

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických vied



ŠTÚDIUM MIGRÁCIE BUNIEK OVPLYVNENÝCH SÍRNYM YPERITOM

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.

Konzultant diplomovej práce: Mgr. Petr Jošt, PhD.

Hradec Králové 2023

Mária Mojská

Pod'akovanie

Chcela by som sa pod'akovať všetkým, ktorí mi akýmkoľvek spôsobom pomohli pri spracovaní tejto práce. Moja veľká vďaka patrí predovšetkým Mgr. Petrovi Joštovi, PhD., ktorý bol veľmi ochotný a mal trpezlivosť so mnou pracovať v laboratóriu. Vždy mi vedel pomôcť a poradiť, navádzal ma správnym smerom pri písaní diplomovej práce. Pod'akovanie patrí aj RNDr. Miloslavovi Macháčkovi, PhD. za ochotu a milý prístup. Taktiež by som chcela pod'akovať mojej rodine a kamarátom, ktorí ma podporovali a dodávali mi energiu v priebehu celého štúdia. V neposlednom rade by som rada pod'akovala za finančnú podporu tejto práce projektu DZRO-FVZ22-ZHN II.

Čestné prehlásenie

„Svojim podpisom prehlasujem, že táto práca je mojim pôvodným autorským dielom. Použitá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri vypracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové, dňa 15. 05. 2023

.....

Mária Mojská

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických vied

Kandidát: Mária Mojská

Školiteľ: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.

Konzultant: Mgr. Petr Jošt, PhD.

Názov diplomovej práce: Štúdium migrácie buniek ovplyvnených sírnym yperitom

Sírny yperit je vysoko toxická chemická látka. Z pohľadu toxikológie ju radíme medzi pľuzgierotvorné chemické látky a jej použitie je zakázané medzinárodným „Dohovorom o zákaze vývoja, výroby, hromadenia a použitia chemických zbraní a o ich zničení“. Aj napriek tomu bola však táto látka v minulosti zneužitá v niekoľkých ozbrojených konfliktoch a teroristických útokoch. Pri kontakte s ľudskou kožou dochádza k tvorbe typických pľuzgierov naplnených nažltlým exsudátom. Sírnny yperit má cytotoxické a cytostatické účinky na živé tkanivo, a preto je liečba takýchto lézií mimoriadne obťažná.

Táto práca sa zaoberá hodnotením hypotézy, či môžu rastové faktory IGF, KGF a EGF prispieť k rýchlejšej regenerácii tkaniva zasiahnutým yperitom. Metódou „scratch wound healing assay“ bol hodnotený vplyv uvedených rastových faktorov na kolektívnu migráciu buniek keratinocytov HaCaT a kožných fibroblastov HDFa v podmienkach *in vitro*.

Naše výsledky ukazujú, že toxické účinky sírneho yperitu natoľko inhibujú migráciu buniek, že sa pozitívny vplyv testovaných rastových faktorov behom 24 hodinového intervalu prejavil len veľmi mierne, čo viedlo k štatisticky nesignifikantným výsledkom. V niektorých prípadoch došlo aj k inhibícii bunkovej migrácie.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Mária Mojská

Supervisor: RNDr. Miloslav Macháček, PhD.

Consultant: Mgr. Petr Jošt, PhD.

Title of diploma thesis: Study of the migration of cells affected by sulfur mustard

Sulfur mustard is a highly toxic chemical agent. From the point of view of toxicology, it is classified as a blistering agent, and its use is prohibited by the Chemical Weapons Convention. However, this substance has been used in several armed conflicts and terrorist attacks in the past. When it comes in contact with human skin, it produces typical blisters filled with a yellowish exudate. Sulfur mustard has cytotoxic and cytostatic effects on living tissue, and therefore the treatment of such lesions is extremely difficult.

This thesis is focused on the *in vitro* evaluation of the possibility of employing growth factors IGF, KGF, and EGF in the wounding process of sulfur mustard-damaged tissue. The effect of these growth factors on collective migration of HaCaT keratinocytes and HDFa skin fibroblasts under *in vitro* conditions was evaluated using the “scratch wound healing assay” method.

Our results show that the toxic effects of sulfur mustard inhibit cell migration to such an extent that the positive effect of the growth factors tested during the 24-hour interval was only very slight, leading to statistically insignificant results. In some cases, inhibition of cell migration also occurred.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	9
2.1	Sírny yperit.....	9
2.1.1	Fyzikálno-chemické vlastnosti	9
2.1.2	Účinky na ľudský organizmus	10
2.1.3	Mechanizmus účinku sírneho yperitu	13
2.2	Ľudská koža	16
2.2.1	Štruktúra kože	17
2.3	Proces hojenia rán	18
2.3.1	Hemostáza a koagulácia.....	19
2.3.2	Zápalová reakcia	20
2.3.3	Proliferácia buniek	21
2.3.4	Remodelácia.....	22
2.4	Rastové faktory	22
2.4.1	Úloha rastových faktorov pri hojení rán	27
2.5	Kožné lézie spôsobené sírnym yperitom.....	28
2.5.1	Mechanizmus vzniku pľuzgiera.....	29
2.5.2	Proces hojenia kožných lézií spôsobených HD	30
2.5.3	Chronické komplikácie po zahojení lézií.....	31
2.6	Bunková migrácia	32
2.6.1	Sledovanie bunkovej migrácie v <i>in vitro</i> podmienkach.....	34
2.6.2	Analýza a kvantifikácia bunkovej migrácie.....	37
3	CIEĽ PRÁCE	40
4	PRAKTICKÁ ČASŤ	41
4.1	Použité chemikálie	41
4.2	Príprava roztokov	42

4.3	Prístroje, pomôcky a programové vybavenie.....	45
4.4	Bunková línia HaCaT a HDFa	46
4.4.1	Kultivácia buniek.....	46
4.4.2	Nasadenie buniek do 24 jamkovej doštičky	46
4.5	Scratch wound healing assay	47
4.5.1	Vyhodnotenie testu	48
4.6	Stanovenie bunkovej viability.....	49
4.7	Štatistická analýza dát	50
5	VÝSLEDKY.....	51
5.1	Vplyv IGF na migráciu buniek HaCaT	51
5.2	Vplyv KGF na migráciu buniek HaCaT	53
5.3	Vplyv EGF na migráciu buniek HaCaT.....	56
5.4	Vplyv IGF na migráciu buniek HDFa.....	59
5.5	Vplyv KGF na migráciu buniek HDFa	62
5.6	Vplyv EGF na migráciu buniek HDFa.....	65
6	DISKUSIA	69
7	ZÁVER.....	72
8	ZOZNAM SKRATIEK	73
9	POUŽITÁ LITERATÚRA	75
10	WEBOVÉ REFERENCIE.....	88

1 ÚVOD

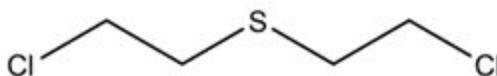
Migrácia buniek je významnou súčasťou procesu hojenia rán. Tohto deja sa zúčastňujú rôzne typy buniek a rad chemických látok ako sú cytokíny alebo zápalové mediátory. Laboratórne je možné sledovať bunkovú migráciu v podmienkach *in vitro* metódou „scratch wound healing assay“, čo možno voľne preložiť ako „metóda zacel'ovania rany“. Pretože táto metóda umožňuje sledovať kolektívnu bunkovú migráciu za definovaných podmienok, využili sme ju pre hodnotenie vplyvu rastových faktorov na migráciu buniek.

Naším cieľom bolo zistiť, ako rastové faktory IGF, KGF a EGF ovplyvňujú migráciu buniek ľudských keratinocytov a kožných fibroblastov, ktoré boli navyše ovplyvnené sírnym yperitom. Sírnym yperitom je pľuzgierotvorná bojová chemická látka s cytotoxickým a cytostatickým účinkom. Spôsobuje typické kožné lézie, ktoré sa komplikovane hoja. Pozitívny vplyv rastových faktorov na proces hojenia by mohol výrazne skrátiť dobu rekonvalescencie a znížiť riziko infekcie chronicky hojacej rany.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Sírnny yperit

Sírnny yperit (bis(2-chlorethyl)sulfid, HD; obr. 1) je vysoko toxická látka, ktorú z pohľadu vojenskej toxikológie radíme medzi pľuzgierotvorné bojové chemické látky. Do tejto kategórie rovnako patrí aj skupina dusíkatých yperitov (HN-1, HN-2 a HN-3), lewisit (L) a fosgenoxim (CX). HD bol použitý v mnohých vojnách a medzištátnych konfliktoch. Známe je jeho prvé použitie Nemcami v 1. svetovej vojne pri zaútočení na Belgicko, použitie Irakom v Iránsko-Irackom konflikte alebo počas konfliktov v Sýrii v roku 2015 (Nourani et al. 2017; Rose et al. 2018; Smith et al. 1995; Wattana a Bey 2009). Sírnym yperitom môže byť naplnená chemická munícia rôzneho typu, napríklad vo forme pozemných mín, delostreleckých granátov, mínometného streliva alebo rakiet. Zamorenie územia môže pretrvávať až niekoľko týždňov v závislosti na klimatických podmienkach. Páry HD sú ťažšie než vzduch a preto majú tendenciu sa hromadiť v nízko položených oblastiach terénu (Wattana a Bey 2009).



Obr. 1 Chemický vzorec sírneho yperitu (upravené podľa Wattana a Bey 2009)

Zatiaľ neexistuje žiadne špecifické antidotum, ktoré by sa dalo použiť v terapii zasiahnutých osôb. Základ starostlivosti spočíva v symptomatickej liečbe. Letalita intoxikovaných HD je nízka, avšak komplikovaná rekonvalescencia a rozvoj neskorších a trvalých následkov nepriaznivo ovplyvňuje kvalitu života jedinca (Khan et al. 2017).

2.1.1 Fyzikálno-chemické vlastnosti

V čistom stave je destilovaný sírnny yperit bezfarebná olejovitá kvapalina. V tejto forme je takmer bez zápachu, poprípade je len slabo cítiť po cesnaku alebo horčici. Tmavo hnedé zafarbenie a typický zápach môže byť zapríčinený obsahom nečistôt pochádzajúcich z procesu chemickej syntézy (východiskové látky, medziprodukty, vedľajšie produkty) alebo produktami vzniknutými dlhodobým skladovaním ako je napríklad sesquiperit (1,2-bis(2-chlorethylsulfanyl)ethan). HD je len obmedzene rozpustný vo vode (0,07 % pri 10 °C) za súčasného hydrolytického rozkladu. Rýchlosť

hydrolyzy zvyšuje alkalické prostredie a vysoká teplota. Naproti tomu v organických rozpúšťadlách je HD rozpustný neobmedzene (Wattana a Bey 2009). Súhrn fyzikálno-chemických vlastností je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1 Fyzikálno-chemické vlastnosti sírneho yperitu (upravené podľa Jošt et al. 2018; Wattana a Bey 2009)

Sumárny vzorec	C ₄ H ₈ Cl ₂ S
Vzhľad	Bezfarebná olejovitá kvapalina
Bod varu	215 až 217 °C
Bod tuhnutia	14,50 °C
Špecifická hustota	1,27 g·cm ⁻³ (20 °C)
Tlak nasýtených pár	96,1 Pa (20 °C)
Prchavosť	610 mg·m ⁻³ (20 °C)
Rozpustnosť vo vode	0,092 g v 100 g vody (22 °C)
Rozpustnosť v organických rozpúšťadlách	Neobmedzene
Zápach	Slabo po cesnaku alebo horčici

2.1.2 Účinky na ľudský organizmus

HD má na tkanivá ľudského organizmu devastujúce účinky. Pri kontakte s povrchom tela dochádza k závažnému poškodeniu podobnému popálenine II. stupňa, ktoré sa hojí len veľmi pomaly a je sprevádzané radom komplikácií (Goswami et al. 2021). Cieľové orgány pri intoxikácii kvapalnou formou, aerosolom alebo parou sú oči, dýchacie cesty a koža. Miera závažnosti intoxikácie potom závisí predovšetkým na veľkosti obdržanej dávky ale aj na ďalších faktoroch (Shakarjian et al. 2010).

HD ľahko penetruje rôznymi materiálmi, rýchlo prechádza cez odev a dostáva sa do kontaktu s pokožkou. Pri expozícii vysokými dávkami HD dochádza okrem lokálneho poškodenia aj ku prieniku HD do systémového obehu, kde hrozí poškodenie vnútorných orgánov. Sú známe aj jeho karcinogénne, mutagénne a teratogénne účinky (Firooz et al. 2011; Smith et al. 1995).

Po kontakte s kvapalnou alebo plynnou fázou HD je nutné čo najrýchlejšie odstrániť kontaminovaný odev a vykonať odmorenie zasiahnutej pokožky. Nechránené, kontaminované časti tela je doporučené oplachovať po dobu aspoň 10 minút pitnou vodou, poprípade s použitím mydla. Nesmie sa vyvolávať zvracanie (Tianyi 2014).

Prvé klinické príznaky intoxikácie sa objavujú s časovým odstupom po prvom kontakte s HD. Pri zasiahnutí očí pozorujeme prvé zmeny už za 10 minút. V prípade kože je ale doba latencie až niekoľko hodín (Nourani et al. 2017).

Zasiahnutie oka sírnym yperitom

Pre vodno-slizničný povrch rohovky, spojovky a vysokej metabolickej aktivity epitelových buniek rohovky patria oči k najcitlivejším orgánom na HD (Balali-Mood a Hefazi 2005; 2006; Etehad-Razavi et al. 2006; Ghabili et al. 2010). Akútna intoxikácia parami sa prejavuje konjunktivitídou, edémom očných viečok, slzením, miózou, fotofóbiou a silnými bolesťami očí. Expozičná dávka par menšia než 50 až 100 mg·min⁻¹·m⁻³ spôsobuje ľahkú konjunktivitídu. Stredná intoxikácia dávkami 100 až 200 mg·min⁻¹·m⁻³ zapríčiňuje lézie očných viečok a rohovky. Dávky HD vyššie než 200 mg·min⁻¹·m⁻³ vyvolajú limbálnu vaskularizáciu rohovky až dočasnú slepotu. Pri týchto koncentráciách zároveň nastupujú aj prejavy systémovej intoxikácie HD (Balali-Mood a Hefazi 2005; 2006; Etehad-Razavi et al. 2006; Kehe a Szinicz 2005). K regenerácii epitelových buniek rohovky dochádza po 4 až 5 dňoch. Úplné zotavenie môže trvať až 6 týždňov. Zasiahnutie oka kvapalným HD môže zapríčiniť perforáciu rohovky a tým aj trvalú stratu zraku (Balali-Mood a Hefazi 2005; 2006; Ghabili et al. 2010).

Postihnutie respiračného systému

Hoci sú oči najcitlivejším miestom, najviac úmrtí je spojených s poškodením respiračného systému. Pri inhalačnej expozícii sú zasiahnuté najmä horné dýchacie cesty. Rozvoj príznakov ako je bolesť v nosnej dutine, zvýšená sekrécia slizníc, kýchanie a bolesť hrdla nekoreluje priamo s koncentráciou HD v zamorenom priestore, ale je závislý na intenzite respirácie. Neskôr sa pridajú respiračné komplikácie ako kašeľ, dýchavičnosť, nádcha, upchaný nos alebo obštrukcia horných dýchacích ciest (Balali-Mood a Hefazi 2005; 2006; Ghabili et al. 2010; Kehe a Szinicz 2005).

Poruchou frekvencie dýchania a výmeny kyslíku a oxidu uhličitého môže dôjsť k metabolickej alkalóze, acidóze alebo k hypoxii (Nourani et al. 2017). Systémovo absorbovaný HD poškodzuje kostnú dreň a imunitný systém, čo podporuje vznik bronchiálnych infekcií (Kehe a Szinicz 2005). Infekcia horných dýchacích ciest sa rozvinie v priebehu 36 až 48 hodín po expozícii. Prechádza až do bronchopneumónie, smrť môže nastať v časovom rozptyle od druhého dňa až do 4 týždňov od expozície.

Predĺžené zotavenie trvajúce 1 až 2 mesiace vedie k nekrotickej bronchopneumónii (Balali-Mood a Hefazi 2006).

Dlhodobá expozícia pár HD môže zapríčiniť poškodenie dolných dýchacích ciest, prejavujúce sa produktívnym kašľom s hnisavým spútom, dýchavičnosťou a možným krvácaním do alveol. Dôjsť môže až k pľúcnej infekcii či gangréne (Balali-Mood a Hefazi 2005; 2006; Ghabili et al. 2010).

Vo všeobecnosti poškodenie respiračného traktu zahŕňa chronickú bronchitídu, emfyzém a tracheobronchomaláciu. Chronická bronchitída patrí medzi neskoršie komplikácie expozície HD v dolných dýchacích cestách. Hypoxémia a hyperkapnia z astmatickej bronchitídy vedú k chronickej obštrukčnej choroby pľúc (CHOPN), *cor pulmonale* a respiračnému zlyhaniu v koncových štádiách ochorenia (Balali-Mood et al. 2011; Rafati-Rahimzadeh et al. 2019).

Perkutánná expozícia sírnemu yperitu

Ľudská koža má vysokú afinitu k lipofilným látkam, a preto HD penetruje veľmi ľahko jej štruktúrami, ktoré však zároveň poškodzuje. Rozsah a dĺžka hojenia kožných lézií je priamo úmerná koncentrácii a času, po ktorý je HD v kontakte s pokožkou (Darchini-Maragheh a Balali-Mood 2018).

Počiatočnou reakciou kože pri prahovej dávke HD (kvapalina 10 až 20 g·cm⁻²; pary 100 až 300 mg·min⁻¹·cm⁻³) je sčervenanie a svrbenie. Pri vyšších dávkach HD (kvapalina 40 až 400 g·cm⁻²; pary 1000 až 2000 mg·min⁻¹·cm⁻³) nasleduje tvorba malých pľuzgierov. Majú tenkú stenu, spočiatku sú vyplnené riedkou, čírou tekutinou, ktorá prechádza do žltkastého zafarbenia (Kehe et al. 2009; Rafati-Rahimzadeh et al. 2019). Pľuzgiere sú charakteristické svojim kupolovým tvarom s priemerom 0,5 až 5 cm (Poursaleh et al. 2012). Tieto pľuzgiernaté útvary vznikajú najmä na teplých a vlhkých miestach v okolí nosenia tesného oblečenia, ako napríklad genitálie alebo podpazušie (Kehe et al. 2009; Rafati-Rahimzadeh et al. 2019). Pľuzgiere naplnené exsudátom sa premieňajú na bolestivé, rozsiahle rany s masívnym zápalom (Kehe a Szinicz 2005; Rose et al. 2018). Po čase sa spájajú a vytvárajú veľké rozsiahle pľuzgiernaté útvary. Po dlhšom časovom úseku, približne 2 až 6 týždňoch, dochádza k nekrotizácii pľuzgierov a alergickým kožným reakciám (Poursaleh et al. 2012). Veľké pľuzgiere majú tendenciu praskať, čím dochádza k eróziám, stenčeniu vrstvy kože a k ulcerácii. V týchto miestach vzniká nekróza tkaniva nasledovaná tvorbou chrást. Po 4 až 6 dňoch sa začne chrasta odlupovať

a ďalšie 2 až 3 týždne ostáva na danom mieste pigmentová jazva (Balali-Mood a Hefazi 2005; 2006).

Liečba

HD poškodzuje živé tkanivo nešpecificky mnohými mechanizmami, a preto nemožno jednoducho zasiahnuť proti tejto látke použitím kauzálneho antidota. Liečba o zasiahnuté osoby teda spočíva v tíšeni symptómov a celkovej metabolickej podpore pacienta (Tianyi 2014). Taktiež je dôležité zamedziť infekcii rán, využíva sa aj cieleňá antibiotická liečba infekcie a podpora hojenia (Ghanei et al. 2010).

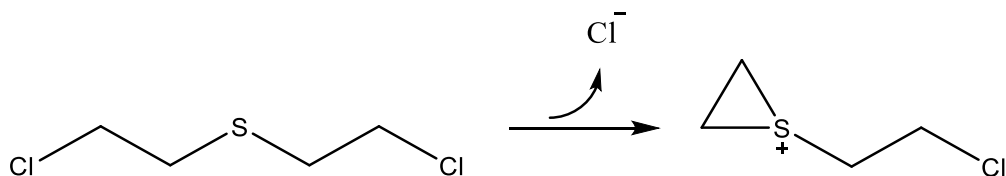
Stratégia liečby je založená na dôkladnej dekontaminácii postihnutých miest, lokálnej aplikácii protizápalových mastí a krémov, častej výmene obväzov, podávaní systémových antiflogistík alebo antibiotík a monitorovaní stavu telesných tekutín a elektrolytov. Rovnako je možné použitie analgetík, opioidov a antihistaminík (Ghanei et al. 2010; Rose et al. 2018; Saladi et al. 2006).

Chirurgické alebo laserové odstránenie postihnutej oblasti dokáže skrátiť čas potrebný na uzatvorenie rany na koži, a to aj v prípade dlhodobého pôsobenia HD po dobu niekoľkých dní. Výhodou laserového ošetrenia je kontrola hemostázy v priebehu operácie a minimálna transplantácia nepostihnutej kože (Graham et al. 2002).

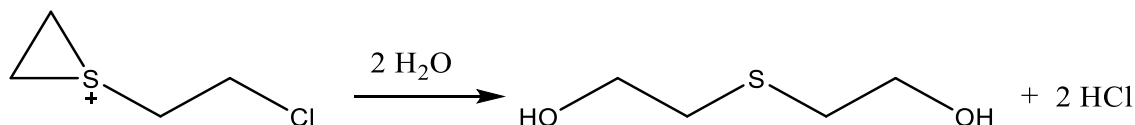
2.1.3 Mechanizmus účinku sírneho yperitu

Biologické účinky HD nachádzame na mnohých úrovniach, a preto ich nemožno uspokojivo vysvetliť jedným mechanizmom. Jeho nešpecifická reakcia s celým radom biologických štruktúr má za následok rôzne patobiochemické odpovede, ktoré sa objavujú v časovom nesúlade medzi rýchlymi chemickými reakciami s biomolekulami a poškodením tkaniva, ku ktorému dochádza až neskôr (Wattana a Bey 2009).

Samotná aktivácia molekuly HD prebieha vo vodnom prostredí. Princípom reakcie je nukleofilná substitúcia prvého rádu. V prvom kroku dochádza k intramolekulárnej cyklizácii 2-chlórethylénového reťazca, pričom sa odštiepi chloridový anión, za vzniku 1-(2-chlorethyl)thiiranium chloridu na jednej strane reťazca (obr. 2). Ďalej prebieha substitučná reakcia s nukleofilom (vodou) za vzniku 2-(2-chlorethylsulfanyl)ethanolu a HCl. Dané reakcie sa odohrávajú aj na druhej strane reťazca. Finálnym produktom hydrolyzy sírneho yperitu vo vodnom prostredí je thiodiglykol (obr. 3) (Jošt et al. 2018).



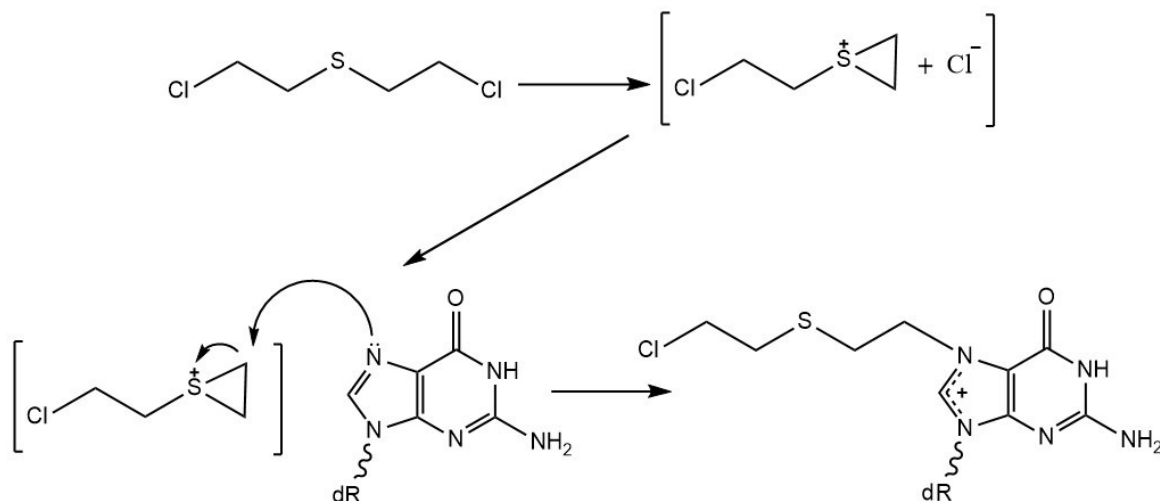
Obr. 2 Priebeh nukleofilnej substitúcie prvého rádu (upravené podľa Wattana a Bey 2009)



Obr. 3 Hydrolyzá sírneho yperitu (upravené podľa Wattana a Bey 2009)

HD predstavuje vysoko reaktívnu chemickú látku schopnú reagovať aj s látkami s veľkou molekulovou hmotnosťou vrátane DNA, RNA, proteínov, lipidov, ako aj s mikromolekulami, napríklad glutathiómom v cieľových tkanivách (Poursaleh et al. 2012).

Reakciou HD s DNA vznikajú mono- a bifunkčné adukty HD. Monoadukty sú hlavným produktom alkylácie DNA. Tvoria sa najmä v polohe N7 guanínu, kde vzniká N7-hydroxyethylthioethyl-guanín (obr. 4). Menej často sa nachádzajú v pozíciách N1 a N3 adenínu, ako napríklad N3-hydroxyethylthioethyl-adenín (Kehe et al. 2009; Panahi et al. 2018).



Obr. 4 Mechanizmus HD indukovanej alkylácie (upravené podľa Shakarjian et al. 2010)

Monoadukty s pôvodným 2-chlorethylenovým reťazcom sú schopné ďalšej nukleofilnej substitúcie. Môžu reagovať s bázami na rovnakom vlákne DNA, poprípade na komplementárnom dcérskom vlákne a zapríčiňujú vnútro- a medzireťazcové kovalentné spojenia (Panahi et al. 2018; Shukla a Mishra 2010). Medzireťazcové kovalentné spojenia môžu zvýšiť mutagenicitu DNA, zamedziť prirodzenej denaturácii DNA, a tým pádom pozastaviť replikáciu a transkripciu DNA. Aj poškodenia vzniknuté bifunkčnými aduktami sa zle opravujú, vedú k dvojvláknovým zlomom DNA a narušia komplementárnu sekvenciu. Tým dochádza k stratám vhodného templátu DNA, ktorý by mal využitie pri reparácii (Panahi et al. 2018; Shakarjian et al. 2010).

Pri primárnom rozpoznávaní poškodenia DNA, na začiatku opravy DNA a zastavení bunkového cyklu majú hlavnú úlohu mutovaná ataxia telangiektázia (ATM), homológ kvasinkového kontrolného proteínu Mec1, a ataxia telangiektázia spojená s proteínom Rad3 (ATR) (Kehe et al. 2009; Roos a Kaina 2006). Obe sa aktivujú pri dvojvláknových zlomoch. ATR fosforyluje checkpoint kinázu 1 (Chk1) a checkpoint kinázu 2 (Chk2) kontrolného uzla bunkového cyklu. Tie následne destabilizujú aktivátor cyklín-dependentnej kinázy (Cdk) Cdc25A, čím inhibujú Cdk (Clarke et al. 2005; Enders 2008; Kehe et al. 2009; Panahi et al. 2018; Roos a Kaina 2006). Aktivácia ATM závisí od rozsahu dvojvláknových zlomov DNA. ATM fosforyluje proteíny p53, nihrín a Brca1 (Banin et al. 1998; Ismail et al. 2005; Kehe et al. 2009). Fosforyláciou efektorových kináz Chk1 a Chk2 sa spúšťa prenos signálov, ktoré regulujú mnohé bunkové funkcie, vrátane transkripčných faktorov, regulátorov bunkového cyklu, apoptických mediátorov a DNA reparačných proteínov (Jan et al. 2020).

Aktivácia a inaktivácia p53 a Cdk prebiehajú po signalizácii, pričom všetky spoločne inhibujú bunkový cyklus. Zástava bunkového cyklu umožňuje reparáciu poškodenej DNA a následne zabraňuje prechodu poškodenej DNA do ďalšej fázy cyklu. V prípade zlyhania opravy však nastáva apoptóza. Kľúčovým faktorom rozhodujúcim medzi apoptózou a nekrozou je poly-(ADP-ribóza)polymeráza-1 (PARP-1). Nízke hladiny PARP-1 signalizujú opravu DNA alebo v prípade zlyhania apoptózu, nadmerná aktivita má za následok vyčerpanie bunkových zásob nikotínamidadeníninukleotidu (NAD⁺) a adenozintrifosfátu (ATP), inhibíciu glykolýzy, uvoľnenie proteáz z tkaniva a smerovanie bunky k nekroze (Balali-Mood a Hefazi 2005; Panahi et al. 2018; Shakarjian et al. 2010).

Uvoľnené proteázy z epidermálnych buniek narúšajú epidermálno-dermálne spojenie a rozvíjajú poškodenie tkaniva. Ďalšie mechanizmy bunkovej smrti sú spojené s proteínmi obsahujúce thiolovú (-SH) skupinu a s peptidmi ako glutathión. Thiolové zlúčeniny sú zodpovedné za oxidačno-redukčný stav bunkových komponentov. Glutathión je dôležitý pri odstraňovaní reaktívnych foriem kyslíku, zachovaní oxidačno-redukčného prostredia a zabránení straty integrity membrány (Balali-Mood a Hefazi 2005).

Významnú úlohu pri apoptóze zohrávajú aj ióny Ca^{2+} . Po expozícii HD sa navýši intracelulárna hladina Ca^{2+} ako odpoveď na oxidatívny stres. Vplyvom reaktívnych foriem kyslíka sa poškodzuje transportný systém pre Ca^{2+} lokalizovaný v endoplazmatickom retikule, mitochondriách, a plazmatickej membráne, čím je narušená homeostáza a trvalo narastá hladina voľného Ca^{2+} (Rosenthal et al. 1998). Kalmodulín patrí medzi regulačný proteín viažuci Ca^{2+} ióny. HD zapríčiňuje časovo závislú indukciu kalmodulínu. Zmeny v intracelulárnej hladine Ca^{2+} taktiež vedú k mitochondriálnej ceste apoptózy (Shakarjian et al. 2010).

Medzi formy bunkového zániku bežným pre epitelové bunky sa radí aj riadená bunková smrť anoikis. Dochádza k nej, keď bunky prestanú získavať signály z okolitej extracelulárnej matrix (ECM), napríklad pri poranení kože indukovanom HD. Glykoproteín laminin 332 priamo interaguje s integrínmi $\alpha 3\beta 1$ a $\alpha 6\beta 4$, základnými zložkami hemidesmozómov nachádzajúcich sa na bazolaterálnom povrchu. Bez týchto signálov dochádza k Fas-závislej, teda vonkajšej, a mitochondriálnej, teda vnútornej, aktivácii apoptózy (Chiarugi a Giannoni 2008; Shakarjian et al. 2010).

Hoci sa HD primárne zameriava na epidermálne bunky, dokáže priamo alkylovať proteíny v koži, ktoré tvoria ECM. Taktiež HD znižuje schopnosť ukladania laminínu na rozhraní *dermis* a *epidermis* (Shakarjian et al. 2010).

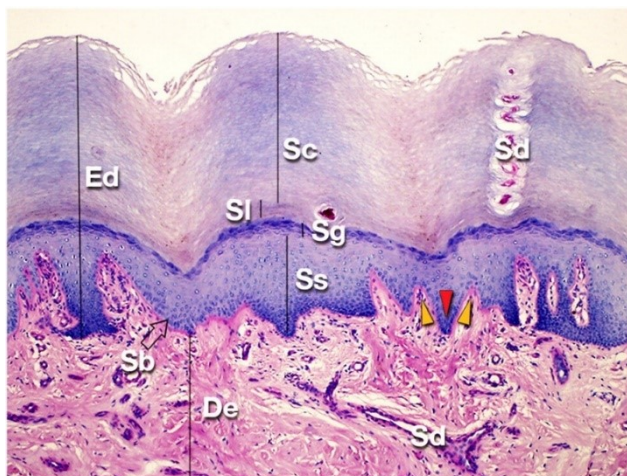
2.2 Ľudská koža

Ľudská koža je najväčším orgánom ľudského tela dosahujúca povrchu až 2 m². Neplní len funkciu fyzikálnej, chemickej a do istej miery aj svetelnej bariéry medzi vnútorným a vonkajším prostredím, ale podieľa sa aj na termoregulácii organizmu, či ochrane pred stratou vody (Wilkinson a Hardman 2020).

2.2.1 Štruktúra kože

Histologicky je koža tvorená tromi základnými vrstvami. Najvrchnejšou časťou je pokožka (*epidermis*), na tú nadväzuje zamša (*dermis*) a najhlbšie uloženou vrstvou je podkožné väzivo (*stratum subcutaneum*) (Arda et al. 2014).

Pokožka je tvorená mnohvrstevným dlaždicovým epitelom. V závislosti od miesta na tele sa jej hrúbka pohybuje od 0,04 mm (očné viečka) po 1,6 mm (plosky nôh). *Epidermis* nedisponuje vlastným zásobením krvou, a preto ju vyživujú krvné cievy zo zamše. Keratinocyty sú hlavné bunky, ktoré tvoria pokožku. Ich vývoj začína vo vrstve *stratum basale*. Postupne keratinocyty prechádzajú procesom diferenciácie a utvárajú vrstvy: *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a nakoniec *stratum corneum* (obr. 5) (Arda et al. 2014; Fore 2006; Chambers a Vukmanovic-Stejic 2020).



Obr. 5 Ľudská koža, pozdĺž povrchu palca na nohe. V hrubej koži je zreteľne vidieť 5 vrstiev *epidermis*. Povrch hrubej kože zobrazuje odtlačky prstov. Svetelná mikroskopia, zväčšenie 6.3×, farbené hematoxilín-eozínom. Červená šípka – epidermálny hrebeň, oranžové šípky – dermálna papila, Ed – *epidermis*, De – *dermis*, Sb – *stratum basale*, Ss – *stratum spinosum*, Sg – *stratum granulosum*, Sl – *stratum lucidum*, Sc – *stratum corneum*, Sd – vývod potných žliaz (prevzaté z Arda a kol. 2014).

Smerom k povrchu tela bunky keratinocytov postupne strácajú jadro, rohovatejú a desknavujú v podobe jemných šupiek. *Stratum basale* je tvorená jednou vrstvou mitoticky aktívnych buniek. Vznikajú tu nové keratinocyty, ktoré sa dostávajú až do vrchných vrstiev pokožky. Súčasťou *stratum basale* sú aj bunky melanocyty, ktoré tvoria vedľa keratinocytov druhú najväčšiu populáciu buniek v *epidermis*. Tieto bunky produkujú pigment melanín. Melanín je prostredníctvom výbežkov melanocytov transportovaný do buniek keratinocytov. Plní tu ochrannú funkciu pred poškodením DNA kožných buniek vplyvom UV žiarenia a zároveň určuje zafarbenie pokožky (od odtieňov

hnedej až po čiernu). Imunitný systém je v *epidermis* zastúpený Langerhansovými bunkami, ktoré patria medzi antigén prezentujúce bunky vytvorené v kostnej dreni. Ďalším typom buniek, ktoré sú rozptýlené v populácii keratinocytov, sú Merkelove bunky. Jedná sa o intraepidermálne mechanoreceptorové bunky. Sú súčasťou zakončenia aferentných senzitivných nervových vlákien pre vnímanie dotyku (Arda et al. 2014; Fore 2006; Chambers a Vukmanovic-Stejic 2020).

Druhou najvrchnejšou vrstvou kože je zamša. Táto vrstva podporuje, vyživuje a spája *epidermis* s vrstvou podkožného väziva. Hrúbka sa líši od telesnej lokácie. Napríklad v oblasti očných viečok je zamša silná len 0,6 mm. Naopak v mechanicky zaťažovaných regiónoch kože, ako je dlaň alebo chodidlo, je vrstva zamše až 3 mm. Pevnosť zamše je zaistená vďaka prítomnosti fibroelastického tkaniva, zväzkov kolagénových vlákien a ich vzájomného prepojenia s *hypodermis*. Zamša je zložená z dvoch vrstiev, ktoré sú však málo zreteľné. Papilárna vrstva je tenká vrstva *dermis*, ktorá sa nachádza bezprostredne pod bazálnou laminou *epidermis* a pokrýva dermálne papily. Druhá vrstva je retikulárna a je tvorená zmesou hustého väziva a zväzkov kolagénových vlákien typu I. Pretože je *dermis* bohato inervovaná a zásobená krvou, nachádzajú sa tu potné žľazy, mazové žľazy a vlasové folikuly (Fore 2006; Chambers a Vukmanovic-Stejic 2020).

Podkožné väzivo nadväzuje na retikulárnu vrstvu *dermis* a je tvorené riedkym väzivom, do ktorého sa postupne začleňuje podkožné tukové tkanivo. Na základe telesnej lokácie tvoria tukové bunky rôzne silnú vrstvu. Táto vrstva plní funkciu tepelného izolantu, zdroja energie, a tiež slúži ako ochrana pred vonkajšími vplyvmi. Podkožné väzivo je voľne spojené s hlbokou fasciou, väzivovými blanami alebo okosticou, čo umožňuje klzavý pohyb (Arda et al. 2014; Chambers a Vukmanovic-Stejic 2020; Khavkin a Ellis 2011). Táto vrstva kože môže byť v niektorých častiach tela veľmi tenká, a dosahuje menej než 1 mm (očné viečka). Naopak jej hrúbka na bruchu dosahuje až niekoľko centimetrov v závislosti od telesnej stavby (Bonmarin a Le Gal 2016).

2.3 Proces hojenia rán

Pojem rana možno definovať ako každé narušenie normálnej anatomickej štruktúry tkaniva s následnou stratou jeho funkcie. Vzhľadom k lokácii je rana charakterizovaná ako otvorené vonkajšie poranenie. Uzavreté lézie sú definované ako

ruptúry, alebo iné vnútorné poranenia orgánov a tkanív, kde zároveň nedošlo k narušeniu kožnej bariéry (Reinke a Sorg 2012).

Hojenie rany je prirodzená fyziologická reakcia organizmu na poškodenie tkaniva. Jedná sa o komplexný proces zahŕňajúci súhru niekoľkých typov buniek, cytokínov, mediátorov a cievneho systému. Kaskáda dejov začína vazokonstrikciou ciev v mieste poranenia a agregáciou krvných doštičiek za účelom zástavy krvácania. Potom nasleduje migrácia imunitných buniek do miesta poškodenia. Tieto bunky produkujú rôzne mediátory a cytokíny, ktoré podporujú angiogénu, trombolýzu a reepitelizáciu (Reinke a Sorg 2012).

Zacelenie kožnej rany môže byť realizované dvoma spôsobmi, a to regeneráciou alebo opravou. Regenerácia zahŕňa špecifickú náhradu tkaniva, ktorá je v mieste poranenia. Jedná sa predovšetkým o *epidermis*, sliznice alebo fetálnu kožu. Pri reparácii dochádza potom k nešpecifickému zahojeniu rany formou fibrotizácie a jazvy. Tento spôsob zacelenia rany prevažuje v dospelom veku (Reinke a Sorg 2012).

Celý proces hojenia rany možno umelo rozdeliť do 4 fáz, ktoré sa navzájom prekrývajú v čase aj v priestore. Jednotlivé fázy zahŕňajú reakciu ciev v mieste poškodenia, bunkovú odpoveď, proliferáciu a reparáciu tkaniva (Viaña-Mendieta et al. 2022).

2.3.1 Hemostáza a koagulácia

Prvou fázou fyziologického hojenia akútnej rany je aktivácia hemostatických mechanizmov a vytvorenie provizórnej matrix v rane. Tento proces začína bezprostredne po poranení a je ukončený po niekoľkých hodinách (Palta et al. 2014; Reinke a Sorg 2012). Ako prvý krok v reakcii na poškodenie cievneho endotelu dochádza k uvoľneniu tkanivového tromboplastínu (faktor III), ktorý následne spustí vonkajšiu cestu hemokoagulačnej kaskády. Vnútorná cesta je spustená aktiváciou trombocytov vďaka adenozíndifosfátu (ADP) a kolagénu v mieste poškodenia cievneho endotelu. ADP a kolagén pôsobia ako agonisti, viažu sa na špecifické receptory na povrchu trombocytov a tým sa zvýši cytoplazmatická koncentrácia Ca^{2+} iónov (Palta et al. 2014; Rumbaut a Thiagarajan 2010). K zvýšeniu vnútrobunkového Ca^{2+} v trombocytoch dochádza jeho uvoľnením z endoplazmatického retikula a influxu Ca^{2+} iónov cez bunkovú membránu (Rumbaut a Thiagarajan 2010). Zároveň poranené cievy spúšťajú niekoľko minútovú vazokonstrikciu iniciovanú trombocytmi, aby sa znížila strata krvi a vyplnila tkanivová

medzera fibrínovou sieťou tvorenou z fibrinových vlákien, erytrocytov a agregovaných krvných doštičiek (Martin 1997; Reinke a Sorg 2012).

Mimo toho, krvná zrazenina obsahuje aj molekuly fibronektínu, vitronektínu a trombospondínov, tvoriace provizórnu matrix pre migráciu leukocytov, keratinocytov, fibroblastov a endoteliálnych buniek. Taktiež je rezervoárom rastových faktorov (Reinke a Sorg 2012; Robson et al. 2001). Vazokonstrikcia s tvorbou zrazenín má za následok lokálne zlyhanie perfúzie s následným nedostatkom kyslíka, zvýšenou glykolýzou a zmenami pH.

Po vazokonstrikcii nasleduje vazodilatácia, ktorá sa prejaví lokálnym začervenaním a edémom. Počas nej prichádzajú do provizórnej matrix trombocyty. Uvoľňovaním chemotaktických faktorov ovplyvňujú trombocyty infiltráciu leukocytov. Zároveň oba typy buniek uvoľňujú cytokíny a rastové faktory, stimulujú syntézu kolagénu, aktivujú transformáciu fibroblastov na myofibroblasty a podporujú proces reepitelizácie (Reinke a Sorg 2012).

2.3.2 Zápalová reakcia

Vlastná zápalová reakcia je obrannou odpoveďou na poškodenie tkaniva, vzniknutie patogénov do rany alebo patologicky zmeneným štruktúram vlastného pôvodu. Jedná sa o súbor vzájomne prepojených biochemických a celulárnych procesov, ktorých intenzita odpovedá rozsahu iniciálneho traumatu. Poškodenie môže byť spôsobené fyzikálnymi, chemickými alebo biologickými faktormi, poprípade ich kombináciou (Chen et al. 2017).

Zápalovú reakciu je možno rozdeliť na skorú fázu, pre ktorú je typická aktivácia neutrofilných granulocytov, a neskorú fázu so zapojením a transformáciou monocytov (Reinke a Sorg 2012).

V rámci zápalovej reakcie zároveň dochádza aj k zvýšenej expresii adhezívnych molekúl na povrchu imunitných buniek a k zvýšeniu počtu receptorov pre tieto molekuly na povrchu aktivovaného endotelu. Týmto spôsobom je zaistené, že cirkulujúce bunky adherujú na cielenom mieste a môžu ďalej pokračovať v extravazácii (Chen et al. 2017).

Neutrofilné granulocyty sú medzi prvými bunkami, ktoré infiltrujú do miesta zápalu. Vďaka ich schopnosti fagocytózy a vylučovaniu proteáz dokážu zabíjať prítomné baktérie a pomáhajú rozkladať nekrotické tkanivo. Navyše produkujú chemoatraktanty

pre ostatné bunky podieľajúce sa na zápalovej reakcii (Chen et al. 2017; Reinke a Sorg 2012). Neutrofilné granulocyty uvoľňujú mediátory ako tumor nekrotizujúci faktor alfa (TNF- α), interleukín 1 (IL-1) a interleukín 6 (IL-6), čím ešte viac podporujú zápalovú reakciu a stimulujú produkciu vaskulárneho endoteliálneho rastového faktora (VEGF) a interleukínu 8 (IL-8) pre adekvátnu reparačnú odpoveď. Približne po 3 dňoch od poranenia vstupujú do miesta rany makrofágy, ktoré fagocytujú patogény a zvyšky buniek. Taktiež vylučujú chemokíny, cytokíny a rastové faktory, ako napríklad transformujúci rastový faktor beta (TGF- β), transformujúci rastový faktor alfa (TGF- α), základný fibroblastový rastový faktor (bFGF), rastový faktor odvodený od krvných doštičiek (PDGF) a VEGF, ktoré podporujú proliferáciu buniek a syntézu molekúl ECM (Koh a DiPietro 2011; Reinke a Sorg 2012).

Zápalová reakcia je ďalej sprevádzaná charakteristickými klinickými prejavmi, ako je lokálny opuch, spôsobený zvýšenou permeabilitou ciev. S opuchom rovnako súvisí aj začervenanie a zvýšenie teploty postihnutého miesta vplyvom zvýšeného prietoku krvi. Zmena fyzikálno-chemických pomerov v mieste zápalu pôsobí na senzitivne nervové zakončenia, ktorými je vnímaná bolesť. Všetky tieto faktory potom majú vplyv na poruchu funkcie daného tkaniva (Chen et al. 2017).

2.3.3 Proliferácia buniek

Vo fáze proliferácie buniek sa proces hojenia sústreďuje najmä na pokrytie povrchu rany, tvorbu granulačného tkaniva a obnovenie cievnej siete. Popri nahromadení fibroblastov pozdĺž fibrínovej siete sa na začiatku reepitelizácie aktivuje aj neovaskularizácia a angiogenéza (Reinke a Sorg 2012). Pod kontrolou regulačných cytokínov ako interferón gama (IFN- γ) a TNF- β , syntézy kolagénu a fibronektínu vzniká základ novej matrix spojivového tkaniva. Slúži na uzatvorenie tkanivových medzier a podporuje mechanickú pevnosť rany. Následne sa v celom okolí rany zvyšuje syntéza kolagénu, proliferácia fibroblastov klesá a postupne sa upravuje rovnováha medzi syntézou a degradáciou ECM (Gantwerker a Hom 2011; Reinke a Sorg 2012).

Taktiež sa prívom keratinocytov objavuje reepitelizácia. Kmeňové bunky z vlasových folikulov a apokrinných potných žliaz začnú s diferenciáciou, osídľujú *stratum basale* a migrujú cez okraj rany (Gantwerker a Hom 2011; Wilkinson a Hardman 2020). Enzymatickým uvoľnením medzibunkových desmózomov prostredníctvom kolagenázy a elastázy migrujú aktivované keratinocyty pozdĺž

vytvorenej fibrínovej zrazeniny vo vyšších vrstvách granulačného tkaniva. Tento proces sa nazýva „premiešavanie“ keratinocytov. Opisuje ich schopnosť kompetitívne migrovať pozdĺž chemotaktického gradientu vytvoreného mediátormi ako je IL-1 a aj cez matrix bohatý na fibronektín do prostredia rany (Reinke a Sorg 2012). Reepitelizácia ochraňuje ranu pred infekciou a zaschnutím (Gantwerker a Hom 2011).

Sanatio per secundam intentionem je scelenie rany vyplnené granulačným tkanivom. Pod vplyvom VEGF je zahájená angiogenéza. Začína vytvorením ciev z krvných ciev obklopujúcich ranu. Granulačné tkanivo sa skladá z fibroblastov, novovytvorených ciev a nezrelého kolagénu typu III. Niektoré fibroblasty sa začínajú diferencovať na myofibroblasty, ktoré vďaka kontrakciám spájajú okraje rany k sebe (Gantwerker a Hom 2011; Wilkinson a Hardman 2020).

2.3.4 Remodelácia

V poslednom kroku hojenia je nahradená zložka provizórnej ECM, kolagén typu III, ktorý bol produkovaný v proliferačnej fáze, za kolagén typu I, čím sa zvyšuje pevnosť vytvorenej jazvy. Bunky z predošlých fáz prestupujú do apoptózy, čím sa aj pozastaví tvorba granulačného tkaniva. Na remodelácii ECM sa podieľajú predovšetkým bunky fibroblastov. Nahrádzajú počiatočnú fibrínovú zrazeninu hyaluronátom, fibronektínom a proteoglykanmi, ktoré vytvárajú kolagénové fibrily pri opravách, a taktiež majú funkciu kanála pri migrácii buniek (Gantwerker a Hom 2011; Wilkinson a Hardman 2020). Myofibroblasty, ktoré vytvárajú sťah v mieste rany svojim viacnásobným prichytením ku kolagénu, pomáhajú znižovať povrch vyvíjajúcej sa rany (Reinke a Sorg 2012; Tziotzios et al. 2012; Wilkinson a Hardman 2020).

Táto fáza trvá zo všetkých najdlhšie. Nadmerná fibróza v tejto časti procesu hojenia rán má za následok hypertrofické zjazvenie alebo tvorbu keloidov (Gantwerker a Hom 2011).

2.4 Rastové faktory

Rastové faktory sú produkty buniek zo skupiny cytokínov. Chemicky sa jedná o biologicky aktívne látky bielkovinovej povahy, ktoré majú funkciu lokálnych mediátorov v rámci medzibunkovej signalizácie. Rastové faktory špecificky stimulujú nielen rast bunky, ale zasahujú aj do bunkovej migrácie, proliferácie, a diferenciácie. Dokážu tiež ovplyvňovať všetky známky bunkového fenotypu. Väzba rastových faktorov

na povrchové bunkové receptory vedie k iniciácii signálnych transdukčných dráh, ktorých výsledkom je ovplyvnenie génovej expresie (Greenhalgh 1996).

Medzi najvýznamnejšie rastové faktory patrí rastový faktor odvodený od krvných doštičiek, epidermálny rastový faktor, inzulínu podobný rastový faktor, fibroblastový rastový faktor, keratinocytový rastový faktor, vaskulárny endoteliálny rastový faktor a transformujúci rastový faktor beta.

a) Rastový faktor odvodený od krvných doštičiek

PDGF (*platelet-derived growth factor*) je glykoproteín vyskytujúci sa vo forme diméru. Jeho syntéza prebieha v kostnej dreni v megakaryocytoch (prekurzor krvných doštičiek). V samotnej krvnej doštičke je potom PDGF skladovaný vo forme α -granúl, z ktorých je sekretovaný pri aktivácii doštičiek. PDGF v mieste pôsobenia aktivuje fibroblasty, ktoré sa podieľajú na angiogenéze (Kardas et al. 2020). Okrem krvných doštičiek je PDGF produkovaný aj inými bunkami ľudského tela. Sú to bunky endotelové, epitelové, glie a imunitné bunky, ktoré sa podieľajú na zápalovej reakcii (Barrientos et al. 2008).

Významnú úlohu hrá PDGF behom embryogenézy, kde stimuluje bunkovú proliferáciu a migráciu. V závislosti na signalizácii prostredníctvom receptora PDGFR α riadi gastruláciu a vývoj pľúc, semenníkov, čriev, ľadvín a ďalších orgánov. V dospelosti je funkcia PDGF úzko spätá s procesom hojenia rán. Patologicky pôsobí pri rade proliferatívnych nádorových ochorení, chronických zápaloch, ateroskleróze či chronickej obštrukčnej pľúcnej chorobe (Andrae et al. 2008).

b) Epidermálny rastový faktor

EGF (*epidermal growth factor*) je malá molekula pozostávajúca z 53 aminokyselín, podobná TGF- α (Steed 1997). Bol nájdený v telesných tekutinách, ako napríklad materské mlieko, sliny, moč, plazma, pankreatická tekutina, duodenálna tekutina a plodová voda. Vylučujú ho podčeľustné slinné žľazy, mliečne žľazy, placenta, obličky a Brunnerove žľazy v duodene (Tang et al. 2016). Produkujú ho krvné doštičky, makrofágy a fibroblasty a parakrinne pôsobí na keratinocyty (Barrientos et al. 2008; Pikuła et al. 2015).

EGF sa podieľa na tvorbe granulačného tkaniva, funkcii fibroblastov a migrácii keratinocytov, čím napomáha k reepitelizácii. Taktiež zohráva úlohu pri obnove bunkovej

adhézie prostredníctvom desmozónov a hemidesmozómov. Po poranení sa zvyšuje jeho koncentrácia, podporuje reepitelizáciu a pevnosť v ťahu rany (Barrientos et al. 2008; Hantash 2008; Pikuła et al. 2015).

Jedným z mechanizmov, ktorými EGF pôsobí, je zvyšovanie expície keratínov K6 a K16, podieľajúcich sa na proliferačnej signalizačnej dráhe. Zníženie regulácie a nesprávna lokácia receptora pre EGF (EGFR) má za následok inhibíciu epitelizácie a vzniku chronických rán. Taktiež bolo zistené, že EGF je citlivý na proteolytické prostredie v okolí rany. V klinických štúdiách pridanie lokálneho EGF pri liečbe chronických rán zvýšilo reepitelizáciu a skrátilo čas hojenia kožných transplantátov od darcu (Barrientos et al. 2008; Viswanathan et al. 2006).

c) Inzulínu podobný rastový faktor

IGF (*insulin-like growth factor*) zahŕňa IGF-I a IGF-II. Oba rastové faktory sú polypeptidy, ktoré majú 50 % aminokyselín spoločných s proinzulínom, vykazujú podobnosť s inzulínom a majú isté prekrývanie v signálnych dráhach (Halmos a Suba 2019; Steed 1997). Štruktúra receptora pre IGF-I je veľmi podobná štruktúre alfa/beta diméru inzulínového receptora. Receptor pre IGF-II má podobnosť s receptorom pre manóza-6-fosfát (Greenhalgh 1996).

Schopnosť IGF-I a IGF-II naviazať sa na povrchové receptory buniek je riadená pomocou väzbových proteínov viažucich rastové faktory podobným inzulínu (IGFBPs). IGFBP-2 až IGFBP-5 sú tvorené bunkami spojivového tkaniva (Clemmons 1998). Hlavným miestom syntézy týchto polypeptidov, ako aj ich väzbových proteínov, je pečeň (Adamek a Kasprzak 2018).

IGF-I sa podieľa na raste, vývoji tkaniva, metabolizme lipidov a sacharidov, má proliferačné účinky, preukazuje protizápalové, anabolické, antioxidačné, neuro- a hepatoprotektívne vlastnosti (Halmos a Suba 2019). Zosilňuje stimulačný účinok PDGF na regeneráciu dermálneho spojivového tkaniva a na epiteliálne hojenie. Taktiež stimuluje tvorbu kolagénu z fibroblastov (Steenfos 1994). IGF-II má výraznejšie účinky pri raste plodu, ale tiež pôsobí podobne ako IGF-I a podporuje hojenie (Greenhalgh 1996).

d) Fibroblastový rastový faktor

FGF (*fibroblast growth factor*) zahŕňa skupinu 23 polypeptidových rastových faktorov. Medzi najvýznamnejšie pri hojení rán patria FGF-2, FGF-7 a FGF-10. Vytvárajú ich keratinocyty, fibroblasty, endotelové bunky, bunky hladkého svalstva, chondrocyty a mastocyty (Barrientos et al. 2008).

Rodina FGF polypeptidov sa viaže na štyri tyrozinkinázové receptory FGFR1 až FGFR4. Signálny receptor vyžaduje na svoju aktiváciu naviazanie heparínu alebo heparansulfátových proteoglykanov na FGF (Barrientos et al. 2008; Maddaluno et al. 2017; Piķuła et al. 2015; Werner a Grose 2003). Navyše vďaka tejto interakcii je FGF stabilizovaný voči tepelnej denaturácii a proteolýze (Werner a Grose 2003).

Koncentrácia FGF-2 sa zvyšuje pri vzniku akútnej rany, zohráva úlohu pri tvorbe granulačného tkaniva, reepitelizácii a remodelácii tkaniva. Reguluje syntézu a ukladanie zložiek ECM, zvyšuje pohyblivosť keratinocytov pri reepitelizácii, podporuje migráciu fibroblastov a stimuluje ich k produkcii kolagenázy (Barrientos et al. 2008; Di Vita et al. 2006; Powers et al. 2000).

FGF-7 a FGF-10 zvyšujú transkripciu faktorov, ktoré sa podieľajú na detoxikácii reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Tým znižujú ROS indukovanú apoptózu keratinocytov v lôžku rany. Vďaka tomu dokážu pretrvať keratinocyty v danom mieste a vykonávať funkcie potrebné na reepitelizáciu (Raja 2007).

e) Keratinocytový rastový faktor

KGF (*keratinocyte growth factor*) je epiteliálny mitógen, radí sa medzi členy fibroblastových rastových faktorov viažúcich heparín (FGF-7) (Rubin 1995). Je produkovaný fibroblastami a mikrovaskulárnymi endoteliálnymi bunkami z rôznych tkanív, ako sú napríklad pľúca, koža, žalúdok alebo močový mechúr. Expresia KGF receptorov bola nájdená na črevných epiteliálnych bunkách, hepatocytoch, keratinocytoch, alveolárnych bunkách typu II, mliečnych bunkách epitelu a uroteli (MacDonald a Hill 2002).

Väčšina endoteliálnych buniek exprimuje FGFR2-IIIb, receptor s vysokou afinitou ku KGF a dokážu naň reagovať. Predpokladá sa teda najmä parakrinný spôsob pôsobenia rastového faktora (Werner 1998).

V jadre buniek indukuje KGF záchrannú cestu a expresiu enzýmov dôležitých pre syntézu *de novo*, čo znamená, že je schopný stimulovať syntézu enzýmov zapojených do biosyntézy nukleotidov počas hojenia rán. To zabezpečuje produkciu dostatočného množstva nukleotidov potrebných na replikáciu DNA a syntézu RNA a následne na proliferáciu keratinocytov (Bártolo et al. 2022). Okrem proliferácie podporuje KGF aj migráciu keratinocytov a následnú reepitelizáciu kože (auf dem Keller et al. 2004; Bártolo et al. 2022).

f) Vaskulárny endoteliálny rastový faktor

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) je rodina rastových faktorov zahrňujúci VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, placentárny rastový faktor (PlGF) a vaskulárny endoteliálny faktor odvodený od endokrinných žliaz (EG-VEGF) (Melincovici et al. 2018).

Schopnosť tvorby VEGF a jeho uvoľňovanie do okolia má okrem keratinocytov a fibroblastov aj celý rad ďalších buniek, ako napríklad makrofágy, neutrofilné granulocyty, krvné doštičky, bunky hladkého svalstva alebo bunky pľúcneho epitelu (Bernatchez et al. 1999; Pikuła et al. 2015). Rastové faktory pôsobia cez svoje receptory VEGFR1 a VEGFR2, ktoré sa viažu na tyrozinkinázové receptory umiestnené na povrchu endotelových buniek (Pikuła et al. 2015).

Transkripcia VEGF-A a jeho sekrécia zároveň s VEGFR sú pri akútnom poranení zvýšené. Pri poranení uvoľňujú aktivované krvné doštičky VEGF-A. Okrem toho aj makrofágy uvoľňujú VEGF-A a zároveň aj TNF- α , ktorý indukuje expresiu VEGF-A v keratinocytoch (Bao et al. 2009; Barrientos et al. 2008). Medzi ďalšie cytokíny a rastové faktory, ktoré pôsobia ako parakrinné faktory zvyšujúce expresiu VEGF-A patria TGF- β 1, EGF, TGF- α , KGF, bFGF, PDGF-BB a IL-1 (Barrientos et al. 2008; Lawrence F Brown et al. 1992). Hlavným stimulom pre uvoľňovanie VEGF-A v akútnej rane je hypoxia, spôsobená metabolickým narušením v prostredí rany. Výsledná angiogenéza obnovuje perfúziu tkaniva, mikrocirkuláciu a zvyšuje parciálny tlak kyslíka v mieste rany. Okrem angiogénnych účinkov zohráva VEGF-A úlohu aj pri lymfangiogenéze počas hojenia rany (Barrientos et al. 2008).

g) Transformujúci rastový faktor beta

TGF- β (*transforming growth factor beta*) sa v ľudskom tele vyskytuje v troch izoformách TGF- β 1 až 3, ktoré medzi sebou vykazujú výraznú homológiu (60 až 80 %). Všetky tri formy vytvárajú dimerizovaný latentný komplex spolu s latentným proteínom za vzniku LTGF- β . Aktivácia komplexu prebieha cez trombín, poprípade iné sérové proteázy (Greenhalgh 1996; Lichtman et al. 2016).

Primárnym zdrojom TGF- β sú krvné doštičky, ktoré dôjdu do miesta rany ihneď po poškodení pokožky, mimo toho je produkovaný keratinocytami, fibroblastami, makrofágmi (Barrientos et al. 2008; Kane et al. 1991).

TGF- β sa podieľa na bunkovej proliferácii, diferenciácii, angiogenéze, chemotaxii, regenerácii spojivového tkaniva, remodelácii ECM a indukuje produkciu prokolagénu (Krishnamoorthy et al. 2001; Lichtman et al. 2016; Penn et al. 2012).

Hoci má TGF- β 3 podobnú biologickú aktivitu ako jeho izoformy, v prípade stimulácie neovaskularizácie sa zdá byť účinnejší než TGF- β 1 a TGF- β 2. TGF- β 3 taktiež pomáha pri liečbe hypertrofických jaziev (Krishnamoorthy et al. 2001).

2.4.1 Úloha rastových faktorov pri hojení rán

Hojenie rany je komplexný proces, ktorý zahŕňa niekoľko prekrývajúcich fáz (Steenfos 1994). Po poranení kože sa naruší epidermálna vrstva. Prvým signálom, ktorý upozorňuje okolité bunky o narušení epidermálnej vrstvy, je uvoľnenie IL-1 z buniek keratinocytov (Barrientos et al. 2008; Freedberg et al. 2001). Do miesta rany sa taktiež uvoľňujú zložky, ktoré aktivujú kaskádu zrážania krvi. Vytvorená zrazenina vyvolá hemostázu a poskytuje matrix pre influx zápalových buniek (Barrientos et al. 2008). Z degranulujúcich trombocytov sa uvoľňujú α -granule, ktoré vylučujú rastové faktory ako EGF, PDGF a TGF- β . Za pomoci TGF- β sa monocyty premieňajú na makrofágy, ktoré hrajú rolu pri zápalovej reakcii a odstraňovaní poškodeného tkaniva. Makrofágy iniciujú vývoj granulačného tkaniva a uvoľňujú prozápalové cytokíny IL-1 a IL-6 a rastové faktory FGF, EGF, TGF- β a PDGF (Barrientos et al. 2008; Steed 1997).

Uvoľnením VEGF a FGF z krvných doštičiek dochádza k proliferácii endotelových buniek a angiogenéze. Daný proces je nevyhnutný pre syntézu, ukladanie a organizáciu novej ECM (Barrientos et al. 2008; Park et al. 2017). FGF, TGF- β a PDGF umožňujú infiltráciu fibroblastov. Okrem toho TGF- β a PDGF v nich iniciujú aj

fenotypové zmeny, čím sa fibroblasty menia na myofibroblasty. Tie potom pozdĺžne lemujú okraje ECM a vytvárajú tak silu na sťah, aby bolo možné vzniknutú ranu ľahko uzavrieť (Barrientos et al. 2008; Hantash 2008).

V priebehu niekoľkých hodín po poranení začína reepitelizácia a uvoľňujú sa rastové faktory EGF a TGF- α . Migrácia a proliferácia epitelových buniek je stimulovaná FGF. Tento proces začína narušením spojenia navzájom medzi bunkami a medzi bunkou a substrátom. Následne dochádza k polarizácii a migrácii keratinocytov cez dočasnú ECM. Po uzatvorení rany sa keratinocyty rozvrstvujú a diferencujú, aby bola znovu obnovená epidermálna vrstva (Barrientos et al. 2008; Raja 2007).

Na vytvorenie matrix je potrebné odstránenie granulačného tkaniva a následná revaskularizácia. Systém kolagénových a elastínových vlákien nahrádza granulačné tkanivo. Neskôr je tento nový systém naplnený proteoglykanmi a glykoproteínami. Nasleduje remodelácia tkaniva, zahŕňajúca rozklad starého kolagénu pomocou PDGF a syntézu nového kolagénu, ktorá je sprostredkovaná TGF- β . Konečným výsledkom tohto procesu je vznik jazvy (Barrientos et al. 2008).

Rastové faktory môžu pôsobiť parakrinnými, autokrinným, juxtakrinnými alebo endokrinnými mechanizmami. Ovplyvňujú správanie buniek v dôsledku ich väzby na špecifický bunkový povrchový receptor alebo proteíny ECM. Vznikom väzby na týchto receptoroch je spustená kaskáda molekulárnych udalostí (Barrientos et al. 2008; Raja 2007).

Pri rastových faktoroch sa na prenose podieľa často fosfolipáza C. Aktiváciou kináz môžu byť stimulované G-proteíny aktivujúce inozitol fosfolipidovú dráhu. Potom pokračuje aktivácia diacylglycerolu a proteínkinázy C. Tá má za následok zmeny v génovej expresii a tým spojenú syntézu nových proteínov, zmeny v bunkovej aktivite alebo proliferáciu (Greenhalgh 1996; Park et al. 2017).

2.5 Kožné lézie spôsobené sírnym yperitom

HD pôsobí až s určitým časovým odstupom medzi expozíciou a prvými príznakmi. Platí to ako pre kontakt s kvapalnou, tak aj s plynnou fázou alebo aerosolom. Po 2 až 6 hodinách sa objavuje erytém podobný spáleniu od slnka sprevádzaný svrbením a páľčivou až bodavou bolesťou (Balali-Mood a Hefazi 2006; Poursaleh et al. 2012).

Histopatologickou analýzou bolo zistené výrazné odumieranie buniek keratinocytov pôsobením HD v bazálnej vrstve spojené so známkami masívnej zápalovej reakcie (Kehe et al. 2009).

Okrem toho, že sa HD zameriava na epidermálne bunky, môže priamo alkylovať proteíny ECM v koži, čo narúša schopnosť bazálnych keratinocytov udržiavať spojenie s bazálnou membránou (Shakarjian et al. 2010).

HD znižuje schopnosť ľudských keratinocytov ukladať laminín v dermálno-epidermálnej vrstve. Aktivita hemidesmozomálnych zložiek dôležitá pre adhérenciu keratinocytov, laminín-332 a integrín $\alpha 6\beta 4$, je pôsobením HD znížená. Oba tieto ECM proteíny sa podieľajú na vzniku pľuzgierov a porúch kože, zahŕňajúc oddelenie *epidermis* na dermálno-epidermálnom spojení. HD dokáže ovplyvniť interakciu bazálnych buniek s matrixovými proteínmi, ktoré sú rozhodujúce pre adhéziu k bazálnej membráne (Shakarjian et al. 2010).

Po kontakte kožných buniek s HD vzniká edém. Proteázy, najmä matrixové metaloproteinázy napomáhajú k špecifickému štiepeniu laminínu a kolagénu typu IV, následne sa *epidermis* oddeľuje od *dermis*. Medzi hlavné patologické zmeny pôsobením HD patria vakuolárna a lichenoidná dermatitída na rozhraní *dermis* a *epidermis*, spongiotická a bulózna dermatitída podobná poškodeniu kože popálením alebo žiarením, porucha pigmentácie a zvýšenie epidermálneho melanínu a zápal *dermis* alebo podkožného tkaniva, sklerodermia a cievne ochorenia. Medzi najčastejšie sa vyskytujúce poškodenia patrí erytém a zmeny pigmentácie (Tianyi 2014).

2.5.1 Mechanizmus vzniku pľuzgiera

Histopatologické vyšetrenie lézií preukázalo možnú tvorbu subepidermálnych pľuzgierov v spojitosti s dermálnou a epidermálnou nekrózou (Firooz et al. 2011; Momeni 1992). Poškodenie kože vyvolané expozíciou HD je podobné so zmenami kože vzniknutými chemickými popáleninami (Ghanei et al. 2010).

Patologické procesy počas prvých dní po expozícii HD zahŕňajú margináciu jadrového chromatinu, dilatáciu jadrového obalu, vylúčenie desmozómov a hemidesmozómov, kompresiu monofilamentov a rozširovanie vnútrobunkového priestoru. Neskôr dochádza k rozsiahlym perinukleárnym a cytoplazmatickým vakuolizáciám, opuchu endoplazmatického retikula, zhutneniu mitochondrií, jadrovej pyknóze, bunkovej fragmentácii až nekróze suprabazálnych buniek. Tým môžu vznikáť

bunky v *stratum spinosum*. Následne sa tvoria dutiny s mikrovezikulami v bazálnej vrstve, konkrétne v jej svetlej vrstve *lamina lucida*. Tie sú distálne viazané degenerujúcimi bazálnymi a epidermálnymi bunkami a proximálne bazálnou laminou bazálnej membrány. Charakteristické lucidolytické mikrovezikuly na dermálno-epidermálnom spojení sa infiltrujú pomocou zápalových buniek, fagocytov, degenerujúcich buniek, zvyškami buniek a tkanivovou tekutinou, a následne vytvárajú pľuzgiere (obr. 6) (Poursaleh et al. 2012).



Pacient 1

Pacient 2

Obr. 6 Kožné lézie po expozícii sírnym yperitom zahrňujúce erytém a pľuzgiere v oblasti predloktia na pacientoch 1 a 2. Pacient 1 je 35 ročný muž a pacient 2 je 22 ročný muž zo skupinky 13 Sýrčanov, ktorí boli v roku 2016 bez ochranných prostriedkov vystavení chemickému útoku. Obaja boli vzdialení menej než 5 m od detonácie. Prejavil sa u nich typický klinický obraz expozície sírnym yperitom vrátane očných, respiračných a kožných príznakov (prevzaté z Sezigen et al. 2020).

2.5.2 Proces hojenia kožných lézií spôsobených HD

Do tkaniva infiltrujú leukocyty, čím sa spustí imunitná odpoveď a z mastocytov sa degranuláciou uvoľňuje histamín, ktorý zvyšuje permeabilitu ciev a dochádza k opuchom (Rose et al. 2018). V priebehu 2 až 24 hodín po expozícii HD vykazuje niekoľko bazálnych buniek jadrové zmeny pozostávajúce z opuchu a straty chromatínu (Ghanei et al. 2010).

Počas prvého dňa sa *epidermis* oddelí od *dermis*, čím vznikajú charakteristické pľuzgiere. Ďalej v epiteli dochádza k hydroskopickej degenerácii cytoplazmy, degenerácii bazálnych buniek a ku skvapalnenej nekróze (Ghanei et al. 2010). Odštartuje sa bunková nekróza, ktorá pokračuje, až kým sa neporušia kožné vrstvy. Chrasta sa tvorí pri vyvrcholení ulcerácie do siedmeho dňa. Hojenie ďalej pokračuje reepitelizáciou poškodenej oblasti od okrajov rany. Po štrnástich dňoch je rana uzatvorená zo 75 % (Rose et al. 2018).

Dlhšie expozície HD ovplyvňujú hlbšie vrstvy než len *epidermis*. Nerovnováha medzi zložkami spojivového tkaniva, ktoré sa zúčastňujú na regenerácii kože a na hojaciach procesoch vedie k neskorším trofickým zmenám kože. Uvoľňovaním angiogénnych, vazoaktívnych cytokínov počas remodelačnej fázy nastávajú cievne zmeny. Bola preukázaná atrofia adnexálnych štruktúr, porušenie vlasových folikulov, ekkrinných a apokrinných potných žliaz. Degenerácia kolagénových vlákien a nadmerná aktivita fibroblastov spôsobuje fibrózu a sklerózu *dermis*. Pigmentácia spolu s atrofiou a vaskulárnymi zmenami vedú k HD indukovanej poikilodermii, ktorá bola u pacientov nájdená v oblasti genitálií (Emadi et al. 2008a; Ghanei et al. 2010; Poursaleh et al. 2012). Kožné zmeny adnex sú zapríčinené aktiváciou proteázových enzýmov (Ghanei et al. 2010).

Subletálne poškodené epidermálne bunky proliferujú pomalšie, a preto dochádza k oneskorenému zahojeniu a vzniku chronických rán. V dôsledku tvorby nefunkčných proteínov vznikajú abnormálne väzby medzi kolagénovými zväzkami v papilárnej *dermis* (Jiang a Maibach 2018; Wattana a Bey 2009). Kožné lézie spôsobené HD sa často spájajú s oneskorením hojenia rany, a tým pádom k novej sekundárnej infekcii (Poursaleh et al. 2012). Na rozdiel od ťažkých popálenín, poškodzujúcich všetky vrstvy kože, HD preniká do povrchu pokožky a poškodzuje bazálne keratinocyty. V zasiahnutých bunkách začína kondenzácia chromatinu počas prvých hodín po kontakte s HD (Jan et al. 2020; Rose et al. 2018).

Hojenie postihnutej časti kože je spojené s pozápalovou hyperpigmentáciou. Avšak môže dôjsť aj k hypopigmentácii, odlupovaním pigmentovanej vrstvy, atrofií a cievnych zmenám po dobu niekoľkých rokov (Balali-Mood a Hefazi 2005; Poursaleh et al. 2012).

2.5.3 Chronické komplikácie po zahojení lézií

Medzi najčastejší neskorší zdravotný problém u pacientov po expozícii HD patrí chronické svrbenie a pocit pálenia. Pôvod svrbenia môže pochádzať z kože – pruritoceptívny pruritus, poprípade z centrálného nervového systému – neurogénny pruritus, alebo je to kombinácia oboch typov (Firooz et al. 2011; Poursaleh et al. 2012).

Xeróza, ekzém, precitlivosť na vonkajšie podnety ako teplo, chlad a vietor patria medzi ďalšie komplikácie. Bola preukázaná narušená biofyzikálna funkcia kože, konkrétne *stratum corneum*, ktoré tvorí hlavnú kožnú bariéru zabraňujúcu vyparovaniu vody. U pacientov dochádza ku zvýšenej transepidermálnej strate vody, je narušená aj

produkcia kožného mazu (Firooz et al. 2011; Ghanei et al. 2010; Moin et al. 2009; Poursaleh et al. 2012).

Prozápalové cytokíny a mediátory indukované HD sú schopné aktivovať melanocyty, a tým spôsobiť hyperpigmentáciu, hlavne u ľudí s tmavšou farbou pleti (Davoudi et al. 2009; Firooz et al. 2011; Poursaleh et al. 2012). Vyčerpanie glutathiónu má za následok zvýšenú aktivitu tyrozinázy, zvýšenú melanogézu indukovanú aktivitou enzýmov na opravu DNA a zvýšenú reguláciu melanocyty stimulujúceho hormónu (MSH) centrálné z hypotalamu prostredníctvom IL-1 a TNF- α (Firooz et al. 2011; Moin et al. 2009; Poursaleh et al. 2012). Na druhej strane, vysoké dávky HD dokážu poškodiť melanocyty a spôsobiť hypopigmentáciu (Davoudi et al. 2009; Firooz et al. 2011; Ghabili et al. 2010; Ghanei et al. 2010; Moin et al. 2009; Momeni 1992; Poursaleh et al. 2012).

Jazva je typickým znakom oneskorených kožných lézií vyvolaných HD. Vytvára sa v mieste predchádzajúceho pľuzgiera. Pozostáva z atrofie kože, cievnych zmien (telangiektáza, čerešňové angiómy), hyperpigmentácie a hypopigmentácie, vypadávania vlasov a ostrovčekov s normálne vyzerajúcou kožou s nepravidelnými okrajmi. Hypertrofické jazvy a keloidy nie sú bežným úkazom (Emadi et al. 2008b; Firooz et al. 2011; Hefazi et al. 2006).

Údaje o karcinogenite HD pochádzajú z bojísk, vojnových nehôd a od pracovníkov v chemických továrňach. Všetky zistenia sú však ťažko interpretovateľné kvôli nedostatku údajov, ktoré by výsledky mohli ovplyvniť. Každopádne je vhodné sledovať jednotlivcov, ktorí boli dlhodobo vystavení HD pre možnosť rakoviny kože. Priamo v jazvách sa vyskytuje rakovina kože po akútnej expozícii HD, po chronickej expozícii môže nastať na akomkoľvek mieste. U dlhoročných pracovníkov v továrňach boli zistené bazocelulárne karcinómy, Bowenova choroba a spinocelulárne karcinómy po predĺženom kontakte s HD (Firooz et al. 2011; Poursaleh et al. 2012).

2.6 Bunková migrácia

Bunková migrácia je proces, pri ktorom sa bunky snažia dosiahnuť správnu lokáciu v danom prostredí, aby mohli vykonávať svoje fyziologicky dané funkcie (Pijuan et al. 2019; te Boekhorst et al. 2016).

Bunky môžu do daného miesta migrovať samostatne alebo migrujú kolektívne. Prvý typ migrácie je spojený s migráciou leukocytov do miesta zásahu behom imunitnej odpovede. Schopnosť individuálnej migrácie majú tiež fibroblasty pri prieniku spojivovým tkanivom (Norden a Lecaudey 2019; te Boekhorst et al. 2016; Trepát et al. 2012). Kolektívna migrácia buniek je koordinovaný pohyb, pri ktorom si bunky zachovávajú medzibunkové spojenia a kolektívnu polaritu (Grada et al. 2017; te Boekhorst et al. 2016). Možno ju pozorovať pri embryonálnom vývoji, hojení rán, ale aj pri patologických procesoch ako zápal alebo formy rakovinových metastáz (Jonkman et al. 2014; Norden a Lecaudey 2019; Pijuan et al. 2019; Trepát et al. 2012).

Medzi základné bunkové a molekulárne mechanizmy kolektívnej migrácie patrí kohézia, polarizácia a koordinácia cytoskeletárnej aktivity. To všetko sa deje pod vedením chemických a fyzikálnych signálov a zároveň v súlade so zmenami podkladového substrátu. Cytoskeletárna dynamika je zdieľaná medzi viacerými bunkami. Umožňuje tak udržať súdržnosť tvorenej štruktúry, smer dráhy migrácie a prestavbu sekundárnej ECM. Adhézia medzi bunkami je sprostredkovaná cez adherentné spojovacie proteíny, kadheríny, ďalšie imunoglobulíny a integríny. Priamym alebo nepriamym spojením s aktínom, poprípade stredným filamentami cytoskeletu vzniká dynamické spojenie (Friedl a Gilmour 2009).

V závislosti od anatomickej a fyziologickej súvislosti sa môže prejavovať kolektívna migrácia ako dvojrozmerný pohyb na povrchu tkaniva alebo ako trojrozmerný pohyb mnohobunkových vlákien naprieč tkanivovú oporu, tzv. „scaffold“ (Friedl a Gilmour 2009; Grada et al. 2017).

K experimentálnemu štúdiu bunkovej migrácie *in vitro* je možné využiť dvojdimenzionálne usporiadanie (2D), aj trojrozmerné usporiadanie (3D) (Friedl a Gilmour 2009).

In vitro 2D model je často používaný pro jeho nekomplikované praktické prevedenie. Pomocou mechanického narušenia súvislej vrstvy buniek sa sleduje ich súdržnosť počas pohybu konfluentných monovrstiev (Friedl a Gilmour 2009; Martinotti a Ranzato 2019). Pre sledovanie kolektívnej migrácie sú vhodné adherentné bunkové línie endotelových alebo epitelových buniek vrátane keratinocytov a fibroblastov (Bindschadler a McGrath 2007; Grada et al. 2017).

Bunková migrácia v 3D prostredí sa snaží priblížiť reálnym podmienkam v organizme. Samotné 3D prostredie je tvorené skeletom z ECM, takže migrácia buniek môže byť menená veľkosťou pórov matrix, usporiadaním vlákien, zosieťovaním ECM, lineárnosťou alebo elastickou nelineárnosťou ECM (Doyle et al. 2015; 2021; Charras a Sahai 2014). Rozhodujúca je veľkosť jadra, bunkovej organely veľmi krehkej voči mechanickému poškodeniu. Pri pohybe úzkym priestorom dochádza ku stlačeniu jadra a tým pádom ku aktivácii bunkovej signálnej kaskády. V extrémnych prípadoch nastane prasknutie jadra, čím sa poškodí DNA a nastane bunková smrť (McGregor et al. 2016; Pawluchin a Galic 2022). ECM je modifikovaná aj samotnými bunkami, ktoré ňou prechádzajú. Prostredie a migrácia sa navzájom ovplyvňujú, jedná sa o recipročný vzťah (Pawluchin a Galic 2022).

Výrazným rozdielom medzi sledovaním migrácie v 2D a 3D prostredí nastáva pri štúdiách bunkovej motility. V nedávnych štúdiách bolo zistené, že bunky vložené do 3D matrix, zloženej z kolagénu a matrigélov, využívajú odlišný pohybový aparát oproti bunkám v 2D prostredí. 3D testy sledovania migrácie ponúkajú výhodu kontrolovaného a dobre manipulovateľného prostredia. Tým uľahčujú analýzu molekulárnych mechanizmov a interpretáciu výsledkov (Visweshwaran a Gautreau 2020).

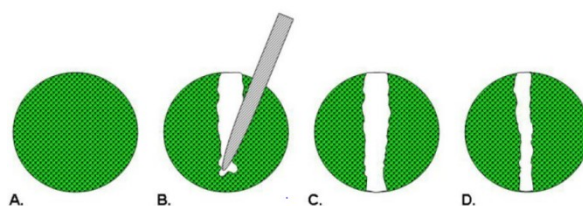
2.6.1 Sledovanie bunkovej migrácie v *in vitro* podmienkach

Analýza bunkovej migrácie metódou „wound healing assay“ môže byť aplikovaná pre kvantitatívne aj kvalitatívne hodnotenie kolektívnej migrácie buniek za rôzne definovaných podmienok, vplyvu ECM alebo medzibunkovej interakcie behom migrácie. Metóda má tiež svoje uplatnenie pri vysokokapacitnom testovaní potenciálnych liečiv, malých molekúl, či screeningu ovplyvňujúceho migráciu rakovinových buniek (Liang et al. 2007).

Pre sledovanie kolektívnej, ale aj individuálnej bunkovej migrácie sú bunky kultivované na mikrotitračných doštičkách s plochým dnom. V závislosti na usporiadaní môže doštička obsahovať 6 až 96 jamiek. Pre dosiahnutie konfluentného rastu buniek je prevedené ciele mechanické poškodenie v podobe lineárne vedenej ryhy v bunkovej monovrstve. Na dne jamky sa tak vytvorí oblasť bez buniek a do voľného priestoru je potom smerovaná samotná bunková migrácia (Martinotti a Ranzato 2019). Pre zachovanie reprodukovateľnosti výsledkov je dôležité zachovať konštantný počet

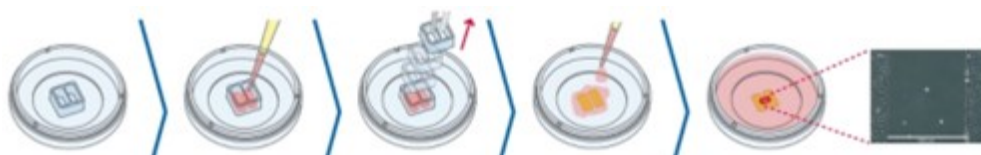
buniek na začiatku experimentu, aby bolo vždy dosiahnuté 95 až 100 % konfluencie v požadovanom čase (Pijuan et al. 2019).

Samotného rozrušenia bunkovej monovrstvy možno doceliť niekoľkými metódami. Tou najjednoduchšou je použitie sterilnej pipetovacej špičky (obr. 7), ktorou tvoríme pozdĺžnu ryhu konfluentnou vrstvou buniek. Úskalie tejto metódy môže byť v nižšej reprodukovateľnosti experimentov, pokiaľ nie je dodržaná správna technika (Martinotti a Ranzato 2019).



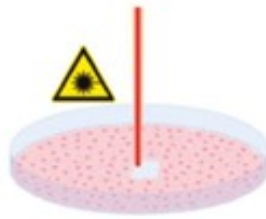
Obr. 7 Vytvorenie ryhy za pomoci pipetovacej špičky (prevzaté z Hulkower a Herber 2011)

Ďalšou metódou je použitie špeciálneho inzertu, ktorý vymedzuje priestor pre rast buniek a priestor pre migráciu už pri nasadení buniek do jamky mikrotitračnej doštičky (obr. 8). Po odobraní inzertu potom bunky migrujú do vytvorenej medzery. Výhodou je dobrá reprodukovateľnosť experimentov, pretože priestor pre migráciu je presne definovaný šírkou inzertu. Nevýhodou môže byť absencia mechanického poškodenia buniek, pri ktorom sa do okolia uvoľňuje celý rad signálnych molekúl podporujúcich migráciu buniek (Ashby a Zijlstra 2012; Jonkman et al. 2014).



Obr. 8 Vytvorenie medzibunkovej medzery pomocou inzertu (prevzaté z WEB1)

Veľmi presnou metódou je vytvorenie ryhy pomocou laserovej ablácie, kde sú bunky odstránené ultrafialovým laserom (obr. 9). Proces môže byť riadený počítačom a plno automatizovaný. Riziko tejto metódy môže ale spočívať v možnom fototermálnom, fotochemickom alebo fotomechanickom poškodení okolitých buniek (Hutson et al. 2003; Wu et al. 2017).



Obr. 9 Laserová ablácia (prevzaté z Stamm et al. 2016)

Aby bolo možné experiment objektívne zhodnotiť, je zhotovená séria mikrofotografií v zvolených časových intervaloch, ktoré dokumentujú zmeny v priestore vymedzenom zorným poľom mikroskopu. Pre udržanie reprodukovateľnosti dát medzi snímkami je nutné zaistiť snímame obrazu v stále rovnakej oblasti. Toho možno dosiahnuť prostredníctvom automatických zobrazovacích systémov, ktoré sú schopné vytvoriť mikrofotografiu v užívateľom definovanej oblasti zorného poľa v zvolených časových intervaloch. Rovnako je možné využívať kontinuálneho časozberného videozáznamu a získať tak ucelené informácie o dynamike celého procesu bunkovej migrácie (Kramer et al. 2013). Doba sledovania experimentu je väčšinou stanovená na 24 hodín, a to z dôvodu minimalizácie vplyvu bunkovej proliferácie. Novo vzniknuté bunky by potom mohli zaplniť priestor určený pre migráciu, a tým tak prispieť ku skráteniu času k zaceleniu ryhy migrujúcimi bunkami (Grada et al. 2017).

K potlačeniu proliferácie behom sledovania bunkovej migrácie možno docieľiť niekoľkými metódami. Jednou z nich je použitie nízkych koncentrácií látok inhibujúcich proliferáciu, ako napríklad mitomycín C. Ten blokuje replikáciu a transkripciu DNA. Samotná koncentrácia a doba pôsobenia mitomycínu C musí byť optimalizovaná, aby jeho toxické účinky neskresľovali výsledok procesu migrácie (Grada et al. 2017).

Ďalšou metódou ako potlačiť bunkovú proliferáciu je zníženie koncentrácie fetálneho bovinného séra v kultivačnom médiu. Obvykle používaná koncentrácia 10 % je tak znížená na 1 až 0,1 %. Kultivácia buniek pri nízkej koncentrácii zasahuje do priebehu bunkového cyklu, ktorý sa potom špecificky zastavuje v G0/G1 fáze. Opäť je aj v tomto prípade nutná optimalizácia, najmä doby kultivácie buniek za takto upravených podmienok. Nízka koncentrácia séra v kultivačnom médiu môže v bunkách indukovať nepredikovateľné zmeny, ktoré môžu ovplyvniť výsledok experimentu. Na druhú stranu, prevedením experimentu za týchto podmienok, poprípade v prostredí bezsérového média,

je možné sledovať účinok rôznych cytokínov alebo rastových faktorov na bunkovú migráciu, ktorý by bol inak prítomnosťou fetálneho bovinného séra maskovaný (Grada et al. 2017; Jonkman et al. 2014).

2.6.2 Analýza a kvantifikácia bunkovej migrácie

Získanie dát o priebehu bunkovej migrácie je obvykle založené na analýze obrazu, ktorý bol zaznamenaný v požadovaných časových intervaloch. Či už sa jedná o kontinuálny záznam alebo o jednotlivé snímky, analyzované dáta je vždy nutné vzťahovať k počiatočnému intervalu merania. Dôležitý parameter, ktorý určuje vhodnosť snímky pre počítačové spracovanie a analýzu, je dostatočný kontrast na rozhraní bunka/kvapalina (Jonkman et al. 2014).

Zobrazenie, ktoré poskytuje mikroskop s fázovým kontrastom, umožňuje pozorovanie natívnych buniek bez nutnosti špeciálneho značenia a pozorovanie možno vykonávať aj v plastových kultivačných nádobách. Pokročilejšou metódou mikroskopie je potom diferenciálny interferenčný kontrast (DIC), ktorý umožňuje detailné zobrazenie aj priehľadných alebo málo kontrastných bunkových štruktúr. Použitím vitálneho fluorescenčného farbenia možno získať snímky s vysokým kontrastom medzi bunkou s naviazaným fluorescenčným farbivom a nefarebným okolím. Nevýhodou môže byť prípadná fototoxicita alebo nestálosť fluorescenčného signálu behom trvajúcich opakovaných meraní. Alternatívou je využitie buniek transfekovaných GFP-proteínom, ktorý prirodzene vykazuje zelenú fluorescenciu (Liang et al. 2007; Yarrow et al. 2004).

Pre spracovanie a analýzu digitálnych obrazových dát je možné využiť komerčné alebo voľno dostupné počítačové programy. Niektoré licencované programy môžu byť v rámci analýzy využité ako voľná platforma (napríklad: Matlab[®], WimScratch[®], Wound Healing ACAS image Analysis[®]) alebo ako súčasť automatických zobrazovacích systémov (napríklad: Incucyte[®], Cytosmart[®], Cytation[®]). Z voľne dostupných programov pre hodnotenie obrazu je to potom ImageJ/Fiji[®] a nebo TScratch[®].

Medzi základné parametre analýzy patrí stanovenie otvorenej plochy a priemernej šírky oblasti bez buniek (Svensson et al. 2018). Software dokáže rozlíšiť oblasti pokryté bunkami od oblastí bez buniek a definovať medzi nimi rozhranie. U oblasti, ktorá je vymedzená ako zvyšný voľný priestor pre bunkovú migráciu je potom vypočítaný obsah plochy (Grada et al. 2017).

Parametre, ktorými je kvantifikovaná dynamika procesu zacel'ovania ryhy sú šírka ryhy, zacelená oblasť ryhy a relatívna hustota buniek v zacel'ovanej oblasti (Grada et al. 2017).

- *Šírka ryhy* je parameter hodnotiaci priemernú vzdialenosť medzi rozhraním migrujúcich buniek a voľného priestoru pre migráciu. Behom časového intervalu, po ktorý je migrácia hodnotená, dochádza k postupnému približovaniu oboch rozhraní a šírka ryhy sa znižuje. Výpočet zahŕňa rozdiel počiatočnej a konečnej šírky za časový interval (1-1). Výsledok je udávaný v jednotkách dĺžky za jednotku času, napríklad [nm·h⁻¹].

$$\text{šírka ryhy} = \frac{w_0 - w_1}{t} \quad (1-1)$$

w₀ - vzdialenosť rozhraní v čase 0

w₁ - vzdialenosť rozhraní v čase 1

t - čas trvania bunkovej migrácie

- *Zacelenie oblasti ryhy* vyjadruje mieru bunkovej migrácie za časovú jednotku. Tento parameter hodnotí zmenu obsahu plochy, kde nie sú prítomné bunky. Táto plocha sa teda so vzrastajúcim časom a mierou bunkovej migrácie znižuje. Výsledok možno vyjadriť ako percentuálny podiel medzi plochou na začiatku experimentu a v danom časovom intervale (1-2).

$$\% \text{ zacelenia} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1-2)$$

A₀ - veľkosť plochy vytvorenej ryhy na začiatku merania

A₁ - veľkosť plochy ryhy v čase 1

- *Relatívna hustota buniek v zacelenej oblasti (RWD)* je parameter, ktorým je vyjadrovaný výsledok bunkovej migrácie získaný automatickými zobrazovacími analyzátormi. RWD hodnotí percentuálny podiel hustoty buniek v oblasti ryhy oproti hustote buniek mimo túto oblasť. Za normálnych podmienok sa hodnota RWD zvyšuje. Výpočet RWD je daný vzťahom (1-3).

$$\% \text{ RWD } (t) = \frac{w_t - w_0}{c_t - w_0} \times 100 \quad (1-3)$$

w_0 - hustota buniek v oblasti ryhy v čase 0

w_t - hustota buniek v oblasti ryhy v čase t

c_t - hustota buniek mimo oblast' ryhy v čase t

3 CIEĽ PRÁCE

Cieľom práce bolo zhodnotiť vplyv vybraných rastových IGF, KGF a EGF na migráciu buniek keratinocytov HaCaT a buniek adultných kožných fibroblastov HDFa, ktoré boli ovplyvnené sírnym yperitom.

4 PRAKTICKÁ ČASŤ

Poznámka k praktickej časti diplomovej práce

Pri experimentálnych prácach bol použitý zásobný roztok sírneho yperitu v DMSO o koncentrácii 20 mmol·l⁻¹. Tento roztok bol uchovávaný pri teplote -20 °C. Pred použitím bol roztok temperovaný na laboratórnu teplotu. Jedná sa o látku uvedenú v Zozname 1 prílohy „Dohovorom o zákaze vývoja, výroby, hromadenia a použitia chemických zbraní a o ich zničení“. Praktická časť bola realizovaná na Katedre toxikológie a vojenskej farmácie Fakulty vojenského zdravotníctva Univerzity obrany. Dané pracovisko je držiteľom platnej licencie k zachádzaniu s látkami uvedenými v Zozname 1, ktorú vydal Štátny úrad pre jadrovú bezpečnosť. Autorka diplomovej práce bola po celé obdobie, kedy pracovala na experimentálnej časti diplomovej práce, zaradená do III. kategórie práce v riziku (vysoko toxické látky) a pravidelne podstupovala periodické zdravotné prehliadky na Oddelení chorôb z povolania Ústrednej vojenskej nemocnice v Prahe. Práca so sírnym yperitom vždy prebiehala pod dohľadom konzultanta tejto diplomovej práce, za použitia predpísaných ochranných pomôcok a stanovených postupov pre dekontamináciu použitého materiálu.

4.1 Použité chemikálie

Fosfátový tlmivý roztok (PBS; Sigma - Aldrich, St. Luise, MO, USA)

IGF (Ipsen Pharma, Praha, Česká republika)

KGF (Sigma - Aldrich, St. Luise, MO, USA)

EGF (ProSpec-Tany TechnoGene, Ness-Ziona, Izrael)

Muse[®] Count & Viability Kit (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA)

Sírnym yperitom (98,5 %, GC-MS, Vojenský výskumný ústav, s. p., Brno, Česká republika)

Trypsín-EDTA (Sigma – Aldrich, St. Luise, MO, USA)

Dimethyl sulfoxid (DMSO; Sigma - Aldrich, St. Luise, MO, USA)

Eaglovo médium modifikované Dulbeccom (DMEM s vysokým obsahom glukózy 4,5 g/l, Bioconcept Ltd, Allschwill - Švajčiarsko)

Penicilín - Streptomycín (Biosera, Nuaille, Francúzsko)

Fetálne bovinné sérum (FBS; Sigma - Aldrich, St. Luise, MO, USA)

L-glutamín (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Nemecko)

Dodecylsírán sodný (SDS; Sigma - Aldrich, St. Luise, MO, USA)

Trihydrát octanu sodného (Sigma - Aldrich, St. Luise, MO, USA)

Kyselina octová (Penta, s.r.o., Praha, Česká republika)

Triton x-100 (Sigma - Aldrich, St. Luise, MO, USA)

Hydroxid sodný (Penta, s.r.o., Praha, Česká republika)

4.2 Príprava roztokov

Príprava kultivačného média

Pre kultiváciu a experimentálne meranie boli použité tri rôzne modifikácie média DMEM.

Kompletné kultivačné médium obsahovalo:

- 450 ml média DMEM
- 50 ml FBS
- 5 ml L-glutamínu
- 5,5 ml roztoku penicilín – streptomycín

Médium DMEM s nízkym obsahom FBS (0,1 %) obsahovalo:

- 450 ml média DMEM
- 0,5 ml FBS
- 5 ml L-glutamínu
- 5,5 ml roztoku penicilín – streptomycín

Bezserové médium DMEM obsahovalo:

- 450 ml média DMEM
- 5 ml L-glutamínu
- 5,5 ml roztoku penicilín – streptomycín

Koncentračný rad pracovných roztokov EGF

Roztok EGF o koncentrácii $500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bol pripravený v sterilnej destilovanej vode. Alikvoty o objeme 10 μl boli uchovávané pri teplote $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vytemperovaní na

laboratórnú teplotu bolo pipetované 8 μl roztoku EGF do 92 μl destilovanej vody. Výsledná koncentrácia roztoku bola $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Následne bol pripravený koncentračný rad pracovných roztokov v bezsérovom kultivačnom médiu o dvojnásobnej koncentrácii než je finálna koncentrácia v jamke 24jamkovej alebo 96jamkovej mikrotitračnej doštičky. Koncentrácia série štyroch pracovných roztokov bola 200, 100, 20 a $2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Pracovný roztok EGF o koncentrácii $200 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bol pripravený zmiešaním 40 μl roztoku EGF ($40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 7,96 ml bezsérového kultivačného média.

Roztok EGF o koncentrácii $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bol pripravený zmiešaním 15 μl roztoku EGF ($40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 5,985 ml bezsérového kultivačného média.

Koncentrácie 20 a $2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ EGF boli pripravené sériovým desiatkovým riedením z koncentrácie $200 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ EGF. Do 4,5 ml bezsérového média bolo pridané 500 μl roztoku EGF o koncentrácii $200 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vznikol tak roztok o koncentrácii $20 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, z ktorého bol pripravený roztok o koncentrácii $2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ zmiešaním 500 μl tohto roztoku s 4,5 ml bezsérového média.

Koncentračný rad pracovných roztokov IGF

Roztok IGF o koncentrácii $10\,000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obsiahnutý v ampulke bol skladovaný pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$ v temne. Z roztoku boli pripravené alikvoty o objeme 100 μl a uchovávané rovnako pri teplote $4 \text{ }^\circ\text{C}$ v temne.

Po vytemperovaní na laboratórnú teplotu bolo pipetované 10 μl zásobného roztoku IGF do 1,990 ml destilovanej vody. Výsledná koncentrácia roztoku činila $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Nato bol pripravený koncentračný rad pracovných roztokov v bezsérovom kultivačnom médiu o dvojnásobnej koncentrácii než je finálna koncentrácia v jamke 24jamkovej alebo 96jamkovej mikrotitračnej doštičky. Koncentrácia série štyroch pracovných roztokov bola 200, 100, 20 a $2 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Pracovný roztok o koncentrácii $200 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bol zhotovený zmiešaním 25,5 μl zásobného roztoku IGF ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 6,350 ml bezsérového kultivačného média.

Roztok IGF o koncentrácii $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bol pripravený zmiešaním 10 μl roztoku IGF ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 4,990 ml bezsérového kultivačného média.

Koncentrácie 20 a $2\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IGF boli pripravené sériovým desiatkovým riedením z koncentrácie $200\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IGF. Do 4,5 ml bezsérového média bolo pridané 500 μl roztoku IGF o koncentrácii $200\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a z novovzniknutého roztoku o koncentrácii $20\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ sa odobralo 500 μl , zmiešalo s 4,5 ml bezsérového média za vzniku roztoku o koncentrácii $2\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Koncentračný rad pracovných roztokov KGF

Roztok KGF o koncentrácii $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bol pripravený v sterilnej vode. Alikvoty o objeme 66,5 μl boli uchovávané pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vytemperovaní na laboratórnu teplotu bolo pipetované 65 μl roztoku KGF do 0,585 ml destilovanej vody.

Potom bol pripravený koncentračný rad pracovných roztokov v bezsérovom kultivačnom médiu o dvojnásobnej koncentrácii než je finálna koncentrácia v jamke 24jamkovej alebo 96jamkovej mikrotitračnej doštičky. Koncentrácia série štyroch pracovných roztokov bola 100, 20, 2 a $0,2\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Zmiešaním 500 μl zásobného roztoku KGF ($1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 4,5 ml bezsérového kultivačného média bol pripravený pracovný roztok o koncentrácii $100\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Roztok KGF o koncentrácii $20\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ bol pripravený zmiešaním 100 μl roztoku KGF ($1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a 4,90 ml bezsérového kultivačného média

Koncentrácie 2 a $0,2\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IGF boli pripravené sériovým desiatkovým riedením z koncentrácie $100\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do 4,5 ml bezsérového média bolo pridané 500 μl roztoku KGF o koncentrácii $20\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Týmto spôsobom vznikol roztok o koncentrácii $2\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, z ktorého bol pripravený roztok o koncentrácii $0,2\text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ zmiešaním 500 μl tohto roztoku s 4,5 ml bezsérového média.

Príprava acetátového tlmivého roztoku

Pre prípravu 1 litru roztoku bolo navážené 13,608 g trihydrátu octanu sodného. Po rozpustení v 900 ml destilovanej vody bolo pH roztoku upravené na hodnotu 5,5 niekoľkými kvapkami koncentrovanej kyseliny octovej (98,5 %). Následne bolo do roztoku pridané 1000 μl tritonu x-100. Po jeho rozpustení bol roztok prevedený do odmernej banky o objeme 1 l a doplnený po rysku. Tlmivý roztok bol uchovávaný v reagenčnej fľaši pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Príprava roztoku *p*-nitrofenylfosfátu o koncentrácii 50 mol.l⁻¹ (10x)

Do 100 ml odmernej banky bolo navážené 1,8557 g *p*-nitrofenylfosfátu a rozpustené v destilovanej vode. Po rozpustení bol roztok doplnený po rysku. Následne boli pripravené alikvoty o objeme 1 ml a uchovávané pri teplote -20 °C.

Príprava 1 N NaOH

Roztok bol pripravený rozpustením 8 g hydroxidu sodného v 100 ml vody. Po rozpustení a vychladnutí bol roztok prevedený do 200 ml odmernej banky a doplnený po rysku. Roztok bol skladovaný pri laboratórnej teplote.

4.3 Prístroje, pomôcky a programové vybavenie

Prístroje

- laminárny box (Safeflow 1.2, EuroClone, Taliansko)
- vodná lázeň (Polyscience, Illinois, USA)
- centrifúga (Hettich® Universal 320 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Nemecko),
- analyzátor buniek Muse® Cell Analyzer (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA)
- prístroj pre meranie konfluencie buniek (Spark® multimode microplate reader, Tecan Trading AG, Švajčiarsko)
- ohrievacia doska (CultureTemp®, Bel-Art Products, New Jersey, USA)
- optický invertovaný mikroskop (Nicon eclipse T100, Nikon, Japonsko)
- CO₂ inkubátor (Binder, BINDER GmbH, Tuttlingen, Nemecko)
- vortex (PV-1, Grant Instruments (Cambridge) Ltd, Spojené kráľovstvo)
- orbitálna trepačka mikrotitračných doštičiek (IKA® MS 3 digital, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Nemecko)
- spektrofotometer (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader, Biotek, USA)

Pomôcky

Sterilné plastové pomôcky:

- sérologické pipety jednorázové sterilné (TPP, Trasadingen, Švajčiarsko)
- špičky (epTIPS Standard, Eppendorf, Hamburg, Nemecko)

- mikrotitračné doštičky 24 a 96 jamiek, kultivačné fľaše T75 (TPP, Trasadingen, Švajčiarsko)
- doštička s jamkami o objeme 1 ml (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- mikroskúmvky typu Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)

Pomôcky pro manipuláciu s kvapalinami:

- elektronický dávkovač Multipette Xstream (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)
- pipetovací nástavec pro sérologické pipety Midi Plus (Sartorius AG, Göttingen, Nemecko)
- multikanálová pipeta Eppendorf® Research® plus (Eppendorf, Hamburg, Nemecko)

Programové vybavenie

ImageJ (ImageJ 1.53a, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA)

Microsoft Excel (Microsoft® Word pre Microsoft 365 MSO (verzia 2212 Zostava 16.0.15928.20196) 32-bitová verzia)

GraphPad Prism 9 pro Windows 64-bit (verze 9.5.0, GraphPad Software, Boston, MA, USA)

4.4 Bunková línia HaCaT a HDFa

Pre experimentálnu prácu boli použité bunky z línie HaCaT zakúpené od CLS Cell Lines Service GmbH, Eppelheim, Nemecko. Jedná sa o imortalizované bunky ľudských keratinocytov. Bunky HDFa boli kúpené od Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA. Sú to primárne dermálne fibroblasty izolované z kože dospelého človeka.

4.4.1 Kultivácia buniek

Bunky HaCaT a HDFa boli kultivované v kompletnom médiu DMEM pri teplote 37 °C, 5 % CO₂ a 98 % relatívnej vzdušnej vlhkosti. Pre kultiváciu buniek boli použité sterilné kultivačné fľaše s plochou dna 75 cm².

4.4.2 Nasadenie buniek do 24 jamkovej doštičky

Z kultivačnej fľaše T75 s bunkami HaCaT alebo HDFa bolo odsaté médium, bunky boli opláchnuté PBS a do kultivačnej fľaše sa pridalo 2 ml trypsínu. Následne sa nechali bunky inkubovať pri 37 °C dokým nedošlo k ich uvoľneniu od povrchu kultivačnej fľaše. K bunkám bolo pipetované 5 ml kompletného kultivačného média

DMEM. Všetok obsah z fľaše bol prenesený do 14 ml centrifugačnej skúmavky, zvyšok objemu sa doplnil PBS na objem 14 ml. Bunky boli po dobu 5 minút centrifugované pri rýchlosti 600 otáčok·min⁻¹. Po centrifugácii bolo médium odsaté a bunky sa resuspendovali v 1 ml kompletného média a následne bola suspenzia zriedená na objem 10 ml. Z homogénnej suspenzie sa odobralo 50 µl vzorku suspenzie do 1,5 ml mikroskúmavky. Ku vzorke suspenzie bolo pridané 100 µl roztoku Muse[®] Count & Viability Kit pre stanovenie počtu a viability buniek na prístroji Muse[®] Cell Analyzer. Po 5 minútach inkubácie bola zmes premiešaná na vortexe a analyzovaná. Na základe počtu buniek bola suspenzia zriedená kompletným médiom DMEM, aby do každej jamky 24jamkovej doštičky bolo pipetované 1,5 ml suspenzie o koncentrácii 300 000 buniek na jamku.

4.5 Scratch wound healing assay

Druhý deň bola prevedená výmena média. Kompletné médium DMEM bolo nahradené médiom so zníženým obsahom FBS (0,1 %). Do každej jamky bolo pipetované 1,5 ml tohto média. Bunky boli ďalej inkubované cez noc.

Tretí deň bola v konfluentnej vrstve buniek vytvorená ryha v tvare kríža pomocou upravenej pipetovacej špičky. Nasledoval oplach buniek PBS a do prázdnych jamiek bolo pipetované 0,95 ml bezsérového média. Ovplyvnenie buniek prebehlo podľa schémy (obr. 10). Do stĺpcov 3 až 6 bolo pipetované 50 µl HD zriedeného v PBS, čím sa dosiahlo výslednej koncentrácie 20 µM HD v 1 ml. Do stĺpcov 1 a 2 bolo pipetované ekvivalentné množstvo roztoku DMSO v PBS ako kontrola. Výsledná koncentrácie DMSO nepresiahla 0,25 %. Bunky sa nechali inkubovať po dobu 1 hodiny v CO₂ inkubátore.

	1	2	3	4	5	6
A	c+M	c+EGF 1	20+M	20+EGF 1	20+EGF 1	20+EGF 1
B	c+M	c+EGF 10	20+M	20+EGF 10	20+EGF 10	20+EGF 10
C	c+M	c+EGF 50	20+M	20+EGF 50	20+EGF 50	20+EGF 50
D	c+M	c+EGF 100	20+M	20+EGF 100	20+EGF 100	20+EGF 100

Obr. 10 Usporiadanie experimentu v 24jamkovej doštičke

Po uplynutí 1 hodiny bolo pipetované 1 ml koncentračného radu pracovného roztoku rastového faktora (IGF/EGF/KGF) pripraveného podľa postupu v kapitole 4.2. Do kontrolných jamiek s bunkami ovplyvnenými len HD bolo pridané 1 ml média DMEM bez séra.

Doštička bola vložená do prístroja pre záznam konfluencie buniek Tecan Spark® multimode microplate reader, kde bola každých 6 hodín meraná konfluencia buniek po dobu 24 hodín. Obrazový záznam konfluencie bol ďalej analyzovaný v programe ImageJ a MS excel.

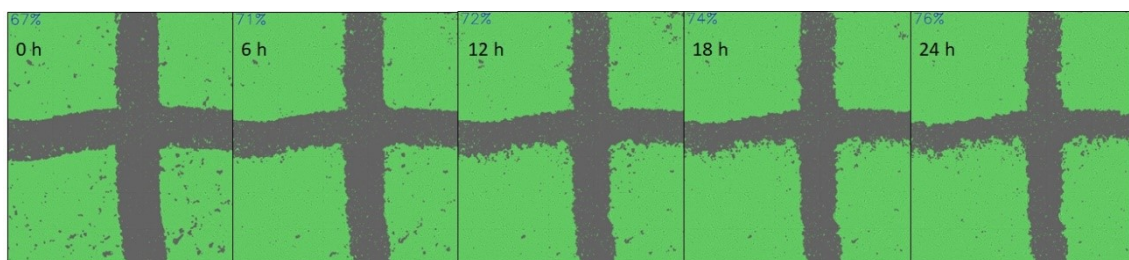
4.5.1 Vyhodnotenie testu

Boli získané série mikrofotografií vo výstupnom formáte pre meranie konfluencie. Plocha pokrytá bunkami bola zobrazená zeleno a priestor pre migráciu šedo (obr. 11).



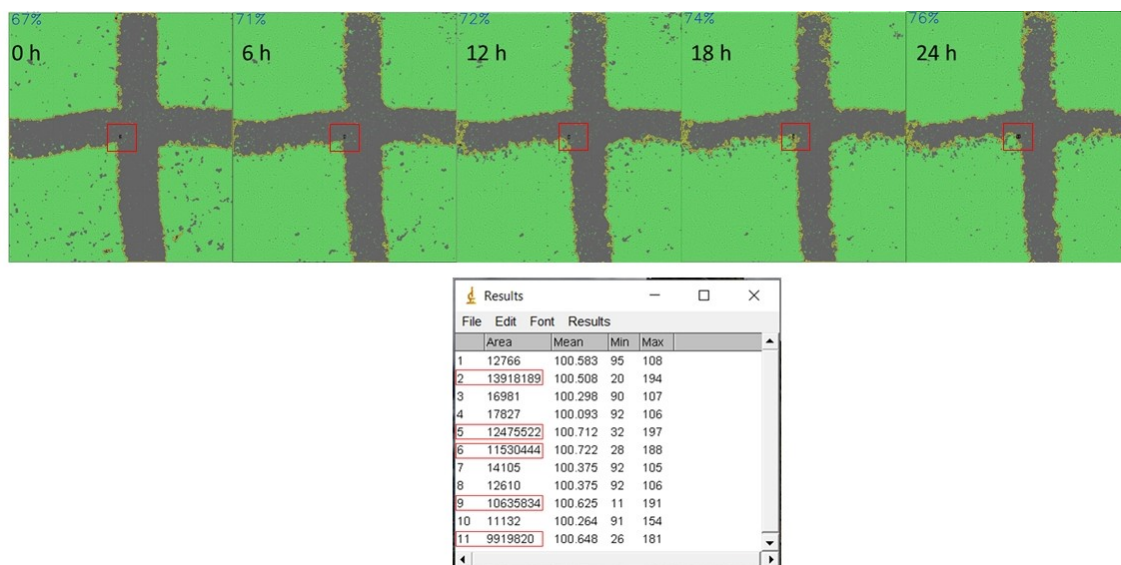
Obr. 11 Mikroskopický snímok buniek HaCaT vo výstupnom formáte pre meranie konfluencie

Následne bola vybraná séria snímok dokumentujúcich bunkovú migráciu v konkrétnej jamke a táto séria snímok bola podrobená počítačovej analýze obrazu (obr. 12).



Obr. 12 Séria snímok buniek HaCaT získaná v 6 hodinových intervaloch, pripravená pre analýzu obrazu

Veľkosť plochy bez buniek bola hodnotená v prostredí programu ImageJ. Plocha bez buniek je potom označená číslom v čiernom poli, ktorá odkazuje na tabuľku, kde je uvedená plocha a ďalšie parametre (obr. 13).



Obr. 13 Analýza digitálnych mikroskopických snímok v programe ImageJ. Číslica v červenom ráme odkazuje na veľkosť analyzovanej plochy bez buniek, ktorá je pod príslušným číslom uvedená v tabuľke výsledkov.

Bunková migrácia vyjadrená ako % zacelenie ryhy bola vypočítaná podľa rovnice (1-4)

$$\% \text{ zacelenia} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100 \quad (1-4)$$

A_0 - veľkosť plochy vytvorenej ryhy na začiatku merania

A_1 - veľkosť plochy ryhy v čase 1

4.6 Stanovenie bunkovej viability

Bunky HaCaT alebo HDFa boli nasadené do 96 jamkovej mikrotitračnej doštičky v množstve 10 000 buniek/jamku (HaCaT) alebo 15 000 buniek/jamku (HDFa) v objeme 100 μ l kompletného média DMEM na jamku. Druhý deň bolo médium nahradené za kultivačné médium s nízkym obsahom FBS (0,1 %). Do každej jamky bolo pipetované 100 μ l tohto média a bunky boli následne inkubované ďalších 24 hodín.

Nasledujúci deň bolo všetko médium odsaté a do jamky bolo pipetované 90 μ l média, ktoré bolo suplementované 2 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ glutamínu a 1 % roztokom penicilín - streptomycín. Toto médium teda neobsahovalo FBS.

Do 90 μl média s bunkami bolo ďalej pipetované 10 μl roztoku HD v PBS. Výsledná koncentrácia činila 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do ostatných jamiek bol pipetovaný ekvivalentný roztok DMSO v PBS ako kontrola. Potom boli bunky inkubované 1 hodinu v CO_2 inkubátore. Výsledná koncentrácia DMSO bola 0,1 %.

Po jednej hodine bolo do príslušných jamiek pipetované 100 μl rastového faktora v dvojnásobnej koncentrácii. Do ostatných jamiek bolo pipetované 100 μl bezsérového média. Do jamiek určených pre blank bolo pipetované 100 μl roztoku 5 % SDS. Nasledovala inkubácia 24 hodín.

Po 24 hodinách od ovplyvnenia bola stanovená viabilita buniek spektrofotometrickým meraním aktivity enzýmu kyslá fosfatáza. Kyslá fosfatáza je enzým prítomný v cytoplazme živých buniek, pri pH 5,5 hydrolyzuje artifiálny substrát *p*-nitrofenyl fosfát na *p*-nitrofenol, ktorý po zvýšení pH [prídavkom NaOH] prechádza na žltó zafarbený produkt.

Najskôr bolo zo všetkých jamiek odsaté médium a do jamiek bolo pipetované 200 μl PBS. Následne bol všetok obsah jamiek odsatý a do každej jamky bolo pipetované 100 μl roztoku *p*NPP v acetátovom tlmivom roztoku. Po 50 minútovej inkubácii pri 37 °C bolo do každej jamky pridané 15 μl 1 N NaOH za vzniku žltého zafarbenia. Absorbancia produktu bola meraná pri 405 nm.

Po odčítaní blanku boli hodnoty absorbancie prepočítané na relatívne % vzhľadom ku kontrole. Hodnoty boli graficky znázornené ako priemer \pm SEM. Dáta boli získané zo štyroch opakovaných nezávislých experimentov prevedených v replikátore $n = 4$.

4.7 Štatistická analýza dát

Hodnoty vyjadrujúce % zacelenie ryhy boli vyjadrené ako priemerná hodnota \pm SEM. Dáta boli získané najmenej z troch nezávislých meraní prevedených v replikáte $n = 3$.

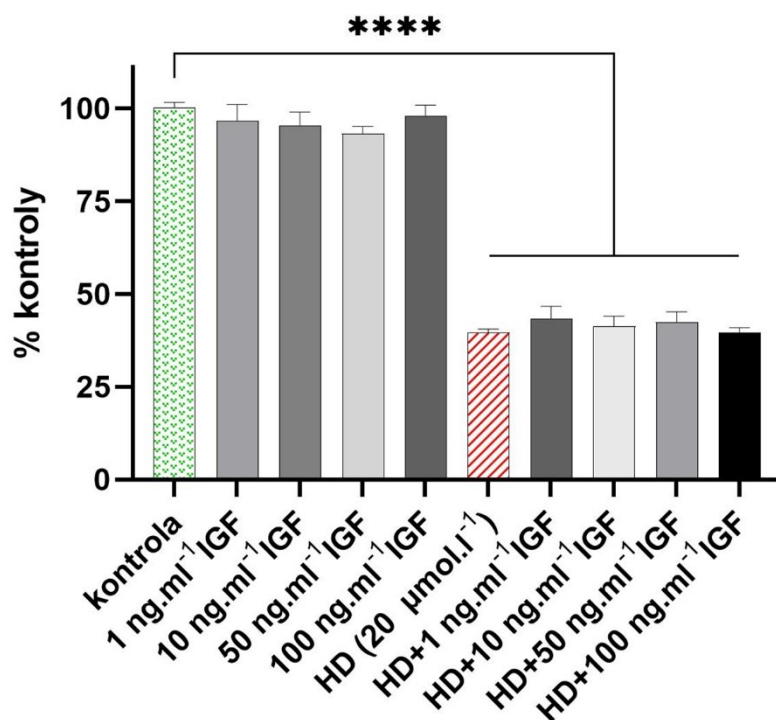
Štatisticky významné zmeny hodnôt v porovnaní s kontrolou boli analyzované jednofaktorovou analýzou rozptylu (one-way ANOVA) v kombinácii s Dunnettovým post hoc testom. Signifikantný rozdiel hodnôt p bol hodnotený na hladinách významnosti *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,0001$ a ****, $p < 0,00001$.

5 VÝSLEDKY

Výsledky sú rozdelené podľa použitých bunkových línií a testovaných rastových faktorov. Najskôr sú uvedené výsledky získané s použitím bunkovej línie HaCaT a rastových faktorov IGF, KGF a EGF. V druhej časti sú výsledky získané s použitím bunkovej línie HDFa a rastových faktorov IGF, KGF a EGF.

5.1 Vplyv IGF na migráciu buniek HaCaT

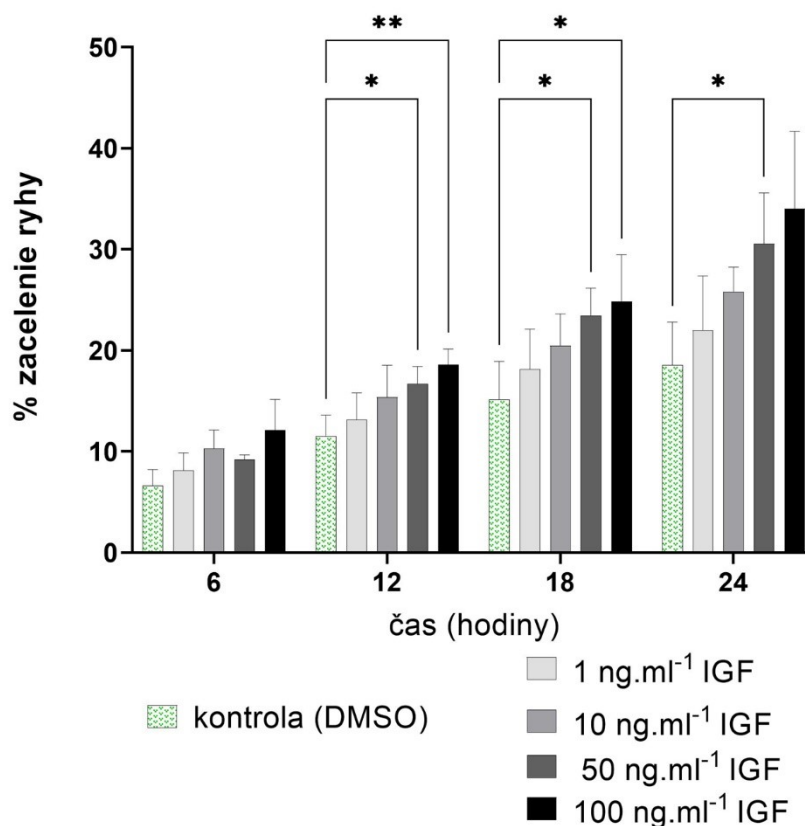
Najskôr bol hodnotený vplyv samotného koncentračného radu IGF, HD a kombinácie HD a jednotlivých koncentrácií IGF na bunkovú viabilitu buniek HaCaT (obr. 14). Štatisticky významný pokles hodnôt bol zistený u buniek HaCaT ovplyvnených $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HD, a to o 60,5 % oproti kontrole. U kombinácie HD a $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IGF došlo k poklesu hodnôt o 56,9 %, u kombinácie HD a $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IGF o 58,4 %, u HD a $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IGF o 57,8 % a u HD a $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IGF o 60,5 %.



Obr. 14 Vplyv koncentračného radu IGF, sírneho yperitu (HD) a kombinácie HD a IGF na viabilitu buniek HaCaT. Po 24 hodinách bola zmeraná bunková viabilita. Štatisticky významný rozdiel hodnôt porovnaní s kontrolou je indikovaný **** (p<0,00001).

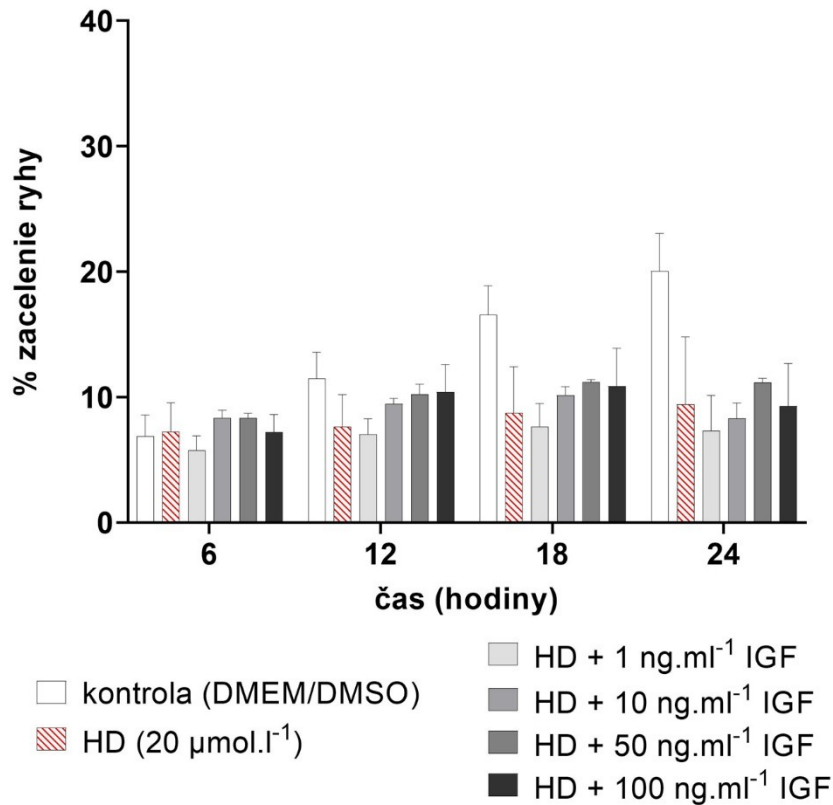
Následne bol hodnotený efekt koncentračného radu IGF na kolektívnu migráciu buniek HaCaT metódou „scratch wound healing assay“ v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín (obr. 15). Behom prvých 6 hodín neboli zistené žiadne významné rozdiely

hodnôt. Po 12 hodinách došlo ku štatisticky významnému zvýšeniu % zacelenia ryhy u buniek HaCaT ovplyvnených 50 a 100 ng·ml⁻¹ IGF, a to o 5,2 % a o 7,1 % v porovnaní s kontrolou. V intervale 18 hodín po pridaní IGF boli nájdené štatisticky významné rozdiely v rovnakých koncentráciách ako v 12 hodinovom intervale. Došlo k zvýšeniu hodnôt o 8,3 % a o 9,3 % oproti kontrole. Po 24 hodinách bol nárast % zacelenia ryhy signifikantný len u koncentrácie 50 ng·ml⁻¹ IGF o 12,1 % oproti kontrole.



Obr. 15 Vplyv koncentračného radu IGF na migráciu buniek HaCaT. Migrácia buniek bola hodnotená ako % zacelenia ryhy metódou „scratch wound healing assay“. Zacelenie ryhy bolo hodnotené v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín. Štatisticky významná zmena oproti kontrole je označená * (p<0,05), ** (p<0,01).

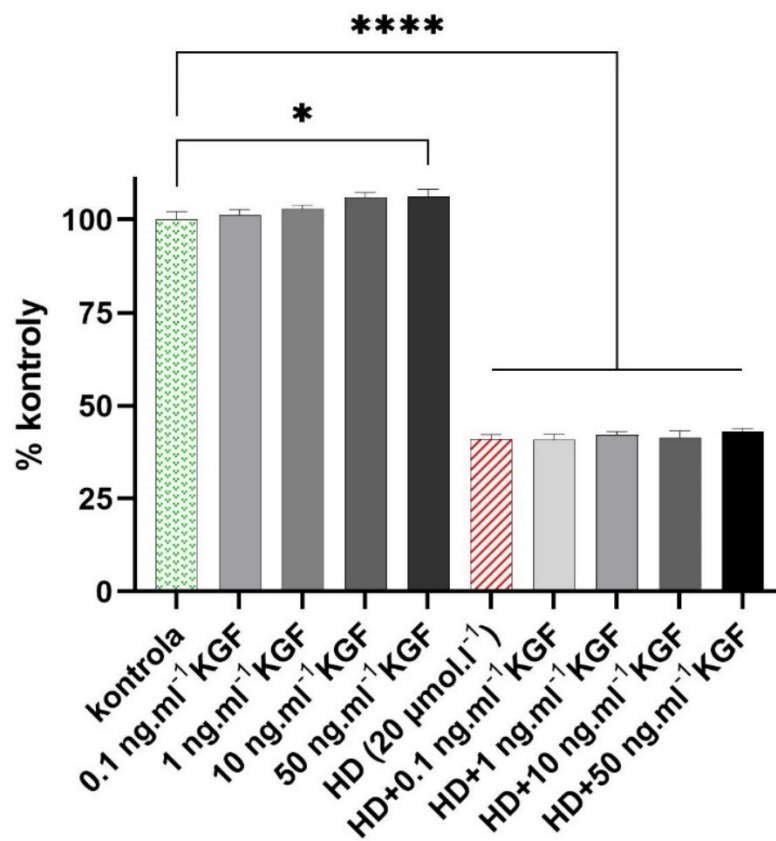
Tretia časť výsledkov vplyvu IGF na bunkovú migráciu je zameraná na migráciu buniek HaCaT, ktoré boli ovplyvnené HD (obr. 16). Je tu vidieť zreteľný vplyv HD na pokles migrácie buniek HaCaT, avšak štatistické hodnotenie bolo zamerané na porovnanie % zacelenia ryhy buniek ovplyvnených HD v porovnaní s bunkami ovplyvnenými HD v kombinácii s IGF. Žiadna z testovaných koncentrácií IGF nespôsobila štatisticky významné zvýšenie kolektívnej migrácie buniek ovplyvnených HD.



Obr. 16 Vplyv koncentračného radu IGF na migráciu buniek ovplyvnených sírnym yperitom (HD). Migrácia buniek bola hodnotená ako % zacelenie ryhy metódou „scratch wound healing assay“. Zacelenie ryhy bolo hodnotené v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín.

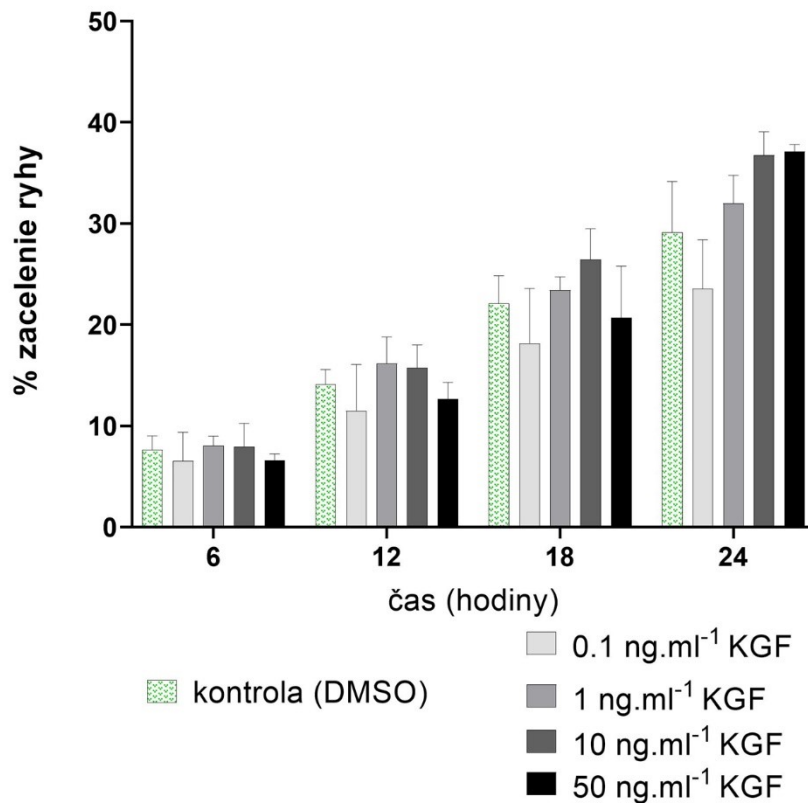
5.2 Vplyv KGF na migráciu buniek HaCaT

Signifikantné zmeny hodnôt viability buniek HaCaT boli zistené v prípade ovplyvnenia buniek $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ KGF. Došlo k miernemu, napriek tomu však signifikantnému zvýšeniu hodnôt o 6,2 % vzhľadom ku kontrole. V prípade buniek ovplyvnených len HD došlo ku štatisticky významnému poklesu hodnôt o 58,9 %. U kombinácie HD a KGF bol pokles hodnôt oproti kontrole veľmi podobný. Pre všetky testované koncentrácie KGF s HD sa zníženie hodnôt pohybovalo v úzkom rozmedzí od 57,0 % do 59,1 % oproti kontrole (obr. 17).



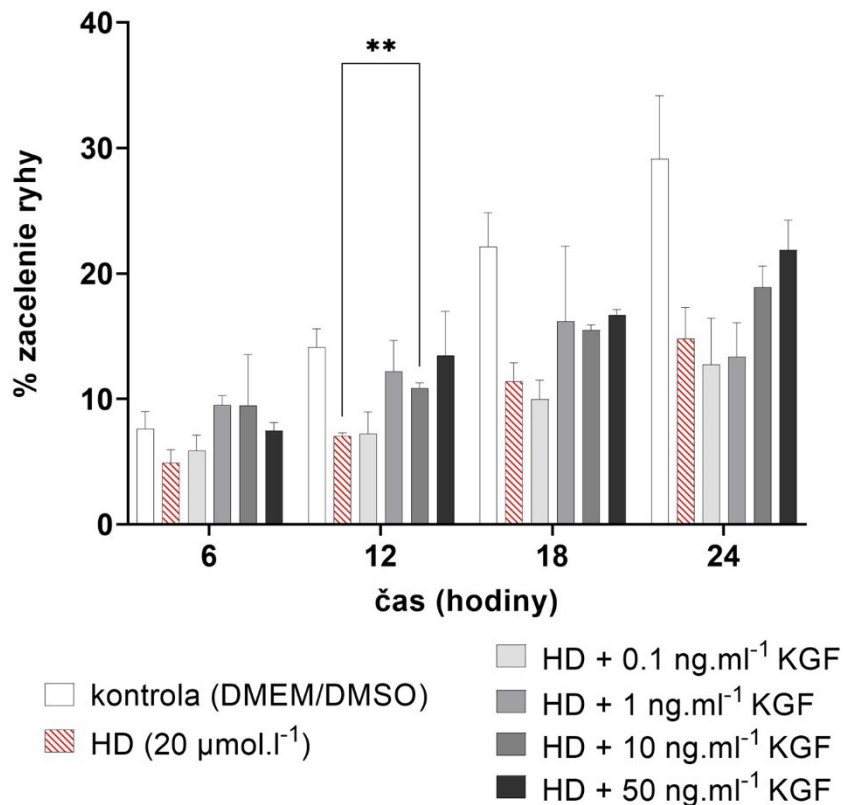
Obr. 17 Viabilita buniek HaCaT. Bunky boli ovplyvnené koncentračným radom rastového faktora KGF alebo kombináciou sírneho yperitu (1 hod) a následne koncentračným radom rastového faktora KGF. Viabilita rástla po 24 hodinách od ovplyvnenia rastovým faktorom. Štatisticky významná zmena viability v porovnaní s kontrolou je indikovaná * ($p < 0,05$), **** ($p < 0,00001$).

Vplyv KGF na kolektívnu migráciu buniek HaCaT bol sledovaný u koncentrácie 0,1; 1, 10 a 50 ng·ml⁻¹ (obr. 18). V žiadnom z hodnotených časových intervalov nebol zistený signifikantný rozdiel hodnôt oproti neovplyvneným bunkám.



Obr. 18 Vplyv rastového faktora KGF na migráciu buniek HaCaT. Migrácia buniek bola meraná metódou „scratch wound healing assay“. Zacelenie ryhy bolo hodnotené v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek koncentračným radom KGF.

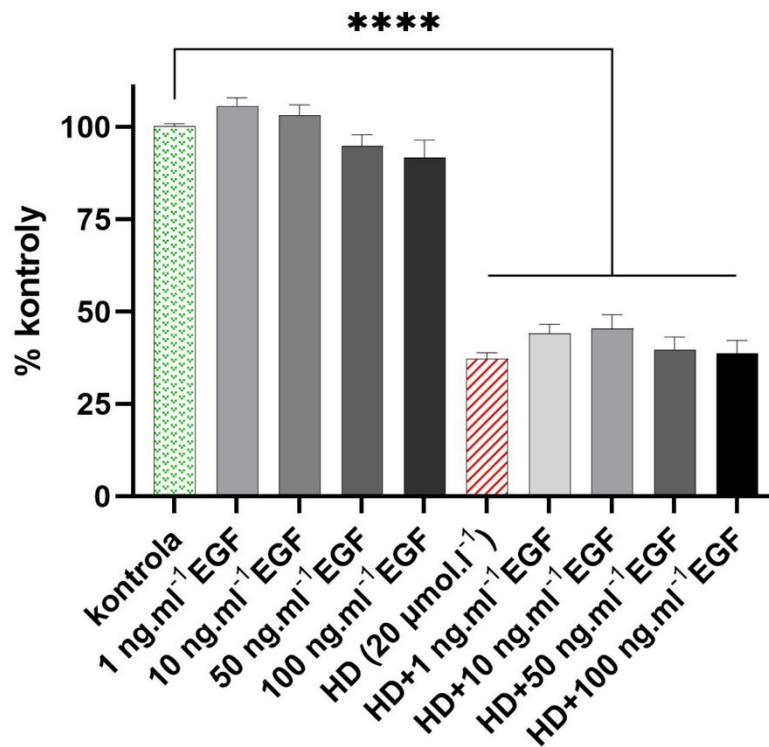
Na obr. 19 je znázornený vplyv rôznych koncentrácií KGF na migráciu buniek HaCaT ovplyvnených $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HD. Štatisticky významný rozdiel bol nájdený v intervale 12 hodín po ovplyvnení buniek KGF o koncentrácii $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Rozdiel hodnôt činil 3,8 %. Ostatné hodnoty sa štatisticky neodlišovali od kontroly (bunky ovplyvnené len HD) po daný časový interval.



Obr. 19 Vplyv rastového faktora KGF na migráciu buniek HaCaT ovplyvnených sírnym yperitom (HD). Bunky boli ovplyvnené sírnym yperitom po dobu 1 hod. a následne bol pridaný koncentračný rad KGF. Zacelenie ryhy bolo sledované v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín po ovplyvnení koncentračným radom KGF. Štatisticky významná zmena oproti kontrole je označená ** ($p < 0,01$).

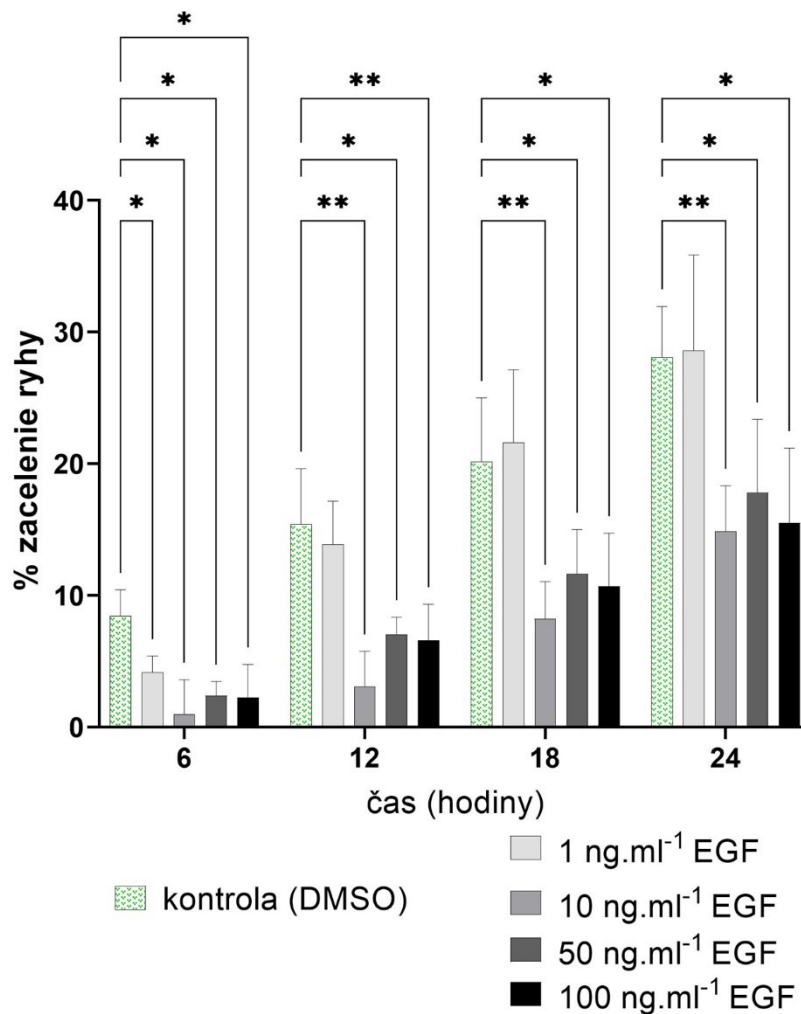
5.3 Vplyv EGF na migráciu buniek HaCaT

Faktor EGF v koncentráciách 1 až 100 ng·ml⁻¹ neindukoval štatisticky významné zníženie viability buniek HaCaT po 24 hodinách inkubácie (obr. 20). HD znížil hodnotu viability buniek o 62,9 %. V kombinácii HD s 1 ng·ml⁻¹ EGF došlo k poklesu viability 56 %, ďalej potom v kombinácii HD a 10 ng·ml⁻¹ EGF o 54,8 %; HD a 50 ng·ml⁻¹ EGF o 60,4 % a HD a 100 ng·ml⁻¹ EGF o 61,3 %.



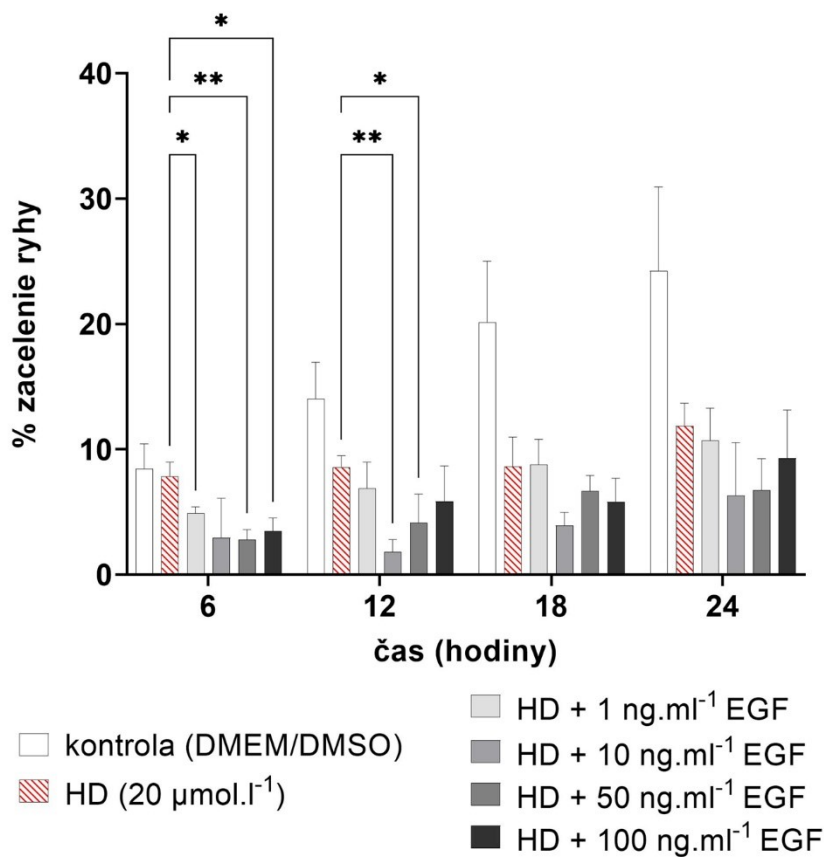
Obr. 20 Viabilita buniek HaCaT. Bunky boli ovplyvnené koncentračným radom rastového faktora EGF alebo kombináciou sírneho yperitu (1 hod) a následne koncentračným radom rastového faktora EGF. Viabilita rástla po 24 hodinách od ovplyvnenia rastovým faktorom. Štatisticky významná zmena viability v porovnaní s kontrolou je indikovaná **** ($p < 0,00001$).

Vplyv EGF na bunkovú migráciu bol prevažne inhibujúceho charakteru v porovnaní s kontrolou (obr. 21). V intervale 6 hodín po ovplyvnení buniek HaCaT koncentračným radom EGF došlo k štatisticky významnému poklesu % zacelenia ryhy u koncentrácie $1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ o 4,3 % oproti kontrole. V koncentrácii $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ EGF o 7,4 %; v koncentrácii $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ o 6,1 % a v koncentrácii $100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ o 6,2 %. Po 12 hodinách inkubácie bol v koncentráciách 10, 50 a $100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ zaznamenaný signifikantný pokles o 12,3 %, 8,3 % a o 8,8 %. Po 18 hodinách došlo v týchto koncentráciách k poklesu o 11,9 %, 8,5 % a o 9,5 %. Za 24 hodín bolo % zacelenie ryhy u týchto koncentrácií rovnako štatisticky významne znížené o 13,2 %, 10,3 % a o 12,6 % v porovnaní s kontrolou.



Obr. 21 Vplyv rastového faktora EGF na migráciu buniek HaCaT. Migrácia buniek bola meraná metódou „scratch wound healing assay“. Zacelenie ryhy bolo hodnotené v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek koncentračným radom EGF. Štatisticky významná zmena oproti kontrole je označená * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

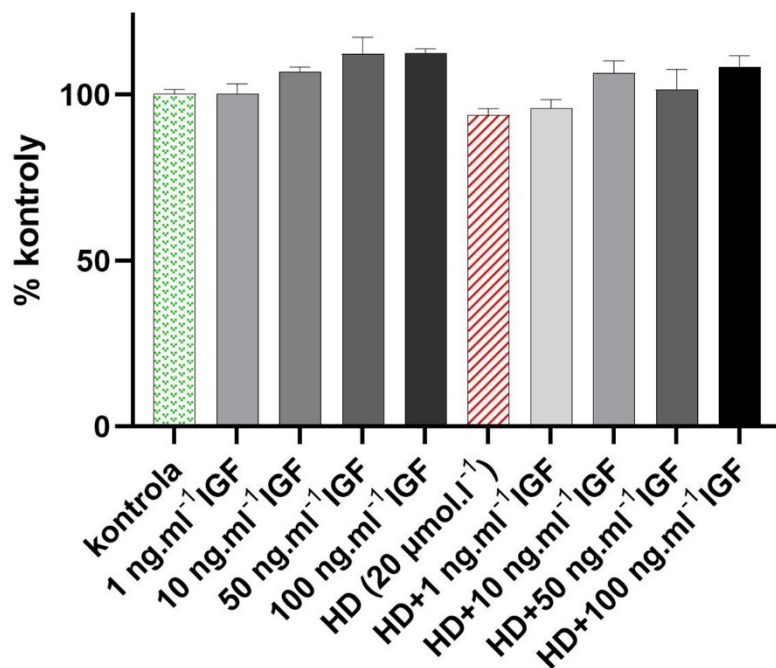
Inhibícia bunkovej migrácie sa prejavila aj u buniek HaCaT ovplyvnených HD v kombinácii s EGF (obr. 22). Došlo ku štatistickému zníženiu hodnôt % zacelenia ryhy v intervale 6 hodín po ovplyvnení buniek koncentračným radom EGF. U kombinácie HD a EGF o koncentrácii $1 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ došlo k poklesu o 2,9 % oproti kontrole. U kombinácie HD a $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ EGF o 5,0 % a u kombinácie HD a $100 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ EGF o 4,3 %. Po 12 hodinách pokračoval trend poklesu hodnôt % zacelenia ryhy. Štatisticky významné zníženie bolo nájdené u kombinácie HD a $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ EGF a to o 6,7 % vzhľadom ku kontrole, ktorú predstavuje HD. Rovnako bol zistený signifikantný pokles u kombinácie HD a $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ EGF a to o 4,4 %.



Obr. 22 Vplyv rastového faktora EGF na migráciu buniek HaCaT ovplyvnených sírnym yperitom (HD). Bunky boli ovplyvnené sírnym yperitom po dobu 1 hod. a následne bol pridaný koncentračný rad EGF. Zacelenie ryhy bolo sledované v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín po ovplyvnení koncentračným radom EGF. Štatisticky významná zmena oproti kontrole je označená * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

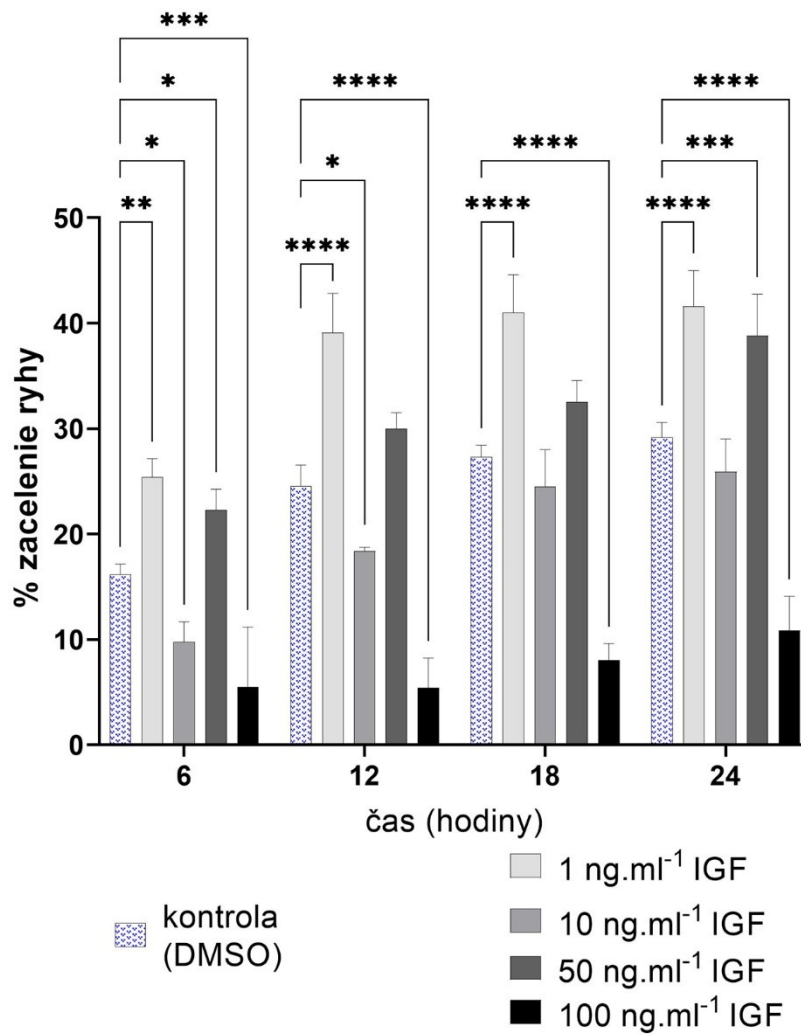
5.4 Vplyv IGF na migráciu buniek HDFa

Druhá časť výsledkov sa týka vplyvu rastových faktorov na bunky adultných ľudských kožných fibroblastov HDFa. Tie boli vystavené pôsobeniu IGF o koncentráciách 1 až 100 ng·ml⁻¹, HD o koncentrácii 20 µmol·l⁻¹ a kombinácii HD a 1 až 100 ng·ml⁻¹ IGF po dobu 24 hodín (obr. 23). Žiadna z týchto látok alebo ich kombinácia nespôsobila štatisticky významný rozdiel v poklese viability buniek oproti kontrole.



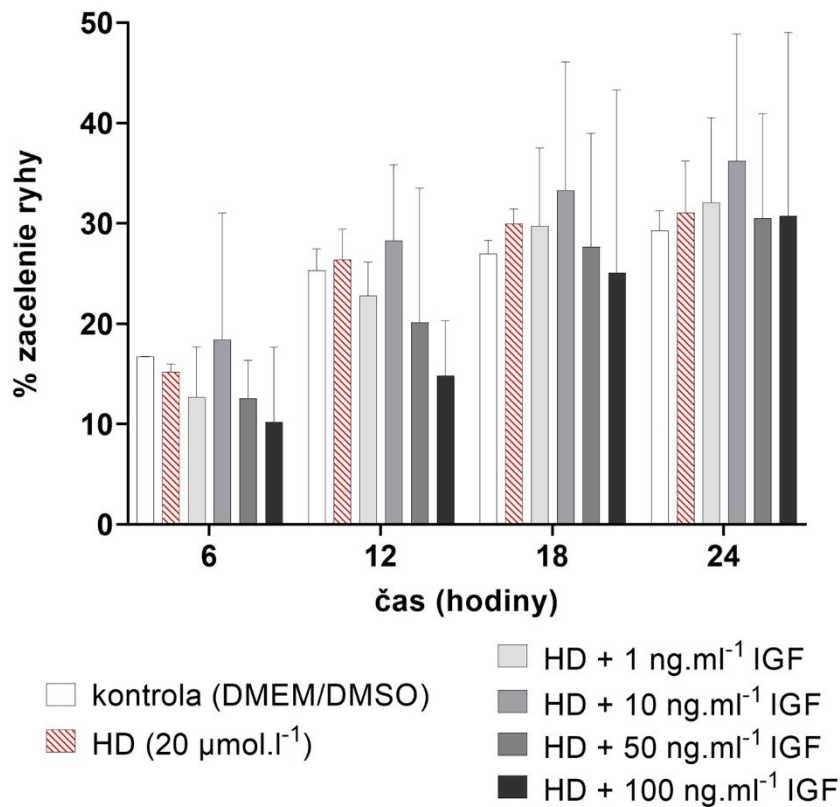
Obr. 23 Viabilita buniek HDFa. Bunky boli ovplyvnené koncentračným radom rastového faktora IGF alebo kombináciou sírneho yperitu (1 hod) a následne koncentračným radom rastového faktora IGF. Viabilita rástla po 24 hodinách od ovplyvnenia rastovým faktorom.

Vplyv IGF na migráciu buniek HDFa nevykazoval koncentračnú závislosť (obr. 24). Po 6 hodinách od ovplyvnenia buniek koncentračným radom IGF došlo u koncentrácie 1 ng·ml⁻¹ IGF ku zvýšeniu hodnoty % zacelenia ryhy o 9,2 % oproti kontrole. Naopak u koncentrácie 10 ng·ml⁻¹ došlo k signifikantnému poklesu o 6,4 % behom 6 hodinového intervalu. Koncentrácia 50 ng·ml⁻¹ spôsobila nárast o 6,1 % a koncentrácia 100 ng·ml⁻¹ zase naopak pokles o 10,6 % v porovnaní s kontrolou. V 12 hodinovom intervale pokračoval trend nárastu % zacelenia ryhy u koncentrácie 1 ng·ml⁻¹ IGF, a to o 14,6 % oproti kontrole. V koncentráciách 10 a 100 ng·ml⁻¹ bol potom zaznamenaný signifikantný pokles o 6,1 % a o 19,1 %. Po 18 hodinách bol zistený signifikantný nárast hodnôt u koncentrácie 1 ng·ml⁻¹ IGF o 13,7 % a u koncentrácie 100 ng·ml⁻¹ IGF došlo naopak k poklesu o 19,3 % oproti kontrole. Po 24 hodinách bolo štatisticky významné navýšenie zaznamenané u koncentráciách 1 a 50 ng·ml⁻¹ IGF, a to o 12,4 % a o 9,6 % v porovnaní s kontrolou. U koncentrácie 100 ng·ml⁻¹ IGF klesla hodnota o 18,3 %.



Obr. 24 Vplyv rastového faktora IGF na migráciu buniek HDFa. Migrácia buniek bola meraná metódou „scratch wound healing assay“. Zacelenie ryhy bolo hodnotené v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek koncentračným radom IGF. Štatisticky významná zmena oproti kontrole je označená * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$).

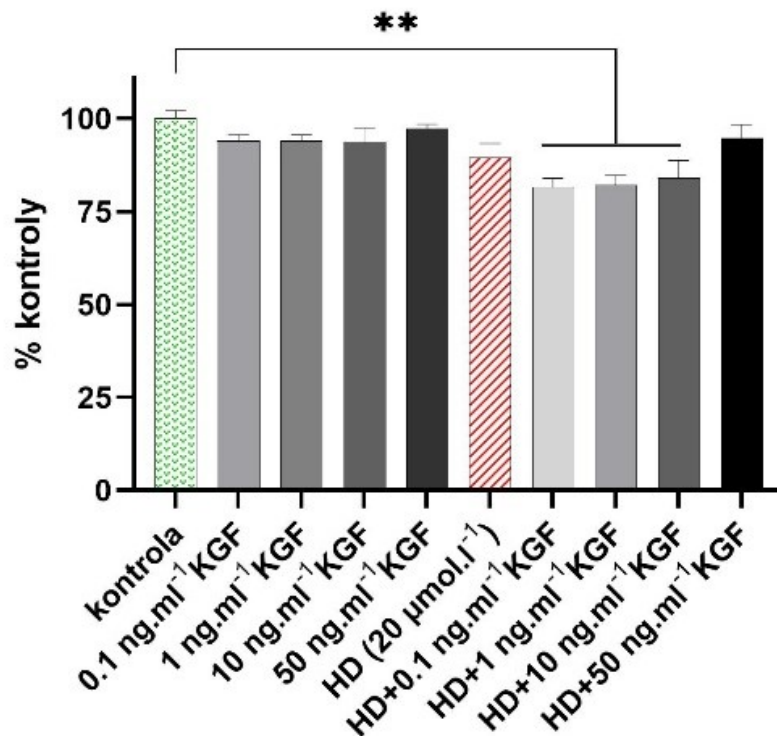
Pri analýze vplyvu IGF na kolektívnu migráciu buniek HDFa ovplyvnených HD neboli zistené žiadne štatisticky významné rozdiely hodnôt v porovnaní s kontrolou, ktorú tvorili bunky ovplyvnené HD (obr. 25).



Obr. 25 Vplyv rastového faktora IGF na migráciu buniek HDFa ovplyvnených sírnym yperitom (HD). Bunky boli ovplyvnené sírnym yperitom po dobu 1 hod. a následne bol pridaný koncentračný rad IGF. Zacelenie ryhy bolo sledované v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín po ovplyvnení koncentračným radom IGF.

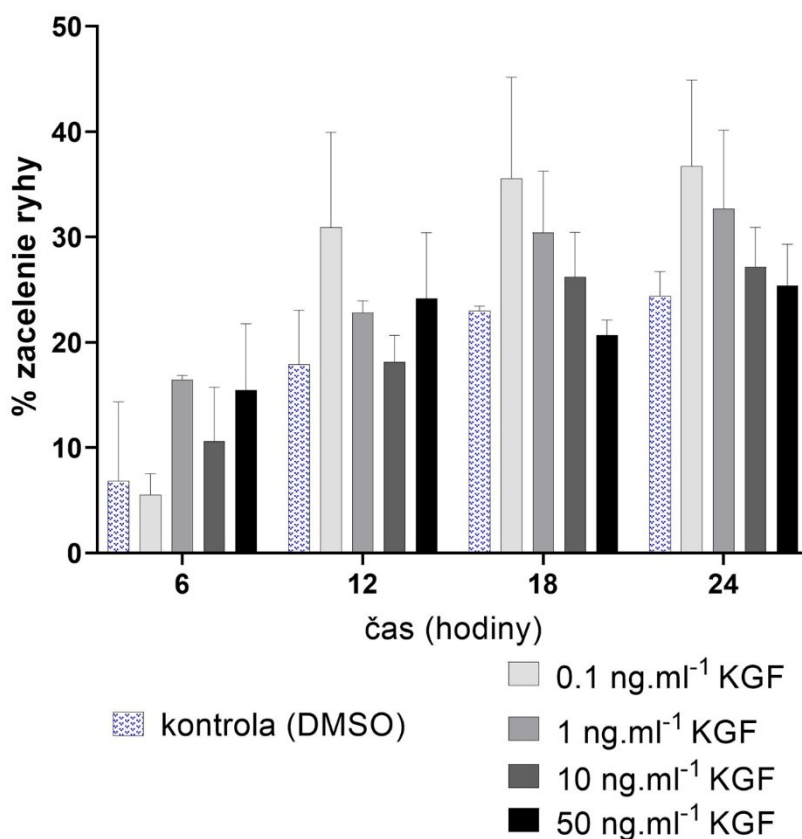
5.5 Vplyv KGF na migráciu buniek HDFa

Vplyv KGF, HD a kombinácie HD a KGF na životaschopnosť buniek HDFa bol hodnotený testom bunkovej viability po 24 hodinovej inkubácii (obr. 26). Samotný koncentračný rad KGF štatisticky významne neovplyvnil viabilitu buniek. Mierny, ale štatisticky významný pokles hodnôt bol zistený u kombinácie HD a KGF u koncentráciách 0,1; 1 a 10 ng·ml⁻¹, a to o 18,4 %, o 17,9 % a o 15,9 % vzhľadom k neovplyvneným bunkám.



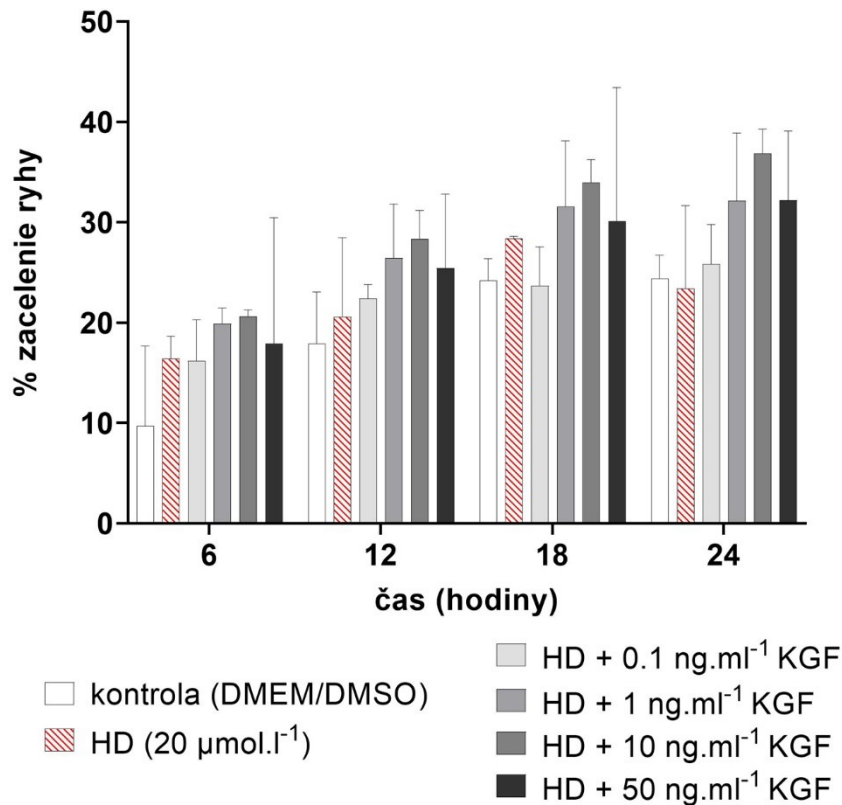
Obr. 26 Viabilita buniek HDFa. Bunky boli ovplyvnené koncentračným radom rastového faktora KGF alebo kombináciou sírneho yperitu (1 hod) a následne koncentračným radom rastového faktora KGF. Viabilita rástla po 24 hodinách od ovplyvnenia rastovým faktorom. Štatisticky významná zmena viability v porovnaní s kontrolou je indikovaná ** ($p < 0,01$).

Vplyv KGF na migráciu buniek HDFa vykazoval v intervale 6 a 12 hodín nekonzistentný nárast alebo pokles hodnôt, ktorý však nebol štatisticky významný (obr. 27). V intervaloch 18 a 24 hodín možno pozorovať koncentračne závislý pokles hodnoty % zacelenia ryhy, ale ani tu nebola preukázaná štatistická signifikancia rozdielných hodnôt v porovnaní s neovplyvnenými bunkami.



Obr. 27 Vplyv rastového faktora na migráciu buniek HDFa. Migrácia buniek bola meraná metódou „scratch wound healing assay“. Zacelenie ryhy bolo hodnotené v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek koncentračným radom KGF.

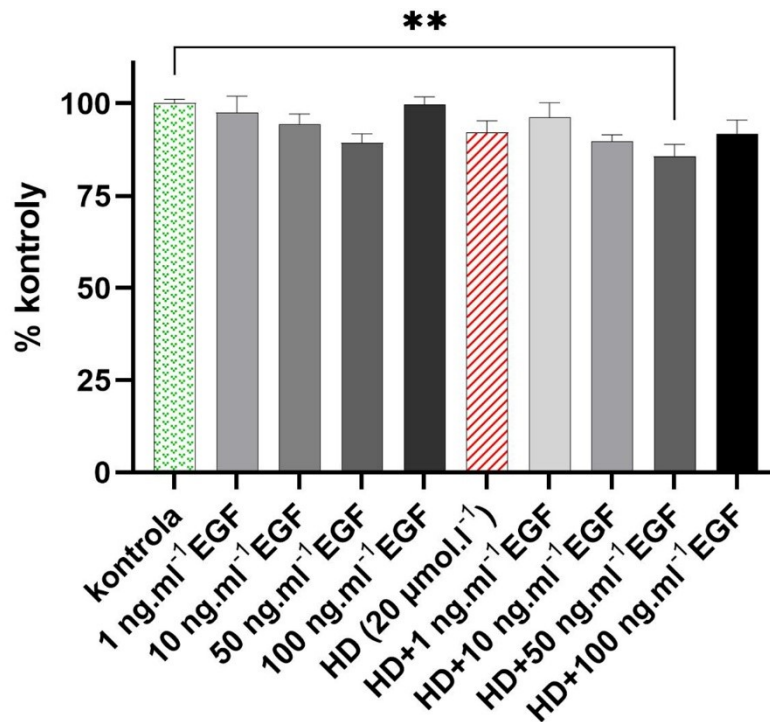
Ani v prípade kombinácie HD a koncentračného radu KGF neboli zistené štatisticky významné rozdiely medzi bunkami ovplyvnenými len HD a bunkami, ku ktorým bol navyše pridaný koncentračný rad KGF (obr. 28).



Obr. 28 Vplyv rastového faktora KGF na migráciu buniek HDFa ovplyvnených sírnym yperitom (HD). Bunky boli ovplyvnené sírnym yperitom po dobu 1 hod. a následne bol pridaný koncentračný rad KGF. Zacelenie ryhy bolo sledované v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín po ovplyvnení koncentračným radom KGF.

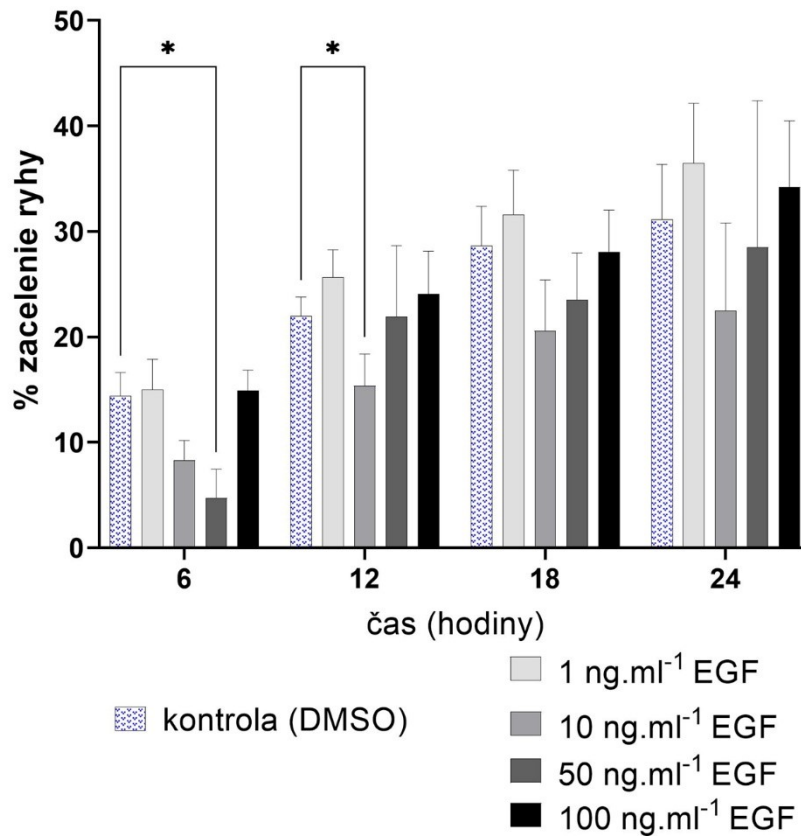
5.6 Vplyv EGF na migráciu buniek HDFa

Rastový faktor EGF v testovaných koncentráciách nespôsobil pokles viability buniek HDFa oproti neovplyvnenej kontrole (obr. 29). Mierny, ale štatisticky významný pokles bol nájdený u kombinácie HD a 50 ng·ml⁻¹ EGF, kde došlo k poklesu viability o 14,5 %.



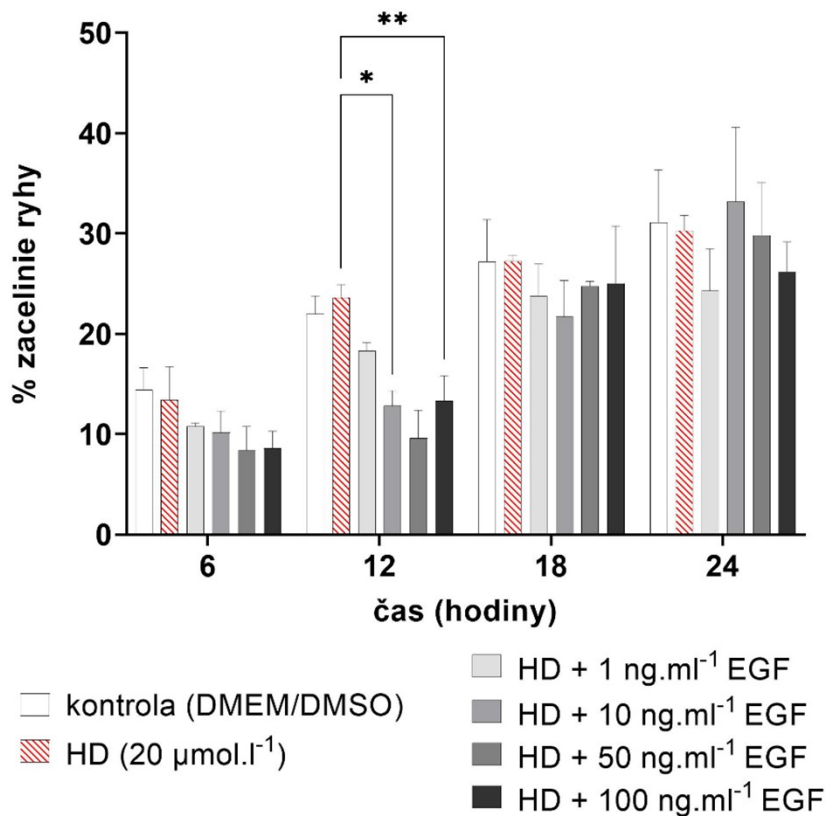
Obr. 29 Viabilita buniek HDFa. Bunky boli ovplyvnené koncentračným radom rastového faktora EGF alebo kombináciou sírneho yperitu (1 hod) a následne koncentračným radom rastového faktora EGF. Viabilita rástla po 24 hodinách od ovplyvnenia rastovým faktorom. Štatisticky významná zmena viability v porovnaní s kontrolou je indikovaná ** ($p < 0,01$).

Samotný faktor EGF nevykazoval signifikantný vplyv na zvýšenie hodnoty % zacelenia ryhy a ani jeho účinok na bunkovú migráciu nevykazoval koncentračnú závislosť (obr. 30). Naopak bolo zistené signifikantné zníženie hodnôt v intervale 6 hodín a koncentrácii $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ EGF o 9,7 % a v intervale 12 hodín a koncentrácii $10 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ o 6,6 % oproti neovplyvnenej kontrole.



Obr. 30 Vplyv rastového faktora na migráciu buniek HDFa. Migrácia buniek bola meraná metódou „scratch wound healing assay“. Zacelenie ryhy bolo hodnotené v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín od ovplyvnenia buniek koncentračným radom EGF. Štatisticky významná zmena oproti kontrole je označená * ($p < 0,05$).

Prítomnosť EGF u buniek ovplyvnených HD neovplyvnila zvýšenie % zacelenia ryhy oproti kontrolným bunkám, ktoré boli ovplyvnené len HD. V intervale 12 hodín došlo u koncentrácie 10 a 100 ng·ml⁻¹ EGF ku štatisticky významnému poklesu hodnôt o 10,8 % a o 10,3 % oproti kontrole. Ostatné zmeny boli nesignifikantné (obr. 31).



Obr. 31 Vplyv rastového faktora EGF na migráciu buniek HDFa ovplyvnených sírnym yperitom (HD). Bunky boli ovplyvnené sírnym yperitom po dobu 1 hod. a následne bol pridaný koncentračný rad EGF. Zacelenie ryhy bolo sledované v časových intervaloch 6, 12, 18 a 24 hodín po ovplyvnení koncentračným radom EGF. Štatisticky významná zmena viability v porovnaní s kontrolou je indikovaná * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$).

6 DISKUSIA

Zasiahnutie kože sírnym yperitom vedie k rozvoju závažných patologických stavov spojených so vznikom typických veľkých pľuzgierov. Takéto kožné lézie sa zdĺhavo a obťažne hoja, a to z niekoľkých príčin. Pľuzgier, ktorý vzniká rozrušením spojenia *dermis* a *epidermis* narušuje fyziologickú bariéru, ktorá je tvorená *epidermis*. Po prasknutí pľuzgiera hrozí riziko mikrobiálnej kontaminácie obnaženej *dermis*, prostredníctvom ktorej môže ľahko dôjsť k prieniku patogénov do organizmu a k systémovej sepe (Tianyi 2014; White et al. 2016). Ďalším faktorom je aj samotný cytotoxický a cytostatický účinok HD. Ten má za následok nekrózu a zánik buniek v centrálnej časti lézie, inhibíciu proliferácie okolitých buniek a jej schopnosť regenerácie a migrácie. Všetky tieto deje neúmerne predlžujú hojenie a zacelenie rany. Ďalšou komplikáciou môže byť aj poranenie kombinované s mechanickým porušením celistvosti kože (Poursaleh et al. 2012).

Cieľom tejto práce bolo zhodnotiť vplyv rastových faktorov IGF, KGF a EGF na migráciu buniek HaCaT a HDFa, ktoré boli vystavené HD. Tieto dva typy buniek boli zvolené ako *in vitro* model kožných buniek. Bunky keratinocytov tvoria základ *epidermis*. Bunky fibroblastov sú nevyhnutné v procese hojenia, tvorby nového spojivového tkaniva a sú základnou štruktúrou v *dermis*.

Bunky HaCaT sú immortalizované ľudské keratinocyty, prvýkrát izolované autormi Boukamp a kol. (Boukamp et al. 1988). Tieto bunky sú často využívané v *in vitro* štúdiách pre svoj nenádorový pôvod a veľmi blízku podobnosť s normálnymi keratinocytami. Rovnako majú schopnosť diferenciácie v zrelé keratinocyty exprimujúce keratín 10 a 14 a involucrin (Seo et al. 2012). Taktiež odpadá riziko interindividuálnych rozdielov medzi darcami, ktoré sú komplikujúcim faktorom pri použití primárnych ľudských keratinocytov (Schoop et al. 1999).

Bunky adultných kožných fibroblastov HDFa sú primárne bunky získané od dospelých darcov biopsiou. Pre svoju nenáročnú kultiváciu *in vitro* sú často používaným experimentálnym modelom pre štúdium fyziologických procesov v koži. Poprípade, pokiaľ sú izolované z patologických oblastí kože, tak ich je možné využiť ako model pre rôzne ochorenia, ako napríklad fibróza (Mesdom et al. 2020; Plikus et al. 2021).

Tieto dva typy buniek sme v našej práci použili pre sledovanie procesu bunkovej migrácie. Kvantifikácia tohto procesu metódou „scratch wound healing assay“ ponúka

možnosť sledovania vplyvu rôznych látok na pohyb buniek behom procesu zaceľovania mechanicky vytvorenej ryhy v bunkovej monovrstve. Sledovanie tohto procesu v čase rovnako prináša informácie o dynamike migrácie buniek (Grada et al. 2017). Aby výsledky našich experimentov neboli skreslené vplyvom ostatných rastových faktorov prirodzene sa vyskytujúcich v suplementoch kultivačného média, boli všetky merania vykonané bez prítomnosti FBS v kultivačnom médiu. Tento postup zároveň obmedzuje proliferáciu buniek a možno tak sledovať len ich migráciu (Jonkman et al. 2014).

Pre štúdium vplyvu rastových faktorov na migráciu buniek sme zvolili faktory IGF, KGF a EGF. Všetky tieto faktory sa vyznačujú mitogénnym účinkom a aktívne sa zúčastňujú procesu hojenia rany (Benito et al. 1996; Borlak et al. 2015; Rubin 1995). Bunková migrácia bola sledovaná u buniek ovplyvnených sírnym yperitom. Cieľom bolo vytvoriť modelovú situáciu, kedy došlo k mechanickému narušeniu buniek a zároveň k jej chemickému poškodeniu.

Bunky HaCaT ovplyvnené HD boli inhibované v raste približne o 60 % oproti kontrole. Na druhú stranu použitá koncentrácia HD nemala žiaden obmedzujúci vplyv na bunky HDFa. To môže vysvetľovať cytostatický účinok sírneho yperitu, ktorý sa odráža aj v teste viability. Oba typy buniek sú tiež rôzne senzitívne k HD. Rýchlo proliferujúce bunky HaCaT sú viac obmedzené v raste než pomalšie proliferujúce bunky fibroblastov HDFa. Súvislosť je možné nájsť aj v rýchlosti bunkového cyklu. Udávaná doba potrebná k rozdeleniu jednej bunky na dve dcérske je u buniek HaCaT približne 28 hodín (Pavez Lorie et al. 2020) a u buniek HDFa asi 47 hodín (Moulin et al. 2011). Koncentrácia $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HD bola zvolená na základe optimálnych hodnôt inhibície migrácie buniek HaCaT. V nami sledovanom intervale 24 hodín nemal žiaden z hodnotených rastových faktorov signifikantný cytoprotektívny efekt.

IGF-I urýchľuje hojenie rany stimuláciou syntézy kolagénu produkovaného fibroblastami, navyše má mitogénny účinok na fibroblasty aj keratinocyty. Podieľa sa však aj na fibrotických stavoch akými sú keloidy, hypertrofické jazvy, Crohnova choroba, fibrotické ochorenie pľúc a glomerulárne ochorenia (Krein et al. 2003; Phan et al. 2003; Rolfe et al. 2007). Naše výsledky potvrdzujú pozitívny vplyv samotného IGF na migráciu buniek HaCaT, kde bol naznačený koncentračne závislý nárast hodnôt, aj keď bez štatisticky významných rozdielov oproti kontrole. U buniek HDFa mala každá z testovaných koncentrácií IGF iný vplyv na ich migráciu. Koncentrácie 1 a $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ IGF spôsobili zrýchlenie zacelenia ryhy. Oproti tomu koncentrácie 10 a $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ viedli

k inhibícii migrácie. Za podmienok, kedy boli bunky ovplyvnené HD bolo pozorované zastavenie, poprípade zníženie bunkovej migrácie.

KGF najlepšie stimuloval bunky HDFa k intenzívnej migrácii a zaceleniu ryhy v najnižšej testovanej koncentrácii $0,1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. S postupne sa zvyšujúcou koncentráciou KGF dochádzalo k útlmu migrácie, a to najmä v čase 18 a 24 hodín. Na druhú stranu za podmienok ovplyvnením HD bola skôr účinnejšia koncentrácia $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, aj keď sa vďaka veľkým rozptylom hodnôt tento výsledok nepotvrdil ako štatisticky významný. U buniek HaCaT naopak koncentrácia $0,1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ KGF pôsobila (nesignifikantné) spomalenie bunkovej migrácie vo všetkých sledovaných časových intervaloch. U buniek HaCaT ovplyvnených HD bol zaznamenaný (nesignifikantný) nárast v čase 24 hodín u koncentrácie 10 a $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ KGF. Výsledky z iných štúdií tiež kladne hodnotia účinky KGF. Produkcia KGF bunkami v blízkosti vytvorenej rany zlepšuje epidermálnu obnovu. Pridaním KGF do kultivačného média sa zvýšila proliferácia keratinocytov. Preto sa uvažuje o kombinácii keratinocytov s bunkami schopnými stimulovať keratinocyty, ako napríklad imortalizované bunkové línie keratinocytov a fibroblastov, ktoré produkujú KGF. Využitie tejto kombinácie by bol v systéme podávania liečiv (Kopp et al. 2004).

EGF v interakcii s bunkami HaCaT inhiboval migráciu buniek v koncentračnom rozmedzí 10 až $50 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. K obdobnému, aj keď miernejšiemu inhibičnému efektu došlo aj u buniek HDFa. Pri testovaní EGF na bunkách ovplyvnených HD neboli zistené žiadne pozitívne účinky, ktoré by prispeli k rýchlejšiemu uzatvoreniu ryhy.

Z našich výsledkov vyplýva, že HD zásadným spôsobom zasahuje do migrácie oboch typov buniek a podmienky pre hojenie lézie sú značne obťažné. Bunke sa musí najskôr vysporiadať s energeticky náročným procesom opravy alkylovanej DNA, čo môže potom negatívne ovplyvniť ďalšie energetické požiadavky nutné pre vyvinutie migračného pohybu bunky do voľného priestoru. Naše experimentálne usporiadanie plne nereflektuje hojenie rany v prirodzených podmienkach organizmu, ktorý má celý rad možností ako proces hojenia podporiť. Napríklad spoločnou interakciou keratinocytov, endoteliálnych buniek a fibroblastov behom hojenia (Henemyre-Harris et al. 2008).

7 ZÁVER

Kožné lézie spôsobené sírnym yperitom sú komplikovaným poranením, kde je do istej miery vďaka cytotoxickým a cytostatickým účinkom sírneho yperitu bránené fyziologickému procesu hojenia. Práca si kládla za cieľ zhodnotiť vplyv rastových faktorov IGF, KGF a EGF na proces bunkovej migrácie, ktorý je súčasťou hojenia rany. Naše výsledky ukazujú, že toxické účinky sírneho yperitu natoľko inhibujú migráciu buniek, že sa pozitívny vplyv testovaných rastových faktorov behom 24 hodinového intervalu prejavil len veľmi mierne, čo viedlo k štatisticky nesignifikantným výsledkom. V niektorých prípadoch došlo aj k inhibícii bunkovej migrácie.

8 ZOZNAM SKRATIEK

ADP – adenzindifosfát (*adenosine diphosphate*)

ATP – adenzintrifosfát (*adenosine triphosphate*)

bFGF – základný fibroblastový rastový faktor (*basic fibroblast growth factor*)

Cdk - cyklín-dependentná kináza (*cyclin-dependent kinase*)

Chk - checkpoint kinázu (*checkpoint kinase*)

CX – fosgenoxim (*phosgene oxime*)

DIC – diferenciálny interferenčný kontrast (*differential interference contrast*)

DMSO – dimethylsulfoxid (*dimethyl sulfoxide*)

DNA – deoxyribonukleová kyselina (*deoxyribonucleic acid*)

ECM – extracelulárna matrix (*extracellular matrix*)

EGF – epidermálny rastový faktor (*epidermal growth factor*)

EG-VEGF – vaskulárny endoteliálny rastový faktor odvodený od endokrinných žliaz (*endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor*)

FBS – fetálne bovinné sérum (*fetal bovine serum*)

FGF – fibroblastový rastový faktor (*fibroblast growth factor*)

FGFR – receptor fibroblastového rastového faktora (*fibroblast growth factor receptor*)

HaCaT – bunková línia ľudských keratinocytov (*human epidermal keratinocyte line*)

HD – sírny yperit (*sulfur mustard*)

HDFa – bunková línia ľudských fibroblastov (*human dermal fibroblasts*)

HN – dusíkatý yperit (*nitrogen mustard*)

IGF – inzulínový rastový faktor (*insulin like growth factor*)

IGFBPs – proteíny viažuce rastový faktor podobný inzulínu (*insulin-like growth factor-binding protein*)

IL - interleukín (*interleukin*)

INF- γ – interferón gama (*interferon gamma*)

KGF – keratinový rastový faktor (*keratinocyte growth factor*)

L – lewisit (*lewisite*)

LTGF- β – latentný transformujúci rastový faktor beta (*latent transforming growth factor beta*)

MSH – melanocyty stimulujúci hormón (*melanocyte stimulating hormone*)

NAC - N-acetylcysteín (*N-acetylcysteine*)

NAD⁺ - nikotínamidadenín dinukleotid (*nicotinamide adenine dinucleotide*)

PARP-1 - poly-(ADP- ribóza)polymeráza-1 (*poly (ADP-ribose) polymerase 1*)

PBS – fosfátom pufovaný fyziologický roztok (*phosphate-buffered saline*)

PDGF – rastový faktor odvodený od krvných doštičiek (*platelet-derived growth factor*)

PIGF – placentárny rastový faktor (*placental growth factor*)

RNA – ribonukleová kyselina (*ribonucleic acid*)

ROS – reaktívne formy kyslíka (*reactive oxygen species*)

RWD – relatívna hustota buniek v zacelenej oblasti (*relative wound density*)

SDS – dodecylsírany sodný (*sodium dodecyl sulfate*)

TGF- α – transformujúci rastový faktor alfa (*transforming growth factor alpha*)

TGF- β – transformujúci rastový faktor beta (*transforming growth factor beta*)

TNF- α – tumor nekrotizujúci faktor alfa (*tumor necrosis factor alpha*)

VEGF – vaskulárny endoteliálny rastový faktor (*vascular endothelial growth factor*)

9 POUŽITÁ LITERATÚRA

- ADAMEK, Agnieszka a Aldona KASPRZAK, 2018. Insulin-Like Growth Factor (IGF) System in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. **19**(5), 1308. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19051308
- ANDRAE, Johanna, Radiosa GALLINI a Christer BETSHOLTZ, 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes & Development* [online]. **22**(10), 1276–1312. ISSN 0890-9369, 1549-5477. Dostupné z: doi:10.1101/gad.1653708
- ARDA, Oktay, Nadir GÖKSÜGÜR a Yalçın TÜZÜN, 2014. Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology* [online]. **32**(1), 3–13. ISSN 0738081X. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinidermatol.2013.05.021
- ASHBY, William J. a Andries ZIJLSTRA, 2012. Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration. *Integrative Biology* [online]. **4**(11), 1338. ISSN 1757-9694, 1757-9708. Dostupné z: doi:10.1039/c2ib20154b
- AUF DEM KELLER, Ulrich, Monika KRAMPERT, Angelika KÜMIN, Susanne BRAUN a Sabine WERNER, 2004. Keratinocyte growth factor: effects on keratinocytes and mechanisms of action. *European Journal of Cell Biology* [online]. **83**(11–12), 607–612. ISSN 01719335. Dostupné z: doi:10.1078/0171-9335-00389
- BALALI-MOOD, Mahdi, Reza AFSHARI, Ramin ZOJAJI, Hadi KAHROM, Maedeh KAMRANI, Davood ATTARAN, Seyed Reza MOUSAVI a Gholam Ali ZARE, 2011. Delayed toxic effects of sulfur mustard on respiratory tract of Iranian veterans. *Human & Experimental Toxicology* [online]. **30**(9), 1141–1149. ISSN 0960-3271, 1477-0903. Dostupné z: doi:10.1177/0960327110389501
- BALALI-MOOD, Mahdi a Mehrdad HEFAZI, 2005. The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning. *Fundamental and Clinical Pharmacology* [online]. **19**(3), 297–315. ISSN 0767-3981, 1472-8206. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-8206.2005.00325.x
- BALALI-MOOD, Mahdi a Mehrdad HEFAZI, 2006. Comparison of Early and Late Toxic Effects of Sulfur Mustard in Iranian Veterans. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. **99**(4), 273–282. ISSN 1742-7843. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-7843.2006.pto_429.x
- BANIN, S., L. MOYAL, S.-Y. SHIEH, Y. TAYA, C. W. ANDERSON, L. CHESSA, N. I. SMORODINSKY, C. PRIVES, Y. REISS, Y. SHILOH a Y. ZIV, 1998. Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage. *Science* [online]. **281**(5383), 1674–1677. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.281.5383.1674
- BAO, Philip, Arber KODRA, Marjana TOMIC-CANIC, Michael S. GOLINKO, H. Paul EHRLICH a Harold BREM, 2009. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *Journal of Surgical Research* [online]. **153**(2), 347–358. ISSN 00224804. Dostupné z: doi:10.1016/j.jss.2008.04.023
- BARRIENTOS, Stephan, Olivera STOJADINOVIC, Michael S. GOLINKO, Harold BREM a Marjana TOMIC-CANIC, 2008. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors

and cytokines in wound healing: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **16**(5), 585–601. ISSN 10671927. Dostupné z: doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x

BÁRTOLO, Inês, Rui L. REIS, Alexandra P. MARQUES a Mariana T. CERQUEIRA, 2022. Keratinocyte Growth Factor-Based Strategies for Wound Re-Epithelialization. *Tissue Engineering Part B: Reviews* [online]. **28**(3), 665–676. ISSN 1937-3368. Dostupné z: doi:10.1089/ten.teb.2021.0030

BENITO, M., A. M. VALVERDE a M. LORENZO, 1996. IGF-I: a mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. **28**(5), 499–510. ISSN 1357-2725. Dostupné z: doi:10.1016/1357-2725(95)00168-9

BERNATCHEZ, Pascal N., Shay SOKER a Martin G. SIROIS, 1999. Vascular Endothelial Growth Factor Effect on Endothelial Cell Proliferation, Migration, and Platelet-activating Factor Synthesis Is Flk-1-dependent*. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **274**(43), 31047–31054. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.43.31047

BINDSCHADLER, Michael a James L. MCGRATH, 2007. Sheet migration by wounded monolayers as an emergent property of single-cell dynamics. *Journal of Cell Science* [online]. **120**(5), 876–884. ISSN 1477-9137, 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.03395

BONMARIN, M. a F.A. LE GAL, 2016. Thermal Imaging in Dermatology. In: *Imaging in Dermatology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 437–454 [vid. 2023-04-06]. ISBN 978-0-12-802838-4. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802838-4.00031-5

BORLAK, Jürgen, Prashant SINGH a Giuseppe GAZZANA, 2015. Proteome mapping of epidermal growth factor induced hepatocellular carcinomas identifies novel cell metabolism targets and mitogen activated protein kinase signalling events. *BMC genomics* [online]. **16**(1), 124. ISSN 1471-2164. Dostupné z: doi:10.1186/s12864-015-1312-z

BOUKAMP, P., R. T. PETRUSSEVSKA, D. BREITKREUTZ, J. HORNUNG, A. MARKHAM a N. E. FUSENIG, 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology* [online]. **106**(3), 761–771. ISSN 0021-9525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.106.3.761

CLARKE, Catriona A.L., Lara N. BENNETT a Paul R. CLARKE, 2005. Cleavage of Claspin by Caspase-7 during Apoptosis Inhibits the Chk1 Pathway. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **280**(42), 35337–35345. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M506460200

CLEMMONS, David R., 1998. Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Molecular and Cellular Endocrinology* [online]. **140**(1), 19–24. ISSN 0303-7207. Dostupné z: doi:10.1016/S0303-7207(98)00024-0

DARCHINI-MARAGHEH, Emadodin a Mahdi BALALI-MOOD, 2018. Delayed Complications and Long-term Management of Sulfur Mustard Poisoning: Recent

Advances by Iranian Researchers (Part I of II). *Iranian Journal of Medical Sciences*. **43**(2), 103–124. ISSN 0253-0716.

DAVOUDI, Seyyed Masoud, Saeed KESHAVARZ, Bardia SADR, Majid SHOHRATI, Mohammad Mehdi NAGHIZADEH, Khalil FARSINEJAD, Mehdi RASHIGHI-FIROUZABADI, Hamed ZARTAB a Alireza FIROOZ, 2009. Skin hydration and transepidermal water loss in patients with a history of sulfur mustard contact: a case-control study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [online]. **23**(8), 940–944. ISSN 09269959, 14683083. Dostupné z: doi:10.1111/j.1468-3083.2009.03235.x

DI VITA, Gaetano, Rosalia PATTI, Pietro D'AGOSTINO, Giuseppe CARUSO, Matteo ARCARA, Salvatore BUSCEMI, Sebastiano BONVENTRE, Viviana FERLAZZO, Francesco ARCOLEO a Enrico CILLARI, 2006. Cytokines and growth factors in wound drainage fluid from patients undergoing incisional hernia repair: Cytokines and growth factors in wound fluid. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **14**(3), 259–264. ISSN 10671927. Dostupné z: doi:10.1111/j.1743-6109.2006.00120.x

DOYLE, Andrew D., Nicole CARVAJAL, Albert JIN, Kazue MATSUMOTO a Kenneth M. YAMADA, 2015. Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nature Communications* [online]. **6**(1), 8720. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms9720

DOYLE, Andrew D., Daniel J. SYKORA, Gustavo G. PACHECO, Matthew L. KUTYS a Kenneth M. YAMADA, 2021. 3D mesenchymal cell migration is driven by anterior cellular contraction that generates an extracellular matrix prestrain. *Developmental Cell* [online]. **56**(6), 826-841.e4. ISSN 15345807. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2021.02.017

EMADI, Seyed Naser, Alireza HOSSEINI-KHALILI, Mohammad Reza SOROUSH, Seyed Masoud DAVOODI a Seyed Samad AGHAMIRI, 2008a. Mustard gas scarring with specific pigmentary, trophic and vascular characteristics (case report, 16-year post-exposure). *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. **69**(3), 574–576. ISSN 01476513. Dostupné z: doi:10.1016/j.ecoenv.2007.01.003

EMADI, Seyed Naser, Mohammadreza MORTAZAVI a Hossein MORTAZAVI, 2008b. Late Cutaneous Manifestations 14 to 20 Years After Wartime Exposure to Sulfur Mustard Gas: A Long-term Investigation. *Archives of Dermatology* [online]. **144**(8) [vid. 2023-03-16]. ISSN 0003-987X. Dostupné z: doi:10.1001/archderm.144.8.1059

ENDERS, Greg H., 2008. Expanded Roles for Chk1 in Genome Maintenance. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. **283**(26), 17749–17752. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R800021200

ETEZAD-RAZAVI, Mohammad, Mahmoud MAHMOUDI, Mehrdad HEFAZI a Mahdi BALALI-MOOD, 2006. Delayed ocular complications of mustard gas poisoning and the relationship with respiratory and cutaneous complications. *Clinical and Experimental Ophthalmology* [online]. **34**(4), 342–346. ISSN 1442-6404, 1442-9071. Dostupné z: doi:10.1111/j.1442-9071.2006.01220.x

FIROOZ, Alireza, Bardia SADR, Seyed M. DAVOUDI, Mansour NASSIRI-KASHANI, Yunes PANAHİ a Yahya DOWLATI, 2011. Long-term skin damage due to chemical weapon exposure. *Cutaneous and Ocular Toxicology* [online]. **30**(1), 64–68. ISSN 1556-9527, 1556-9535. Dostupné z: doi:10.3109/15569527.2010.529547

FORE, Jane, 2006. A Review of Skin and the Effects of Aging on Skin Structure and Function. *Wound Management & Prevention* [online]. **52**(9) [vid. 2023-02-11]. Dostupné z: <https://www.hmpgloballearningnetwork.com/site/wmp/content/a-review-skin-and-effects-aging-skin-structure-and-function>

FREEDBERG, Irwin M., Marjana TOMIC-CANIC, Mayumi KOMINE a Miroslav BLUMENBERG, 2001. Keratins and the Keratinocyte Activation Cycle. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **116**(5), 633–640. ISSN 0022-202X, 1523-1747. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1747.2001.01327.x

FRIEDL, Peter a Darren GILMOUR, 2009. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **10**(7), 445–457. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm2720

GANTWERKER, Eric A. a David B. HOM, 2011. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* [online]. **19**(3), 441–453. ISSN 1558-1926. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsc.2011.06.009

GHABILI, Kamyar, Paul S. AGUTTER, Mostafa GHANEI, Khalil ANSARIN a Mohammadali M. SHOJA, 2010. Mustard gas toxicity: the acute and chronic pathological effects. *Journal of Applied Toxicology* [online]. **30**(7), 627–643. ISSN 0260437X. Dostupné z: doi:10.1002/jat.1581

GHANEI, Mostafa, Zohreh POURSALEH, Ali Amini HARANDI, Seyed Emad EMADI a Seyed Naser EMADI, 2010. Acute and chronic effects of sulfur mustard on the skin: a comprehensive review. *Cutaneous and Ocular Toxicology* [online]. **29**(4), 269–277. ISSN 1556-9527, 1556-9535. Dostupné z: doi:10.3109/15569527.2010.511367

GOSWAMI, Dinesh G., Neha MISHRA, Rama KANT, Chapla AGARWAL, Claire R. CROUTCH, Robert W. ENZENUER, Mark J. PETRASH, Neera TEWARI-SINGH a Rajesh AGARWAL, 2021. Pathophysiology and inflammatory biomarkers of sulfur mustard-induced corneal injury in rabbits. *PLoS ONE* [online]. **16**(10), e0258503. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0258503

GRADA, Ayman, Marta OTERO-VINAS, Francisco PRIETO-CASTRILLO, Zaidal OBAGI a Vincent FALANGA, 2017. Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **137**(2), e11–e16. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jid.2016.11.020

GRAHAM, John S, Kevin T SCHOMACKER, Robert D GLATTER, Crystal M BRISCOE, Ernest H BRAUE a Katherine S SQUIBB, 2002. Efficacy of laser debridement with autologous split-thickness skin grafting in promoting improved healing of deep cutaneous sulfur mustard burns. *Burns* [online]. **28**(8), 719–730. ISSN 03054179. Dostupné z: doi:10.1016/S0305-4179(02)00198-5

GREENHALGH, D. G., 1996. The role of growth factors in wound healing. *The Journal of Trauma* [online]. **41**(1), 159–167. ISSN 0022-5282. Dostupné z: doi:10.1097/00005373-199607000-00029

HALMOS Tamás a SUBA Ilona, 2019. A növekedési hormon és az inzulinszerű növekedési faktorok élettani szerepe. *Orvosi Hetilap* [online]. **160**(45), 1774–1783. ISSN 0030-6002, 1788-6120. Dostupné z: doi:10.1556/650.2019.31507

HANTASH, Basil, M., 2008. Adult and fetal wound healing. *Frontiers in Bioscience* [online]. **13**(13), 51. ISSN 10939946, 10934715. Dostupné z: doi:10.2741/2559

HEFAZI, Mehrdad, Masoud MALEKI, Mahmoud MAHMOUDI, Abbas TABATABAEE a Mahdi BALALI-MOOD, 2006. Delayed complications of sulfur mustard poisoning in the skin and the immune system of Iranian veterans 16–20 years after exposure. *International Journal of Dermatology* [online]. **45**(9), 1025–1031. ISSN 0011-9059, 1365-4632. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-4632.2006.03020.x

HENEMYRE-HARRIS, Claudia L., Angela L. ADKINS, Augustine H. CHUANG a John S. GRAHAM, 2008. Addition of epidermal growth factor improves the rate of sulfur mustard wound healing in an in vitro model. *Eplasty*. **8**, e16. ISSN 1937-5719.

HULKOWER, Keren I. a Renee L. HERBER, 2011. Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery. *Pharmaceutics* [online]. **3**(1), 107–124. ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics3010107

HUTSON, M. Shane, Yoichiro TOKUTAKE, Ming-Shien CHANG, James W. BLOOR, Stephanos VENAKIDES, Daniel P. KIEHART a Glenn S. EDWARDS, 2003. Forces for Morphogenesis Investigated with Laser Microsurgery and Quantitative Modeling. *Science* [online]. **300**(5616), 145–149. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.1079552

CHAMBERS, Emma S. a Milica VUKMANOVIC-STEJIC, 2020. Skin barrier immunity and ageing. *Immunology* [online]. **160**(2), 116–125. ISSN 0019-2805, 1365-2567. Dostupné z: doi:10.1111/imm.13152

CHARRAS, Guillaume a Erik SAHAI, 2014. Physical influences of the extracellular environment on cell migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. **15**(12), 813–824. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm3897

CHEN, Linlin, Huidan DENG, Hengmin CUI, Jing FANG, Zhicai ZUO, Junliang DENG, Yinglun LI, Xun WANG a Ling ZHAO, 2017. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* [online]. **9**(6), 7204–7218. ISSN 1949-2553. Dostupné z: doi:10.18632/oncotarget.23208

CHIARUGI, Paola a Elisa GIANNONI, 2008. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochemical Pharmacology* [online]. **76**(11), 1352–1364. ISSN 00062952. Dostupné z: doi:10.1016/j.bcp.2008.07.023

ISMAIL, Ismail Hassan, Susanne NYSTRÖM, Jonas NYGREN a Ola HAMMARSTEN, 2005. Activation of Ataxia Telangiectasia Mutated by DNA Strand Break-inducing Agents Correlates Closely with the Number of DNA Double Strand Breaks. *Journal of*

Biological Chemistry [online]. **280**(6), 4649–4655. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M411588200

JAN, Yi-Hua, Diane E. HECK, Debra L. LASKIN a Jeffrey D. LASKIN, 2020. DNA damage signaling in the cellular responses to mustard vesicants. *Toxicology Letters* [online]. **326**, 78–82. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2020.03.008

JIANG, Austin a Howard MAIBACH, 2018. Dermatotoxicology of sulfur mustard: Historical perspectives from World War I. *Journal of Applied Toxicology* [online]. **38**(1), 108–112. ISSN 0260-437X, 1099-1263. Dostupné z: doi:10.1002/jat.3524

JONKMAN, James E. N., Judith A. CATHCART, Feng XU, Miria E. BARTOLINI, Jennifer E. AMON, Katarzyna M. STEVENS a Pina COLARUSSO, 2014. An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion & Migration* [online]. **8**(5), 440–451. ISSN 1933-6918. Dostupné z: doi:10.4161/cam.36224

JOŠT, Petr, Ľubica MÚČKOVÁ, Rudolf ŠTĚTINA a Jaroslav PEJCHAL, 2018. SULFUR MUSTARD: PERSISTING THREAT. *Military Medical Science Letters* [online]. **87**(3), 106–118. ISSN 03727025, 03727025. Dostupné z: doi:10.31482/mmsl.2018.021

KANE, Cynthia J. M., Patricia A. HEBDA, Jonathan N. MANSBRIDGE a Philip C. HANAWALT, 1991. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor β 1 expression during cutaneous wound healing. *Journal of Cellular Physiology* [online]. **148**(1), 157–173. ISSN 0021-9541, 1097-4652. Dostupné z: doi:10.1002/jcp.1041480119

KARDAS, Grzegorz, Agnieszka DASZYŃSKA-KARDAS, Mateusz MARYNOWSKI, Oliwia BRZAŃKALSKA, Piotr KUNA a Michał PANEK, 2020. Role of Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) in Asthma as an Immunoregulatory Factor Mediating Airway Remodeling and Possible Pharmacological Target. *Frontiers in Pharmacology* [online]. **11**, 47. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2020.00047

KEHE, K., F. BALSZUWEIT, D. STEINRITZ a H. THIERMANN, 2009. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. *Toxicology* [online]. **263**(1), 12–19. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2009.01.019

KEHE, Kai a Ladislaus SZINICZ, 2005. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology* [online]. **214**(3), 198–209. ISSN 0300483X. Dostupné z: doi:10.1016/j.tox.2005.06.014

KHAN, Fazlullah, Kamal NIAZ, Fatima ISMAIL HASSAN a Mohammad ABDOLLAHI, 2017. An evidence-based review of the genotoxic and reproductive effects of sulfur mustard. *Archives of Toxicology* [online]. **91**(3), 1143–1156. ISSN 1432-0738. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-016-1911-8

KHAVKIN, Jeannie a David A.F. ELLIS, 2011. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America* [online]. **19**(2), 229–234. ISSN 10647406. Dostupné z: doi:10.1016/j.fsc.2011.04.003

- KOH, Timothy J. a Luisa Ann DIPIETRO, 2011. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Reviews in Molecular Medicine* [online]. **13**, e23. ISSN 1462-3994. Dostupné z: doi:10.1017/S1462399411001943
- KOPP, Jürgen, Guang Y. WANG, Peter KULMBURG, Stefan SCHULTZE-MOSGAU, Jing N. HUAN, Kang YING, Harun SEYHAN, Mark D. JESCHKE, Ulrich KNESER, Alexander D. BACH, Sheng D. GE, Steven DOOLEY a Raymund E. HORCH, 2004. Accelerated Wound Healing by In vivo Application of Keratinocytes Overexpressing KGF. *Molecular Therapy* [online]. **10**(1), 86–96. ISSN 15250016. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymthe.2004.04.016
- KRAMER, Nina, Angelika WALZL, Christine UNGER, Margit ROSNER, Georg KRUPITZA, Markus HENGSTSCHLÄGER a Helmut DOLZNIG, 2013. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* [online]. **752**(1), 10–24. ISSN 13835742. Dostupné z: doi:10.1016/j.mrrev.2012.08.001
- KREIN, Peter M., Peter J. B. SABATINI, William TINMOUTH, Francis H. Y. GREEN a Brent W. WINSTON, 2003. Localization of Insulin-like Growth Factor-I in Lung Tissues of Patients with Fibroproliferative Acute Respiratory Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. **167**(1), 83–90. ISSN 1073-449X, 1535-4970. Dostupné z: doi:10.1164/rccm.2201012
- KRISHNAMOORTHY, L., H.L. MORRIS a K.G. HARDING, 2001. Specific growth factors and the healing of chronic wounds. *Journal of Wound Care* [online]. **10**(5), 173–178. ISSN 0969-0700, 2052-2916. Dostupné z: doi:10.12968/jowc.2001.10.5.26076
- LAWRENCE F BROWN, KiangTeck YEO, Brygida BERSE, Tet-Ki YEO, Donald R SENGGER, Harold F DVORAK a Livingston VAN DE WATER, 1992. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *The Journal of Experimental Medicine*. **176**(5), 1375–1379. ISSN 0022-1007.
- LIANG, Chun-Chi, Ann Y PARK a Jun-Lin GUAN, 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* [online]. **2**(2), 329–333. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2007.30
- LICHTMAN, Michael K., Marta OTERO-VINAS a Vincent FALANGA, 2016. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis: TGF- β and wound healing. *Wound Repair and Regeneration* [online]. **24**(2), 215–222. ISSN 10671927. Dostupné z: doi:10.1111/wrr.12398
- MACDONALD, Kelli a Geoffrey HILL, 2002. Keratinocyte Growth Factor (KGF) in Hematology and Oncology. *Current Pharmaceutical Design* [online]. **8**(5), 395–403. ISSN 13816128. Dostupné z: doi:10.2174/1381612023396104
- MADDALUNO, Luigi, Corinne URWYLER a Sabine WERNER, 2017. Fibroblast growth factors: key players in regeneration and tissue repair. *Development* [online]. **144**(22), 4047–4060. ISSN 1477-9129, 0950-1991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.152587

MARTIN, Paul, 1997. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science* [online]. **276**(5309), 75–81. ISSN 0036-8075, 1095-9203. Dostupné z: doi:10.1126/science.276.5309.75

MARTINOTTI, Simona a Elia RANZATO, 2019. Scratch Wound Healing Assay. In: Kursad TURKSEN, ed. *Epidermal Cells* [online]. New York, NY: Springer US, Methods in Molecular Biology, s. 225–229 [vid. 2022-11-12]. ISBN 978-1-07-160250-8. Dostupné z: doi:10.1007/7651_2019_259

MCGREGOR, Alexandra Lynn, Chieh-Ren HSIA a Jan LAMMERDING, 2016. Squish and squeeze — the nucleus as a physical barrier during migration in confined environments. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. **40**, 32–40. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2016.01.011

MELINCOVICI, Carmen Stanca, Adina Bianca BO, Carina MIHU, Mihnea ISTRATE, Ioana-Maria MOLDOVAN, Alexandra Livia ROMAN a Carmen Mihaela MIHU, 2018. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis.

MESDOM, Pierre, Romain COLLE, Elise LEBIGOT, Séverine TRABADO, Eric DEFLESSELLE, Bruno FÈVE, Laurent BECQUEMONT, Emmanuelle CORRUBLE a Céline VERSTUYFT, 2020. Human Dermal Fibroblast: A Promising Cellular Model to Study Biological Mechanisms of Major Depression and Antidepressant Drug Response. *Current Neuropharmacology* [online]. **18**(4), 301–318. ISSN 1875-6190. Dostupné z: doi:10.2174/1570159X17666191021141057

MOIN, Athar, Tooba GHAZANFARI, Seyyed Masoud DAVOUDI, Naser EMADI, Yunes PANAHI, Zuhair Mohammad HASSAN, Mohammad Reza SOROUSH, Shahryar KHATERI, Reza AMINI, Mohammad Mehdi NAGHIZADEH, Roya YARAEI, Hassan GHASEMI, Jalaleddin SHAMS, Mohammad Reza Vaez MAHDAVI, Sakine MOAIEDMOHSENI, Mohammad Reza Jalali NADOUSHAN, Javad MERASIZADEH a Soghra FAGHIHZADEH, 2009. Long-term skin findings of sulfur mustard exposure on the civilians of Sardasht, Iran. *Toxin Reviews* [online]. **28**(1), 24–29. ISSN 1556-9543, 1556-9551. Dostupné z: doi:10.1080/15569540802689311

MOMENI, Ali-Z, 1992. Skin Manifestations of Mustard Gas: A Clinical Study of 535 Patients Exposed to Mustard Gas. *Archives of Dermatology* [online]. **128**(6), 775. ISSN 0003-987X. Dostupné z: doi:10.1001/archderm.1992.01680160059004

MOULIN, VJ, D MAYRAND, A LAFORCE-LAVOIE, S LAROCHELLE, H GENEST, Moulin VJ, Mayrand D, Laforce-Lavoie A, Larochelle S a Genest H, 2011. In Vitro Culture Methods of Skin Cells for Optimal Skin Reconstruction by Tissue Engineering. In: *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials* [online]. B.m.: IntechOpen [vid. 2023-05-10]. ISBN 978-953-307-663-8. Dostupné z: doi:10.5772/20341

NORDEN, Caren a Virginie LECAUDEY, 2019. Collective cell migration: general themes and new paradigms. *Current Opinion in Genetics & Development* [online]. **57**, 54–60. ISSN 0959437X. Dostupné z: doi:10.1016/j.gde.2019.06.013

- NOURANI, Mohammad Reza, Hamideh MAHMOODZADEH HOSSEINI, Sadegh AZIMZADEH JAMALKANDI a Abbas Ali IMANI FOOLADI, 2017. Cellular and molecular mechanisms of acute exposure to sulfur mustard: a systematic review. *Journal of Receptors and Signal Transduction* [online]. **37**(2), 200–216. ISSN 1079-9893, 1532-4281. Dostupné z: doi:10.1080/10799893.2016.1212374
- PALTA, Sanjeev, Richa SAROA a Anshu PALTA, 2014. Overview of the coagulation system. *Indian Journal of Anaesthesia* [online]. **58**(5), 515–523. ISSN 0019-5049. Dostupné z: doi:10.4103/0019-5049.144643
- PANAHI, Yunes, Amir FATTAHI, Hamid Reza NEJABATI, Sina ABROON, Zeinab LATIFI, Abolfazl AKBARZADEH a Tohid GHASEMNEJAD, 2018. DNA repair mechanisms in response to genotoxicity of warfare agent sulfur mustard. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. **58**, 230–236. ISSN 13826689. Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2018.01.012
- PARK, Jin, Seung HWANG a In-Soo YOON, 2017. Advanced Growth Factor Delivery Systems in Wound Management and Skin Regeneration. *Molecules* [online]. **22**(8), 1259. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22081259
- PAVEZ LORIE, Elizabeth, Nicola STRICKER, Beata PLITTA-MICHALAK, I-Peng CHEN, Beate VOLKMER, Rüdiger GREINERT, Anna JAUCH, Petra BOUKAMP a Alexander RAPP, 2020. Characterisation of the novel spontaneously immortalized and invasively growing human skin keratinocyte line HaSKpw. *Scientific Reports* [online]. **10**(1), 15196. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-71315-0
- PAWLUCHIN, Anna a Milos GALIC, 2022. Moving through a changing world: Single cell migration in 2D vs. 3D. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **10**, 1080995. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2022.1080995
- PENN, Jack W, Adriaan O GROBBELAAR a Kerstin J ROLFE, 2012. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *International Journal of Burns and Trauma*. **2**(1), 18–28. ISSN 2160-2026.
- PHAN, Toan-Thang, Ivor Jiun LIM, Boon Huat BAY, Robert QI, Michael Thornton LONGAKER, Seng-Teik LEE a Hung HUYNH, 2003. Role of IGF system of mitogens in the induction of fibroblast proliferation by keloid-derived keratinocytes in vitro. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* [online]. **284**(4), C860–C869. ISSN 0363-6143, 1522-1563. Dostupné z: doi:10.1152/ajpcell.00350.2002
- PIJUAN, Jordi, Carla BARCELÓ, David F. MORENO, Oscar MAIQUES, Pol SISÓ, Rosa M. MARTI, Anna MACIÀ a Anaïs PANOSA, 2019. In vitro Cell Migration, Invasion, and Adhesion Assays: From Cell Imaging to Data Analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **7**, 107. ISSN 2296-634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2019.00107
- PIKUŁA, Michał, Paulina LANGA, Paulina KOSIKOWSKA a Piotr TRZONKOWSKI, 2015. [Stem cells and growth factors in wound healing]. *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)* [online]. **69**, 874–885. ISSN 1732-2693. Dostupné z: doi:10.5604/17322693.1162989

PLIKUS, Maksim V., Xiaojie WANG, Sarthak SINHA, Elvira FORTE, Sean M. THOMPSON, Erica L. HERZOG, Ryan R. DRISKELL, Nadia ROSENTHAL, Jeff BIERNASKIE a Valerie HORSLEY, 2021. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell* [online]. **184**(15), 3852–3872. ISSN 1097-4172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2021.06.024

POURSALEH, Zohreh, Mostafa GHANEI, Farhang BABAMAHOODI, Morteza IZADI, Ali Amini HARANDI, Seyed Emad EMADI, Nez'hat-o-Sadat TAGHAVI, Seyede Somaye SAYAD-NOURI a Seyed Naser EMADI, 2012. Pathogenesis and treatment of skin lesions caused by sulfur mustard. *Cutaneous and Ocular Toxicology* [online]. **31**(3), 241–249. ISSN 1556-9527, 1556-9535. Dostupné z: doi:10.3109/15569527.2011.636119

POWERS, C J, S W MCLESKEY a A WELLSTEIN, 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-related cancer* [online]. 165–197. ISSN 1351-0088. Dostupné z: doi:10.1677/erc.0.0070165

RAFATI-RAHIMZADEH, Mehrdad, Mehravar RAFATI-RAHIMZADEH, Sohrab KAZEMI a Ali Akbar MOGHADAMNIA, 2019. Therapeutic options to treat mustard gas poisoning – Review. *Caspian Journal of Internal Medicine* [online]. **10**(3), 241–264. ISSN 2008-6164. Dostupné z: doi:10.22088/cjim.10.3.241

RAJA, Raja, 2007. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Frontiers in Bioscience* [online]. **12**(8–12), 2849. ISSN 10939946, 10934715. Dostupné z: doi:10.2741/2277

REINKE, J.M. a H. SORG, 2012. Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research* [online]. **49**(1), 35–43. ISSN 0014-312X, 1421-9921. Dostupné z: doi:10.1159/000339613

ROBSON, Martin C., David L. STEED a Michael G. FRANZ, 2001. Wound healing: Biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Current Problems in Surgery* [online]. **38**(2), A1-140. ISSN 00113840. Dostupné z: doi:10.1067/msg.2001.111167

ROLFE, Kerstin J., Alison D. CAMBREY, Janette RICHARDSON, Laurie M. IRVINE, Adriaan O. GROBBELAAR a Claire LINGE, 2007. Dermal fibroblasts derived from fetal and postnatal humans exhibit distinct responses to insulin like growth factors. *BMC Developmental Biology* [online]. **7**(1), 124. ISSN 1471-213X. Dostupné z: doi:10.1186/1471-213X-7-124

ROOS, Wynand P. a Bernd KAINA, 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine* [online]. **12**(9), 440–450. ISSN 14714914. Dostupné z: doi:10.1016/j.molmed.2006.07.007

ROSE, Dorothee, Annette SCHMIDT, Matthias BRANDENBURGER, Tabea STURMHEIT, Marietta ZILLE a Johannes BOLTZE, 2018. Sulfur mustard skin lesions: A systematic review on pathomechanisms, treatment options and future research directions. *Toxicology Letters* [online]. **293**, 100 years after the first use of sulfur mustard - re-emerging threats of chemical warfare agents and current state of medical research, 82–90. ISSN 0378-4274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2017.11.039

ROSENTHAL, Dean S., Cynthia M.G. SIMBULAN-ROSENTHAL, Sudha IYER, Mark E. SMULSON, Alexander SPOONDE, William SMITH a Radharaman RAY, 1998. Sulfur Mustard Induces Markers of Terminal Differentiation and Apoptosis in Keratinocytes Via a Ca²⁺-Calmodulin and Caspase-Dependent Pathway. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **111**(1), 64–71. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00250.x

RUBIN, J, 1995. Keratinocyte growth factor. *Cell Biology International* [online]. **19**(5), 399–412. ISSN 10656995. Dostupné z: doi:10.1006/cbir.1995.1085

RUMBAUT, Rolando E. a Perumal THIAGARAJAN, 2010. *Platelet Aggregation* [online]. B.m.: Morgan & Claypool Life Sciences [vid. 2023-04-05]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53449/>

SALADI, R. N., E. SMITH a A. N. PERSAUD, 2006. Mustard: a potential agent of chemical warfare and terrorism. *Clinical and Experimental Dermatology* [online]. **31**(1), 1–5. ISSN 0307-6938, 1365-2230. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2230.2005.01945.x

SEO, Min-Duk, Tae-Jin KANG, Chang-Hoon LEE, Ai-Young LEE a Min-Soo NOH, 2012. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. *Biomolecules and Therapeutics* [online]. **20**(2), 171–176. ISSN 1976-9148. Dostupné z: doi:10.4062/biomolther.2012.20.2.171

SEZIGEN, Sermet, Rusen Koray EYISON, Mesut ORTATATLI, Ertugrul KILIC a Levent KENAR, 2020. Myelosuppression and acute hematological complications of sulfur mustard exposure in victims of chemical terrorism. *Toxicology Letters* [online]. **318**, 92–98. ISSN 03784274. Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2019.10.017

SHAKARJIAN, Michael P., Diane E. HECK, Joshua P. GRAY, Patrick J. SINKO, Marion K. GORDON, Robert P. CASILLAS, Ned D. HEINDEL, Donald R. GERECKE, Debra L. LASKIN a Jeffrey D. LASKIN, 2010. Mechanisms Mediating the Vesicant Actions of Sulfur Mustard after Cutaneous Exposure. *Toxicological Sciences* [online]. **114**(1), 5–19. ISSN 1096-6080. Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfp253

SHUKLA, P. K. a P. C. MISHRA, 2010. A quantum chemical study of reactions of DNA bases with sulphur mustard: a chemical warfare agent. *Theoretical Chemistry Accounts* [online]. **125**(3), 269–278. ISSN 1432-2234. Dostupné z: doi:10.1007/s00214-009-0514-3

SCHOOP, Veronika M., Norbert E. FUSENIG a Nicolae MIRANCEA, 1999. Epidermal Organization and Differentiation of HaCaT Keratinocytes in Organotypic Coculture with Human Dermal Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. **112**(3), 343–353. ISSN 0022202X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1523-1747.1999.00524.x

SMITH, Kathleen J, Charles G HURST, Robert B MOELLER, Henry G SKELTON a Frederick R SIDELL, 1995. Sulfur mustard: Its continuing threat as a chemical warfare agent, the cutaneous lesions induced, progress in understanding its mechanism of action, its long-term health effects, and new developments for protection and therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. **32**(5), 765–776. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/0190-9622(95)91457-9

- STAMM, Anne, Kerstin REIMERS, Sarah STRAUSS, Peter VOGT, Thomas SCHEPER a Iliyana PEPELANOVA, 2016. In vitro wound healing assays – state of the art. *BioNanoMaterials* [online]. **17**(1–2), 79–87. ISSN 2193-066X. Dostupné z: doi:10.1515/bnm-2016-0002
- STEED, David L., 1997. THE ROLE OF GROWTH FACTORS IN WOUND HEALING. *Surgical Clinics of North America* [online]. **77**(3), 575–586. ISSN 0039-6109. Dostupné z: doi:10.1016/S0039-6109(05)70569-7
- STEENFOS, Henrik H., 1994. Growth Factors and Wound Healing. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery* [online]. **28**(2), 95–105. ISSN 0284-4311. Dostupné z: doi:10.3109/02844319409071186
- SVENSSON, Carl-Magnus, Anna MEDYUKHINA, Ivan BELYAEV, Naim AL-ZABEN a Marc Thilo FIGGE, 2018. Untangling cell tracks: Quantifying cell migration by time lapse image data analysis: Untangling Cell Tracks. *Cytometry Part A* [online]. **93**(3), 357–370. ISSN 15524922. Dostupné z: doi:10.1002/cyto.a.23249
- TANG, Xiaopeng, Hu LIU, Shufen YANG, Zuohua LI, Jinfeng ZHONG a Rejun FANG, 2016. Epidermal Growth Factor and Intestinal Barrier Function. *Mediators of Inflammation* [online]. **2016**, 1–9. ISSN 0962-9351, 1466-1861. Dostupné z: doi:10.1155/2016/1927348
- TE BOEKHORST, Veronika, Luigi PREZIOSI a Peter FRIEDL, 2016. Plasticity of Cell Migration In Vivo and In Silico. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* [online]. **32**(1), 491–526. ISSN 1081-0706, 1530-8995. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125201
- TIANYI, Gu, 2014. Mechanism and treatment of sulfur mustard-induced cutaneous injury. *Chinese Journal of Traumatology* [online]. **17**(6), 345–350. ISSN 1008-1275. Dostupné z: doi:10.3760/cma.j.issn.1008-1275.2014.06.010
- TREPAT, Xavier, Zaozao CHEN a Ken JACOBSON, 2012. Cell Migration. In: Ronald TERJUNG, ed. *Comprehensive Physiology* [online]. 1. vyd. B.m.: Wiley, s. 2369–2392 [vid. 2023-01-11]. ISBN 978-0-470-65071-4. Dostupné z: doi:10.1002/cphy.c110012
- TZIOTZIOS, Christos, Christos PROFYRIS a Jane STERLING, 2012. Cutaneous scarring: Pathophysiology, molecular mechanisms, and scar reduction therapeutics. *Journal of the American Academy of Dermatology* [online]. **66**(1), 13–24. ISSN 01909622. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaad.2011.08.035
- VIAÑA-MENDIETA, Pamela, Mirna Lorena SÁNCHEZ a Jorge BENAVIDES, 2022. Rational selection of bioactive principles for wound healing applications: Growth factors and antioxidants. *International Wound Journal* [online]. **19**(1), 100–113. ISSN 1742-4801, 1742-481X. Dostupné z: doi:10.1111/iwj.13602
- VISWANATHAN, Vijay, Sharad PENDSEY, N. SEKAR a G.S.R. MURTHY, 2006. A Phase III Study to Evaluate the Safety and Efficacy of Recombinant Human Epidermal Growth Factor (REGEN-D™ 150) in Healing Dia. *Wounds* [online]. [vid. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://www.hmpgloballearningnetwork.com/site/wounds/article/5943>

VISWESHWARAN, Sai a Alexis GAUTREAU, 2020. Analysis of Random Migration of Cancer Cells in 3D. *BIO-PROTOCOL* [online]. **10**(1) [vid. 2023-04-07]. ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.3482

WATTANA, Monica a Tareg BEY, 2009. Mustard Gas or Sulfur Mustard: An Old Chemical Agent as a New Terrorist Threat. *Prehospital and Disaster Medicine* [online]. **24**(1), 19–29. ISSN 1945-1938, 1049-023X. Dostupné z: doi:10.1017/S1049023X0000649X

WERNER, S., 1998. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine & Growth Factor Reviews* [online]. **9**(2), 153–165. ISSN 1359-6101. Dostupné z: doi:10.1016/s1359-6101(98)00010-0

WERNER, Sabine a Richard GROSE, 2003. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiological Reviews* [online]. **83**(3), 835–870. ISSN 0031-9333, 1522-1210. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.2003.83.3.835

WHITE, Carl W., Raymond C. RANCOURT a Livia A. VERESS, 2016. Sulfur mustard inhalation: mechanisms of injury, alteration of coagulation, and fibrinolytic therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. **1378**(1), 87–95. ISSN 0077-8923. Dostupné z: doi:10.1111/nyas.13130

WILKINSON, Holly N. a Matthew J. HARDMAN, 2020. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology* [online]. **10**(9), 200223. ISSN 2046-2441. Dostupné z: doi:10.1098/rsob.200223

WU, Shang-Ying, Yung-Shin SUN, Kuan-Chen CHENG a Kai-Yin LO, 2017. A Wound-Healing Assay Based on Ultraviolet Light Ablation. *SLAS Technology* [online]. **22**(1), 36–43. ISSN 2472-6303, 2472-6311. Dostupné z: doi:10.1177/2211068216646741

YARROW, Justin C., Zachary E. PERLMAN, Nicholas J. WESTWOOD a Timothy J. MITCHISON, 2004. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnology* [online]. **4**(1), 21. ISSN 1472-6750. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6750-4-21

10 WEBOVÉ REFERENCIE

WEB1. Creating the Gap: Different Approaches. *Ibidi* [online]. (nedatované) [cit. 2023-01-10]. Dostupné z <https://ibidi.com/content/282-creating-the-gap>