
NEDERLANDSE SAMENVATTING

Een stap richting de ontwikkeling van therapieën voor wondgenezing

Wondgenezing verloopt volgens een vast patroon: ontsteking, proliferatie of regeneratie en remodellering. Wondgenezing ontstaat doordat cellen in en om het wondgebied (bijv. ontstekingscellen en huidcellen) mediators produceren en uitscheiden, waarop andere cellen reageren met migratie, proliferatie, productie van wondgenezing mediators of productie van dermale matrixcomponenten. Deze processen worden met name gereguleerd door groeifactoren en cytokinen. Bij het optreden van weefsel schade worden groeifactoren en cytokinen aangemaakt door beschadigde cellen en bloedplaatjes wat het begin van de ontsteking kenmerkt. Vervolgens worden de ontstekingscellen en de huidcellen (keratinocyten, fibroblasten en endotheel cellen) een bron van groeifactoren en cytokinen in de proliferatie fase. Een subgroep van de cytokinen zijn de chemokinen.

Chemokinen zijn een familie van structureel verwante cytokinen. De naam is een samentrekking van chemotactische cytokinen. Vrijwel alle kernhoudende cellen produceren en geven chemokinen af aan hun omgeving als reactie van het lichaam op verwonding, allergenen, antigenen of micro-organismen. Een groot deel van deze cellen bevat tevens chemokine receptoren. Chemokinen werden voor het eerst beschreven voor hun inductie van gerichte migratie van leukocyten uit het bloed naar plaatsen van ontsteking. Leukocyten bevatten chemokine receptoren en migreren onder invloed van een chemokine gradiënt. Daarnaast kunnen chemokinen leukocyten aanzetten tot proliferatie en productie van andere chemokinen. Door deze eigenschappen spelen chemokinen een belangrijke rol in de ontsteking fase van het wondgenezing proces. Naast de aanwezigheid van chemokine receptoren op ontstekingscellen is in mindere mate de aanwezigheid van enkele receptoren op huidcellen (keratinocyten, fibroblasten en endotheelcellen) beschreven. Dit suggereert dat chemokinen, naast ontsteking, ook andere processen van wondgenezing reguleren en dat zij een rol kunnen spelen in abnormale wondgenezing (bv. chronische- en brandwonden).

Het doel van dit onderzoeksproject was de ontwikkeling van chemokine therapieën voor moeilijk te genezen chronische wonden en brandwonden. Om dit te bereiken moest in kaart gebracht worden welke chemokinen een rol spelen in normale en abnormale wondgenezing. Hiervoor is vergeleken welke chemokinen aanwezig zijn in relatief goed genezende chirurgische wonden en in moeilijk te genezen chronische wonden en brandwonden. Tevens is het effect van verschillende chemokinen op huidcellen bepaald met betrekking tot processen (migratie en proliferatie) gericht op huidregeneratie.

In **hoofdstuk 2** wordt een nieuwe simpele methode beschreven die het mogelijk maakt om het wondbed van chronische wonden te analyseren op de aanwezigheid van chemokinen. Deze methode maakt gebruik van het weefsel dat in de behandeling van chronische wonden wordt verwijderd door chirurgisch afschrappen (debridement) van de wond. In chronische wond extracten werden 17 cytokines, chemokines en groeifactoren aangetoond met behulp van ELISA. Bio-activiteit assays toonden aan dat chemokinen in het chronische wond extract fibroblast migratie stimuleren. Daarnaast is aangetoond dat IL-1 α in het chronisch wond extract verantwoordelijk is voor stimulatie van gezonde cellen, getest in een huid construct. Deze nieuwe methode biedt een mogelijkheid om aan de hand van mediator bepalingen het chronische wond milieu te analyseren en suggereren tevens dat de vertraagde wondgenezing in chronische wonden niet het resultaat is van inactiviteit van bepaalde wondgenezing factoren.

Het doel van het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 3** was om aan te tonen welke chemokinen tijdens het normale wondgenezingproces reeds in de eerste uren na verwonding worden geproduceerd door verschillende cellen. Dit werd bestudeerd in wondvocht verkregen uit drains geplaatst in gesloten wonden na mamma-reductie operaties. Op verschillende locaties werden drains geplaatst, namelijk intra- en subcutaan. Resultaten laten zien dat chemokine profielen van wondvochten afhankelijk zijn van de afgifte van chemokinen door cellen aanwezig in het weefsel waarin de drain zich bevindt. Daarnaast tonen de resultaten aan dat de ontstekingsfase zeer snel na verwonding wordt geïnduceerd door de aanwezigheid van chemokinen die ontstekingscellen kunnen aantrekken. Het is bekend dat de vroege ontstekingsfase en ontstekingscellen een rol spelen bij het ontstaan van littekenhypertrofie. Deze resultaten suggereren dat chemokines hierbij betrokken zijn.

Om de rol van chemokinen in abnormale wondgenezing te bepalen is het eerst noodzakelijk om aan te tonen welke chemokinen aanwezig zijn in de wond. **Hoofdstuk 4** vergelijkt de chemokinen profielen in het wondvocht van chirurgische wonden (referentie voor normale wondgenezing) met die in het wondvocht van chronische- en brandwonden. In brandwonden zijn lage concentraties cytokinen en hoge concentraties chemokinen en groeifactoren aanwezig vergeleken met chirurgische wonden. In chronische wonden zijn eveneens lage concentraties cytokinen en hoge concentraties chemokinen en groeifactoren aanwezig vergeleken met chirurgische wonden. Opvallend was de hoge expressie van CCL5 en CCL27 in brandwonden en de hoge expressie van CXCL1 en CCL20 in chronische wonden. Deze resultaten geven informatie over de status van het wondbed van de verschillende wonden die bruikbaar kan zijn bij de ontwikkeling van nieuwe therapieën.

Grote excisie wonden zijn ondanks goede genezingscapaciteit vaak moeilijk te sluiten door de grootte van de wond. **Hoofdstuk 5** beschrijft de resultaten van het gebruik van een au-

toloog huidsubstituut op tumor excisie wonden. Positieve resultaten met het autologe huidsubstituut werden eerder beschreven voor het genezen van therapie resistente chronische wonden. Echter, applicatie van het huidsubstituut op excisie wonden resulteerde binnen 1 week in hypergranulatie van de wond. Om het verschil in genezing van beide wonden na gebruik van een huidsubstituut te verklaren is gekeken of oplosbare mediators aanwezig in het wondbed van chronische- en chirurgische wonden de genezingscapaciteit van het huidsubstituut kunnen beïnvloeden. Wondvochten van beide typen wonden zetten het huidsubstituut aan tot een verhoogde afgifte van granulatiweefsel stimulerende chemokines. Stimulatie van granulatiweefsel leidt in inerte chronische wonden juist tot genezing, maar in actieve excisie wonden tot hypergranulatie. In chronische wonden bleek dit proces IL-1 α afhankelijk en in excisie wonden TNF- α afhankelijk. Het huidsubstituut in zijn huidige vorm is daarom niet geschikt voor excisie wonden, maar neutralisatie van TNF- α voordat het huidsubstituut aangebracht wordt zou de formatie van granulatiweefsel kunnen remmen.

Naast keratinocyten, fibroblasten en endotheelcellen spelen ook stamcellen een belangrijke rol in het genezingsproces. Stamcellen zijn multipotente cellen die tot een beperkt aantal celtypen kunnen differentiëren. De aanwezigheid van multipotente stamcellen kan leiden tot weefselregeneratie met als stimulatie van de wondgenezing. Het doel van het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 6** was te bepalen of mesenchymale stamcellen aanwezig zijn in de dermis en/of in het vetweefsel van de huid, en te bepalen welke chemokinen de migratie en proliferatie van deze cellen zouden kunnen reguleren. De resultaten tonen aan dat de cellen die in het verleden beschreven werden als fibroblasten, stamcel eigenschappen vertonen. Stamcellen geïsoleerd uit de dermis en het vetweefsel vertonen een overeenkomend phenotype, maar verschillen wel in morfologie en differentiatie capaciteit. Deze verschillen bevestigen eerdere bevindingen, evenals de verhoogde α -SMA expressie en contractie van vet stamcellen. Resultaten laten zien dat dermale en vet stamcellen een zelfde set chemokine receptoren tot expressie brengen op het cel oppervlakte. Verschillende chemokine liganden, waarvan CCL5/RANTES de sterkste bleek, induceren migratie van beide celtypen.

In het epithelialisatie proces staan de keratinocyten centraal. Re-epithelialisatie begint met keratinocyten migratie en proliferatie gevolgd door hun differentiatie ter herstel van de beschadigde epidermis. In de studie beschreven in **hoofdstuk 7** zijn verschillende chemokine receptoren op keratinocyten geïdentificeerd die betrokken zijn bij de autocrine regulatie van re-epithelialisatie na verwonding van de huid. CCR1, 10, CXCR1, 2 en 3 en hun monospecifieke chemokine liganden CCL14, CCL27, CXCL8, CXCL1 en CXCL10 stimuleren keratinocyt migratie en proliferatie. De genoemde chemokines bleken ook door keratinocyten geproduceerd te worden in een *in vitro* epidermaal model na verwonding. Tot nu toe werd CCL27 beschreven als een chemokine die specifiek door keratinocyten wordt geproduceerd en uitgescheiden wordt om T-cellen aan te trekken naar de huid. **Hoofdstuk 8** beschrijft

een verhoogde CCL27 expressie tijdens re-epithelialisatie na verwonding in het front van de migrerende epidermis. Ook wordt CCL27 aangetoond in het wondbed van chirurgische- en brandwonden. In **hoofdstuk 8** wordt de rol van CCL27 in het wondgenezing nader bepaald en wordt bestudeerd of CCL27 een effect heeft op de migratie, proliferatie en productie van ontstekingsfactoren (VEGF, CXCL1, CXCL8, IL-6, CCL2, CCL5, CCL20) door verschillende cellen in en om het wond gebied (keratinocyten, stamcellen uit dermis en vetweefsel, endotheelcellen, granulocyten en monocytten). Resultaten laten zien dat CCL27 na verwonding verhoogd wordt uitgescheiden door keratinocyten, endotheelcellen en monocytten. Deze verhoogde CCL27 productie zet stamcellen in het vetweefsel aan tot productie van factoren betrokken bij angiogenese, granulatie weefsel formatie en inflammatie. Tegelijkertijd stimuleert CCL27 migratie en proliferatie van keratinocyten met als doel re-epithelialisatie.

Wonden in de mond genezen sneller en met minder littekenvorming dan wonden in de huid. Histatine is een eiwit aanwezig in het humane speeksel en lijkt een rol te spelen in deze superieure wondgenezing. **Hoofdstuk 9** beschrijft dat histatine re-epithelialisatie stimuleert in een *in vitro* wondgenezing model van de huid. Het effect van histatine is afhankelijk van de structuur van het eiwit, waarbij het cyclische eiwit actiever is dan het lineaire histatine in het stimuleren van celactiviteit. Tevens werd aangetoond dat een G-eiwit gekoppelde receptor betrokken is bij de cel activatie door histatine.

Dit proefschrift beschrijft dat verschillende chemokine profielen gevonden worden in chirurgische, chronische en brandwonden. Daarnaast wordt het effect van enkele chemokinen op specifieke cellen in en om het wondgebied beschreven. In hoofdstuk 10 wordt deze informatie gebruikt om therapieën voor te stellen voor het genezen van chronische en brandwonden. De resultaten beschreven in dit proefschrift en klinische bevindingen tonen aan dat een behandeling voor inerte chronische wonden de formatie van granulatiweefsel moet stimuleren ten einde wondgenezing te bereiken. Een voorgestelde behandeling voor het genezen van chronische wonden is de applicatie van een gekweekt autoloog huidsubstituut. Een andere voorgestelde behandeling voor chronische wonden is een cocktail van recombinant histatine en recombinante chemokinen, zoals CCL5 en CCL27. Maar, in tegenstelling tot chronische wonden moet bij de behandeling van brandwonden de duur van het ontstekingsproces ingeperkt worden evenals de vorming van granulatie weefsel. Een nieuwe behandeling voor brandwonden zou een combinatie therapie kunnen zijn bestaande uit het voorbereiden van de wond met anti-TNF α en vervolgens applicatie van een autoloog gekweekt huidsubstituut. Een ander optie zou geboden kunnen worden met het aanbrengen van een cocktail van neutraliserende antilichamen voor CCL27 en CCL5, eventueel samen met recombinant histatine.