

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Michaela Hybešová

Buněčná a molekulární podstata regenerace kůže u obojživelníků a savců
Cellular and molecular basis of a skin regeneration in amphibians and mammals

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8.8.2019

Michaela Hybešová

.....

Poděkování

Mé poděkování patří doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval.

Abstrakt

Hojení poraněné kůže u savců a její regenerace u obojživelníků patří mezi významná biomedicínská témata v rámci posledních pár desetiletí. Nejdůležitějším aspektem u člověka je tvorba jizvy a snaha o její nahrazení funkční diferencovanou tkání. K modulaci mechanismů tvorby jizvy je třeba porovnat tento proces s regeneračními mechanismy u obojživelníků, kde dochází k obnově původní tkáně a funkčnosti. Hlavním modelem pro studium regenerace jsou mloci, kteří si tuto schopnost zachovávají po celý život. Na druhou stranu žáby o tuto vlastnost přicházejí s metamorfózou, i když ne zcela. Imunitní systém žab po metamorfóze se shoduje s tím u savců. Podobně přechod z časného embryonálního vývoje u savců, kde byl plod schopen kompletní regenerace poškozené tkáně, na dospělý typ hojení, jde také ruku v ruce s rozvojem imunitního systému a strukturní diferenciací poškozené tkáně. Klíčovými faktory, které rozlišují proces hojení s jizvou a bez jizvy, jsou tak zánětlivé buňky a jejich regulace, tvorba ECM včetně proliferace fibroblastů, a produkce příslušných cytokinů.

Abstract

Wound healing of skin in mammals and its regeneration in Amphibians are crucial biomedicine topics in the last few decades. The most important aspect in humans is the scarring process and the effort to substitute it with the regeneration producing functional and differentiated tissues. To modulate the formation of scar it is necessary to compare both processes. The core animal model is axolotl (Caudata) where regeneration takes place during whole lifespan. On the other hand, in frogs (Anurans) this phenomenon is restricted up to metamorphosis. After metamorphosis, the immune system of Anurans is similar if compared to mammals. Similarly, the transition from early embryonic development in mammals, where the fetus was able to completely regenerate damaged tissue to an adult type of healing, goes hand-in-hand with the development of the immune system and structural differentiation of damaged tissue. Thus, the inflammatory cells and their regulation, the formation of ECM, which includes fibroblast proliferation, and the production of appropriate cytokines are key factors that distinguish the process of healing with and without scarring.

Seznam zkratek

ECM extracelulární matrix

IL interleukin

MMP matrixové metaloproteázy

TIMP tkáňové inhibitory matrixových metaloproteáz

VEGF vaskulární endoteliální růstový faktor

EGF epidermální růstový faktor

FGF fibroblastový růstový faktor

PDGF růstový faktor odvozený od červených destiček

TGF transformující růstový faktor

TNF- α faktor nádorové nekrózy alfa

EGF-HB heparin vázající růstový faktor podobný EGF

MCP-1 Protein monocytového chemoatraktantu -1

IP-10 chemokin, protein indukovaný interferonem gama -10

ESC epitelové kmenové buňky

MSC mezenchymální kmenové buňky

CCT-eta chaperonin obsahující T-komplex polypeptidové podjednotky

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Struktura kůže.....	2
2.1. Struktura kůže u savců.....	2
2.2. Struktura kůže u obojživelníků.....	3
3. Hojení ran.....	4
3.1. Tvorba jizvy	4
3.1.1.Zánět.....	4
3.1.2.Proliferace.....	6
3.1.3.Remodelace	7
3.1.4.Buněčná signalizace v procesu hojení rány u savců	9
3.2. Hojení ran u savců ve fetálním období.....	13
3.2.1.Porovnání hojení ran mezi časným fetálním plodem a dospělým savcem	13
4. Modely pro regeneraci.....	18
5. Regenerace kůže u obojživelníků.....	19
5.1. Zánět, reepitelizace u obojživelníků	20
5.2. Fibroblasty a ECM v regeneraci.....	21
5.3. Imunitní systém a regenerace	21
5.4. Metamorfóza a její vliv na regeneraci	22
6. Závěr	23
7. Reference.....	25

1. Úvod

Kůže, jakožto největší orgán těla, je také nejvíce náchylná na poranění. Jedna z mnoha funkcí je především udržování strukturální a fyziologické bariéry mezi vnitřním a vnějším prostředím organismu. Je to první obranná linie proti vnějším vlivům, jako jsou různé chemické látky, mikroorganismy, UV záření a jiná mechanická poškození. Proces regenerace se u obratlovců liší.

U savců včetně lidí jde o omezenou schopnost regenerace. V případě poranění, kdy rána zasahuje hluboko až do spodní vrstvy dermis, nejsou buňky fibroblasty schopné plné regenerace a obnovy tkáně. Neregenerují ani kožní deriváty, či potní žlázy a vlasové folikuly. V místě hlubokého poranění u nich proto dochází k tzv. hojení rány, ne regeneraci. Utvoří se tak u nich jizva, která překlenuje vzniklou mezeru kolagenními vlákny za účasti fibroblastů. Jizvy, které se nám utvoří po zranění, operaci, popálení a jiných nemocech nám způsobují zdravotní a kosmetické problémy a mohou ústít až k hypertrofickému nebo keloidnímu zjizvení. Tento proces, který vede ke vzniku kolagenních tkáňových jizev fibroblasty, se nazývá „fibróza“. Můžeme ji pozorovat nejen na kůži, ale i v různých částech těla jako je srdce, ledviny, játra a další. Hojení vyvolá sérii procesů na reparaci rány. Jde o komplexní mnohobuněčný proces, který usiluje o znovuzacelení a navrácení bariéry. Tento proces zahrnuje hemostázy, zánětlivou odpověď, tvorbu nových tkání a remodelaci kůže. Jde o koordinovanou snahu několika typů buněk. Patří sem: keratinoocyty, fibroblasty, monocyty, makrofágy, krevní destičky a neutrofilů. Tuto koordinaci zajišťují četné růstové faktory (např. EGF, TGF- β , FGF, PDGF) a jiné látky jako jsou cytokiny a chemokiny. Dochází zde k migraci, infiltraci a proliferaci těchto buněk.

U savců se na konci procesu hojení rány utvoří jizva, výjimkou jsou pouze časná embryonální stádia, kdy dochází k plné regeneraci. Důvodem toho je, že vyvíjející se plod s ještě nezralým endokrinním systémem nemůže zahájit takovou imunitní odpověď jako dospělý jedinec, navíc se nachází ve sterilním prostředí matky. Na druhou stranu je „dospělá kůže“ diferencovaná, rány jsou otevřené a vystavené infekci. Jednou z metod pro objasnění rozdílu mezi regenerací kůže a hojením ran s jizvou by tak mohlo být porovnání kůže fetálního plodu a dospělého jedince jednoho druhu (např. myši, potkana).

Schopnost regenerace kůže u savců je omezená, zatímco u obojživelníků je schopná plné regenerace v celé její „hloubce“ i v postnatálním stádiu.

Cílem této práce proto bude pochopit a popsat hlavní rozdíly mezi molekulární a buněčnou podstatou regenerace kůže u obojživelníků a procesu hojení ran u savců. Tato práce se snaží zjistit, jak navodit dokonalejší rekonstrukci poškozených částí tkáně. Důkazy, které svědčí o tom, že toho lze dosáhnout, vyplývají ze studií hojení ran u embryí, u kterých dochází v podstatě k dokonalé regeneraci poškozené tkáně.

2. Struktura kůže

Kůže se skládá se ze dvou vrstev - spodní vrstvy dermis (škára) a vrchní vrstvy epidermis (pokožka), překrývající subkutánní tkáň, což mají obratlovci jako savci a obojživelníci společně. Embryonální základ epidermis je ektodermální, zatímco dermis, vazivová část, pochází z mezodermu.

Kůže obojživelníků sdílí nejvíce podobných znaků s kůží savců. Oba druhy mají vícevrstevnou epidermis, ale u savců je stratifikovaná a rohovatějící, zatímco u obojživelníků nerohovatí. Savci mají také oproti obojživelníkům, kteří jsou evolučně primitivnější, lepší adaptaci proti vysoušení (shrnutí v Yokoyama et al., 2018).

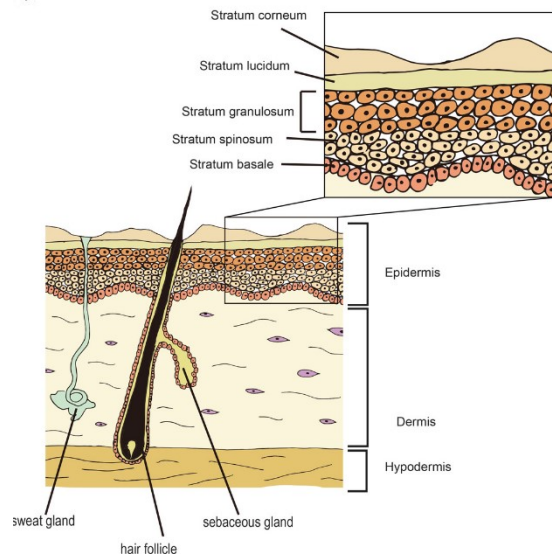
2.1. Struktura kůže u savců

Epidermis neboli pokožka je vícevrstevná (Obr.1, Yokoyama et al., 2018), kdy se buňky ve spodní vrstvě neustále dělí a posouvají směrem k povrchu. Rohovatí a na základě programované buněčné smrti odumírají a odlupují se. Tento proces se nazývá keratinizace. Vrstvy jsou tvořeny buňkami kubického tvaru sestávajících se z keratinocytů v různých stupních diferenciaci, z nediferencovaných kmenových buněk ve stratum basale (nejhlubší část epidermis), přes postupně diferencované keratinocyty stratum spinosum a stratum granulosum k terminálně diferencovaným a silně keratinizovaným buňkám stratum corneum (nejvíce povrchová část epidermis) (Stocum, 2012). Bezsrstá pleť v dlaních a chodidlech je nejsilnější, protože epidermis obsahuje další vrstvu navíc, stratum lucidum (Yousef et al., 2019). Nacházíme zde kromě keratinocytů i melanocyty, zodpovědné za pigmentaci kůže a ochranu před UV zářením. Dále Langerhansovy buňky, dendritické epidermální buňky, exprimují Ia antigeny (Klareskog et al., 1977) a jsou tak složkou imunitního systému. V neposlední řadě jsou zde Merkelovy buňky (mechanoreceptory) mající smyslovou funkci pro dotek. Vyrůstají zde kožní deriváty, jako jsou rohy, srst, peří, nebo šupiny, které ale zasahují také hluboko do dermální vrstvy.

Mezi epidermis a dermis je bazální membrána (lamina), která se skládá ze sítě kolagenu a retikulárních vláken (Selby, 1955) a je připojena k stratum basale hemidesmosomy (Yousef et al., 2019).

Škára neboli dermis obsahuje krevní a lymfatické cévy a je bohatě prokrvena. Zajišťuje tak výživu a podporu epidermálních buněk, které se nachází ve vrstvě nad ní. Jedná se o vazivovou vrstvu kůže, která je pevná, ale pružná díky řadě elastických a kolagenních vláken. Rozdělujeme zde dvě vrstvy – papilární (pars papillaris) a retikulární (pars reticularis) (Yousef et al., 2019).

Pro dosažení nejefektivnějšího přísunu živin jsou zde na rozhraní pokožky a škůry tzv. papily. Do dermis zasahuje řada epidermálních přírůstků, včetně vlasových folikulů, potních a mazových žláz (Stocum, 2012).



Obr.1 – Struktura kůže u savců (převzato z Yokoyama et al., 2018)

2.2. Struktura kůže u obojživelníků

U obojživelníků se liší struktura kůže podle toho, zda se obojživelník nachází před metamorfózou nebo po ní. Například u axolotla je epidermis pseudo-stratifikovaná, obsahuje epitelové a Leydigovy buňky a nemá oproti savcům tak dobře definovanou stratum corneum (Seifert et al. 2012a). Po indukované metamorfóze má však kůže axolotla stratifikovaný epitel, kde rozeznáme jednotlivé vrstvy – stratum spinosum, granulosum a stratum corneum (Seifert et al., 2012b). Horní vrstva epidermis u obojživelníků je zrohovatělá vrstva mrtvých diferencovaných keratinocytů (Schempp et al., 2009). Dýchání a příjem vody se u obojživelníků děje z velkého podílu právě prostřednictvím kůže, která tak musí být dobře prokrvena.

Dermis obsahuje velké množství epidermálně odvozených slizových žláz. Například alveolární žlázy, jejichž exkrece udržuje pokožku stále vlhkou a chrání ji tak před vysycháním, nebo granulární žlázy, které jsou uloženy ve stratum spongiosum. Tato vrstva se vyskytuje v dermis spolu se stratum compactum, pod kterou se nachází podkoží. Vrstva

compactum je tvořena zesílenou vrstvou stlačených kolagenových vláken a odděluje kůži od podkladového svalu.

3. Hojení ran

3.1. Tvorba jizvy

Fibróza, je proces tvorby kolagenní jizvy fibroblasty (Gurtner et al., 2008; Stocum, 2012), která doslova přemostňuje „propast“ utvořenou mechanickým nebo jiným poškozením. U savců tedy nedochází k obnovení původní tkáně, ale pouze k její opravě. Tuto „částečnou regeneraci“ nazýváme u savců jako hojení rány. Jedná se o fibroproliferativní odpověď. Poškození kožní tkáně je opraveno zánětlivou a fibrotickou odpovědí, která vede k vytvoření jizvy (Clark, 1988). Pokud by při procesu hojení nastala nějaká situace, která by vedla ke změně obvyklého průběhu, mohlo by to přinést nežádoucí účinky ve formě udržování vzniklého zánětu a celkově k prodloužení doby poškození a hojení tkáně. Proces může být zastaven u jedinců s různými nemocemi nebo špatným zdravotním stavem. Normální proces opravy ohrožují patologické stavy jako je například diabetes, špatná arteriální perfúze, žilní hypertenze, špatná výživa, imunosuprese nebo sepse. U nich mohou přejít akutní rány v chronické, což může vést k nadměrné fibróze, tvorbě keloidní jizvy či bolestem.

Hojení ran spočívá v interakci mezi buňkami a jejich prostředím, přičemž důležitou složkou je extracelulární matrix (ECM). Interakce mezi buňkami a ECM jsou vzájemné (Bissell & Glennhall, 1982), dynamické a mění se v reakci na podněty z okolního prostředí. K interakci mezi buňkami a ECM dochází prostřednictvím integrinů, membránových proteinů, kdy jejich extracelulární část interaguje s molekulami ECM (např. fibronectin, kolagen) a intracelulární část zas se signálními nebo adaptorovými proteiny navázanými na cytoskelet (Bramham et al., 2008). Tyto reakce tak regulují prostřednictvím genové exprese, syntézy proteinů, organizace aktinů nebo polaritou buněk.

Průběh hojení je u savců vícestupňový komplexní proces, který dělíme na 3 fáze – zánět, proliferace (tvorba tkáně) a remodelace (Broughton et al., 2006; Gurtner et al., 2008). Tyto 3 fáze jsou znázorněny na obrázku 2 (Obr. 2, Gurtner et al., 2008).

3.1.1 Zánět

Krevní srážení je součástí zánětlivé reakce. Nejdříve se po poranění uvolňuje krev z poškozených cév. Dochází k procesu hemostáze neboli tvorbě krevní sraženiny, která vede k řadě událostí pro zastavení ztráty krve. Aktivují se keratinocyty, které signalizují poškození.

Výsledkem je rozpad hemidesmosomů, které drží keratinocyty na místě v bazální membráně, a je tak zahájena jejich migrace (Chen & Parks, 2009). Ztráta spojovací adheze vyplývá z rozpuštění hemidesmosomových vazeb mezi epidermis a bazální membránou (Krawczyk & Wilgram, 1973). Keratinocyty opravují tkáň a vrací se poté zpátky k normální diferenciaci (Freedberg et al., 2001; Raja et al., 2007). Vše je řízeno extracelulárními signály. Po poranění se uvolní cytoplazmatický interleukin-1 (IL-1) ze zasažených keratinocytů, což je prvotní signál, který upozorní okolní buňky na poškození, a zahajuje aktivaci a migraci keratinocytů (Kupper et al., 1986; Wood et al., 1996; Murphy et al., 2000; Freedberg et al., 2001).

Do místa poškození se sbíhají krevní destičky, které se zachytávají do sítě tvořené fibrinovými vlákny. Ty se utváří během štěpení fibrinogenu trombinem. Během pár sekund po zranění dochází k uvolnění TGF- β 1 a PDGF z degranulačních destiček (Ferguson & O'Kane, 2004). Koagulace krve a agregace krevních destiček vytvářejí sraženinu bohatou na fibrin, která vyplňuje diskontinuitu v poraněné tkáni. Vzniklá sraženina spolu s navázaným fibronectinem a vitronectinem poskytuje provizorní matici pro přítok monocytů a fibroblastů. Díky ní mohou buňky migrovat během opravy poškozené tkáně. Migrující buňky pravděpodobně používají receptory integrinu, které rozpoznávají fibrin, fibronectin a vitronektin, a interagují tak s maticí sraženiny (Hynes, 1992), která rovněž slouží jako rezervoár cytokinů a růstových faktorů, které uvolňují aktivované destičky, proteáz a inhibitorů proteáz (Clark, 2003).

Destičky degranulují a uvolňují tak α -granule, které vylučují například epidermální růstový faktor (EGF), růstový faktor krevních destiček (PDGF) a transformující růstový faktor (TGF- β) (Barrientos et al., 2008), právě přeměna monocytů na makrofágy záleží na těchto dvou faktorech PDGF spolu s TGF- β (Barrientos et al., 2008).

Mnoho proteinů uvolňovaných destičkami jsou chemoatraktanty nebo mitogeny. Přilákají tak zánětlivé buňky, jako jsou neutrofilů a monocytů, ale i fibroblasty a buňky hladkého svalstva (Schultz et al., 2011).

Nastává zánětlivá fáze, která je charakterizována přílivem imunitních buněk. Ty jsou přitahovány cytokininy uvolněnými z krevních destiček, nebo produkty z degradace bakterií, které jsou též chemotaktické pro neutrofilů (Grose & Werner, 2004), jež jsou přitahovány do místa poranění hlavně díky těmto dvěma faktorům: PDGF a IL-1 (Hantash et al., 2008). Infiltrující neutrofilů čistí poraněnou oblast od cizích částic, mikroorganismů a bakterií. Snaží se tyto nečistoty odstranit pomocí fagocytózy a následným působením enzymů a toxických kyslíkových radikálů (Elsbach & Weiss, 1992). Neutrofilů uvolňují chemoatraktanty pro fibroblasty a makrofágy (Singer & Clark, 1999a).

Po očištění tkáně odchází s odumřelou tkání, nebo jsou fagocytovány makrofágy (Newman et al., 1982).

Monocyty migrují prostřednictvím integrinů z krve do rány a vážou se na proteiny ECM. Tato vazba, kromě faktorů PDGF a TGF- β , indukuje jejich diferenciaci na makrofágy a reguluje produkci růstových faktorů (Shaw et al., 1990). Makrofágy odstraňují tkáň fagocytózou, štěpením cizorodých částic a neutrofilů. Pokud jsou aktivovány bakteriálním endotoxinem, tak uvolní látky, které aktivují neutrofile. Makrofágy jsou důležitými zprostředkovateli angiogeneze neboli remodelace a tvorby sítě krevních kapilár. Dále se pak podílí na tvorbě granulační tkáně a iniciují též reepitelizaci za současného uvolňování řady prekurzorových cytokinů a růstových faktorů (Clark 1988; Barrientos et al. 2008; Yokoyama et al. 2018). Uvolňují např. s aktivovanými monocyty trombospondin-1, který dále přitahuje makrofágy (Agah et al., 2002). Důležité je taky zmínit jejich funkci při odstraňování apoptických neutrofilů, čímž zabrání snížení v uvolňování aktivního TGF- β 1 a následnému snížení počtu myofibroblastů a kontrakci rány (Sindrilaru et al., 2009).

Proces hojení ran zahrnuje nábor makrofágů, které zase přitahují fibroblasty, stimulují syntézu kolagenu a angiogenezi a tím podporují normální opravu (DiPietro, 1995).

3.1.2. Proliferace

Hlavní charakteristikou proliferační fáze je tvorba granulační tkáně proliferujícími fibroblasty, které se diferencují na myofibroblasty. Charakteristická je i tvorba krevních cév (tzv. angiogeneze), makrofágů, fibroblastů a uvolněné pojivové tkáně (Schultz et al., 2011). Tato fáze zahrnuje také časnou kontrakci ran a reepitelizaci rány. Reepitelizace, neboli tvorba nové tkáně začíná 2-10 dní po penetraci kůže.

Kapiláry začnou migrovat do rány do 4. dne po poranění. Závisí to na degradaci původní bazální membrány pomocí enzymů jako je metaloproteáza (Lafleur et al., 2003), na přítomnosti fibrinu a růstových faktorů – např. vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) nebo fibroblastový růstový faktor (FGF)-2 (Tonnesen et al., 2000; Wernes & Grose, 2003).

Narušení pokožky aktivuje migraci keratinocytů přes poraněnou dermis, které proliferují a obnovují zde bariérovou funkci epitelu. Děje se to s rozpadem hemidesmosomů řízeným metaloproteázou, následkem čehož je narušena kotva, která drží keratinocyty na místě v bazální membráně, a je umožněna jejich migrace (Chen & Parks, 2009). Ty pak přemísťují integriny, které na sebe vážou kolagen, z laterálního povrchu membrány k bazálnímu a umožní migraci buněk přes nově vytvořené lože granulační tkáně (Schultz et al., 2011).

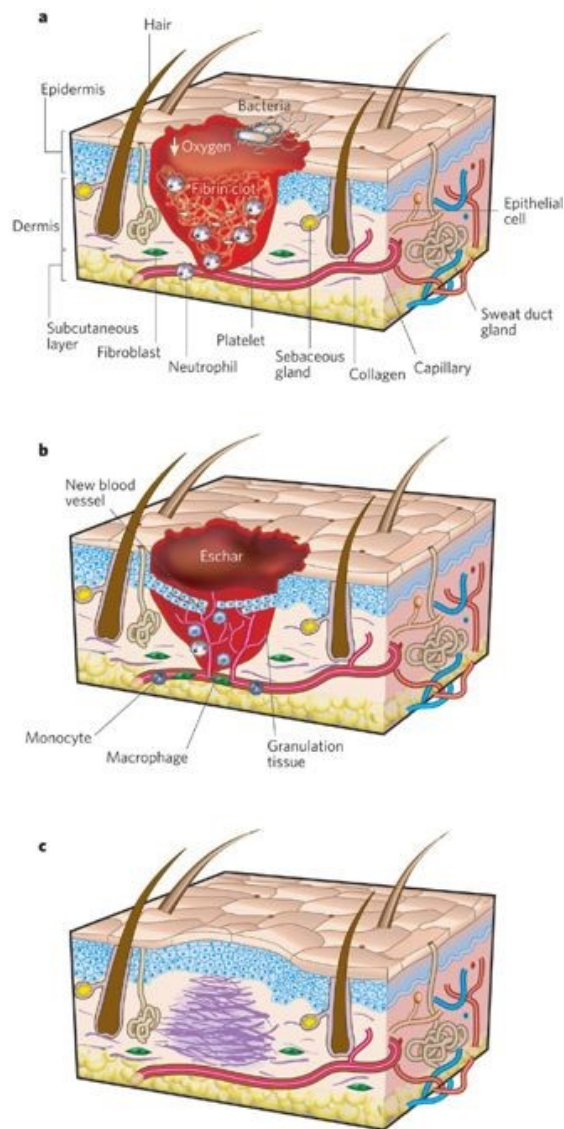
Uvolněné růstové faktory EGF, TGF- α a FGF stimulují migraci a proliferaci buněk epitelu během pár dní po poranění a začíná tak reepitelizace (Barrientos et al., 2008). Reepitelizaci též přispívají epitelové kmenové buňky vlasových folikulů, které urychlují počátek hojení (Takeo et al., 2015). V pozdější fázi do sraženiny migrují fibroblasty, které jsou přitahovány z okraje rány nebo kostní dřene, a proliferují na myofibroblasty, což jsou kontraktilní buňky (Opalenik & Davidson, 2005; Verstappen et al., 2011). Změna fenotypu je zapříčiněna TGF- β a PDGF (Desmoulière et al. 1993; Clark et al. 2004; Hantash et al. 2008). TGF- β také stimuluje fibroblasty k syntéze kolagenu, fibronektinu, trombospondinů, a také k zvýšení exprese integrinů (Varga et al., 1987; Igotzs et al., 1989; Opalenik & Davidson, 2005). PDGF zas stimuluje nejen proliferaci fibroblastů, ale i produkci proteoglykanů fibroblasty, které jsou důležité zas ve vazbě s integriny pro migraci fibroblastů a vazbu na prozatímní matici (Clark et al., 2004). Vazba fibroblastů na nově uložený kolagen přes receptory integrinu také stimuluje produkci metaloproteáz, které usnadňují migraci buněk (Steffensen & Hakkinen, 2001).

Spolu se zánětlivými buňkami a kapilárami napadají fibroblasty sraženinu za vzniku kontraktilní granulační tkáň, což usnadňuje uzavření rány (Clark, 1988; Hantash et al., 2008; Yokoyama et al., 2018). Když jsou buňky stimulovány k migraci, např. angiogenezi podléhá změnám jejich adhezí buněčná matrice, což je doprovázeno změnami integrinů. Dojde k přepínání typů integrinů, které exprimují a aktivují signální dráhy v průběhu angiogeneze (Truong & Danen, 2009). Granulační tkáň se tak nazývá díky jejímu granulovanému vzhledu a tvoří nový substrát pro migraci keratinocytů v pozdějších fázích hojení. Makrofágy poskytují trvalý zdroj cytokinů pro stimulaci tvorby vaziva a angiogeneze, fibroblasty zas tvoří extracelulární matrix pro podporu růstu buněk jejich vazbou na fibronectin. Tento proces stimuluje tvorbu kolagenu, proteoglykanů a kyseliny hyaluronové (McDonald et al., 1982). Krevní cévy zas přivádí kyslík a živiny. Buňky získají tvar vyvolaným napětím při jejich zakotvení do ECM prostřednictvím integrinů spojených s cytoskeletem. Během hojení ran narušuje degradace ECM mechanické napětí a následně tvar buněk, ovlivňuje tak buněčnou proliferaci a migraci (Ghosh et al., 2007). Výsledkem proliferace je nahrazení fibrinové sraženiny granulační tkání.

3.1.3. Remodelace

Ve třetí fázi hojení ran dochází k remodelaci granulační tkáň (časné matrix), ukládání sítě extracelulární matrix (ECM). Ta je nahrazena fibrózní jizvou, tvořenou kolagenem. Začíná 2-3 týdny po zranění a může trvat déle než rok. Během proliferační fáze fibroblasty, zpočátku

navázané prostřednictvím specifických integrinů na fibronectin, migrují a proliferují v reakci na PDGF (Schultz et al., 2011). Produkují řídkou ECM s vyššími hladinami kolagenu typu III. ECM je v průběhu 6–12 měsíců aktivně remodelována, což se děje pod vlivem TGF- β a růstového faktoru pojivové tkáně (CTGF) a začíná zde převládat kolagen typu I, který uvolňují myofibroblasty (Witte & Barbul, 1997). V pokračující přítomnosti TGF- β 1 se diferencují fibroblasty na myofibroblasty (Schultz et al., 2011), což jsou buňky odpovědné za kontrakci dermis (rány). Kontrakci poranění zajišťují interakcí se svazky kolagenu a růstovými faktory (Singer & Clark, 1999b). Do myofibroblastů se mohou taktéž diferencovat cirkulující buňky původem z kostní dřeně (Verstappen et al., 2011). Bylo prokázáno, že myofibroblasty mají mnohačetný původ (Micallef et al., 2012).



Obr. 2 – a) zánět, b) proliferace, c) remodelace kůže (převzato z Gurtner et al., 2008)

Tento proces remodelace časné matrice probíhá za spoluúčasti matricových metaloproteináz, které jsou vylučovány fibroblasty, makrofágy a endotelovými buňkami (Gurtner et al., 2008). Nově vytvořený kolagen se ukládá podle napětí, které tam v kůži je. Tkáň však nikdy nezískává zpátky ty samé vlastnosti, které měla před zraněním (Levenson et al., 1965). K hypertrofickému zjizvení může dojít například nevhodnou reakcí na tyto tahové síly, což způsobí nadměrné ukládání matrice. (Schultz et al., 2011). Tato fáze má nejdelší trvání v průběhu několika měsíců za vzniku jizvy. Reepitelizovaná rána mírně vystupuje a v tato oblast neobsahuje normální kožní přívesky.

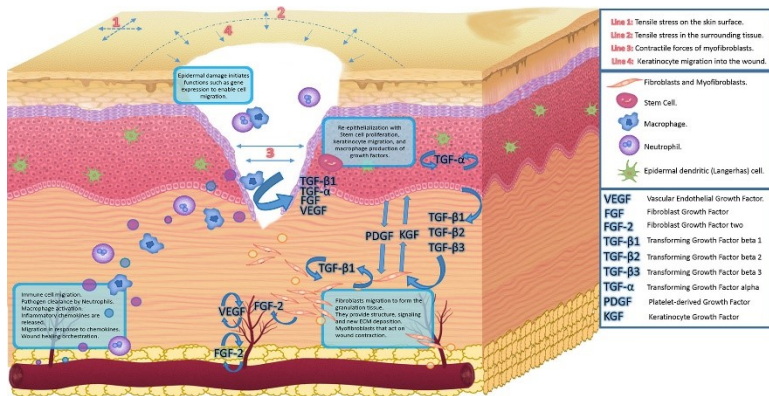
3.1.4. Buněčná signalizace

v procesu hojení rány u savců

Celý průběh hojení se odehrává díky četným růstovým faktorům (Obr.3, Herskovitz et al., 2016), záleží též na cytokinech (např. IL-1) a chemokinech.

Dohromady zajišťují integraci signálů a koordinaci buněčných

procesů. Patří sem rodina EGF, TGF- β , FGF, VEGF, IL a TNF- α (Barrientos et al., 2008).



Obr. 3 – Oprava rány (převzato z Herskovitz et al., 2016)

Rodina epidermálního růstového faktoru- EGF

Do této rodiny růstových faktorů řadíme hlavně EGF, TGF- α a EGF-HB. Jedná se o ligandy, jejímž receptorem je EGFR na povrchu buněk – transmembránový protein tyrosin-kinázy (Schlesinger & Ullricht, 1992). Navázáním např. epidermálního růstového faktoru (EGF) nebo jiného faktoru z této rodiny způsobí jeho aktivaci, dimerizaci tohoto receptoru a autofosforylaci tyrosinových zbytků (Kholodenko et al., 1999; Oda et al., 2005). Signální dráha tohoto receptoru je jedna z nejdůležitějších systémů regulující růst, buněčnou migraci a proliferaci keratinocytů v ranách (Martin, 1997; Oda et al., 2005). Koncentrace receptorů EGF je nejvyšší v bazální vrstvě, ale najdeme ho normálně i v celé epidermis (Nanney et al., 1984). Faktor EGF, jehož hladina se zvýší po poranění, urychluje migraci keratinocytů, a tím i reepitelizaci (Brown et al., 1986; Ando & Jensen 1993), působí na ně parakrinním způsobem (Schultz et al., 1991). Vylučován je např. krevními destičkami, makrofágy nebo fibroblasty (Barrientos et al., 2008; Schultz et al., 1991).

Dalším členem této rodiny, ne tak významným, je TGF- α , který je též vylučován krevními destičkami, makrofágy, fibroblasty, ale i keratinocyty a lymfocyty, ovšem na keratinocyty působí na rozdíl od EGF autokrinním způsobem (Schultz et al., 1991; Bennett et al., 2003; Barrientos et al., 2008) jako HB-EGF (Dlugosz et al., 1995). HB-EGF (heparin vázající růstový faktor) je jedním z růstových faktorů nacházející se v ráně, kde podporuje migraci keratinocytů, a tím reepitelizaci (Shirakata Yuji et al., 2005). Má i možnou funkci ve stimulaci angiogeneze (Abramovitch et al., 1998).

Rodina fibroblastového růstového faktoru – FGF

Nejdůležitější členové této rodiny, které se účastní hojení kožních ran, jsou tyto tři: FGF-2, FGF-7 a FGF-10. Z hlediska rodiny FGF přispívají k opravě ran zejména ligandy pro variantu IIIb receptoru 2 FGF (FGFR2-IIIb) (Gurtner et al., 2008). FGF je uvolňován mnoha typy buněk, např. makrofágy, kteří ho tvoří během zánětlivé fáze, nebo fibroblasty a endotelovými buňkami během proliferační fáze (Schultz et al., 2011). Produkovány jsou i keratinocyty, buňkami hladkého svalstva a chondrocyty (Bennett et al., 2003; Gallucci et al., 2004). FGF interaguje s heparinovými skupinami v ECM a na plazmatické membráně, aby stimuloval cíl buněk během hojení ran (Schultz et al., 2011). Jejich receptory jsou transmembránové proteiny tyrosin kinázy, jsou čtyři (RFGF 1-4) a fungují podobně jako EGFR (Gorlin, 2005). K aktivaci receptoru je třeba FGF s navázaným proteoglykanem – heparinem, k němuž má FGF silnou afinitu (Burgess & Maciag, 1989; Ornitz, 2000). FGF je silným faktorem při regulaci angiogeneze (Powers et al., 2000; Schultz et al., 2011).

FGF-2 je důležitý při tvorbě granulační tkáně, reepitelizaci nebo remodelaci tkáně (Clark, 1996; Powers et al., 2000). FGF-2 je důležitým regulátorem angiogeneze (Gurtner et al., 2008).

FGF-7 a jeho homolog FGF-10 jsou růstovými faktory keratinocytů, jejichž receptory se nachází pouze na keratinocytech a působí parakrinním způsobem (Ornitz, 2000). Poprvé byl FGF-7, jako růstový faktor keratinocytů (KGF) objeven roku 1989 panem Rubinem a kol. (Rubin et al., 1989). Nejenže tyto dva faktory stimulují proliferaci a migraci keratinocytů, ale také zvyšují transkripci faktorů, které se podílí na detoxifikaci ROS (reaktivních forem kyslíku), čímž zabraňují buněčné apoptóze keratinocytů (Raja et al., 2007). Silným zdrojem těchto dvou faktorů jsou hlavně dendritické epidermální T-buňky (Jameson et al., 2002). U myši, která postrádala tyto dendritické buňky, došlo ke snížené proliferaci keratinocytů a uzavření rány.

Rodina transformujících růstových faktorů TGF- β

Z různých růstových faktorů, které se podílejí na procesu hojení ran zejména fibróze, hraje TGF- β hlavní roli (Roberts et al., 1986). Izoformy TGF- β nalezené u savců jsou tyto tři TGF- β 1-3 (Leung et al., 2012). Produkovány jsou makrofágy, fibroblasty, keratinocyty a krevními destičkami (shrnutí v Barrientos et al., 2008). Nejdříve je TGF- β dodáván destičkami, později jejich roli přejímají ostatní zmiňované buňky. Při hojení kožních ran převládá hlavně TGF- β 1, který je důležitý při nábore zánětlivých buněk, angiogenezi, reepitelizaci a regeneraci pojivové tkáně (Barrientos et al., 2008). Podílí se na produkci kolagenu, zároveň

inhibuje metaloproteázy, a tím rozklad kolagenu (Zeng et al. 1996; White et al., 2000). V ranách dospělých savců dochází ke zvýšení exprese TGF- β 1 a TGF- β 2 v porovnání s TGF- β 3, který je více exprimován v ranách plodu a má naopak nižší hladiny TGF- β 1 a TGF- β 2 (Leung et al., 2012).

Přidáním rekombinantního TGF- β 1 do rány plodu uprostřed těhotenství vede k tvorbě jizvy (Lin et al., 1995), což ukazuje jeho jasnou roli, kterou přispívá k fibróze a zjizvení (Takeo et al., 2015). Transformující růstové faktory- β iniciují svůj buněčný účinek vazbou na receptory s vlastní serin / threonin kinázovou aktivitou (Massagué et al., 1994). Použití neutralizační protilátky proti TGF- β 1 a TGF- β 2 do okrajů kožních ran u dospělých hlodavců do 24 hodin po zranění, vedlo ke snížené zánětlivé odpovědi, angiogenezi a menšímu ukládání ECM, důsledkem toho se vytvořila lepší architektura neodermis podobná té původní a vedla k menšímu zjizvení (Shah et al., 1994; Ferguson & O’Kane, 2004). Působení TGF- β 1 na fibroblastické buňky iniciuje jejich expresi α -SMA a rychlou přeměnu fibroblastů na myofibroblasty (Desmoulière et al., 1993) a stimuluje jejich produkci kolagenu, převážně typu I a III, během tvorby matrice a remodelace tkáně (Barrientos et al., 2008).

TGF- β 2, který se vyskytuje v ranách spolu s TGF- β 1, se též podílí na atrakci zánětlivých buněk, stimulaci angiogeneze, tvorbě granulační tkáně a na závěr na tvorbě jizev u savců (Shah et al., 1995). Z tohoto důvodu je důležité snížit hladiny těchto dvou faktorů v hojících se ranách za účelem redukce zjizvení.

Třetí izoformou TGF- β je TGF- β 3, která se od předešlých dvou izoform liší tím, že naopak inhibuje zjizvení a zajišťuje lepší organizaci kolagenu, čímž zlepšuje architekturu neodermis (Shah et al., 1995).

Zajímavé je, že tyto jen mírně odlišné izoformy růstového faktoru TGF- β , ale v různých poměrech mohou vést k úplně odlišným výsledkům. Na konci procesu je buď opět obnovena kůže a její funkce, nebo je na konci jizva typická pro savce.

Růstový faktor produkovaný červenými destičkami (PDGF)

Růstové faktory PDGF jsou produkovány nejen červenými destičkami, ale i fibroblasty, makrofágy, nebo keratinocyty (Bennett et al., 2003). Po poranění se uvolňuje z degranulačních destiček a přitahuje do místa poškození neutrofilů (s pomocí IL-1), makrofágy a fibroblasty (Heldin & Westermarck, 1999), které jsou důležité při hojení ran. Bylo zjištěno, že keloidní fibroblasty mají ve srovnání s fibroblasty normální kůže až pětkrát více receptorů PDGF, což znamená, že nadměrná aktivita PDGF vede k tvorbě keloidních

jizev (Haisa et al., 1994). PDGF spolu s TGF- β zvyšuje proliferaci fibroblastů, jejich přeměnu na myofibroblasty, a tím produkci ECM (Hantash et al., 2008).

PDGF-BB byl schválen FDA jako lék při léčbě chronických vředů (Barrientos et al., 2008; Eming et al., 2014).

Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF)

Např. VEGF-A je produkován endoteliálními buňkami, keratinocyty, fibroblasty, buňkami hladkého svalstva, neutrofilů, makrofágy a trombocyty (Barrientos et al., 2008; Bao et al., 2009). Jeho role při hojení ran spočívá hlavně v angiogenezi, poté v migraci a proliferaci endoteliálních buněk (Watanabe et al., 1997; Bao et al. 2009). VEGF-A spolu s FGF-2 jsou důležitými pozitivními regulátory angiogeneze (Gurtner et al., 2008).

Cytokiny a chemokiny

Jejich exprese je zvýšena po zranění. Patří sem hlavně cytokiny IL-1, IL-6 a TNF- α , které jsou up-regulovány během zánětlivé fáze (Singer & Clark, 1999a).

IL-1 je po zranění okamžitě uvolněn z poraněných keratinocytů a zvyšuje jejich migraci a proliferaci (Raja et al., 2007), také upozorní ostatní buňky na vzniklé poškození. Produkován je i neutrofilů, monocytů a makrofágy (Barrientos et al., 2008).

Prozánětlivé interleukiny IL-6 a 8 přilákají zánětlivé buňky, jako jsou monocytů, makrofágy a neutrofilů. Jejich hladina je ovlivňována protizánětlivým faktorem IL-10.

Chemokiny jsou hlavně chemoatraktanty pro zánětlivé buňky a jsou uvolňovány keratinocyty. Např. MCP-1, který přitahuje monocytů a T-lymfocyty (DiPietro et al., 1995). Patří sem i IP-10, který negativně ovlivňuje hojení ran, třeba inhibicí angiogeneze (Belperio et al., 2000), nebo interleukin-8 (IL-8). IL-8 zvyšuje během akutní rány proliferaci a migraci keratinocytů, a má tak podíl na reepitelizaci (Tuschil et al. 1992; Barrientos et al. 2008). IL-8 je chemotaktický faktor zánětlivých buněk, hlavně pro neutrofilů, takže má svoji roli při zánětlivých reakcích (Kondo et al., 1993).

U lidí, kteří trpí například cukrovkou, mohou nastat problémy spojené s hojením a to takové, kdy se může hojení ran značně opozdit, nebo může docházet k nadměrnému ukládání kolagenu a tím tvorbě hypertrofických a keloidních jizev, které s sebou nesou značné zdravotní problémy. Často se tyto rány vyskytují u starších pacientů, neboť průběh hojení se zhoršuje s věkem. Víme, že se zvýšené množství faktoru TGF- β 1 nachází v ranách, které se hojí jizvou, na rozdíl od těch, kde probíhá regenerace (Lin et al., 1995). Proto zde byla snaha

zablokovat tvorbu jizev protilátkami namířenými hlavně proti TGF- β 1. Dále pak včasnou aplikací terapeutických činidel (např. růstového faktoru – TGF β 3) můžeme dosáhnout změny a přetrvávání buněk, které se vyskytují právě v regeneračním typu hojení u fetálních savců (Shah Mamta et al., 1995).

Aby se mohl proces hojení ran u savců přiblížit tomu u obojživelníků, třeba mloků, tak by bylo nutné zpomalit jejich rychlou fibrotickou odpověď tak, aby umožnily multipotentním buňkám regenerovat. Tato rychlá reakce na poranění je zapříčiněna nejspíše evolučním procesem, kdy byla prvotní snaha, aby organizmus rychle obnovil bariéru a zvýšil svoje šance na přežití. My jsme tak možnými oběťmi našeho evolučního úspěchu, protože konečným výsledkem opravy je nadměrné a špatně uspořádané ukládání extracelulární matrice (ECM) a fibróza, což zbavuje tkáň správné funkčnosti. Proto je zde pár posledních desetiletí snaha přijít na účinné terapie, které by funkčnost tkáně, nejen kůže, obnovily.

3.2. Hojení ran u savců ve fetálním období

Oprava kožních ran u savců ve fetálním období probíhá na rozdíl od dospělosti bez tvorby jizvy (Whitby & Ferguson, 1991; Bullard et al., 2003; Hantash et al., 2008; Henderson et al., 2011). Experimenty provedené *in vivo* u různých druhů savců jako jsou králíci, ovce, prasata, vačnatci nebo opice, prokázaly, že kůže se hojí v první třetině až polovině těhotenství dokonale bez jizev (McCallion & Ferguson, 1988), poté už nastupuje hojení rány s jizvou dospělého typu (Longaker et al., 1990). Například přechod z regenerační fáze na tvorbu jizev probíhá u potkanů v rozmezí 14 -18 dnů gestace (Colwell et al., 2003). Rány plodu se hojí rychle, ale bez dediferenciace buněčných složek, jako tomu je při regeneraci obojživelníků (Hess, 1954). Srovnáním hojení ran mezi fetálními savci a dospělými by mohlo mít přínos v pochopení procesu opravy kožní rány, které by zabránilo tvorbě jizvy.

3.2.1. Porovnání hojení ran mezi časným fetálním plodem a dospělým savcem

Jedním z rozdílů u hojení ran mezi fetálním plodem a dospělým savcem je prostředí, v kterém se daný organismus nachází. Plod se nachází ve vlhkém sterilním prostředí, které je více méně stálé a jeho buňky jsou ve stavu chronické hypoxie (Mast et al., 1992). Avšak prostředí není tím, co rozděluje hojení rány na tu s jizvou a bez jizvy. Tento přechod souvisí s vyvíjející se fetální kůží. U lidí je fetální kůže méně diferencovaná, než kůže dospělých během prvních 24 týdnů těhotenství (Lorenz & Adzick, 1993), zatímco dospělá kůže je plně stratifikovaná.

Zánětlivá reakce

Dalším a důležitým rozdílem je však zánětlivá reakce, která je u vyvíjejícího se plodu nízká, což má na svědomí nezralý endokrinní systém. Zánětlivá odpověď je u embryonálních ran tvořena nižším počtem méně diferencovaných zánětlivých buněk jako jsou neutrofilů, makrofágů a žírné buňky (Cowin et al., 1998; Satish & Kathju, 2010; Wulff et al., 2012). Také u ovcí bylo zaznamenáno, že jejich časné fetální neutrofilů jsou fyziologicky odlišné od těch, které jsou přítomny na konci těhotenství a postnatálně (Jennings et al., 1991). Typická infiltrace neutrofilů v postnatálních ranách, je tak zde v ranách plodu výrazně snížena (Adzick et al., 1985), jako i počet tkáňových makrofágů. Také produkce prozánětlivých cytokinů, interleukin-6 (IL-6) a interleukin-8 (IL-8), které regulují zánět, je nižší ve fetální ráně v porovnání s postnatální kůží (Liechty et al., 1998; Satish and Kathju, 2010). Aktivované fetální fibroblasty totiž vylučují výrazně méně těchto prozánětlivých cytokinů, než fibroblasty od dospělých (Liechty et al., 2000), což by mohlo vysvětlit snížený počet makrofágů a minimální zánětlivou odpověď během hojení rány.

Avšak exprese protizánětlivého interleukinu-10 (IL-10), který deaktivuje makrofágy, neutrofilů a produkci prozánětlivých cytokinů (IL-6 a 8), je mnohem vyšší u plodu v první polovině těhotenství, než u postnatálních jedinců (Gordon et al., 2008; Leung et al., 2012). Z těchto poznatků vyplývá, že pokud by se u poraněného plodu snížila exprese IL-10, tak by se zvýšila hladina prozánětlivých faktorů a zánětlivých buněk, výsledkem toho by došlo k hojení rány s utvořením jizvy na jejím konci. Bylo prokázáno, že nadměrná exprese tohoto cytokinu IL-10 umožnila průběh fetálního regenerativního hojení ran bez jizvy v závislosti na dávce (Gordon et al., 2008).

Extracelulární matrix, myofibroblasty, růstové faktory a další

Přechod z hojení rány bez jizev na dospělou s jizvou je postupný během přechodu z časného vývoje plodu do pozdní fáze fetálního vývoje, a je charakterizován abnormální organizací neodermis – ukládáním hustě uspořádaným svazků extracelulární matrix tvořenou hlavně z kolagen typu I, ale i III a fibronektinu vedle sebe (Ferguson & O'Kane, 2004). Kolagen je u fetálního plodu ukládán v jemném retikulárním vzorci, který nelze rozeznat od nepoškozené kůže (Colwell et al., 2003). ECM u fetálního plodu má vyšší podíl kolagenu typu III, proteoglykanu a hyaluronové kyseliny, než ECM u dospělého jedince (Merkel et al., 1988; Lorenz & Adzick, 1993). Navíc se embryo rychle vyvíjí a roste, tím pádem embryonální kůže a rány obsahují vysoké hladiny morfogenetických faktorů zajišťující růst, remodelaci

a morfogenezi kůže. Tento fakt spolu s redukovanou zánětlivou reakcí způsobuje, že jsou zde jiné poměry a množství těchto růstových faktorů, které mají i odlišnou dobu působení oproti ráně u dospělých savců (O’Kane & Ferguson, 1997; Shah et al., 2000).

Kůže dospělého savce je plně diferencovaná a neustále vystavená vnějším vlivům, rány jsou otevřené a náchylné infekci a vysychání. Proto je zde prvotní zájem ránu rychle zacelit a obnovit tak krycí bariéru a minimalizovat tak infekci. Dospělé i fetální fibroblasty jsou přitahovány do místa poškození chemoatraktanty uvolňovanými makrofágy nebo neutrofily (Colwell et al., 2003). Právě myofibroblasty, které způsobují kontrakci rány expresí α -SMA a její uzavření, se vyskytují v pozdních fázích plodu, avšak v časných fázích tyto kontraktilní buňky nenacházíme (Chen et al., 2007). Jsou zde však fetální fibroblasty, které řídí regenerativní ukládání ECM, a mají vyšší expresi hyaluronového receptoru, což napomáhá rychlejší migraci fibroblastů (Alaish et al., 1994).

Dále víme, že svoji roli při regenerativním hojení u fetálních ran savců mají i pluripotentní kmenové buňky stejně jako u obojživelníků. Patří sem hlavně epitelové kmenové buňky (ESC) v bazální vrstvě nebo u vlasových folikulů a mezenchymálních kmenové buňky (MSC), které chrání před nadměrnými zánětlivými odpověďmi (Prockop & Youn Oh, 2012).

Vliv TGF- β na průběh hojení

Zjizvení je během opravy kůže podporováno cytokiny nebo růstovými faktory (např. FGF nebo TGF- β) vytvořenými právě na základě zánětlivé odpovědi (Takeo et al., 2015). Jemná změna signálního prostředí rány může vést k dramaticky odlišným výsledkům. Embryonální rány, které se hojí bez jizvy, mají nízké hladiny TGF β 1 a TGF β 2, nízké hladiny růstového faktoru odvozeného z destiček (PDGF) a vysoké hladiny TGF β 3 (Ferguson & O’Kane, 2004). Naproti tomu dospělé rány mají vysoký obsah TGF β 1 a TGF β 2, který je syntetizován degranulací destiček a následně zánětlivými buňkami (monocyty, makrofágy), a také velké množství PDGF (Lin et al., 1995). Nejdůležitějším charakteristickým rysem hojení rány bez vzniku jizvy je tedy výrazně snížená zánětlivá odpověď, kterou fetální plod má (Cowin et al., 1998). Právě vysoká exprese TGF β 3 produkovaný keratinocyty a fibroblasty je dalším významným rozdílem, kterým se fetální kůže plodu potkana lišila od dospělého jedince (Soo et al., 2003). Dodáním exogenního TGF- β 3 do rány dermis plné tloušťky snížilo hromadění zánětlivých buněk - monocytů a makrofágů v oblasti rány a vedlo ke snížení ukládání fibronektinu a kolagenu I a III v raném stádiu hojení, čímž se výrazně zlepšila architektura neodermis a snížilo se zjizvení (Shah et al., 1995). Dnes se používá tento růstový faktor TGF- β 3 i u lidí pro redukci zjizvení (Oocleston et al., 2008). Naopak přidáním faktoru TGF- β 1

do fetální kožní rány způsobilo utvoření jizvy u plodu, který by se jinak hojil bezjizvě (Lin et al., 1995). Z těchto poznatků vyplývá, že TGF- β 3 přispívá k hojení ran bez jizev, kdy má pozitivní vliv na migraci fibroblastů (Ellis & Schor, 1998), zatímco izoformy TGF- β 1 a TGF- β 2 přispívají ke kožnímu zjizvení. Migrace fetálních fibroblastových buněk do rány vede k normálnějšímu uspořádání fibroblastů a molekul extracelulární matrice, což má za následek standartní dermální organizaci bez jizvy (Ferguson & O'Kane, 2004), a lepší rozložení působících sil v tahu. To vše přispívá k normální obnově funkce kůže.

Další faktory

Kromě faktoru TGF- β 1 a β 2 přispívá k fibróze také PDGF (Haynes et al., 1994) a FGF s několika izoformami, jejichž hladiny jsou vyšší v kožních ranách u dospělých savců (Dang et al., 2003). Protože se fetální krevní destičky špatně agregují, tak produkují nižší hladiny těchto profibrotických růstových faktorů - např. TGF- β 1 a PDGF (Leung et al., 2012). Také faktoru VEGF, který přispívá angiogenezi a má na svědomí utváření jizev (Barrientos et al., 2008; Wilgus et al., 2008).

Dalším faktorem, který se podílí na rychlejší reepitelizaci u ran plodu, je zvýšená exprese integrinů v reakci na poranění fetálních keratinocytů oproti dospělým keratinocytům, právě načasování zde hraje u integrinů důležitou roli (Satish & Kathju, 2010). U fetálního plodu nacházíme i zvýšenou expresi adhezivních proteinů, jako je fibronectin, který zprostředkovává buněčné připojení k ECM a přitahuje fibroblasty, keratinocyty a endoteliální buňky do místa poškození (McCallion & Ferguson, 1988).

Malý protein Rho, který váže GTP, je třeba důležitý pro správné sestavení aktinového „kabelu“ (Brock et al., 1996).

Též je genový produkt CCT-eta (podjednotka polypeptidu T-komplexu obsahujícího chaperonin) méně hojný ve fetálních fibroblastech než v dospělých buňkách (Satish et al., 2010). CCT- eta je specifickým regulátorem motility a kontraktility fibroblastů, čímž specificky reguluje expresi α -SMA, takže může být jedním z důležitých rozdílů mezi hojením ran s jizvou a bez jizev (Satish et al., 2010). Případným snížením CCT-eta je možné navodit v dospělých fibroblastech vlastnosti podobné fetálním fibroblastům.

Kůže fetálního plodu se liší od kůže dospělého jedince. Po zranění je u těchto dvou skupin odlišný poměr cytokinů a růstových faktorů, které se liší ve své expresi. Liší se i fenotypem některých buněk a rozdílnou mírou zánětlivé reakce. V následující tabulce (Tabulka 1, Satish

& Kathju, 2010) jsou shrnuty charakteristické hlavní rozdíly, které nastávají během přechodu hojení rány u časného fetálního plodu na dospělý typ hojení.

Tabulka 1: Rozdíly mezi kožním hojením ran časného fetálního plodu vs. dospělého jedince u savců (převzato a upraveno Satish & Kathju, 2010)

	Fetální plod	Dospělý jedinec
Zánětlivé reakce	minimální	silné
Růstové faktory		
PDGF	přechodné	trvalé
FGF	nízká hladina	vysoká hladina
TGFβ	nízká hladina TGFβ1 a TGFβ2	vysoká hladina TGFβ1 a TGFβ2
Cytokiny		
IL-6	nízká hladina	vysoká hladina
IL-8	nízká hladina	vysoká hladina
IL-10	vysoká hladina	nízká hladina
Tvorba granulační tkáně	ne	ano
ECM proteiny		
Kolagen	Vyšší poměr kolagenu typu III (oproti kolagenu typu I)	Vyšší poměr kolagenu typu I (oproti kolagenu typu III)
Fibronektin	předčasné ukládání	pozdní
Tenascin	častý objev	pozdní
Glykosaminoglykany		
Hyaluronová kyselina	vysoká hladina	nízká hladina
Myofibroblasty	nevyskytují se	vyskytují se
Integriny během reepitelizace	zvýšená exprese	pozdní

Z těchto poznatků je jasné, že vyvíjející se plod má schopnost regenerovat rány obnovu epidermis a dermis s původní funkcí. Víme, že velkou roli v přechodu mezi regenerací a fibrotickým hojení kůže má imunitní systém, který je u fetálních plodů nezralý, díky čemu se zřejmě mohou hojit bez jizev (Mescher & Neff, 2005). Kvůli zdravotním problémům, které s sebou jizvy přináší, se snažíme objasnit procesy, které vedou k její tvorbě a pokusit se je přetransformovat tak, aby mohla být původní tkáň zcela obnovena. Prováděné výzkumy přinesly mnoho poznatků o základních vlastnostech kožní rány a procesu hojení, ale protože zde jde o souhru několika typů buněk v různých časových sekvencích, tak je velmi složité tyto procesy napodobit, nebo ovlivnit v náš prospěch.

Víme, že regenerace tkání u savců lze dosáhnout díky experimentům prováděným u stejného zvířete a ve stejné tkáni, což naznačuje, že sdílejí podobné mechanismy a regulátory, ale v jiném stádiu vývoje. Takže teoreticky se dalo jemnou změnou poměru růstových faktorů přítomných během hojení dospělých savčích ran indukovat dokonalé hojení bez jizev se zrychleným průběhem hojení. V nedohledné době by nemuselo být zjizvení nevyhnutelným důsledkem, hlavně pokud by bylo utvářeno ve sterilních podmínkách na sále a o ránu by bylo nadále pečováno (třeba dodáváním TGF- β 3, kyseliny hyaluronové, protizánětlivého faktoru IL-10 nebo pomocí genové terapie) odborným personálem.

Srovnáním mezi postnatálním a fetálním hojením ran se zjistilo pár hlavních rozdílů, které jsou v zánětlivé odpovědi, buněčných mediátorech, cytokinech, růstových faktorech a při tvorbě ECM.

4. Modely pro regeneraci

Pro pochopení molekulárních a buněčných rozdílů je nejlepší využít srovnávací modely, modely regeneračních tkání s modely tkání s regeneračním deficitem. Vhodným modelem pro studium regenerace kůže a pro srovnávací analýzy jsou žáby *Xenopus leavis* a *Xenopus tropicalis*, u kterých byl osekvenován celý genom (Hellsten et al., 2010; Session et al., 2016). Dalším osekvenovaným modelem je axolotl (Nowoshilow et al., 2018), u kterého se vyskytuje neotenie (pedomorfóza), jev, kdy jedinec dosáhne pohlavní dospělosti ve stádiu larvy. S neotenií je také spojena schopnost regenerace po celý život. Tito zástupci z řádu *Urodela* (ocasatí) a *Anurana* (bezocasí) jsou tak dobrými modely pro studium regenerace kůže u obojživelníků.

5. Regenerace kůže u obojživelníků

Regenerace ran u obojživelníků je zajímavá vzhledem k jejich úzkému vztahu, který se savci mají. Jedná se hlavně o období fetálního růstu savců, kdy jsou některé procesy regenerace téměř totožné s regenerací probíhající u obojživelníků. Rozdíl mezi dospělým savcem a obojživelníkem je právě ve schopnosti téměř kompletní regenerace kůže, který dospělý savec ztratil. Nejen, že obojživelníci regenerují kůži včetně dermis a sekrečních žláz, ale mají schopnost regenerovat i amputované přívěsky. Proces regenerace končetiny po amputaci lze rozdělit do 3 fází: počáteční fáze je hojení rány, poté aktivace progenitorových buněk a nakonec opětovný vývoj, který je považován za rekapitulaci embryonálního vývoje, ale u dospělých (Godwin & Rosenthal, 2014). Tato regenerace probíhá tvorbou blastému, což jsou nediferencované buňky, které jsou toho schopné. Po poranění se diferencované buňky v oblasti amputace dělí na jednojaderné buňky blastému, které mohou proliferovat a diferencovat se na více typů buněk (Suzuki et al., 2005). Je nutné zde zmínit nervovou stimulaci, která je při tomto procesu důležitá a nezbytná (Endo et al., 2004; Suzuki et al., 2005), protože pokud zde není, tak buňky blastému nedokáží rediferencovat a místo regenerace dochází k hojení. Počáteční fáze hojení při regeneraci končetin sdílí mnoho funkcí s hojením ran bez jizev mimo regenerační pole.

Zajímavým modelem pro studium regenerace jsou mloci, kteří mají ve srovnání s jinými obratlovci úžasnou schopnost regenerovat končetiny, ale i srdce, čočku, míchu, ocas, vnitřní orgány a třeba klouby (Agata & Inoue, 2012; Seifert et al., 2012a). Dospělý axolotl (*Ambystoma mexicanum*) vykazuje několik juvenilních rysů – např. má pseudo-stratifikovanou epidermis s Leydigovými buňkami a vnější žábry. Vrstvu dermis má společnou s ostatními obojživelníky, ale epidermis je pseudo-stratifikovaná a nemá tak dobře definovanou stratum corneum (Seifert et al., 2012b). Mloci si udržují schopnost opravit rány bez zjizvení a regenerovat řadu orgánů a tkání po celý život, např. axolotl regeneruje kůži na trupu, včetně dermis a sekrečních žláz, a to i po indukované metamorfóze (Seifert et al., 2012c). Oproti žábám, které prochází metamorfózou a tak částečně ztrácí svoji regenerační kapacitu, spolu s vývojem dochází ke zrání jejich imunitního systému (Godwin & Brockes, 2006; Bertolotti et al., 2013). Přestože tyto dvě skupiny spolu úzce souvisí, tak jsou mezi nimi velké rozdíly právě v adaptivní imunitě (Chen & Robert, 2011; Godwin & Rosenthal, 2014). Imunitní buňky produkují velké množství cytokinů a jiných mediátorů, které působí zejména na tkáňové fibroblasty (Kovacs, 1991). Průběh regenerace by mohl být blokován nadměrnou fibroplasií vyvolanou zánětem, tím pádem i tvorbou kolagenu, který fibroblasty produkují.

Proto je zde důležitá regulace imunitního systému a fibrotických drah během procesu regenerace.

Studie zkoumající poranění na končetinách přispěly mnoha poznatky o průběhu reepitelizace (Ferris et al., 2010; Levesque et al., 2010) a regenerace bazální membrány (Neufeld et al., 1996). Dále definování faktorů zodpovědných za ztrátu regenerační kapacity u žab a zachování regenerační schopnosti u mloků, je důležité pro pochopení dalších kroků, jak zlepšit léčbu ran a zabránění zjizvení u lidí.

5.1. Zánět, reepitelizace u obojživelníků

Po zranění dochází ke srážení krve, ale díky vlhkosti kůže bez tvorby strupu, a je zde pouze malá známka fibrinové sraženiny. Po vytvoření epidermální „zátky“ dochází k deorganizaci tkáně pod tím. Narušení organizovaných tkáňových struktur vede k dediferenciaci a hromadění buněk blastému pod epidermis při regeneraci končetin u obojživelníků (Han et al., 2005; Suzuki et al., 2006). Tyto buňky blastému končetin exprimují transkripční faktor prx-1 (Suzuki et al., 2005; Satoh et al., 2007). Např. u žáby *Xenopus leavis* se po excizním odstranění kůže exprimuje pod epidermis rány též prx-1 nejen na končetině, ale i dorzálním trupu (Yokoyama et al., 2011). Oproti tomu u dospělé myši nebyly tyto blastému podobné buňky, které byly označeny prx-1 končetinovým zesilovačem, zaznamenány (Yokoyama et al., 2011). Pro regeneraci kůže je tak zřejmě důležité mít buňky podobné blastémům s prx-1 enhancerovou aktivitou. U žáby *Xenopus leavis* je tak regenerována kůže téměř v celém rozsahu, včetně dermis i se sekrečními žlázami (Yokoyama et al., 2011; Otsuka-Yamaguchi et al., 2017), taktéž jako u axolotlů (Seifert et al., 2012a), bez vzniku jizvy.

Po poranění je nutná reepitelizace lůžka rány, aby se obnovila epidermální bariéra. Rychlá reepitelizace je dalším typickým rysem pro obojživelníky, avšak v metamorfách je pomalejší (Seifert et al., 2012b). Právě přechod z pseudo-stratifikované na stratifikovanou epidermis během metamorfózy zabraňuje rychlé reepitelizaci a tím pádem přispěje k delší zánětlivé reakci. U savců, například myši trvá více než 10 dní (Yokoyama et al., 2011), zatímco např. u axolotlů epidermis překrývá ránu během 1 dne (Levesque et al., 2010), u metamorfovaných déle. Epitelové buňky z okrajů rány migrují přes podkladový sval a nahromaděnou plazmu a „epitelizují“ ránu (Seifert et al., 2012c). Po reepitelizaci je tak nově vzniklá epidermis v blízkosti základního svalu.

5.2. Fibroblasty a ECM v regeneraci

K plné regeneraci pokožky dochází u obojživelníků v oblasti tzv. regeneračního pole (hlavy, končetin a ocasu), zatímco mimo tuto oblast se rány hojily jizvou (Ferguson & O’Kane, 2004). V ložisku rány se do 2 týdnů nalézají dermální fibroblasty. Fibroblasty jsou hlavním zdrojem ECM. Jejich imunologická regulace je hlavním článkem ve vývoji fibrotické tkáně nebo složek regenerované tkáně ECM (Moyer & Wagner, 2011). Syntéza kolagenu u metamorfovaného axolotla probíhá podobně jako u savců, avšak u nich se neutvoří jizva díky nízké hladině fibronektinu a přetrvávající vysoké hladině tenascin-C (TN-C) (Seifert et al., 2012b). Mezi epidermis a svalem se vytvoří silná ECM a v regenerovaném stratum spongiosum vzniknou nové epidermální orgány. Úplná tloušťka kůže, včetně epidermálních orgánů a svalů, byla zcela regenerována do 80 dnů při výzkumu Seiferta a kol. (Seifert et al., 2012c). Úplná regenerace bazálních membrán odpovídá regeneraci dermis. Po reepitelizaci přetrvávají u axolotla vysoké hladiny matricových metaloproteáz (MMP), na rozdíl od savců, a díky tomu se už netvoří nová ECM a usnadňuje se lepší migrace buněk (Dang et al., 2003; Seifert et al., 2012b). Při regeneraci extracelulární matrice u bezjizevných ran byla posunuta rovnováha mezi celkovou aktivitou MMP a TIMP (tkáňové inhibitory metaloproteáz), kdy vyšší poměr exprese MMP k TIMP je spojován právě s bezjizevnou opravou (Dang et al., 2003). MMP (matricové metaloproteázy) mohou hrát klíčovou roli během migrace a regenerace keratinocytů, a jejich trvalá aktivita může řídit načasování ukládání ECM.

Bylo prokázáno, že některé buňky z podkožních tkání též přispívají k regeneraci kůže (zejména dermis) u žáby *Xenopus leavis* (Otsuka-Yamaguchi et al., 2017). Dosud není známo, jak buňky podobné blastému a myofibroblastům interagují v místě poranění a zda alfa-SMA pozitivní fibroblasty přispívají ke kontrakci ran a tvorbě jizvy u obojživelníků (Yokoyama et al., 2018). Je známo ale, že metamorfni proměna žáby *Xenopus leavis* se časově shoduje s omezením regenerační kapacity. Ještě před metamorfózou, kdy je vyvíjející se končetina v raném stádiu amputována, dochází k její kompletní regeneraci. V pozdějších fázích po metamorfóze má amputace za následek nedokonalou regeneraci končetin s nadměrnou produkcí pojivové tkáně (Mescher & Neff, 2006), což je dáváno za vinu právě rozvinutému imunitnímu systému.

5.3. Imunitní systém a regenerace

V žabách jsou tedy aktivní dva vývojově odlišné imunitní systémy: 1. je larvální systém (stádium), kde není klasická prezentace antigenu MHC I. třídy nebo účinné efektorové

mechanismy (Robert et al., 1998) a 2. systém je postmetamorfní, který se vyznačuje silnou adaptivní imunitou podobnou savcům (Robert et al., 1998; Godwin & Rosenthal, 2014).

Imunitní systém mloka vzhledem k žabám a savcům považován za nedostatečný, pomalý a postrádá několik klíčových adaptivních imunitních odpovědí (Chen & Robert, 2011).

U lidí, myši a ptáků tvoří fetální a dospělé T buňky odlišné populace, které jsou přítomny v různých stádiích vývoje (Mold et al, 2010). Diference T buněk během vývoje má za úkol podporovat toleranci vůči „vlastním antigenům“. Ztráta této tolerance v dospělosti přispívá ke ztrátě regenerace spolu se vznikem adaptivní imunitní odpovědi (Godwin & Rosenthal, 2014). Vrozený imunitní systém je zodpovědný za zánětlivé odpovědi, které vedou myeloidní buňky, jako jsou monocyty, makrofágy nebo granulocyty. Právě monocyty a makrofágy regulují proces zánětu, kdy poskytují růstové faktory a signální molekuly, které jsou důležité například pro angiogenezi a mohou ovlivnit diferenciaci progenitorových buněk (Delavary et al., 2011).

Makrofágy odvozené z monocytů a tkáňové makrofágy zahrnují skupinu buněk různého vývojového původu. Zaujímají širokou škálu různých fenotypů a funkcí těchto buněk, jejíž primární funkce je v přirozené imunitě (Godwin & Rosenthal, 2014). Také hrají důležitou roli ve vývoji a rozhodování o osudu buněk v mnoha typech tkání (Stefater et al., 2011). Regulují zánět, poskytují růstové faktory a signální molekuly důležité pro angiogenezi a mohou ovlivnit diferenciaci progenitorových buněk. Makrofágy také interagují s adaptivními imunitními buňkami, aby modulovaly funkci fibroblastů, a jsou považovány za hlavní regulátory fibrózy a tvorby jizev (Lucas et al., 2010).

Během hojení ran u dospělých savců dochází zprvu typicky k zánětlivé odpovědi, při které dochází k infiltraci leukocytů, hlavně neutrofilů, a jejich následnému odstranění makrofágy. Hladina leukocytů po poranění je mnohem vyšší u metamorfovaných obojživelníků, než u paedomorfů, avšak neutrofilů v porovnání se savci zde mají nižší zastoupení (Seifert et al., 2012b).

5.4. Metamorfóza a její vliv na regeneraci

Po metamorfóze u *Xenopus leavis* se kůže larev osídí dendritickými i Langerhansovými buňkami, spolu s epidermálními T-buňkami tvoří součást dospělé kůže a všechny slouží jako regulátory při opravě tkáně savců, a také regulují úspěšnost opravy a regenerace kůže u žab (Mescher et al., 2007). Změny při opravě kožního poškození u metamorfovaných zvířat,

kde je regenerační proces uzavření rány nahrazen kontrakcí buněk jako u savců, jsou nejspíše řízeny těmito buňkami (Mescher & Neff, 2005). Metamorfní axolotl stahuje rány podobně jako lidská kůže, avšak je zde nepatrné množství myofibroblastů. Před kontrakcí rány začínají dermální fibroblasty produkovat aktin hladkého svalstva (α -SMA) v granulační tkáni a na okraji poranění, čímž dochází k jejímu uzavření (Grinnell, 1994), avšak v porovnání s myší, kde jsou tyto alfa-SMA pozitivní buňky četné v granulační tkáni, je u axolotla přítomno jen malé množství (Seifert et al., 2012b).

V porovnání kůže při regeneraci u paedomorfních (vodních) a metamorfovaných (terestrických) axolotlů se zjistila pomalejší reepitelizace, zvýšený počet zánětlivých buněk i ukládání ECM a prodloužená doba trvání potřebná pro celkovou regeneraci kůže (Seifert et al., 2012b). U obojživelníků je ale v porovnání se savci snižená hemostáze, nižší hladiny neutrofilů, zpožděná produkce a jiné složení ECM, avšak rychlejší reepitelizaci rány.

U savců jsou neutrofilové dominantním typem buněk přítomných okamžitě po poranění oproti obojživelníkům, a jsou nezbytné k ničení bakterií a boji proti infekci.

6. Závěr

Proces regenerace se u obratlovců liší. Přestože máme s obojživelníky společné strukturální rysy kůže, nesdílíme s nimi jejich regenerační schopnosti pro obnovu normální struktury a funkčnosti poškozené tkáně. Výjimku u savců tvoří časná embryonální stádia, která se hojí bezjizevně až do poloviny těhotenství (jako je tomu u lidí, myší, nebo potkanů), a africké ostnaté myši. Je zde nutno oddělit tak dva pojmy: regeneraci tkáně nebo její zhojení. Regenerací se myslí plné obnovení tkáně, která je k nerozeznání od původní.

U savců, kde zasahuje rána až do dermis, nedochází k regeneraci, ale k rychlému procesu, který vede k uzavření rány za cenu její nefunkčnosti a vzniku jizvy. Po poranění u nich dochází k hemostázi, přílivu zánětlivých buněk, aktivaci, migraci a proliferaci buněk (monocytů, keratinocytů, fibroblastů, epiteliálních buněk), tvorbě ECM a remodelaci tkáně. Nejprve se utvoří fibrinová sraženina, která slouží jako prozatímní extracelulární matrix, poté následuje její degradace a nahrazení granulační tkáně, která je během remodelace přetvořena na fibrotickou jizvu. Hojení ran je složitý překrývající se proces, který regulují různé růstové faktory, cytokiny, nebo chemokiny, a zajišťují tak koordinaci více typů buněk, které se procesu účastní. U fetálních ran je zánětlivá odpověď tvořena nižším počtem méně diferencovaných zánětlivých buněk, je zde například snížena typická infiltrace neutrofilů,

produkce prozánětlivých interleukinů (IL-6 a 8), avšak zvýšená exprese protizánětlivého interleukinu-10 (IL-10). Menší produkce prozánětlivých cytokinů v plodu vysvětluje snížený počet makrofágů a minimální zánětlivou odpověď. U dospělých jedinců je adaptivní imunita silnější a způsobuje fibroplasiu, kontrakci rány a tvorbu kolagenu. Fetální destičky produkují méně růstového faktoru PDGF, TGF- β 1 a TGF- β 2, než ty postnatální a mají sníženou agregaci, nejspíše následkem zvýšené hladiny kyseliny hyaluronové. Zánětlivá reakce organismu tak hraje v procesu hojení důležitou roli. Je zde i důležitý rozdíl mezi fetálními a dospělými fibroblasty, neboť ECM produkovaná fetálními fibroblasty má vyšší podíl kolagenu typu III, proteoglykanu a hyaluronové kyseliny a její syntéza je rychlejší, než v ráně dospělého savce.

Regenerační schopnosti nacházíme především u obojživelníků. Některé organismy si tuto schopnost zachovávají po celý život, jedná se zejména o řád *Urodela*, jmenovitě o mloky (např. *Ambystoma mexicanum*). U obojživelníků hraje též významnou roli imunitní systém, který se mění zvláště během metamorfózy. Během přechodu z larvy na dospělou žabu dochází k zdokonalení imunity, přeměny lymfocytů a dalších imunitních buněk. U dospělé žaby jsou buněčné i humorální imunitní odpovědi podobné těm u savců z hlediska nástupu, paměti a specificity buněk. Jejich fylogeneticky primitivnější příbuzní jako jsou mloci, vedou minimální zánětlivou reakci s relativně slabou buněčnou a humorální imunitou, která je pomalá a postrádá paměť. Imunitní systém dále ovlivňuje průběh hojení např. různými interleukiny, které způsobují proliferaci fibroblastů a produkci kolagenu.

Ke ztrátě schopnosti bezjizevného hojení rány dochází postupným vývojem plodu, s tvorbou imunitního systému a nástupem zánětlivé odpovědi na poranění. Svůj význam mají zánětlivé cytokiny, které inhibují regeneraci kůže. Selhání regenerace u dospělých žab jde ruku v ruce s vyspělejší adaptivní imunitou, neboť u jejich larev nebo u mloků s méně vyvinutou adaptivní imunitou se nachází minimální zánětlivé reakce a skvělé schopnosti regenerace tkání. Výsledkem ztráty regenerační schopnosti v průběhu evoluce jsou tak faktory uvolňovány během zánětu, které dále způsobují fibrózu a kontrakci rány.

7. Reference:

- Abramovitch, Rinat, Michal Neeman, Reuven Reich, Ilan Stein, Eli Keshet, Judith Abraham, Arie Solomon, and Moshe Marikovsky. 1998. "Intercellular Communication between Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells Mediated by Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor." *FEBS Letters* 425(3):441–47.
- Agah, Azin, Themis R. Kyriakides, Jack Lawler, and Paul Bornstein. 2002. "The Lack of Thrombospondin-1 (TSP1) Dictates the Course of Wound Healing in Double-TSP1/TSP2-Null Mice." *The American Journal of Pathology* 161(3):831–39.
- Agata, Kiyokazu and Takeshi Inoue. 2012. "Survey of the Differences between Regenerative and Non-Regenerative Animals." *Development Growth and Differentiation* 54(2):143–52.
- Alaish, Samuel M., Dorne Yager, Robert F. Diegelmann, and I. Kelma. Cohen. 1994. "Biology of Fetal Wound Healing: Hyaluronate Receptor Expression in Fetal Fibroblasts." *Journal of Pediatric Surgery* 29(8):1040–43.
- Ando, Yoshihiro and Pamela J. Jensen. 1993. "Epidermal Growth Factor and Insulin-like Growth Factor I Enhance Keratinocyte Migration." *Journal of Investigative Dermatology* 100(5):633–39.
- Bao, Philip, Arber Kodra, Marjana Tomic-Canic, Michael S. Golinko, H. Paul Ehrlich, and Harold Brem. 2009. "The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing." *The Journal of Surgical Research* 153(2):347–58.
- Barrientos, Stephan, Olivera Stojadinovic, Michael S. Golinko, Harold Brem, and Marjana Tomic-Canic. 2008. "PERSPECTIVE ARTICLE: Growth Factors and Cytokines in Wound Healing." *Wound Repair and Regeneration* 16(5):585–601.
- Belperio, J. A., M. P. Keane, D. A. Arenberg, C. L. Adisson, J. E. Ehlert, and Burdick M. D. 2000. "CXC Chemokines in Angiogenesis." *Journal of Leukocyte Biology* (68):1–8.
- Bennett, S. P., G. D. Griffiths, A. M. Schor, G. P. Leese, and S. L. Schor. 2003. "Growth Factors in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers." *British Journal of Surgery* 90(2):133–46.
- Bertolotti, Evelina, Davide Malagoli, and Antonella Franchini. 2013. "Skin Wound Healing in Different Aged *Xenopus Laevis*." *Journal of Morphology* 274(8):956–64.

- Bissell, Minaj and H. Glennhall. 1982. *How Does the Extracellular Matrix Direct Gene Expression?* Vol. 99.
- Bramham, C. R., P. F. Worley, M. J. Moore, J. F. Guzowski, and ; S Miller. 2008. "The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils." *Semin. Cell Dev. Biol* 28:194.
- Brock, Jane, Katie Midwinter, Julian Lewis, and Paul Martin. 1996. "Healing of Incisional Wounds in the Embryonic Chick Wing Bud: Characterization of the Actin Purse-String and Demonstration of a Requirement for Rho Activation." *Journal of Cell Biology* 135(4):1097–1107.
- Broughton, George, Janis E. Jeffrey, and Christopher E. Attinger. 2006. "The Basic Science of Wound Healing." *Surgery* 28(9):409–12.
- Brown, G. L., L. Curtsinger, J. R. Brightwell, D. M. Ackerman, G. R. Tobin, H. C. Polk, C. George-Nascimento, P. Valenzuela, and G. S. Schultz. 1986. "Enhancement of Epidermal Regeneration by Biosynthetic Epidermal Growth Factor." *The Journal of Experimental Medicine* 163(5):1319–24.
- Bullard, Kelli M., Michael T. Longaker, and H. Peter Lorenz. 2003. "Fetal Wound Healing: Current Biology." *World Journal of Surgery* 27(1):54–61.
- Burgess, W. H. and T. Maciag. 1989. "The Heparin-Binding (Fibroblast) Growth Factor Family of Proteins." *Annual Review of Biochemistry* 58(1):575–602.
- Chen, Guangchun and Jacques Robert. 2011. "Antiviral Immunity in Amphibians." *Viruses* 3(11):2065–86.
- Chen, Jianxin, Hongxia Li, Nirmala SundarRaj, and James H. C. Wang. 2007. "Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Enhances Cell Traction Force." *Cell Motility and the Cytoskeleton* 64(4):248–57.
- Chen, Peter and William C. Parks. 2009. "Role of Matrix Metalloproteinases in Epithelial Migration." *Journal of Cellular Biochemistry* 108(6):1233–43.
- Clark, Richard A. F. 1988. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*.
- Clark, Richard A. F. 2003. "Fibrin Is a Many Splendored Thing." *Journal of Investigative Dermatology* 121(5).
- Clark, Richard A. F., Fubao Lin, Doris Greiling, Jianqiang An, and John R. Couchman. 2004. "Fibroblast Invasive Migration into Fibronectin/Fibrin Gels Requires a Previously

- Uncharacterized Dermatan Sulfate-CD44 Proteoglycan.” *Journal of Investigative Dermatology* 122(2):266–77.
- Colwell, Amy S., Michael T. Longaker, and H. Peter Lorenz. 2003. “Fetal Wound Healing.” *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 8:s1240-8.
- Cowin, A. J., M. P. Brosnan, T. M. Holmes, and M. W. J. Ferguson. 1998. “Endogenous Inflammatory Response to Dermal Wound Healing in the Fetal and Adult Mouse.” *Developmental Dynamics* 212(3):385–93.
- Dang, Catherine M., Steven R. Beanes, Haofu Lee, Xinli Zhang, Chia Soo, and Kang Ting. 2003. “Scarless Fetal Wounds Are Associated with an Increased Matrix Metalloproteinase-to-Tissue-Derived Inhibitor of Metalloproteinase Ratio.” *Plastic and Reconstructive Surgery* 111(7):2273–85.
- Dang, Catherine M., Steven R. Beanes, Chia Soo, Kang Ting, Prosper Benhaim, Marc H. Hedrick, and H. Peter Lorenz. 2003. “Decreased Expression of Fibroblast and Keratinocyte Growth Factor Isoforms and Receptors during Scarless Repair.” *Plastic and Reconstructive Surgery* 111(6):1969–79.
- Delavary, Babak Mahdavian, Willem M. van der Veer, Marjolein van Egmond, Frank B. Niessen, and Robert H. J. Beelen. 2011. “Macrophages in Skin Injury and Repair.” *Immunobiology* 216(7):753–62.
- Desmoulière, A., A. Geinoz, F. Gabbiani, and G. Gabbiani. 1993. “Transforming Growth Factor-Beta 1 Induces Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts.” *The Journal of Cell Biology* 122(1):103–11.
- Desmoulière, Alexis, Antoine Geinoz, Franfoise Gabbiani, and Giulio Gabbiani. 1993. “Transforming Growth Factor-Beta 1 Induces Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Granulation Tissue Myofibroblasts and in Quiescent and Growing Cultured Fibroblasts.” *Journal of Cell Biology*.
- DiPietro, L. A. 1995. “Wound Healing: The Role of the Macrophage and Other Immune Cells.” *Shock (Augusta, Ga.)* 4(4):233–40.
- DiPietro, L. A., P. J. Polverini, S. M. Rahbe, and E. J. Kovacs. 1995. “Modulation of JE/MCP-1 mRNA Expression in Dermal Wound Repair.” *Am J Pathol* (146):868–75.
- Dlugosz, Andrzej A., Christina Cheng, Erin K. Williams, Nadine Darwiche, Peter J.

- Dempsey, Bruce Mann, Ashley R. Dunn, Robert J. Coffey, and Stuart H. Yuspa. 1995. *Autocrine Transforming Growth Factor α Is Dispensable for V-RasHa-Induced Epidermal Neoplasia: Potential Involvement of Alternate Epidermal Growth Factor Receptor Ligands*. Vol. 55.
- Ellis, Ian R. and Seth L. Schor. 1998. "DIFFERENTIAL MITOGENIC AND BIOSYNTHETIC RESPONSE OF FETAL AND ADULT SKIN FIBROBLASTS TO TGF- β ISOFORMS." *Cytokine* 10(4):281–89.
- Eming, Sabine A., Paul Martin, and Marjana Tomic-Canic. 2014. "Wound Repair and Regeneration: Mechanisms, Signaling, and Translation." *Science Translational Medicine* 6(265):265sr6.
- Endo, Tetsuya, Susan V Bryant, and David M. Gardiner. 2004. "A Stepwise Model System for Limb Regeneration." *Developmental Biology* 270(1):135–45.
- Ferguson, Mark W. J. and Sharon O’Kane. 2004. "Scar-Free Healing: From Embryonic Mechanisms to Adult Therapeutic Intervention" edited by J. P. Brockes and P. Martin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359(1445):839–50.
- Ferris, Donald R., Akira Satoh, Berhan Mandefro, Gillian M. Cummings, David M. Gardiner, and Elizabeth L. Rugg. 2010. "Ex Vivo Generation of a Functional and Regenerative Wound Epithelium from Axolotl (*Ambystoma Mexicanum*) Skin." *Development, Growth & Differentiation* 52(8):715–24.
- Freedberg, Irwin M., Marjana Tomic-Canic, Mayumi Komine, Miroslav Blumenberg, and The O. Ronald Perelman. 2001. "Keratins and the Keratinocyte Activation Cycle." *J Invest Dermatol* (116):633–40.
- Gallucci, Randle M., Dusti K. Sloan, Julie M. Heck, Anne R. Murray, and Sijy J. O’Dell. 2004. "Interleukin 6 Indirectly Induces Keratinocyte Migration." *Journal of Investigative Dermatology* 122(3):764–72.
- Godwin, James W. and Jeremy P. Brockes. 2006. "Regeneration, Tissue Injury and the Immune Response." *Journal of Anatomy* 209(4):423–32.
- Godwin, James W. and Nadia Rosenthal. 2014. "Scar-Free Wound Healing and Regeneration in Amphibians: Immunological Influences on Regenerative Success." *Differentiation* 87(1–2):66–75.

- Gordon, Ashley, Elliott D. Kozin, Sundeep G. Keswani, Sachin S. Vaikunth, Anna B. Katz, Philip W. Zoltick, Michele Favata, Antoneta P. Radu, Louis J. Soslowky, Meenhard Herlyn, and Timothy M. Crombleholme. 2008. "Permissive Environment in Postnatal Wounds Induced by Adenoviral-Mediated Overexpression of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 Prevents Scar Formation." *Wound Repair and Regeneration* 16(1):70–79.
- Gorlin, R. J. 2005. "Fibroblast Growth Factors, Their Receptors and Receptor Disorders." *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 25(2):69–79.
- Grinnell, Frederick. 1994. "Fibroblasts, Myofibroblasts, and Wound Contraction." *Journal of Cell Biology* 124(4):401–4.
- Grose, Richard and Sabine Werner. 2004. *Wound-Healing Studies in Transgenic and Knockout Mice*.
- Gurtner, Geoffrey C., Sabine Werner, Yann Barrandon, and Michael T. Longaker. 2008. "Wound Repair and Regeneration." *Nature* 453(7193):314–21.
- Gurtner, Geoffrey C., Sabine Werner, Yann Barrandon, and T. Michael Longaker. 2008. "Wound Repair and Regeneration." *NATURE* 453:314–21.
- Haisa, Minora, Hitoshi Okochi, and Gary R. Grotendorst. 1994. "Elevated Levels of PDGF α Receptors in Keloid Fibroblasts Contribute to an Enhanced Response to PDGF." *Journal of Investigative Dermatology* 103(4):560–63.
- Han, Manjong, Xiaodong Yang, Gail Taylor, Carol A. Burdsal, Rosalie A. Anderson, and Ken Muneoka. 2005. "Limb Regeneration in Higher Vertebrates: Developing a Roadmap." *Anatomical Record - Part B New Anatomist* 287(1):14–24.
- Hantash, Basil M., Longmei Zhao, Joseph A. Knowles, and H. Peter Lorenz. 2008. "Adult and Fetal Wound Healing." *New York* 3(1):51–61.
- Haynes, Jeffrey H., Danna E. Johnson, Bruce A. Mast, Robert F. Diegelmann, David A. Salzberg, I. Kelma. Cohen, and Thomas M. Krummel. 1994. "Platelet-Derived Growth Factor Induces Fetal Wound Fibrosis." *Journal of Pediatric Surgery* 29(11):1405–8.
- Heldin, Carl-henrik and Bengt Westermark. 1999. "Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor." *Physiological Reviews* 79(4):1283–1316.
- Hellsten, Uffe, Richard M. Harland, Michael J. Gilchrist, David Hendrix, Jerzy Jurka,

- Vladimir Kapitonov, Ivan Ovcharenko, Nicholas H. Putnam, Shengqiang Shu, Leila Taher, Ira L. Blitz, Bruce Blumberg, Darwin S. Dichmann, Llna Dubchak, Enrique Amaya, John C. Detter, Russell Fletcher, Daniela S. Gerhard, David Goodstein, Tina Graves, Igor V Grigoriev, Jane Grimwood, Takeshi Kawashima, Erika Lindquist, Susan M. Lucas, Paul E. Mead, Therese Mitros, Hajime Ogino, Yuko Ohta, Alexander V Poliakov, Nicolas Pollet, Jacques Robert, Asaf Salamov, Amy K. Sater, Jeremy Schmutz, Astrid Terry, Peter D. Vize, Wesley C. Warren, Dan Wells, Andrea Wills, Richard K. Wilson, Lyle B. Zimmerman, Aaron M. Zorn, Robert Grainger, Timothy Grammer, Mustafa K. Khokha, Paul M. Richardson, and Daniel S. Rokhsar. 2010. "The Genome of the Western Clawed Frog *Xenopus Tropicalis*." *Science* 328(5978):633–36.
- Henderson, James, Giorgio Terenghi, and Mark William James Ferguson. 2011. "The Reinnervation and Revascularisation Pattern of Scarless Murine Fetal Wounds." *Journal of Anatomy* 218(6):660–67.
- Herskovitz, Ingrid, Flor Macquhae, Joshua D. Fox, and Robert S. Kirsner. 2016. "Skin Movement, Wound Repair and Development of Engineered Skin." *Experimental Dermatology* 25(2):99–100.
- Hess, Arthur. 1954. "Reactions of Mammalian Fetal Tissues to Injury. II. Skin." *The Anatomical Record* 119(4):435–47.
- Hynes, Richard O. 1992. "Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion." *Cell* 69(1):11–25.
- Ignotzs, Ronald A., Jyrki Heinoq, and Joan Massague. 1989. *Regulation of Cell Adhesion Receptors by Transforming Growth Factor-Beta REGULATION OF VITRONECTIN RECEPTOR AND LFA-1**. Vol. 264.
- Jameson, Julie, Karen Ugarte, Nicole Chen, Pia Yachi, Elaine Fuchs, Richard Boismenu, and Wendy L. Havran. 2002. "A Role for Skin Gamma Delta T Cells in Wound Repair." *Science (New York, N.Y.)* 296(5568):747–49.
- Jennings, Russell W., N. Scot. Adzick, Michael T. Longaker, Brian W. Duncan, Heinz Scheuenstuhl, and Thomas K. Hunt. 1991. "Ontogeny of Fetal Sheep Polymorphonuclear Leukocyte Phagocytosis." *Journal of Pediatric Surgery* 26(7):853–55.
- Kholodenko, B. N., O. V Demin, G. Moehren, and J. B. Hoek. 1999. "Quantification of Short Term Signaling by the Epidermal Growth Factor Receptor." *The Journal of Biological*

Chemistry 274(42):30169–81.

- KLARESKOG, LARS, ULLA MALMNÄS TJERNLUND, URBAN FORSUM, and PER A. PETERSON. 1977. “Epidermal Langerhans Cells Express Ia Antigens.” *Nature* 268(5617):248–50.
- Kondo, Seiji, Takeshi Kono, Daniel N. Sauder, and Roderick C. McKenzie. 1993. “IL-8 Gene Expression and Production in Human Keratinocytes and Their Modulation by UVB.” *Journal of Investigative Dermatology* 101(5):690–94.
- Kovacs, Elizabeth J. 1991. “Fibrogenic Cytokines: The Role of Immune Mediators in the Development of Scar Tissue.” *Immunology Today* 12(1):17–23.
- Kupper, TS, EA Deitch, CC Baker, and WC Wong. 1986. “The Human Burn Wound as a Primary Source of Interleukin-1 Activity.” *Surgery* 100(2):409–15.
- Lafleur, Marc A., Madeleine M. Handsley, and Dylan R. Edwards. 2003. “Metalloproteinases and Their Inhibitors in Angiogenesis.” *Expert Reviews in Molecular Medicine* 5(23):1–39.
- Leung, Alice, Timothy M. Crombleholme, and Sundeep G. Keswani. 2012. “Fetal Wound Healing: Implications for Minimal Scar Formation.” *Curr Opin Pediatr* 24(3):371–78.
- Levenson, S. M., E. F. Geever, L. V. Crowley, J. F. Oates, C. W. Berard, and H. Rosen. 1965. “THE HEALING OF RAT SKIN WOUNDS.” *Annals of Surgery* 161:293–308.
- Levesque, Mathieu, Éric Villiard, and Stéphane Roy. 2010. “Skin Wound Healing in Axolotls: A Scarless Process.” *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 314 B(8):684–97.
- Liechty, K. W., T. M. Crombleholme, D. L. Cass, B. Martin, and N. S. Adzick. 1998. “Diminished Interleukin-8 (IL-8) Production in the Fetal Wound Healing Response.” *The Journal of Surgical Research* 77(1):80–84.
- Liechty, Kenneth W., N. Scot. Adzick, and Timothy M. Crombleholme. 2000. “DIMINISHED INTERLEUKIN 6 (IL-6) PRODUCTION DURING SCARLESS HUMAN FETAL WOUND REPAIR.” *Cytokine* 12(6):671–76.
- Lin, Richard Y., Kerry M. Sullivan, Peter A. Argenta, Martin Meuli, H. Peter Lorenz, and N. Scott Adzick. 1995. “Exogenous Transforming Growth Factor-Beta Amplifies Its Own Expression and Induces Scar Formation in a Model of Human Fetal Skin Repair.” *Annals*

of Surgery 222(2):146–54.

- Longaker, M. T., D. J. Whitby, N. S. Adzick, T. M. Crombleholme, J. C. Langer, B. W. Duncan, S. M. Bradley, R. Stern, M. W. Ferguson, and M. R. Harrison. 1990. “Studies in Fetal Wound Healing, VI. Second and Early Third Trimester Fetal Wounds Demonstrate Rapid Collagen Deposition without Scar Formation.” *Journal of Pediatric Surgery* 25(1):63–68; discussion 68-9.
- Lorenz, H. Peter and N. Scott Adzick. 1993. “Scarless Skin Wound Repair in the Fetus.” *Western Journal of Medicine* 159:350–55.
- Lucas, Tina, Ari Waisman, Rajeev Ranjan, Jürgen Roes, Thomas Krieg, Werner Müller, Axel Roers, and Sabine A. Eming. 2010. “Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair.” *The Journal of Immunology* 184(7):3964–77.
- Martin, P. 1997. “Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration.” *Science (New York, N.Y.)* 276(5309):75–81.
- Massagué, Joan, Liliana Attisano, and Jeffrey L. Wrana. 1994. “The TGF- β Family and Its Composite Receptors.” *Trends in Cell Biology* 4(5):172–78.
- Mast, Bruce A., Robert F. Diegelmann, Thomas M. Krummel, L. Kelman Cohen, and Virginia Richmond. 1992. “Scarless Wound Healing in the Mammalian Fetus.” *Surgery Gynecology and Obstetrics* 174(5):441–51.
- McCallion, R. L. and M. W. J. Ferguson. 1988. “Fetal Wound Healing and the Development of Antiscarring Therapies for Adult Wound Healing.” Pp. 561–600 in *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Boston, MA: Springer US.
- McDonald, John A., Diane G. Kelley, and Thomas J. Broekelmann. 1982. “Role of Fibronectin in Collagen Deposition: Fab to the Gelatin- Binding Domain of Fibronectin Inhibits Both Fibronectin and Collagen Organization in Fibroblast Extracellular Matrix.” *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 92:485–92.
- Merkel, J. R., B. R. DiPaolo, G. G. Hallock, and D. C. Rice. 1988. “Type I and Type III Collagen Content of Healing Wounds in Fetal and Adult Rats.” *Experimental Biology and Medicine* 187(4):493–97.
- Mescher, Anthony L., Byron H. Hartman, Evelyn T. Nguyen, Anton W. Neff, Wendy L. Wolf, E. Ashley Moseman, Byron Hartman, Clint Harrison, and Evelyn Nguyen. 2007. “Cells of Cutaneous Immunity in *Xenopus*: Studies during Larval Development and

- Limb Regeneration.” *Developmental and Comparative Immunology* 31:383–93.
- Mescher, Anthony L. and Anton W. Neff. 2005. “Regenerative Capacity and the Developing Immune System.” *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 93:39–66.
- Mescher, Anthony L. and Anton W. Neff. 2006. “Limb Regeneration in Amphibians: Immunological Considerations.” *Review Article Limb and Fin Regeneration TheScientificWorldJOURNAL* 6(S1):1–11.
- Micallef, Ludovic, Nicolas Vedrenne, Fabrice Billet, Bernard Coulomb, Ian A. Darby, and Alexis Desmoulière. 2012. *The Myofibroblast, Multiple Origins for Major Roles in Normal and Pathological Tissue Repair*.
- Mold, Jeff E., Shivkumar Venkatasubrahmanyam, Trevor D. Burt, Jakob Michaëlsson, Jose M. Rivera, Sofiya A. Galkina, Kenneth Weinberg, Cheryl A. Stoddart, and Joseph M. McCune. 2010. “Fetal and Adult Hematopoietic Stem Cells Give Rise to Distinct T Cell Lineages in Humans.” *Science* 330(6011):1695–99.
- Moyer, Adam L. and Kathryn R. Wagner. 2011. “Regeneration versus Fibrosis in Skeletal Muscle.” *Current Opinion in Rheumatology* 23(6):568–73.
- Murphy, Jo-Ellen, Caroline Robert, and Thomas S. Kupper. 2000. “Interleukin-1 and Cutaneous Inflammation: A Crucial Link Between Innate and Acquired Immunity.” *Journal of Investigative Dermatology* 114(3):602–8.
- Nanney, Lillian B., James A. McKanna, Christa M. Stoscheck, Graham Carpenter, and Lloyd E. King. 1984. *Visualization of Epidermal Growth Factor Receptors in Human Epidermis**. Vol. 82.
- Neufeld, Daniel A., Frances A. Day, and Harry E. Settles. 1996. “Stabilizing Role of the Basement Membrane and Dermal Fibers during Newt Limb Regeneration.” *Anatomical Record* 245(1):122–27.
- Newman, Simon L., Janet E. Henson, and Peter M. Henson. 1982. “Phagocytosis of Senescent Neutrophils by Human Monocyte-Derived Macrophages and Rabbit Inflammatory Macrophages.” *Journal of Experimental Medicine* 156(2):430–42.
- Nowoshilow, Sergej, Siegfried Schloissnig, Ji-Feng Fei, Andreas Dahl, Andy W. C. Pang, Martin Pippel, Sylke Winkler, Alex R. Hastie, George Young, Juliana G. Roscito, Francisco Falcon, Dunja Knapp, Sean Powell, Alfredo Cruz, Han Cao, Bianca Habermann, Michael Hiller, Elly M. Tanaka, and Eugene W. Myers. 2018. “The Axolotl

- Genome and the Evolution of Key Tissue Formation Regulators.” *Nature* 554(7690):50–55.
- O’Kane, Sharon and Mark W. J. Ferguson. 1997. “Transforming Growth Factor Bs and Wound Healing.” *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29(1):63–78.
- Occleston, Nick L., Hugh G. Lavery, and Mark W. J Ferguson. 2008. “Prevention and Reduction of Scarring in the Skin by Transforming Growth Factor Beta 3 (TGFβ3): From Laboratory Discovery to Clinical Pharmaceutical.” *Journal of Biomaterials Science*.
- Oda, Kanae, Yukiko Matsuoka, Akira Funahashi, and Hiroaki Kitano. 2005. “A Comprehensive Pathway Map of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling.” *Molecular Systems Biology* 1:2005.0010.
- Opalenik, Susan R. and Jeffrey M. Davidson. 2005. “Fibroblast Differentiation of Bone Marrow-Derived Cells during Wound Repair.” *The FASEB Journal* 19(11):1561–63.
- Ornitz DM. 2000. “FGFs, Heparan Sulfate and FGFRs: Complex Interactions Essential for Development.” *Bioessays* 22:108–12.
- Otsuka-Yamaguchi, Rina, Aiko Kawasumi-Kita, Nanako Kudo, Yumi Izutsu, Koji Tamura, and Hitoshi Yokoyama. 2017. “Cells from Subcutaneous Tissues Contribute to Scarless Skin Regeneration in *Xenopus Laevis* Froglets.” *Developmental Dynamics* 246(8):585–97.
- Powers, C. J., S. W. McLeskey, and A. Wellstein. 2000. “Fibroblast Growth Factors and Their Receptors.” *Endocrine-Related Cancer* 7:165–97.
- Prockop, Darwin J. and Joo Youn Oh. 2012. “Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of Inflammation.” *Molecular Therapy* 20(1):14–20.
- Raja, K. Sivamani, Miki Shirakawa Garcia, and RR Isseroff. 2007. *Wound Re-Epithelialization: Modulating Keratinocyte Migration in Wound Healing*. Vol. 12.
- Robert, Jacques, Nicholas Cohen, Jucijuk Rebert, Michoios Cohen, and Jacques Robert Box. 1998. *Evolution of Immune Surveillance and Tumor Immunity: Studies in Xenopus*. Vol. 166.
- Roberts, Anita B., Michael B. Sporn, Richard K. Assoian, Joseph M. Smith, Nanette S.

- Roche, Lalage M. Wakefield, Ursula I. Heine, Lance A. Liotra, Vincent Falangat, John H. Kehrl, and Anthony S. Faucit. 1986. *Transforming Growth Factor Type (Beta): Rapid Induction of Fibrosis and Angiogenesis in Vivo and Stimulation of Collagen Formation in Vitro*. Vol. 83.
- Rubin, Jeffrey S., Hiroyuki Osada, Paul W. Finch, William G. Taylor, Stuart Rudikoff, and Stuart A. Aaronson. 1989. *Purification and Characterization of a Newly Identified Growth Factor Specific for Epithelial Cells (Mitogen/Keratinocyte/Protein Purification/Heparin Binding/N-Terminal Sequence)*. Vol. 86.
- Satish, Latha, Sandra Johnson, James H. C. Wang, J. Christopher Post, Garth D. Ehrlich, and Sandeep Kathju. 2010. "Chaperonin Containing T-Complex Polypeptide Subunit Eta (CCT-Eta) Is Specific Regulator of Fibroblast Motility and Contractility." *PLoS ONE* 5(4):10063.
- Satish, Latha and Sandeep Kathju. 2010. "Cellular and Molecular Characteristics of Scarless versus Fibrotic Wound Healing." *Dermatology Research and Practice* 2010(1):11.
- Satoh, Akira, David M. Gardiner, Susan V. Bryant, and Tetsuya Endo. 2007. "Nerve-Induced Ectopic Limb Blastemas in the Axolotl Are Equivalent to Amputation-Induced Blastemas." *Developmental Biology* 312(1):231–44.
- Schempp, Christoph, Matthias Emde, and Ute Wolfle. 2009. "Dermatology in the Darwin Anniversary. Part 1: Evolution of the Integument." *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 7(9):750–57.
- Schlesinger, J. and A. Ullricht. 1992. *Growth Factor Signaling by Receptor Tyrosine Kinases Review*. Vol. 9.
- Schultz, Gregory, Warren Clark, and D. Scott Rotatori. 1991. "EGF and TGF- α in Wound Healing and Repair." *Journal of Cellular Biochemistry* 45(4):346–52.
- Schultz, Gregory S., Jeffrey M. Davidson, Robert S. Kirsner, Paul Bornstein, and Ira M. Herman. 2011. "Dynamic Reciprocity in the Wound Microenvironment." *Wound Repair and Regeneration* 19(2):134–48.
- Scott Adzick, N., Michael R. Harrison, Philip L. Glick, Jay H. Beckstead, Robin L. Villa, Heinz Scheuenstuhl, and William H. Goodson. 1985. "Comparison of Fetal, Newborn, and Adult Wound Healing by Histologic, Enzyme-Histochemical, and Hydroxyproline Determinations." *Journal of Pediatric Surgery* 20(4):315–19.

- Seifert, Ashley W., James R. Monaghan, S. Randal Voss, and Malcolm Maden. 2012a. “Skin Regeneration in Adult Axolotls: A Blueprint for Scar-Free Healing in Vertebrates” edited by Z. Zhou. *PLoS ONE* 7(4):e32875.
- Seifert, Ashley W., James R. Monaghan, S. Randal Voss, and Malcolm Maden. 2012b. “Skin Regeneration in Adult Axolotls: A Blueprint for Scar-Free Healing in Vertebrates” edited by Z. Zhou. *PLoS ONE* 7(4):e32875.
- Seifert, Ashley W., James R. Monaghan, S. Randal Voss, and Malcolm Maden. 2012c. “Skin Regeneration in Adult Axolotls: A Blueprint for Scar-Free Healing in Vertebrates” edited by Z. Zhou. *PLoS ONE* 7(4):e32875.
- SELBY, C. C. 1955. “An Electron Microscope Study of the Epidermis of Mammalian Skin in Thin Sections. I. Dermo-Epidermal Junction and Basal Cell Layer.” *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 1(5):429–44.
- Session, Adam M., Yoshinobu Uno, Taejoon Kwon, Jarrod A. Chapman, Atsushi Toyoda, Shuji Takahashi, Akimasa Fukui, Akira Hikosaka, Atsushi Suzuki, Mariko Kondo, Simon J. van Heeringen, Ian Quigley, Sven Heinz, Hajime Ogino, Haruki Ochi, Uffe Hellsten, Jessica B. Lyons, Oleg Simakov, Nicholas Putnam, Jonathan Stites, Yoko Kuroki, Toshiaki Tanaka, Tatsuo Michiue, Minoru Watanabe, Ozren Bogdanovic, Ryan Lister, Georgios Georgiou, Sarita S. Paranjpe, Ila van Kruijsbergen, Shengquiang Shu, Joseph Carlson, Tsutomu Kinoshita, Yuko Ohta, Shuuji Mawaribuchi, Jerry Jenkins, Jane Grimwood, Jeremy Schmutz, Therese Mitros, Sahar V. Mozaffari, Yutaka Suzuki, Yoshikazu Haramoto, Takamasa S. Yamamoto, Chiyo Takagi, Rebecca Heald, Kelly Miller, Christian Haudenschield, Jacob Kitzman, Takuya Nakayama, Yumi Izutsu, Jacques Robert, Joshua Fortriede, Kevin Burns, Vaneet Lotay, Kamran Karimi, Yuuri Yasuoka, Darwin S. Dichmann, Martin F. Flajnik, Douglas W. Houston, Jay Shendure, Louis DuPasquier, Peter D. Vize, Aaron M. Zorn, Michihiko Ito, Edward M. Marcotte, John B. Wallingford, Yuzuru Ito, Makoto Asashima, Naoto Ueno, Yoichi Matsuda, Gert Jan C. Veenstra, Asao Fujiyama, Richard M. Harland, Masanori Taira, and Daniel S. Rokhsar. 2016. “Genome Evolution in the Allotetraploid Frog *Xenopus Laevis*.” *Nature* 538(7625):336–43.
- Shah Mamta, Mark W. J. Ferguson, and Rorison. 2000. *The Role of Transforming Growth Factors Beta in Cutaneous Scarring*. edited by Garg H. G. and M. T. Longaker. New York: Marcel Dekker Inc.

- Shah Mamta, Foreman David M., and Ferguson Mark W. J. 1994. "Neutralising Antibody to TGF β 1,2 Reduces Cutaneous Scarring in Adult Rodents." *Journal of Cell Science* 1137–57.
- Shah Mamta, Foreman David M., and Ferguson Mark W. J. 1995. "Neutralisation of TGF-Beta1 and TGF-Beta2 or Exogenous Addition of TGF- Beta3 to Cutaneous Rat Wounds Reduces Scarring." *Journal of Cell Science* (108):985–1002.
- Shaw, R. J., D. E. Doherty, A. G. Ritter, S. H. Benedict, and R. A. E. Clark. 1990. *Adherence-Dependent Increase in Human Monocyte PDGF(B) MRNA Is Associated with Increases in c-Fos, c-Jun, and EGR2 MRNA.*
- Shirakata Yuji, Kimura Rina, Nanba Daisuke, Iwamoto Ryo, Tokumaru Sho, Morimoto Chie, Yokota Koichi, Nakamura Masanori, Sayama Koji, Mekada Eisuke, Higashiyama Shigeki and, and Hashimoto Koji. 2005. "Heparin-Binding EGF-like Growth Factor Accelerates Keratinocyte Migration and Skin Wound Healing." *Journal of Cell Science* 118, 2363-2370 Published by The Company of Biologists 2005.
- Sindrilaru, Anca, Thorsten Peters, Jürgen Schymeinsky, Tsvetelina Oreshkova, Honglin Wang, Anne Gompf, Francesca Mannella, Meinhard Wlaschek, Cord Sunderkö Tter, Karl Lenhard Rudolph, Barbara Walzog, Xosé R. Bustelo, Klaus D. Fischer, and Karin Scharffetter-Kochanek. 2009. "Wound Healing Defect of Vav3 -/- Mice Due to Impaired β 2 -Integrin-Dependent Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils." *Blood* 113(21):5266–76.
- Singer, Adam J. and Richard A. F. Clark. 1999a. "Cutaneous Wound Healing" edited by F. H. Epstein. *New England Journal of Medicine* 341(10):738–46.
- Singer, Adam J. and Richard A. F. Clark. 1999b. "Cutaneous Wound Healing" edited by F. H. Epstein. *New England Journal of Medicine* 341(10):738–46.
- Soo, Chia, Steven R. Beanes, Fei-Ya Hu, Xinli Zhang, Catherine Dang, Grace Chang, Yubert Wang, Ichiro Nishimura, Earl Freymiller, Michael T. Longaker, H. Peter Lorenz, and Kang Ting. 2003. "Ontogenetic Transition in Fetal Wound Transforming Growth Factor- β Regulation Correlates with Collagen Organization." *The American Journal of Pathology* 163(6):2459–76.
- Stefater, James A., Shuyu Ren, Richard A. Lang, and Jeremy S. Duffield. 2011. "Metchnikoff's Policemen: Macrophages in Development, Homeostasis and

- Regeneration.” *Trends in Molecular Medicine* 17(12):743–52.
- Steffensen, Bjorn and Lari Hakkinen. 2001. “PROTEOLYTIC EVENTS OF WOUND-HEALING- COORDINATED INTERACTIONS AMONG MATRIX METALLOPROTEINASES (MMPs), INTEGRINS AND EXTRACELLULAR MATRIX MOLECULES.” 12(5):373–98.
- Stocum, David L. 2012. “Repair of Skin by Fibrosis.” *Regenerative Biology and Medicine* 21–42.
- Suzuki, Makoto, Akira Satoh, Hiroyuki Ide, and Koji Tamura. 2005. “Nerve-Dependent and -Independent Events in Blastema Formation during *Xenopus* Froglet Limb Regeneration.” *Developmental Biology* 286(1):361–75.
- Suzuki, Makoto, Nayuta Yakushiji, Yasuaki Nakada, Akira Satoh, Hiroyuki Ide, and Koji Tamura. 2006. “Limb Regeneration in *Xenopus Laevis* Froglet.” *TheScientificWorldJournal* 6(SUPPL.1):26–37.
- Takeo, Makoto, Wendy Lee, and Mayumi Ito. 2015. “Wound Healing and Skin Regeneration.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(1).
- Tonnesen, Marcia G., Xiaodong Feng, and Richard A. F. Clark. 2000. “Angiogenesis in Wound Healing.” *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 5(1):40–46.
- Truong, Hoa and Erik H. J. Danen. 2009. “Integrin Switching Modulates Adhesion Dynamics and Cell Migration.” *Cell Adhesion & Migration* 3(2):179–81.
- Tuschil, Andrea, Charles Lam, Alexander Haslberger, and Ivan Lindley. 1992. “Interleukin-8 Stimulates Calcium Transients and Promotes Epidermal Cell Proliferation.” *J Invest Dermatol* (99):294–98.
- Varga, John, Joel Rosenbloom, and Sergio A. Jimenez. 1987. *Transforming Growth Factor (TGF β) Causes a Persistent Increase in Steady-State Amounts of Type I and Type III Collagen and Fibronectin MRNAs in Normal Human Dermal Fibroblasts*. Vol. 247.
- Verstappen, Jochem, Christos Katsaros, Anne Marie Kuijpers-Jagtman, Ruurd Torensma, and Johannes W. Von Den Hoff. 2011. “The Recruitment of Bone Marrow-Derived Cells to Skin Wounds Is Independent of Wound Size.” *Wound Repair and Regeneration* 19(2):260–67.

- Watanabe, Yoshifumi, Sam W. Lee, Michael Detmar, Itsuki Ajioka, and Harold F. Dvorak. 1997. "Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor (VPF/ VEGF) Delays and Induces Escape from Senescence in Human Dermal Microvascular Endothelial Cells." *Oncogene* 14(17):2025–32.
- Weiss, J., P. Elsbach, C. Shu, J. Castillo, L. Grinna, A. Horwitz, and G. Theofant. 1992. "Human Bactericidal/Permeability-Increasing Protein and a Recombinant NH₂-Terminal Fragment Cause Killing of Serum-Resistant Gram-Negative Bacteria in Whole Blood and Inhibit Tumor Necrosis Factor Release Induced by the Bacteria." *Journal of Clinical Investigation* 90(3):1122–30.
- Wernes, Sabine and Richard Grose. 2003. "Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines." *Physiological Reviews* 83(2):835–70.
- Whitby David J and Mark W. J. Ferguson. 1991. *The Extracellular Matrix of Lip Wounds in Fetal, Neonatal and Adult Mice*. Vol. 112.
- White, Lori A., Teresa I. Mitchell, and Constance E. Brinckerhoff. 2000. "Transforming Growth Factor β Inhibitory Element in the Rabbit Matrix Metalloproteinase-1 (Collagenase-1) Gene Functions as a Repressor of Constitutive Transcription." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1490(3):259–68.
- Wilgus, Traci A., Ahalia M. Ferreira, Tatiana M. Oberyszyn, Valerie K. Bergdall, and Luisa A. Dipietro. 2008. "Regulation of Scar Formation by Vascular Endothelial Growth Factor." *Lab Invest* 88(6):579–90.
- Witte, M. B. and A. Barbul. 1997. "General Principles of Wound Healing." *The Surgical Clinics of North America* 77(3):509–28.
- Wood, Ladonna C., Peter M. Elias, Cornelia Calhoun, Janice C. Tsai, Carl Grunfeld, and Kenneth R. Feingold. 1996. "Barrier Disruption Stimulates Interleukin-1 α Expression and Release from a Pre-Formed Pool in Murine Epidermis." *Journal of Investigative Dermatology* 106(3):397–403.
- Wulff, Brian C., Allison E. Parent, Melissa A. Meleski, Luisa A. DiPietro, Megan E. Schrementi, and Traci A. Wilgus. 2012. "Mast Cells Contribute to Scar Formation during Fetal Wound Healing." *Journal of Investigative Dermatology* 132(2):458–65.
- Yokoyama, Hitoshi, Nanako Kudo, Momoko Todate, Yuri Shimada, Makoto Suzuki, and Koji Tamura. 2018. "Skin Regeneration of Amphibians: A Novel Model for Skin

Regeneration as Adults.” *Development, Growth & Differentiation* 60(6):316–25.

Yokoyama, Hitoshi, Tamae Maruoka, Akio Aruga, Takanori Amano, Shiro Ohgo, Toshihiko Shiroishi, and Koji Tamura. 2011. “Prx-1 Expression in *Xenopus Laevis* Scarless Skin-Wound Healing and Its Resemblance to Epimorphic Regeneration.” *Journal of Investigative Dermatology* 131(12):2477–85.

Yousef, Hani, Mandy Alhajj, and Sandeep Sharma. 2019. *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. StatPearls Publishing.

Zeng, Guangyuan, Heather M. Mccue, Laura Mastrangelo, and Albert J. T. Millis. 1996. “Endogenous TGF- β Activity Is Modified during Cellular Aging: Effects on Metalloproteinase and TIMP-1 Expression.” *Experimental Cell Research* 228(2):271–76.