

## CELULELE STEM ÎN PROCESUL DE VINDECARE A RĂNILOR CUTANATE

### STEM CELLS INVOLVEMENT IN THE PROCESS OF CUTANEOUS WOUND HEALING

M. ALECU<sup>\*,\*\*</sup>, COMAN GABRIELA<sup>\*</sup>, IONICA RĂDULESCU<sup>\*\*</sup>, ALINA MUȘETESCU<sup>\*,\*\*</sup>, MARIA GRIGORE<sup>\*</sup>, MIRELA PETRESCU<sup>\*</sup>, OANA ANDREIA COMAN<sup>\*,\*\*\*</sup>

#### Rezumat

Vindecarea rănilor reprezintă un proces secvențial cu participare celulară și biochimică care tinde să refacă parțial sau total țesuturile distruse.

Celulele stem din țesuturi, care realizează în condiții normale homeostazia țesutului respectiv reprezintă elementul celular cel mai important în refacerea țesuturilor distruse.

În cazul pielii, participă la refacerea țesutului distrus celulele stem epidermice (interfoliculare sau din regiunea nișei), celulele stem mezenchimale (celule stem derivate din măduva osoasă, celulele stem mezenchimale propriu-zise celule stem derivate din adipocite), celulele stem melanocitare (din regiunea nișei).

Numeroși factori de creștere și citokine ca și o serie de factori microambientali modulează activitatea celulelor stem din piele atât a celulelor stem unipotente cât și a celulelor stem multipotente din regiunea nișei sau a celulelor stem derivate din măduva osoasă. De asemenea există numeroase procese în care sunt asociate celulele stem (migrarea, tranziția mezenchimal epitelială) care favorizează vindecarea rănilor.

Cunoașterea acțiunii celulelor stem în procesul de vindecare a rănilor deschide perspective terapeutice importante în medierea regenerativă. Pe de altă parte asemănările care există între procesul de vindecare a rănilor

#### Summary

Wound healing represents a sequential process, with cellular and biochemical participation, seeking to partially or totally recover damaged tissues. Tissue stem cells achieve homeostasis in normal conditions and are the most important cellular element in restoring damaged tissues.

In skin, epidermal stem cells (interfollicular or niche cells), mesenchymal (bone marrow - derived, actual mesenchymal, adipose - derived stem cells) and melanocytic stem cells (from the niche region) contribute in rebuilding the tissue.

Various growth factors and cytokines as well as a number of micro-environmental factors modulate the activity of stem cells in the skin, such as unipotent stem cells, niche multipotent stem cells and bone marrow - derived stem cells. Also, there are many processes that are associated with stem cells (migration, epithelial mesenchymal transition) which support wound healing.

Knowing the action of stem cells in wound healing, opens important therapeutic perspectives in regenerative mediation. On the other hand, the similarities between wound healing - carcinogenesis and stem cells cycle in these processes create the opportunity to

\* Spitalul de Boli Infecțioase și Tropicale Dr. „Victor Babeș”, București.  
“Dr. Victor Babeș” Infectious and Tropical Diseases Hospital, Bucharest  
\*\* Universitatea Titu Maiorescu, Facultatea de Medicină, București.  
“Titu Maiorescu University”, Faculty of Medicine, Bucharest.  
\*\*\* Universitatea „Carol Davila”, Catedra de Dermatologie, București.  
“Carol Davila University”, Department of Dermatology, Bucharest.

*și carcinogeneză și ciclul celulelor stem în aceste procese face ca să se acumuleze noi date necesare în înțelegerea ambelor procese.*

**Cuvinte cheie:** vindecarea rănilor, piele, celule stem.

Intrat în redacție: 17.12.2015

Acceptat: 18.01.2016

*accumulate new data contributing to the understanding of both processes.*

**Key words:** wound healing, skin, stem cells.

Received: 17.12.2015

Accepted: 18.01.2016

Vindecarea rănilor reprezintă un proces complex de restructurare morfologică și funcțională a țesutului afectat în care sunt implicate numeroase celule din circulația sanguină.

Vindecarea rănilor este un proces desfășurat în cascadă, într-o succesiune strictă, unidirecționată, de faze, dar cu numeroase elemente de feedback și feedforward care sunt influențate de țesutul afectat, ca și de microambientul plăgii [1].

### Aspecte clasice ale vindecării rănilor

În procesul de vindecare a rănilor s-au identificat până în prezent următoarele faze: faza inflamatorie, faza proliferativă și faza de remodelare [1,2].

**Faza inflamatorie.** Reprezintă prima fază a procesului de vindecare a rănilor care începe imediat după traumatism. Este faza în care organismul încearcă să oprească sau să limiteze pierderea de sânge și ulterior să consolideze oprirea pierderii de sânge. Inițial la locul plăgii ajung plachetele din sânge (trombocitele) care secretă trombină (serin protează) și care transformă fibrinogenul plasmatic în fibrinogen insolubil formându-se astfel cheagul. Plachetele secretă o serie de factori ca: PDGF, TGF $\beta$ , trombospondină, factorul von Willebrand și induc totodată eliberarea de citokine din monocite: IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , factorul chemotactic pentru plachete și neutrofile, care spre sfârșitul acestei faze predomină numeric. Aceste celule distrug bacteriile și secretă proteaze care distrug țesutul lezat. Odată cu neutrofilele ajung la nivelul plăgii și limfocitele T care secretă citokine și factori de creștere care activează macrofagele [3,4,5,6].

**Faza proliferativă.** Oprirea pierderii de sânge face ca procesul de vindecare a rănilor să treacă într-o nouă fază în care are loc o proliferare

Wound healing is a complex functional and morphological restructuration process of the affected tissue that involves numerous cells from the bloodstream. This process takes place in a cascade manner, in a strict sequence of unidirectional phases, but with many feedback and feed forward elements that are influenced by the affected tissue as well as by the wound micro-environment [1].

### Classical aspects of wound healing

So far, in the wound healing process, the following phases were identified: inflammation, proliferation, and remodeling [1,2].

**The inflammatory phase.** Represents the first phase that begins immediately after wounding. It is the phase in which the organism tries to stop or limit blood loss and further to consolidate the stopping of blood loss. Initially the wound site is reached by blood platelets which secrete thrombin (serine protease) that converts plasma fibrinogen into insoluble fibrinogen so that the clot is formed. Platelets secrete a number of factors such as PDGF, TGF $\beta$ , thrombospondin, von Willebrand factor and induces at the same time the release of cytokines from monocytes: IL-6, IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , chemotactic factor for platelets and neutrophils, which by the end of this phase will predominate. Neutrophils destroy bacteria and secrete proteases that clear the cellular debris in the wound area. T-lymphocytes migrate into wounds following neutrophils and secrete cytokines and growth factors that activate the macrophages [3,4,5,6].

**The proliferative phase.** Stopping blood loss turns the process of wound healing into a new phase in which cells proliferate as it happens in the skin with the proliferation of keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells.

Keratinocytes proliferate and migrate from the wound edges inward, suffering a series of

celulară respectiv în cadrul pielii a keratinocitelor fibroblastelor dar și a celulelor endoteliale.

Keratinocitele proliferază și migrează de la marginile plăgii spre interior, suferind o serie de modificări morfologice ca retracția tonofilamentelor, ruperea legăturilor desmozomale, formarea filamentelor periferice intracelulare de actină. Numeroși factori promovează migrarea keratinocitelor cum ar fi: fibronectina, colagenul IV, colagenul de tip I denaturat, TGF $\beta$ , EGF (factorul de creștere epidermal) și alți factori: laminina sau colagenul IV și VII din membrana bazală. Reconstrucția membranei bazale reprezintă un semnal puternic de oprire a migrării keratinocitelor. Adeziunea keratinocitelor necesară fixării acestora după oprirea migrării este asigurată de integrine respectiv alfa și beta intergine [1,3,5,7].

Odată cu migrarea keratinocitelor are loc și proliferarea fibroblastelor și a celulelor endoteliale.

Fibroblastele proliferază, migrează spre centrul plăgii și produc componentele țesutului conjunctiv, respectiv colagenul, proteoglicanii, elastina și alte tipuri de proteine matriceale. Fibroblastele migrează utilizând fibronectina din cheag, ulterior ele producând fibronectină și celelalte componente matriceale [1,5,8,9].

Celulele endoteliale suferă o serie de modificări care le permit să migreze din periferie spre centrul plăgii, să prolifereze și să formeze vase de sânge de neoformație. Migrarea celulelor endoteliale se face pe un țesut conjunctiv constituit și este dependentă de numeroase semnale chimice și de contact cu matrixul extracelular nou format.

Celulele endoteliale au și un rol activ în faza inflamatorie producând o serie de factori care limitează agregarea plachetară și formarea cheagului. Macrofagele stimulate de oxigenarea scăzută, produc factori angiogenetici ca: TGF $\beta$ , EGF. De asemenea, receptorii pentru integrine în special  $\alpha\beta_3$  stimulează angiogeneza [1,3,6,8].

În afară de migrarea keratinocitelor și a fibroblastelor, faza proliferativă cuprinde mai multe procese: angiogeneza, fibroplazia (formarea țesutului de granulație) formarea matrixului dermal și reepitelizarea, care în final duc la formarea țesutului de granulație [1,2].

În această fază are loc o formare masivă de țesut de granulație care începe în finalul fazei

morphological changes such as tonofilaments retraction, breaking of desmosomes bindings, forming peripheral intracellular actin filaments. Many factors promote keratinocyte migration, such as: fibronectin, collagen IV, type I denatured collagen, TGF $\beta$ , EGF (epidermal growth factor), and other factors: laminine or collagen IV and VII in the basal membrane. Reconstruction of the basal membrane is a strong signal to stop the migration of keratinocytes. Keratinocytes adhesion, needed for their fixing, after the arrest of their migration, is ensured by alpha and beta integrin [1,3,5,7].

Together with the migration and proliferation of keratinocytes, fibroblasts and endothelial cells proliferate also.

Fibroblasts proliferate, migrate toward the center of the wound and produce connective tissue components, namely collagen, proteoglycans, elastin and other matrix proteins. Fibroblasts migrate using the fibronectin from the clot, and then they itself produce fibronectin and other matrix components [1,5,8,9].

Endothelial cells undergo several changes that enable them to migrate from the periphery to the center of the wound, to proliferate and form neoformation blood vessels. The migration of endothelial cells is done on a constitutive conjunctive tissue and is dependent on many chemical signals and on the contact with the newly formed extracellular matrix. Endothelial cells have some characteristics and an active role in the inflammatory phase producing a number of factors which limit platelet aggregation and clot formation. Macrophages stimulated by low oxygenation produce angiogenic factors such as TGF $\beta$  and EGF. They also produce integrin receptors,  $\alpha\beta_3$  in particular, which stimulates angiogenesis [1,3,6,8].

In addition to the migration of keratinocytes and fibroblasts, the proliferative phase consists of several processes: angiogenesis, fibroplasia (the formation of the granulation tissue), formation of the dermal matrix and reepithelization that ultimately results in the formation of granulation tissue. [1,2].

In the proliferation phase there is a massive formation of granulation tissue that begins at the end of the inflammatory phase and ends by fully covering the wound. The granulation tissue is a

inflamatorii și se sfârșește odată cu acoperirea în întregime a plăgii cu acest țesut. Țesutul de granulație este un țesut provizoriu cu o funcționalitate redusă care ulterior va fi remodelat dar crează condițiile de reepitelizare a plăgii [5,9,10].

Angiogeneza presupune migrarea și proliferarea celulelor endoteliale de la marginea plăgii spre interior cu formarea de noi vase de sânge. Celulele endoteliale sunt atrase spre centrul plăgii prin intermediul unor factori chemotactici produși de , hipoxie, acid lactic, dar și de fibronectină[4,6].

Simultan cu migrarea celulelor endoteliale are loc și migrarea și proliferarea fibroblastelor din țesutul sănătos din jurul plăgii prin intermediul fibrelor de fibrină și a fibronectinei. Fibroblastele, prin depozitarea de diverse componente ale matrixului extracelular, ulterior al colagenului, realizând un matrix extracelular provizoriu prin secreția de colagen I, fibronectina, glicozaminoglicani (GAG) și ale altor componente ale matrixului țesutului conjunctiv [1,2].

Țesutul de granulație nou format este un țesut rudimentar care diferă de țesutul conjunctiv normal. Conține mai multă fibronectină și acid hialuronic ceea ce duce la o hidratare a matrixului extracelular facilitând astfel migrarea celulară în special a keratinocitelor [2,3].

Keratinocitele migrează în plagă la câteva ore de la traumatism fiind o mișcare asociată cu o proliferare redusă, dar adevărata reepitelizare se realizează după formarea țesutului de granulație când este distrusă membrana bazală. Reepitelizarea plăgii se face pe seama keratinocitelor bazale de la nivelul foliculilor piloși și a glandelor sebacee [5,11]. În cazul în care nu este distrusă membrana bazală, reepitelizarea se face pe seama proliferării și migrării keratinocitelor din stratul bazal al marginilor plăgii [3,10] .

Transformările pe care le suferă keratinocitele în timpul migrării cuprind atât aspecte morfologice (formarea de lamelipodii, formarea de pseudopode, ruperea desmozomilor, formarea filamentelor de actină) dar și funcționale (fagocitoză țesutului distrus, secreția de colagenaze, secreția de metaloproteinaze matriceale, secreția de activatori de plasminogen) sunt esențiale pentru vindecarea rănilor. În absența

temporary tissue with reduced functionality which will further be remodeled but meanwhile it creates the conditions for wound re-epithelialization [5,9,10].

Angiogenesis involves the proliferation and migration of endothelial cells from the wound edge to the inside with the formation of new blood vessels. The endothelial cells are attracted to the center of the wound by means of chemotactic factors produced by hypoxia, lactic acid, and fibronectin [4,6].

Simultaneously with endothelial cell migration, fibroblast proliferation and migration occurs starting from the healthy tissue around the wound using fibrin fibers and fibronectin. Fibroblasts, by depositing various components of the extracellular matrix, collagen thereafter, make a provisional extracellular matrix by secreting collagen I , fibronectin, glycosaminoglycans (GAGs), and other components of the connective tissue from the matrix [1,2].

The newly formed granulation tissue is a rudimentary tissue that differs from normal connective tissue. It contains more fibronectin and hyaluronic acid, which results in hydration of the extracellular matrix facilitating cell migration, mostly keratinocytes [2,3]. Keratinocytes migrate into the wound few hours after traumatism, with low proliferation, the real reepithelializations achieved after the formation of the granulation tissue when the basement membrane is destroyed. Epithelialization of the wound is at the expense of basal keratinocytes from the hair follicles and sebaceous glands [5,11]. If the basement membrane is not destroyed, re-epithelialization is based on the proliferation and migration of keratinocytes from the basal layer of the wound edges [3,10].

The transformations that keratinocytes suffer, during migration, include both morphological (lamellipodia and pseudopodia formation, desmosomes breaking, actin filaments formation) and functional aspects (phagocytosis of damaged tissue, secretion of collagenase, secretion of matrix metalloproteinase, secretion of plasminogen activators) that are essential for wound healing. In their absence, keratinocytes could not restore the epithelium covering the wound [3,10,11]. Keratinocyte migration is present until the covering epithelium is entirely restored. Once

acestora, keratinocitele nu ar putea reface epitelul care să acopere plaga [310,11]. Migrarea keratinocitelor este prezentă până la refacerea în întregime a epitelului de acoperire. Odată ce acest punct este atins și apar semnalele de oprire a migrării, keratinocitele secretă membrana bazală, se restabilesc desmozomii și hemidesmozomii și revin la funcțiile avute înaintea traumatismului.

**Faza de remodelare.** Concomitent cu reepitelizarea apare contracția țesutului nou format în plagă care continuă și în cazul în care reepitelizarea s-a încheiat. Transformarea fibroblastelor în miofibroblaste realizează contracția cheagului. Realizarea contracției și epitelizarea țesutului nou format al plăgii suferă o rearanjare sau maturare. Baza acestui proces o reprezintă transformarea colagenului de tip IV în colagen de tip I și reorganizarea fibrelor de colagen în funcție de liniile de tensiune proces care poate dura săptămâni și luni de la apariția plăgii [2,3,4].

### Celulele stem

Cercetările desfășurate în ultimile două decenii au evidențiat faptul că țesuturile se reînnoiesc sau se reface atât prin diviziune mitotică clasică cât și prin intermediul unor celule cu potențial crescut de proliferare denumite celule stem. În prezent se admite că importanța celulelor stem în regenerarea și refacerea unui țesut este variabilă. Astfel în cazul epiteliiilor și a celulelor măduvei osoase importanța acestor celule în asigurarea refacerii țesutului distrus este foarte mare, în cazul mușchiului cardiac sau a pancreasului, celulele stem intervin în anumite condiții [1,12].

Celulele stem sunt cunoscute de mai multe decenii în embriologia și hematologia clasică dar relativ recent s-a stabilit existența mai multor tipuri de celule stem. Astfel din embriologie se cunoșteau celulele care formează blastocistul, care pot reproduce întregul organism, respectiv celulele specializate care formează țesuturile. Ulterior s-a evidențiat faptul că în afară de celulele stem care formează blastocistul, respectiv celulele stem nediferențiate, sau celulele stem embrionare (embryonic stem cells) există și celule stem non embrionare sau celule stem somatice,

this point is reached and signals appear to stop their migration, basal keratinocytes secrete the basal membrane, desmosomes and hemidesmosomes are restored and returned to the functions they had before the trauma.

**The remodeling phase.** Simultaneously with the re-epithelialization of the wound, the contraction of the newly formed tissue occurs and continues even if re-epithelialization was completed. The transformation of fibroblasts into myofibroblasts allows the clot to contract. The contraction and epithelialization of the newly formed tissue undergoes rearrangement or maturing. The basis of this process is the transformation of type IV collagen into type I collagen and the reorganization of collagen fibers by lines of force which can take weeks and months after the appearance of the wound [2,3,4].

### Stem cells

The research conducted during the last two decades have shown that tissues are renewed or recovered both by classical mitotic division and also by the so called stem cells, cells that have an increased proliferation potential. Today it is recognized that the importance of stem cells in tissue regeneration and reconstruction is variable. So in the case of epithelial cells and bone marrow cells such importance in ensuring the recovery of damaged tissue is very high, in the case of the heart muscle or pancreas these stem cells get involved only in certain circumstances [1,12].

Stem cells have been known for several decades, in classical embryology and hematology. Recently, however, the existence of several types of stem cells has been established. The cells which form the blastocyst, or which can reproduce the entire body, respectively specialized cells that form tissues were known in embryology. It was later revealed, that apart from the stem cells forming the blastocyst, respectively undifferentiated stem cells or embryonic stem cells, there are non-embryonic stem cells or somatic, adult stem cells. Embryonic stem cells have the ability to differentiate into any cell in the body while adult stem cells can only differentiate into cells that belong to a single tissue (unipotent character). Between these two forms there are

adulte. Celulele stem embrionare au capacitatea de a se diferenția în orice celulă din organism în timp ce celulele stem adulte se pot diferenția numai în celulele care aparțin unui singur țesut (caracter unipotent). Între aceste două forme există mai multe forme intermediare, respectiv celule stem care se pot diferenția numai în celule care aparțin unui grup de țesuturi [1,12,13].

Atât celulele stem embrionare cât și celulele stem adulte prezintă câteva caracteristici care le diferențiază de celulele somatice. Astfel, celulele stem au un ciclu de viață lung, au capacitate crescută de proliferare și au un mod de diviziune asimetric respectiv dintr-o celulă stem rezultă o celulă stem identică cu celula mamă, care reproduce populația de celule stem și o celulă care va deveni celulă somatică specializată [1,14].

Un aspect important al diferențierii celulelor stem îl reprezintă semnalele pe care le percep aceste celule pentru a iniția desfășurarea acestui proces. S-au identificat semnale interne legate de activarea mai multor gene prin intermediul factorilor de transcripție, dar și semnale externe venite prin intermediul unor factori secretați de celulele din jur sau factori din microambientul celular [15].

În afară de celulele stem embrionare, respectiv celulele care formează blastocistul, cu caracter totipotent sau omnipotent și a formelor intermediare în care caracterul totipotent scade până la oligopotent, respectiv celule care se pot diferenția numai în câteva tipuri de celule asemănătoare (celule stem mieloide sau celule stem limfoide) în țesuturi s-au identificat celulele stem adulte sau somatice. Aceste celule se pot diferenția într-un singur tip de celule, respectiv celulele țesutului în care se găsesc. S-au identificat celule stem în măduva osoasă, mușchi, creier, intestin, piele [13,16].

Un exemplu interesant îl reprezintă măduva osoasă, în care s-au identificat în perioada 1950-1960 celule stem hematopoietice care formează celulele sanguine pe toate liniile și o populație de celule respectiv celule stromale care au tot caracter de celule stem (celule stem mezenchimale) și care se pot diferenția în celule osoase, cartilajii, sau celule care formează țesutul conjunctiv. În prezent se consideră că principalele celule stem adulte sunt celulele stem hematopoietice, celulele stem mezenchimale,

several intermediate forms, respectively stem cells that can differentiate into cells that belong only to a group of tissues [1,12,13].

Both embryonic stem cells and adult stem cells have some characteristics that makes them different from somatic cells. Thus, stem cells have a long life cycle, have an increased proliferation capacity and an asymmetrically way of dividing, meaning that from a single stem cell follows a stem cell identical to the parent cell, that reproduces the population of stem cells and a cell that will become a specialized somatic cell [1,14].

An important aspect of stem cell differentiation is the signals that these cells perceive in order to initiate the development of this process. Internal signals related to the activation of several genes through transcription factors as well as external signals coming through some secreted factors of the surrounding cells or factors of the micro cellular environment were identified [15].

Apart from embryonic stem cells or cells that form the blastocyst, which have a totipotent or unipotent character, and apart from the intermediary forms where totipotent character becomes oligopotent, respectively cells that can differentiate in only a few similar cell types (myeloid stem cell or lymphoid stem cells), adult or somatic stem cells were also identified in tissues. These cells can differentiate into one cell type, respectively the tissue in which these cells are located. Stem cells have been identified in bone marrow, muscle, brain, bowel, skin [13,16].

An interesting example is the bone marrow. Between 1950-1960 hematopoietic stem cells which form all lines of blood cells were identified, together with a population of stromal cells that have also a stem cell nature (mesenchyme stem cells) that can differentiate into bone, cartilage, or connective tissue-forming cells. Currently, it is considered that the main adult stem cells are hematopoietic stem cells, mesenchymal, neural, and epidermal stem cells [1,17,18].

The main function of adult stem cells is to regenerate the tissue which they are a part, ensuring a numerical balance between cells that are physiologically lost and newly formed. Adult stem cells also participate in rebuilding traumatized tissue with lack of substance [1,18].

The skin is made up mainly of two types of fundamental tissues and has several types of

celulele stem neuronale și celulele stem epidermale din piele [1,17,18].

Principala funcție a celulelor stem adulte este asigurarea regenerării țesutului din care fac parte, respectiv asigurarea unui echilibru numeric între celulele care se pierd în mod fiziologic și celulele nou formate. De asemenea celulele stem adulte participă la refacerea țesutului în caz de traumatism cu lipsă de substanță [1,18].

Pielea care este formată în principal din două tipuri de țesuturi fundamentale prezintă mai multe tipuri de celule stem: celule stem epidermice, celule stem mezenchimale, celule stem melanocitare.

**Celulele stem epidermice.** Reprezintă celulele de origine pentru keratinocitele bazale care intră în diferențierea terminală. Prin intermediul marcării cu substanțe radioactive s-a observat că celulele stratului bazal au un ciclu de viață diferit. Astfel există aproximativ 10% celule bazale cu ciclu lent, 40% keratinocite cu ciclu de viață normal și keratinocite bazale cu ciclu de viață intermediar. Celulele cu ciclu de viață lent sunt considerate celule stem, celulele cu ciclu intermediar, celule tranzitorii de proliferare iar celulele bazale cu ciclu de viață normal sunt keratinocitele intrate în procesul de diferențiere terminală. Celulele de amplificare tranzitorie au o capacitate de proliferare intermediară între celulele stem și keratinocitele normale, rolul lor fiind probabil în a mări capacitatea de proliferare a epidermului. În culturi celulele cu ciclu lent de proliferare au o capacitate crescută de a forma colonii (holoclone) comparativ cu celulele cu ciclu celular mai rapid [1,13,16,19].

În stratul malpighian celulele stem sunt practic absente. Odată intrate în procesul de diferențiere terminală celulele stem își pierd caracteristicile de celule stem.

Menținerea caracteristicilor de celule stem a celulelor din stratul bazal se realizează prin o serie de semnale extracelulare venite prin căile semnalizare Wnt,  $\beta$  1 integrină, Notch sau BMP (bone morphogenetic protein) [1].

Celulele stem bazale realizează o structură (mai mult funcțională) de proliferare denumită unitate epidermală de proliferare care este formată dintr-o celulă stem înconjurată de aproximativ 10 celule de amplificare tranzitorii și

stem cells: epidermal stem cells, mesenchyme stem cells, melanocyte stem cells.

**Epidermal stem cells.** Represent the cells of origin for the basal keratinocytes which enter terminal differentiation. It has been observed by radioactive tracing, that the cells of the basal layer have a different life cycle. Thereby, about 10% from the basal cells have a slow cycle, 40% are keratinocytes with a normal life cycle and the rest are basal keratinocytes with an intermediary life cycle. The cells with a slow life cycle are considered stem cells, cells with an intermediate cell cycle are considered transitory proliferative cells and basal cells with a normal life cycle are keratinocytes which enter the terminal differentiation process. Transit-amplifying cells have an intermediate proliferation capacity, between stem cells and normal keratinocytes, their role is likely to increase the capacity of epidermal proliferation. In cultures, the cells with a slow proliferation cycle have an increased capacity to form colonies (holoclone) compared to cells that have a faster cellular cycle [1,13,16,19].

In malpighian layer, stem cells are practically absent. Once entered into the terminal differentiation process, stem cells lose their stem cells features.

Maintaining basal cells stem cells characteristics is achieved through a series of extracellular signaling, coming from Wnt,  $\beta$  1 integrin, Notch or BMP (bone morphogenetic protein) signaling pathways [1].

The baseline stem cells achieve a more functional proliferation structure called the epidermal proliferation unit which is composed of a stem cell surrounded by approximately ten transient amplification cells and keratinocytes entered in terminal differentiation located above the basal cells, giving the appearance of a column [12].

Stem cells are located in the interfollicular epidermis, at the papillary ridges, in a special region called the bulge region, located at the level of the hair follicle close to the opening of the sebaceous gland.

Stem cells intervene in two major processes of the body, maintaining tissue homeostasis and having a regeneration activity when tissues are destroyed. These two aspects are highlighted in

keratinocite intrate în diferențiere terminală situate deasupra acestei celule bazale dând aspectul unei coloane [12].

Celulele stem sunt localizate în epidermul interfolicular la nivelul creștelor papilare și într-o regiune specială numită regiunea nișei (bulge region) situată la nivelul foliculului pilos în apropiere de orificiul glandei sebacee.

Celulele stem intervin în două procese importante ale organismului, respectiv menținerea homeostaziei țesutului și activitatea de refacere a țesuturilor atunci când acestea sunt distruse. Aceste două aspecte se evidențiază și în cazul epiteliului cutanat și al plăgilor pielii dar este mult mai bine exprimat iar acțiunea celulelor stem este mai vizibilă și sunt mai ușor de demonstrat.

**Regiunea nișei.** O a doua localizare a celulelor stem epidermice este la nivelul foliculului pilos într-o zonă situată la nivelul țesutului epitelial extern sub inserția mușchiului pilos erector, în apropierea orificiului glandei sebacee. Această regiune denumită regiunea nișei sau regiunea infundibulară (bulge region- lower permanent portion) conține celule stem epidermice, celule stem melanocitare și țesut conjunctiv. Celulele stem epiteliale sunt localizate în porțiunea superioară a nișei iar celulele stem melanocitare se găsesc în porțiunea inferioară a acestei regiuni [1,20,21].

O serie de celule din zona istmului, a acestei regiuni, au caracter de celule stem contribuind la regenerarea celulelor sebacee.

Regiunea nișei nu are o morfologie specifică în epiderm dar creează și menține un micro-ambient separat de restul țesutului menținând celulele stem epidermice și melanocitare nediferențiate în faza  $G_0$  a ciclului celular. Celulele din regiunea nișei nu degenerază în cursul ciclului folicular. Celulele stem epidermice exprimă tenascina c, keratina 15 și 19,  $\beta 1$  integrina, factorii de transcripție Nfatc1, Lgr2 și Lgr6., în timp ce celulele stem melanocitare exprimă Sox10, PAX3, Mitf, Kit, Oct, Tyr [1,20,21].

Celulele stem epidermice din regiunea nișei nu participă în mod curent la homeostazia epitelială dar constituie un rezervor de celule multipotente necesar în cursul epitelizării pe suprafețe mari. La șoarece s-a demonstrat că în cursul ciclului foliculilor celulele stem din nișă

the case of skin wounds and skin epithelium, but it is much better expressed and the action of stem cells is more visible and easier to prove.

**Niche region.** A second location of the epidermal stem cells is at the hair follicle, in the area located at the external epithelial tissue under the insertion of the aerector pili muscle, close to the opening of the sebaceous gland. This region called the niche or infundibular region (bulge region- lower permanent portion) contains epidermal stem cells, melanocyte stem cells and connective tissue. Epithelial stem cells are located in the upper portion of the niche and melanocyte stem cells are located in the lower portion of this region [1,20,21].

A number of cells in the isthmus area, of this region, have the character of stem cells contributing to the regeneration of sebaceous cells.

The niche region has no specific morphology in the epidermis, but creates and maintains a separate micro-environment from the rest of the tissue, while maintaining epidermal and undifferentiated melanocyte stem cells in  $G_0$  phase of the cell cycle. The cells from the niche region do not degenerate during the cell cycle. Epidermal stem cells express tenascin-C, keratin 15 and 19,  $\beta 1$  integrin, NFATc1, Lgr2 and Lgr6 transcription factors, while the melanocyte stem cells express Sox10, Pax3, MITF, Kit, Oct, Tyr [1,20,21].

Epidermal stem cells from the niche region are not currently participating in epithelial homeostasis but constitute a reservoir of multipotent cells required during epithelialization over large areas. It has been demonstrated in mice, that during follicles cycle, niche stem cells may leave the niche getting differentiated into various cells of the hair follicle [1,22].

**Melanocyte stem cells.** These cells are derived from the neural crest and migrate into the skin in the form of melanoblasts during the embryonic period, migration which is dependent on the c-kit receptor and their stem cell factor ligand. The location of melanocyte stem cell is in the bulge, at the lower level where they are found as multipotent stem cells. It is assumed that during anagen, progenitor stem cells differentiate



pot părăsi nișa diferențiindu-se în diverse celule ale foliculului pilos [1,22]

**Celulele stem melanocitare.** Aceste celule derivă din creasta neurală și migrează sub formă de melanblaste în piele în perioada embrionară, migrare care este dependentă de receptorul c-kit și de ligandul acestora, stem cell factor (SCF). Localizarea celulelor stem melanocitare este la nivelul nișei în regiunea de jos unde se găsesc sub formă de celule stem multipotente. Se presupune că în anagen celulele stem progenitoare se diferențiază și migrează în bulb pigmentând foliculul pilos. Se consideră că celulele melanocitare adulte din epiteliul interfolicular ar proveni tot din celulele stem ale nișei, o altă ipoteză susține că și epiteliul interfolicular ar conține melanocite cu caracter de celule stem. Astfel, la nivelul pielii, celulele stem melanocitare sunt localizate în nișă, în matrixul foliculului pilos ca și în epiteliul interfolicular [23,24].

Menținerea caracterului de celule stem melanocitare se realizează la nivelul nișei prin menținerea unui nivel scăzut de Pax10, a unui nivel crescut de RGFβ ca și creșterea activității lui Notch. TGFβ reglează expresia factorului Mitf, suprimă expresia genelor implicate în melanogeneză și are rol în regresia foliculului pilos. Calea de semnalizare Wnt are un rol important în proliferarea și diferențierea celulelor stem melanocitare. Atunci când este blocată calea Wnt/β catenina, se reduce numărul de melanocite stem. La nivelul nișei există o serie de inhibitori ai Wnt cum ar fi: DKK3, Sfrp1 și DAB2 [24,25].

Un factor important în supraviețuirea, diferențierea și migrarea melanocitelor îl reprezintă factorul de transcripție Mitf. El se găsește exprimat pe melanocitele stem din nișă fiind un reglator direct al genelor Act, Tyr, Tyrp1 și Temp1, de asemenea implicate în evoluția celulelor stem melanocitare.

Localizarea în aceeași regiune a două tipuri de celule stem sugerează ideea unei cooperări intense între aceste două tipuri de celule. Se consideră în prezent că inițierea proliferării celulelor stem melanocitare este controlată de celulele stem epidermice prin semnale directe [24,25,26].

**Celulele stem mezenchimale.** Sunt celule multipotente derivate din țesut mezenchimal embrionar care are capacitatea de a se diferenția

and migrate into the bulb pigmenting the hair follicle. It is considered that adult melanocytic cells from the interfollicular epithelium would also arise from the niche stem cells, another hypothesis claims that the interfollicular epithelium contains melanocytes with stem cell character. Thereby, in the skin, melanocyte stem cells are located in the niche, in the matrix of the hair follicle and in the interfollicular epithelium [23,24].

Maintaining the stem cells character of melanocytes is accomplished in the niche by maintaining a low level of Pax10, an increased level of RGFβ, as well as an increased activity of the Notch. TGFβ regulates the expression of Mitf factor, suppresses the expression of the genes involved in melanogenesis and has a role in hair follicle regression. The Wnt signaling pathway plays an important role in the proliferation and differentiation of melanocyte stem cells. When Wnt / β catenin pathway is blocked, the number of stem melanocytes is reduced. At the niche, there are a number of Wnt inhibitors such as DKK3, Sfrp1 and DAB2 [24,25].

An important factor in the survival, differentiation and migration of melanocytes is the Mitf transcription factor. It is expressed in the niche stem melanocytes as a direct regulator of Act, Tyr, Tyrp1 and Temp1 genes which are also involved in the development of melanocyte stem cells.

The location in the same region of the two types of stem cells, suggests an intense cooperation between these two cell types. It is now considered that the initiation of melanocytic stem cell proliferation is controlled by direct signals of the epidermal stem cells [24,25,26].

**Mesenchymal stem cells.** Are multipotent cells derived from embryonic mesenchymal tissues, which have the ability to differentiate into osteocytes, chondrocytes, adipocytes, myoblasts, neurons, chondrocytes, suitable structures or tissues [27].

The source of these cells is the bone marrow that contains both hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells. There are several differences between mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells but it is believed that mesenchymal stem cells are found in the

în osteolite, condrocite, adipocite, mioblaste, neuroni, condrocite, structuri sau țesuturi corespunzătoare [27].

Sursa acestor celule o constituie măduva osoasă care conține atât celule stem hematopoietice cât și celule stem mezenchimale. Există mai multe deosebiri între celulele stem mezenchimale și celulele stem hematopoietice dar se consideră că celulele stem mezenchimale se găsesc în placenta, pulpa dentară, membrana sinovială, cordonul ombilical și țesutul adipos [27,28].

Ipotetic, ar exista o regiune asemănătoare nișei, situată perivascular, identificându-se cu peretele care ar avea caracteristicile regiunii nișei din bulb [27].

Celulele stem mezenchimale exprimă pe suprafața lor markerii: CD45, CD34, CD14 [28,29].

În piele există celule stem mezenchimale derivate din măduva osoasă care se pot transforma în toate componentele pielii, celule stem endoteliale (aparțin grupului de celule stem mezenchimale) care prezintă diferențe minime față de celulele stem mezenchimale propriu-zise și celulele stem derivate din adipocite [27,28,29].

Celulele stem derivate din adipocite au un caracter multipotent putându-se diferenția în țesut osos, cartilagos, mușchi scheletici, cardiomiocite [30,31].

Celulele stem derivate din adipocite exprimă pe suprafața lor markerii: CD9, CD10, CD13, CD44, CD90, fibronectină și vimentină. În evoluția lor celulele stem derivate din adipocite sunt puternic influențate de BMP (proteină morfogenetică a oaselor).

Celulele stem derivate din adipocite nu se deosebesc de adipocitele din derm dar se apreciază că există o celulă stem derivată din adipocite la mai multe mii sau zeci de mii de celule adipoase din derm [30,32].

### **Acțiunea celulelor stem la nivelul plăgii**

Spre deosebire de menținerea homeostaziei epidermului în cazul plăgilor apar câteva aspecte ale fiziopatologiei plăgilor care influențează activitatea celulelor stem și implicit vindecarea rănilor.

Apariția unor plăgi duce la o serie de perturbări atât locale cât și sistemice. Astfel o plagă este o zonă în care oxigenarea este redusă

placenta, dental pulp, the synovia, the umbilical cord and adipose tissue [27,28].

Hypothetically there is a perivascular niche-like region, which is identified with the vascular wall that might have the characteristics of the niche region from the bulb [27].

Mesenchymal stem cells express the markers: CD45, CD34, CD14 on their surface [28,29].

Mesenchymal stem cells which are derived from bone marrow and can develop into all components of the skin, endothelial stem cells (belonging to mesenchymal stem cells group) which show minimal differences to actual mesenchymal stem cells and stem cells derived from adipocytes, all exist in the skin [27,28,29].

Adipose-derived stem cells have multipotent nature and can differentiate into bone, cartilage, skeletal muscle, cardiomyocytes [30,3].

Adipose-derived stem cells express markers on their surface: CD9, CD10, CD13, CD44, CD90, fibronectin and vimentin. In their evolution adipocyte-derived stem cells are strongly influenced by BMP (bone morphogenetic protein).

Adipose-derived stem cells are indistinguishable from the adipocytes in the dermis but it is estimated that there is one stem cell derived from adipocytes to several thousand or tens of thousands of fat cells in the dermis [30,32].

### **The action of stem cells in the wound**

Unlike the maintenance of epidermal homeostasis, in the wound, some pathophysiology aspects occur that influence stem cell activity and thus wound healing.

The emergence of a wound leads to a number of both local and systemic disruptions. Such a wound is an area where oxygen is reduced by the decreased supply of oxygen blood delivered. The consequence of this decrease in oxygenation in the wound is the endothelial cell apoptosis by decreasing the activity of neutrophils and fibroblasts. Also in chronic wounds fibroblasts are phenotypically senescent and respond poorly to the stimuli given by the cytokines. Also, a bacterial infection leads to an increased level of pro-inflammatory cytokines and a decreased activity level and activity of growth factors [2,3].

In acute wounds, after stopping bleeding, hypoxia and lack of substance represents the

prin scăderea aportului de oxigen adus pe cale sanguină. Consecința acestei scăderi a oxigenării în plagă este o apoptoză a celulelor endoteliale cu descreșterea activității neutrofilelor și a fibroblastelor. Totodată în rănile cronice fibroblastele sunt fenotipic senescente și răspund greu la stimulii dați de citokine. De asemenea, infecția bacteriană duce la creșterea nivelului de citokine proinflamatorii și la scăderea nivelului și activității factorilor de creștere [2,3].

În cazul plăgilor acute după oprirea hemoragiei, hipoxia și lipsa de substanță reprezintă principalele aspecte patogene. Pe de altă parte hipoxia reprezintă un factor care crește recrutarea de neutrofile și celule stem la nivelul plăgilor [2].

În cursul fazei inflamatorii contactul între matrixul extracelular și plachete duce nu numai la formarea cheagului de fibrină dar și la eliberarea de mediatori ca: factorul de creștere derivat din plachete (PDGF),  $TNF\alpha$  care fac leucocitele să migreze prin diapedeză din vasele de sânge spre zona distrusă. Aceste celule au o acțiune antimicrobiană, angiogenică și ulterior participă la debridare [2,3].

Odată cu aceste celule ajung în plagă și celulele stem derivate din măduva osoasă. Teoretic celulele stem derivate din măduva osoasă au prin procesul de transdiferențiere, capacitatea de a se transforma în toate componentele celulare ale pielii, inclusiv keratinocitele epidermale [34,35]. Dar experimental s-a observat că aceste celule contribuie la formarea de 4% din totalul de keratinocite ce vor acoperi ulterior plaga. Același lucru se poate spune și despre celulele stem keratinocitare din nișă Krt15 pozitive care formează rapid celule de amplificare tranzitorii ce asigură o epitelizare de urgență [18,23]. Keratinocitele adulte care iau naștere pe această cale, se regăsesc într-o foarte mică proporție în celulele epiteliale care persistă după epitelizarea plăgii. Cu toate aceste celule se consideră că celulele stem mezenchimale, inclusiv celulele stem derivate din măduva osoasă participă direct la refacerea țesuturilor distruse [34,35,36]. Dar ca și în cazul keratinocitelor, numai 20% din fibroblastele nou formate la nivelul plăgilor sunt considerate a proveni din măduva osoasă [48,49]. Experimental, injectarea de celule stem în plagă, a realizat o supraviețuire a numai 5% din aceste

major pathogenic aspects. On the other hand hypoxia is a factor which increases neutrophils and stem cells recruitment in wounds [2].

During the inflammatory phase, the contact between the extracellular matrix and platelets leads to the formation of a fibrin clot and the release of mediators such as: platelets derived growth factor (PDGF),  $TNF\alpha$ , which causes leucocytes to migrate through diapedesis from the blood vessels into the wounded area. These cells have an antimicrobial and angiogenic action and participate in the subsequent debridement [2,3].

With these cells, stem cells arrive at the wound site also. Theoretically, bone marrow derived stem cells, through the process of trans-differentiation, have the ability to transform into all cellular components of the skin, including epidermal keratinocytes [34,35]. But it has been observed, experimentally, that these cells contribute to the formation of 4% from total keratinocytes, which will then cover the wound. The same can be said about the Krt15 positive keratinocyte stem cells from the niche which are rapidly forming transit-amplifying cells that ensure an emergency epithelialization [18,23]. Adult keratinocytes arising in this way are found in a very small proportion of epithelial cells, that persist after epithelialization of the wound. Although, it is believed that mesenchymal stem cells, including stem cells derived from bone marrow are directly involved in tissue repair [34,35,36]. But, as in the case of keratinocytes, only 20% of the newly formed fibroblasts in the wound are believed to originate in the bone marrow [48,49]. Experimental injecting of stem cells into wounds, achieved a survival of only 5% of these cells [48,50]. The injection of mesenchymal stem cells in human wounds has not led to a transformation into keratinocytes or any other type of cells of the skin [18,37,38]. It is very likely that the support in various growth factors necessary for the development of stem cells into the wound may not be the appropriate one.

One of these factors, the most important one, is the cooperation between keratinocytes / fibroblasts. Thus, as a result of various paracrine signals, keratinocytes release IL-1 which induces the secretion of growth factors for keratinocytes

celule [48,50]. Injecția de celule stem mezenchimale umane în plagă nu a dus la transformarea acestora în keratinocite sau alte tipuri de celule din piele [18, 37,38]. Este foarte probabil ca aportul în diverși factori de creștere necesari dezvoltării celulelor stem în plagă să nu fie cel adecvat.

Unul dintre acești factori, cel mai important, îl reprezintă cooperarea keratinocitelor/fibroblastelor. Astfel ca urmare a diverselor semnale paracrine, keratinocitele eliberează IL-1 care induce secreția din fibroblaste, a factorilor de creștere pentru keratinocite cum ar fi: factorul de creștere al keratinocitelor, FGF-7, IL-6, GM-CSF, MGF, realizându-se o exacerbare a activității și proliferării atât a keratinocitelor cât și a fibroblastelor [5].

În prezent se consideră că reepitelizarea se realizează plecând de la celulele stem keratinocitare interfoliculare localizate în stratul bazal și a celulelor stem din regiunea nișei. Aceste celule au capacitatea de a prolifera rapid formând celule de amplificare tranzitorii (transient amplifying cells), care se diferențiază în keratinocite adulte prin intermediul căii Notch/p63 [18].

Este dificil de apreciat originea celulelor stem, din nișă sau interfoliculare. Este însă cert că celulele stem din nișă nu intervin în homeostazia normală a epitelului ci numai în condiții de existență a unei plăgi. Celulele din nișă, în condiții experimentale, sunt capabile să reproducă epidermul interfolicular ca și foliculul pilosebaceu [39]. Absența celulelor stem din nișă nu împiedică reepitelizarea dar aceasta se face mult mai greu și într-o perioadă de timp mai lungă. Astfel celulele stem din nișă ar funcționa ca un rezervor de celule stem care ar funcționa în principal în cazul existenței plăgilor în toate fazele de vindecare a acestora [18,40].

Experimental, distrugerea la șoarecele neonatal a foliculului pilos, respectiv a regiunii nișei duce la disfuncția majoră a regenerării epiteliale în timp ce la șoarecele adult duce la întârzierea accentuată a epitelizării plăgilor [18,22].

Un alt aspect al vindecării rănilor îl reprezintă tranziția mezenchimal epitelială și reversul acesteia tranziția epitelial mezenchimală.

from fibroblasts, such as: keratinocytes growth factor, FGF-7, IL-6, GM-CSF, MGF, realizing an exacerbation of the activity and proliferation of keratinocytes and fibroblasts [5].

Currently it is considered that re-epithelialization is performed starting from the interfollicular keratinocyte stem cells localized in the basal layer and from the niche stem cells. These cells have the ability to rapidly proliferate forming transit-amplifying cells that differentiate into adult keratinocytes via Notch / p63 pathway [18].

It is difficult to determine the origin of niche or inter-follicular stem cells. It is certain that niche stem cells do not intervene in the normal epithelial homeostasis but only in wounds. The niche cells, under experimental conditions, are capable of reproducing the inter-follicular epidermis, the same as the pilosebaceous follicle [39]. The absence of stem cells from the niche doesn't prevent re-epithelialization, but it takes a longer period of time. Thereby niche stem cells would act as a reservoir of stem cells that operates mainly in the case of wound healing in all its phases. [18,40].

The experimental destruction of hair follicles in neonatal mice, in the region of the niche leads to a major epithelial regeneration dysfunction, while in the adult mouse it leads to a delayed wound epithelization [18,22].

Another aspect of wound healing is the mesenchymal epithelial transition and its reverse, the epithelial mesenchymal transition.

It has been shown that mesenchymal cells can develop phenotypic characteristics of keratinocytes and vice versa. This process is not limited to the skin where we discuss about regeneration of wounds but also in the regeneration of other organs. It is considered that in the early stages of the wound, when there is an acute need for cells, a number of epithelial cells from the wound edges change their phenotype into mesenchymal cells, detach from the intercellular connections and rapidly migrate towards the center of the wound where they can regain their epithelial cells role [41].

Experimentally, the cells which underwent the process of epithelial mesenchymal transition were highlighted in the wound among bone

S-a evidențiat faptul că celulele mezenchimale pot dezvolta caractere fenotipice ale keratinocitelor și invers. Acest proces nu este limitat numai la piele în cazul regenerării plăgilor dar și în regenerarea altor organe. Se consideră că în primele faze ale plăgii când este o nevoie acută de celule la nivelul plăgii, o serie de celule epiteliale din marginea plăgii își schimbă fenotipul în celule mezenchimale, se desprind de legăturile intercelulare și migrează rapid spre centrul plăgii unde pot redeveni celule epiteliale [41].

Experimental, celulele care au suferit procesul de tranziție epitelial mezenchimală au fost evidențiate la nivelul plăgii printre celulele mezenchimale derivate din măduva osoasă dar numărul lor este surprinzător de mic [41,42].

Celulele stem epidermice ca și celulele stem, mezenchimale sunt implicate și în fazele târzii ale vindecării plăgilor. Fibrocitele derivate din măduva osoasă ca și celulele stem mezenchimale „locale” (celule stem dermale multipotente) au o capacitate de proliferare intensă și pot produce miofibroblaste ca și fibroblaste adulte. Celulele stem mezenchimale derivate din măduva osoasă se găsesc în plagă contribuind la procesele reparatorii propriu-zise dar și la procesele de remodelare. Astfel atât fibroblastele provenite din celulele mezenchimale derivate din măduva osoasă cât și celulele stem mezenchimale exprimă proteine ale matrixului extracelular cum ar fi colagenul I și III sau vimentina care reprezintă una dintre etapele importante ale fazei de remodelare [18,23]

Neogeneza foliculului pilos. Experimental, la șoarece, s-a demonstrat că refacerea foliculului pilos are loc în cadrul fazelor târzii ale procesului de vindecare a rănilor. Celulele mezenchimale și epiteliale cu proprietăți de celule stem pot regenera foliculul pilos atunci când acesta a fost distrus.

Tot la șoarece s-a demonstrat că foliculul pilos poate apărea „de novo” în zonele de epitelizare inițial ca o invaginare a stratului bazal, care se alungește, din care se formează foliculul matur [22]. Responsabile de această refacere par a fi datorită faptului că predomină la acest nivel, celulele stem Krt+. În acest caz foliculul se dezvoltă din celulele stem nefoliculare. În cazul foliculului pilos dezvoltat din celulele stem

marrow-derived mesenchymal cells but their number was surprisingly low [41,42].

Epidermal stem cells, as mesenchymal stem cells are involved in the later stages of wound healing. Bone marrow derived fibroblasts as “local” mesenchymal stem (dermal multipotent stem cells) have an intense proliferative capacity and can produce miofibroblasts as adult fibroblasts. The mesenchymal stem cells derived from bone marrow are contributing in the reparative processes in the wound but also in the remodeling processes. Thus, fibroblasts originating from bone marrow mesenchymal cells as well as mesenchymal stem cells express proteins of the extracellular matrix such as collagen I and III or vimentin that represents one of the important steps of the remodeling phase [18,23].

**Hair follicle neogenesis.** Experiments conducted with mice have shown that hair follicle regeneration takes place in the late phases of wound healing. Mesenchymal and epithelial cells with properties of stem cells can regenerate the hair follicle when this was destroyed.

It was also shown in mice that the hair follicle can arise de novo in areas of epithelialization, initially as an invagination of the basal layer, that stretches and from which the mature follicle is formed [22]. It seems that Krt+ stem cells, because they protrude on this level, are responsible for this regeneration. In this case the hair follicle develops from non-follicular stem cells.

The hair follicle which is developed from follicular stem cells expresses Lgr6 and possible, it develops from the cells that are located in the isthmus area of the niche. In both cases, the Wnt pathway plays an important induction role for the development of the hair follicle. It wasn't yet proven that in humans, the hair follicle can appear de novo from epithelial cells, in the re-epithelialization area [18,43].

Follicular stem cells serve not only for the regeneration of the hair follicle but also for the regeneration of the sebaceous glands. In the absence of follicular stem cells the restoration of the hair follicle and sebaceous glands is almost blocked. Besides, it is known, that wound re-epithelialization (especially in burns) occurs much faster when the hair follicles are not destroyed.

foliculare acestea exprimă Lgr6 și posibil, se dezvoltă din celulele localizate în zona istmului nișei. În ambele cazuri, calea Wnt are un rol principal în inducerea de formare a foliculului pilos. La om nu s-a demonstrat că foliculul pilos poate apărea spontan, de novo, din celulele epiteliale la nivelul zonei de reepitelizare [18,43].

Celulele stem foliculare pot contribui nu numai la refacerea foliculului pilos dar și a glandelor sebacee. În absența celulelor stem foliculare refacerea foliculului pilos și a glandelor sebacee este aproape blocată. De altfel, se cunoaște că epitelizarea rănilor (mai ales în arsuri) se face mult mai rapid atunci când foliculii piloși nu sunt distruși. Mai mult când celulele foliculare dermale sunt implantate în plăgile cutanate acestea sunt încorporate în epiteliul nou format ca și cum ar apărea de novo la locul respectiv. Pe de altă parte s-a demonstrat că nestina, care este un marker pentru celulele neurale progenitoare este exprimat pe o serie de celule din regiunea nișei. Aceste celule au capacitatea de a se diferenția în neuroni, celule epiteliale, keratinocite, celule musculare netede, melanocite, ceea ce dovedește potențialul imens de regenerare a celulelor din regiunea nișei [18,22,44].

**Repigmentare.** Reprezintă procesul de refacere a barierei de melanină al organismului. Celulele responsabile de acest proces sunt melanocitele amelanotice de la nivelul tecii epiteliale externe (outer root sheath) care derivă din celulele stem melanocitare [18]. Pe modele animale s-a observat că melanocitele ce repigmentează epiteliul format după epitelizarea plăgilor aparțin în special foliculului pilos și într-o mică măsură melanocitelor epidermice [18,24,45].

**Revascularizarea.** Reprezintă procesul de refacere a rețelei vasculare distruse de la nivelul plăgii. Revascularizarea se face prin angiogeneză respectiv formarea de noi vase de sânge.

S-au identificat la șoarece, un grup de celule stem care au capacitatea de a forma vase de sânge. Aceste celule au caracter multipotent și exprimă pe suprafața lor nestina [18]. În afară de acestea s-au identificat o serie de celule denumite TEPS (tissue-resident endothelial precursors) localizate în derm și țesutul adipos care au capacitatea și totodată formează vase de sânge

Furthermore, when dermal follicular cells are implanted in the cutaneous wound, they are incorporated in the new epithelium as if they appeared de novo to that site. On the other side it was demonstrated that nestin, which is a marker for the progenitor neural cells is expressed on a series of cells from the niche region. These cells have the capacity to differentiate in neurons, epithelial cells, keratinocytes, smooth muscle cells, melanocytes, which proves the immense regeneration potential of the cells from the niche region [18,22,44].

**Repigmentation.** It represents the restoration process of the organism's melanin barrier. The cells responsible for this process are the amelanotic melanocytes from the outer root sheath that derive from melanocytic stem cells [18]. It's been observed on animal models that the melanocytes which repigment the epithelium after the epithelialization of the wound belong especially to the hair follicle and to a lesser extent to the epidermal melanocytes [18,24,45].

**Revascularization.** Represents the restoration process of the destroyed vascular network from the wound. Revascularization is realized through angiogenesis that is the formation of new blood vessels.

A group of stem cells which have the ability to form blood vessels was identified in mice. These cells have a pluripotent character and express nestin on their surface [18]. Besides this, a series of so called TEPS (tissue-resident endothelial precursors) cells were identified in dermis and the adipose tissue which have the capacity to also form functional blood vessels. On the other hand it is known that mesenchymal stem cells derived from bone marrow can form tubes of endothelial cells in the culture medium. Thus restoring vascular network in the wound is done mainly through two resources [18,46,47].

These cells seem to especially intervene in the first phases of wound healing, mostly in the deep areas of the wound. Their attraction in the wound occurs because the angiogenic factors such as VEGF, NGF, and angiopoietin1 are excessive in the wound. The presence of these cells is transitory because there is a regression/remodeling of the vascular network in the last

funcționale. Pe de altă parte se cunoaște faptul că celulele stem mezenchimale derivate din măduva osoasă pot forma în mediu de cultură tuburi de celule endoteliale. Astfel, refacerea rețelei vasculare la nivelul plăgii se face în principal prin două resurse [18,46,47].

Aceste celule par să intervină în special în primele faze ale procesului de vindecare a rănilor, în special în zonele profunde ale plăgilor. Atragerea lor în plagă se datorează prezenței în exces a factorilor angiogenici VEGF, NGF, angiopoietina1, la nivelul plăgii. Prezența acestor celule este tranzitorie deoarece în ultimile faze ale vindecării rănilor are loc o regresie /remodelare a rețelei vasculare, care se face în special cu participarea preponderentă a TEPS și a celulelor stem pluripotente care exprimă nestina. Celulele stem mezenchimale derivate din măduva osoasă promovează angiogeneza și diferențierea vasculară în prima fază a vindecării rănilor [18,46,47].

Celulele stem derivate din adipocite au capacitatea de a se diferenția în celule endoteliale, pot favoriza angiogeneza dar în prezent se consideră că au un rol minor [18 ].

\* \*

Celulele stem reprezintă principalul element în refacerea țesuturilor distruse datorită capacității de proliferare extrem de mare realizând într-un timp scurt celulele necesare înlocuirii celulelor distruse cu refacerea integrală a funcțiilor țesutului respectiv.

La nivelul pielii celulele stem epidermice și mezenchimale, ca și celulele stem melanocitare pot reface în întregime țesutul distrus, proces ce necesită o succesiune de evenimente în care sunt implicate celule, stem sau anumite categorii de celule stem.

Aceste evenimente sunt controlate de factori microambientali de la nivelul plăgii dar și de cooperarea între celulele stem și substanța fundamentală de la nivelul plăgii.

În cazul celulelor stem cutanate, atât cele rezidente cât și cele derivate din măduva osoasă, s-a demonstrat faptul că aceste celule intervin în toate fazele procesului de vindecare a rănilor fie prin formarea de celule noi adulte fie prin elaborarea unor semnale (citokine) care sunt

phases of wound healing, which is done especially with TEPS and pluripotent stem cells which express nestin. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow, promote angiogenesis and vascular differentiation in the first phase of wound healing [18,46,47].

Adipose-derived stem cells have the capacity to differentiate into endothelial cells and can favor angiogenesis but they are considered to play a minor role [18].

\* \*

Stem cells are the main element in restoring damaged tissue due to their extremely high proliferation capacity, making in a short time the cells which are needed for the replacement of damaged cells with also restoring that tissue integral function.

In the skin, the epidermal and mesenchymal stem cells, as well as melanocytic stem cells, can fully restore the damaged tissue, a process that needs a succession of events in which stem cells or certain categories of stem cells are involved.

These events are controlled by environmental factors in the wound but also by the cooperation between stem cells and fundamental substance from the wound.

In the case of skin stem cells, both the resident and those derived from bone marrow, it's been demonstrated that these cells are involved in all phases of wound healing either by forming new adult cells, either by developing signals (cytokines) that are integrated in the development of wound healing process ensuring an optimal development.

Knowledge of the role of stem cells in wound healing made these cells to be used in therapeutics of destructive or regenerative processes of various organs, including the nervous system. Even if adipose-derived stem cells became almost an usual technique in dermocosmetics, using cutaneous stem cells in a series of destructive processes in the heart (heart attack), nervous system (sections of spinal cord) or in leg ulcers, are still experimental. If stem cells are relatively well known, the succession of biochemical signals and their interference, needed in order to proliferate and turn into adult tissue cells, are not sufficiently well known.

integrate în desfășurarea procesului de vindecare a rănilor asigurând desfășurarea optimă a acestuia.

Cunoașterea rolului celulelor stem în vindecarea rănilor a făcut ca aceste celule să se utilizeze în terapia proceselor distructive sau regenerative a diverselor organe inclusiv la nivelul sistemului nervos. Chiar dacă utilizarea celulelor stem derivate din adipocite a devenit o tehnică aproape uzuală în dermatocosmetică utilizarea celulelor stem cutanate într-o serie de procese distructive de la nivelul cordului (infarctul miocardic) sistemului nervos (secțiuni de măduvă) sau în ulcerul de gambă sunt încă la nivel experimental. Dacă celulele stem sunt relativ bine cunoscute, semnalele biochimice ca și succesiune și interferența lor, de care au nevoie pentru a putea prolifera și a se transforma în celule adulte ale țesutului respectiv, nu sunt suficiente de bine cunoscute.

Dezvoltarea tehnicilor de formare a PSCS (celule stem pluripotente induse) reprezintă un mare pas înainte, nu numai în procesul de vindecare a rănilor cutanate dar în tot ceea ce se numește în prezent terapie regenerativă.

Pe de altă parte similitudinile care s-au evidențiat între procesul de dezvoltare a rănilor și procesul de dezvoltare tumorală (exemplu, cale de semnalizare Wnt și Hedgehog) sau comunicarea intercelulară prin aceleași citokine face ca terapia cu celule stem să ridice la momentul actual o serie de semne de întrebare privind controlul evoluției celulelor stem introduse în organism.

Cu toate acestea terapia cu celule stem care are ca model procesul de vindecare a rănilor rămâne o certă promisiune.

The development of techniques for forming iPSC (induced pluripotent stem cells) represents a big step forward, not only in the cutaneous wound healing process but in what is now called regenerative therapy.

On the other hand, the similarities that have been identified between wounds and tumor development process (example: Wnt and Hedgehog signaling) or intercellular communication through the same cytokines, raise a number of questions regarding stem cells therapy control once these stem cells have been introduced into the organism.

However, stem cell therapy, which emulates the process of wound healing, remains a definite promise.

## Bibliografie/ Bibliography

1. Fairley J.A., Zivony D. Epidermal kinetics and regulation of cell proliferation in the biology of the skin. Ed. By Freinkel R.K, Woodley D.T., Parthenon Publishing 2001, 12, 201-207.
2. Neligan P.C.. Wound healing in plastic surgery. Third Edition Elsevier Inc. 2013, 14, 240-266.
3. Guo S., LA Dipietro. Factors affecting wound healing. J. Dent. Res., 2010, 89(3), 219-229.
4. R.E. Pollock, F. CharlesBrunicardi, Anderson D.K., et al. The cellular, biochemical and mechanical phases of wound healing. Schwartz's Principles of Surgery, Ninth Edition, McGraw-Hill Professional, 2009, 4, 184-196
5. Werner S., Gross R., Regulation of wound healing by growth factor and cytokine. Physiol. Rev. 2003, 83, 835-870
6. Schneml S., Szimies R.M., Prant L., Landthaler M., Basilas P. Wound healing in the 21st century. J.A.Acad.Dermatol. 2010,63, 866-881.
7. L. Dunn, H.C.G. Prosser, Tan J.T.M., L.Z. Vanags, M.K.C. Ng, C.A. Bursil. Murine model of wound healing. J.Vis.Exp. 2013, 75, e50265.
8. R.K. Sivamani, Gracia M.S., Issroff R.R. Wound re-epithelization modulating keratinocyte migration in wound healing. Frontiers in Bioscience 2007, 12, 2849-2868.



9. Werner S., Krieg T., Smola H. Keratinocyte-fibroblast interaction in wound healing. *J.Invest.Dermatol.* 2007, 127, 998-1008.
10. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008, 453, 314-321.
11. Martin P., Leibovich S.J. Inflammatory cell during wound repair:the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology* 2005, 15, 599-6072+
12. Weissman I.L., Stem cells: units of regeneration and unit in evolution *Cell.* 2000, 100(1)157-168.
13. Townsend C.M., Beauchamp R.D., Evens B.M., Mattox K.L. Regenerative medicine in Sabiston Textbook of Surgery. Nineteenth Edition 2012, 8, 178-187.
14. Lakver R.M., Tung-Tien Sun. Epidermal stem cells: propertis, markers, and location. *Proceedings of Nat. Acad.of Sciences*, 2008, 97, No 25, 13473-13475.
15. Chen L., Tredget E.E., Wu P.Y.G., Wu Y. Paracrine factor of mesenchimal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cell and enhance wound healing. *Plos One* 2008,3,e 1886.
16. Blanpain C., Fuchs Elaine. Epidermal stem cells of the skin. *Annu. Rev. Cell.Dev. Biol.* 2006, 22, 339-373.
17. Cotter-Fox M.N., Lapidot T, Petit I., Kollet O., Presio J.F., Link D. Et al. Stem cells mobilization. *Hematol.Am.Soc.Hematol. Educ.Program* 2003, 419-437.
18. Lau K., Paus R., Tiede S., Day Philip, Bayat Ardeshir. Exploring role of the stem cells in cutaneous wound healing. *Experimental Dermatol.* 2009, 921-933.
19. Shen Q.,Jin H., Wang X. Epidermal stem cells and their epigenetic regulation. *Int.J.Mol.Sci.* 2013, 14, 17861-17880.
20. Zhang J., Li. Stem cell niche microenvironment and beyond. *The Journal of Biological Chemistry* 2008, 283, 9499-9503.
21. Lavker R.M., Sun T-T. Epidermal stem cells. Properties, marker and location. *Proceedings of the Nat.Acad. of Science* 2000, 97(25), 13473-13477.
22. Plikus M.V., Gay D.L., Treffeisen E., Wang A., Supapannachart R.T., Costarelis G. Epithelial stem cells and implications for wound repair. *Semin. Cell Dev.Biol.* dec. 2012, 23, (9), 946-953.
23. Costarelis G., Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J. Invest. Dermatol* 2006, 126, 1459-1468.
24. Nishimura E.K. Melanocyte stem cells: a melanocyte rezervoir in Hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Research* 2011, 24(3), 401-410.
25. Lang D., Mascarentias J.B., Shea C.R. Melanocytes, melanocyte stem cells and melanoma stem cells. *Clin. Dermatol.* 2013, 31(2), 166-178.
26. Mull A.N., Zolekar A., Wang Y.C. Understanding melanocyte stem cells for disease modeling and regenerative medicine applications.
27. Bianco P., Robey P.G., Simmons P.J. Mesenchimal stem cells: Revisiting, History, Concepts and Assays.
28. Maxson S., Lopez E.A., Yoo D., Danilkovith-Miagkova A., Leroux M.A. Concise review: Role of mesenchimal stem cells in wound repair.
29. Wu Y., Chen L., Scott P.G., Tredget E.E. Mesenchimal stem cells entiance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*, 2007, 25(10), 2648-2650.
30. Cherubino M., Rubin J.P., Milikoviv N., Kelmendi-Doko A., Marra K.G. Adipose derived stem cells for wound healing applications. *Ann.Plast.Surg.* 2011, 66(2), 210-215.
31. Baer P.C. Adipose-derived stem cells and their potential to Differentiate into the epithelial lineage. *Stem Cells Dev.* 2011, 20(10), 1805-1816
32. Mizumo H., Tobita M., Uysal A.C. Concise review: Adipose derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 2012, 30(5), 804-810.
33. Blanplain C., Horsley V., Fuch S. Epithelial stem cells: turning over new leaves...*Cell*, 2007, 128(3), 445-458
34. Patersson M., Niemann C. Stem cells dynamics and heterogenity: Implications for epidermal regeneration and skin cancer. *Curr.Med.Chem.* 2012, 19(35), 5984-5992.
35. Wu Y, Wang J., Scott P.G., Tredget E. Bone marrow derived stem cells in wound healing: a review. *Wound Re.Re.* 2007(suppl 1), S18-S26.
36. Badiavas E.V., Abedi M., Butmarc J., Falanga V., Quesenberry P. Participation of bone marrow derived cells to skin: in Cutaneous Wound Healing? *J. Cell Physiol.* 2003, 196(2), 245-250.
37. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y, Longaker M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* 2008, 453, 314-321.
38. Chen M., Przyborowsky M., Berthiaume F. Stem cells for skin tissue engin eering and wound healing. *Crit.Rev.Biomed Eng.* 2009, 37(4-5), 399-421.
39. Levy V., Lindon C., Zheng Y., Harte B.D., Morgan B.A. Epidermal stem cells arise from hair folicle after wounding. *FASEB J.* 2007, 21, 1358-1366.
40. Oshima H., Rochat A., Kedziac C., et al. Morphogenesis and Renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell.* 2001, 104, 233-245.
41. Radisky D., LaBarje M.A.Epithelial-mesenchimal transition and the stem cell phenotype. *Cell Stem Cell* 2008, 6, 511-513.
42. Moni S.A., Guo W., Liao M-J. Et al. The epithelial mesenchimal transition generate cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008, 133, 704-715.