prowadzi to do przykurczów i uniemożliwia odzyskanie pełnej fizycznej sprawności, jak na przykład całkowite rozprostowywanie kończyn czy skreślanie głową (w zależności od lokalizacji blizny).

W ostatnim trzecim etapie gojenia rany, fazie przebudowy (remodelingu), nowopowstała macierz jest poddawana dodatkowym obróbkom poprzez działanie proteinaz matriks, jednak blizna nigdy nie będzie wykazywać pełnej funkcjonalności i struktury, które skóra posiadała przed urazem. W fazie remodelingu miofibroblasty, które wypełniły swoje przeznaczenie, podlegają procesowi apoptozy. Apoptoza, nazywana inaczej programowaną śmiercią komórki, jest zjawi-



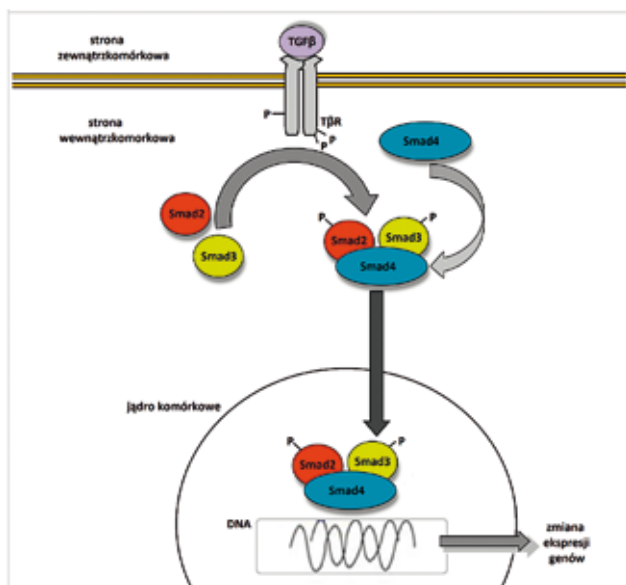
Ryc. 4. Miofibroblasty produkują kurczliwe białko – α -aktynę mięśni gładkich, która formuje struktury włókien naprężeniowych i nadaje tym komórkom cechy „mięśniowe”. Miofibroblasty wykazują zdolności kurczliwe, dzięki czemu mogą one brać udział w obkurczaniu szerokości rany. Struktury włókien naprężeniowych zostały przedstawione na zdjęciu dzięki wybarwieniu białka α -aktyny mięśni gładkich poprzez zastosowanie metody immunofluorescencji z użyciem odpowiednich przeciwciał (kolor czerwony). Jądro komórkowe pojedynczego miofibroblasty wyznakowano DAPI (kolor niebieski). Obraz uzyskano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. Zdjęcie: Olga Zastawny.

skiem bardzo powszechnie występującym zarówno w dorosłym organizmie, jak i w czasie embriogenezy. Przykładowo w czasie rozwoju zarodka dzięki apoptozie możliwe jest rzeźbienie poszczególnych palców ze zwartej masy komórkowej. W przypadku miofibroblastów po wykształceniu blizny konieczne jest wyłączenie ich funkcji. Obecność tych komórek po zakończonym procesie gojenia nie jest dłużej pożądana, a wręcz może okazać się katastroficzna w skutkach. Dlatego też miofibroblasty włączają program apoptozy, by ostatecznie zniknąć z miejsca początkowego uszkodzenia. Liczne zmiany wewnątrz komórek, które uruchomiły programowaną śmierć komórki, prowadzą do ich obkurczenia: cytoskielet

zapada się, dochodzi do rozpadu otoczki jądrowej, a materiał genetyczny jest cięty na drobne fragmenty. Pozostałości miofibroblastów, będące wynikiem tego komórkowego „samobójstwa”, są bardzo szybko i dyskretnie usuwane przez sąsiadujące komórki oraz makrofagi. Zapobiega to wylaniu się zawartości obumierających komórek na zewnątrz, co mogłoby doprowadzić do stanu zapalnego. Tym samym, o ile ziarnina bogata jest w miofibroblasty, w bliznie, tak jak w nieuszkodzonej skórze, znajdują się głównie fibroblasty. Prolongacja działania miofibroblastów oraz zaburzenia w procesie apoptozy powodują liczne patologie związane z zabliznianiem rany – takie jak blizny hipertroficzne czy keloidy, czyli bliznowce. W porównaniu z nimi blizny prawidłowo ukształtowane nazywane są często normotroficznymi. W przypadku tych patologii bliznowacenia dochodzi do zaburzenia balansu pomiędzy depozycją i degradacją składników macierzy zewnątrzkomórkowej. W związku z tym keloidy i blizny hipertroficzne charakteryzują się znacznym przerostem tkanki bliznowatej i stanowią problem dwoistej natury: zarówno estetycznej, jak i medycznej. Pacjenci cierpiący z powodu obydwu tych schorzeń skarżą się na dolegliwości takie jak świąd, trudności ruchowe, a także dyskomfort psychiczny, znacznie obniżający jakość życia. W związku z tym obecnie liczne badania naukowe nakierowane są na zrozumienie natury powstawania tych patologii oraz opracowanie coraz to lepszych metod ich leczenia.

Keloidy różnią się od blizn hipertroficznych pod wieloma względami, jak na przykład budową histologiczną czy przebiegiem włókien kolagenu. Ponadto bliznowce, w przeciwieństwie do blizn hipertroficznych, rozrastają się poza pierwotny obszar rany. W obydwu tych przypadkach, tak jak w prawidłowych, nie przerostowych bliznach, włókna kolagenu układają się równolegle względem siebie. Jednak w przeciwieństwie do blizn normotroficznych, w keloidach i bliznach hipertroficznych wciąż obecne są miofibroblasty. Dodatkowo miofibroblasty zaangażowane w procesy nadmiernego bliznowacenia wykazują zmienione cechy w porównaniu z komórkami występującymi w ziarninie, na której powstanie prawidłowo wykształcona blizna. Słabiej odpowiadają one na sygnały indukujące apoptozę oraz wykazują mniejszą zdolność do degradacji komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej, co jest wynikiem wzmożonej sekrecji inhibitorów metaloproteinaz TIMPs. Ponadto w bliznach hipertroficznych i keloidach obecne są również znaczne ilości kolagenu typu III, który w prawidłowych bliznach w większości zastępowany jest kolagenem typu I.

Pośród szeregu sygnałów, które zaangażowane są w różnicowanie fibroblastów, najważniejszą rolę zdaje się odgrywać transformujący czynnik wzrostu β (TGF β). Wiąże się on ze swoim receptorem na powierzchni błony komórkowej, tym samym regulując zachowanie i funkcje wielu typów komórek, także fibroblastów. Związanie cząsteczki TGF β z receptorem powoduje aktywację tego receptora (która objawia się przyłączeniem do niego grup fosforanowych – tak zwaną fosforylacją). Zaktywowany receptor rekrutuje następnie po stronie cytoplazmy komórki białka Smad – Smad2 oraz Smad3, które również ulegają fosforylacji. Aktywne białka Smad2 i Smad3 łączą się i tworzą kompleks z białkiem Smad4, a następnie w takiej postaci przemieszczają się do jądra komór-



Ryc. 5. Ścieżka sygnałowa TGF β . Połączenie cząsteczki TGF β z jej receptorem (T β R) powoduje fosforylację tego receptora, czyli przyłączenie do niego grup fosforanowych (P) i jego aktywację. Zaktywowany receptor powoduje fosforylację białek Smad2 oraz Smad3, które następnie wraz z białkiem Smad4 tworzą kompleks przemieszczający się do jądra komórkowego. Kompleks ten łączy się z DNA i jako czynnik transkrypcyjny, zmienia ekspresję wielu genów. Wykonanie: Olga Zastawny; na podstawie: Stępień-Wyrobiec, 2008.

kowego, by tam regulować ekspresję wielu genów. Komórki włączają produkcję białka α SMA, nabierają zdolności kurczliwych, rozpoczyna się także wzmożona depozycja składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Ponadto fibroblasty pobudzone TGF β rozpoczynają sekrecję tego czynnika wzmacniając sygnał działający na nie same, a także na sąsiednie komórki. Inhibitorem działania aktywnych białek Smad2 i Smad3 jest Smad7. Jego działanie ma na celu zapobiegnięcie nadmiernemu odłożeniu się białek ECM i tym samym przerostowi blizny.

Ścieżka sygnałowa TGF β przebiegająca z udziałem białek Smad została przedstawiona na Rycinie 5.

Cząsteczki, które jak białka Smad przenikają do jądra komórkowego i aktywują bądź też hamują działanie genów, nazywane są czynnikami transkrypcyjnymi. MyoD jest czynnikiem transkrypcyjnym powiązanym bezpośrednio z powstawaniem tkanki mięśniowej, czyli tak zwaną miogenezą. MyoD jest obecne również podczas różnicowania fibroblastów, kiedy nabierają one „mięśniowych” cech.

Jak zostało opisane TGF β po związaniu ze swoim receptorem wpływa na ekspresję wielu genów, tym samym uruchamiając produkcję licznych białek, w tym MyoD. To właśnie ten czynnik bezpośrednio wpływa na syntezę α SMA i formowanie włókien naprężeniowych.

Pomimo iż, jak opisano wcześniej, miofibroblasty, które zakończyły budowę blizny, podlegają apoptozie, istnieją pewne doniesienia mówiące, że niektóre czynniki są w stanie cofnąć różnicowanie miofibroblastów, tak że powracają one do swojej poprzedniej, fibroblastycznej postaci. Obecnie badania naukowe prowadzone między innymi na hodowlach komórkowych skupiają się na zastosowaniu czynników, które mogą obniżyć ilości MyoD w zróżnicowanych miofibroblastach, i tym samym powodować ich odróżnicowanie, czyli powrót do formy prekursorowej. Tego typu badania podstawowe to pomocne narzędzie przy opracowywaniu nowych terapii związanych z nadmiernym bliznowaceniem.

Powstawanie blizn, które jest następstwem gojenia ran skórnych, zdaje się stanowić kompromis pomiędzy pełną regeneracją struktury i funkcji tkanki a szybkim uzupełnieniem ubytku i przywróceniem homeostazy organizmu po urazie. Jak wywnioskować można z niniejszego artykułu jest to proces niezwykle złożony i angażujący liczne typy komórek. Poznanie natury powstawania blizn, ich fizjologii i właściwości jest konieczne dla ulepszenia terapii związanych z gojeniem ran i patologiami bliznowacenia.