

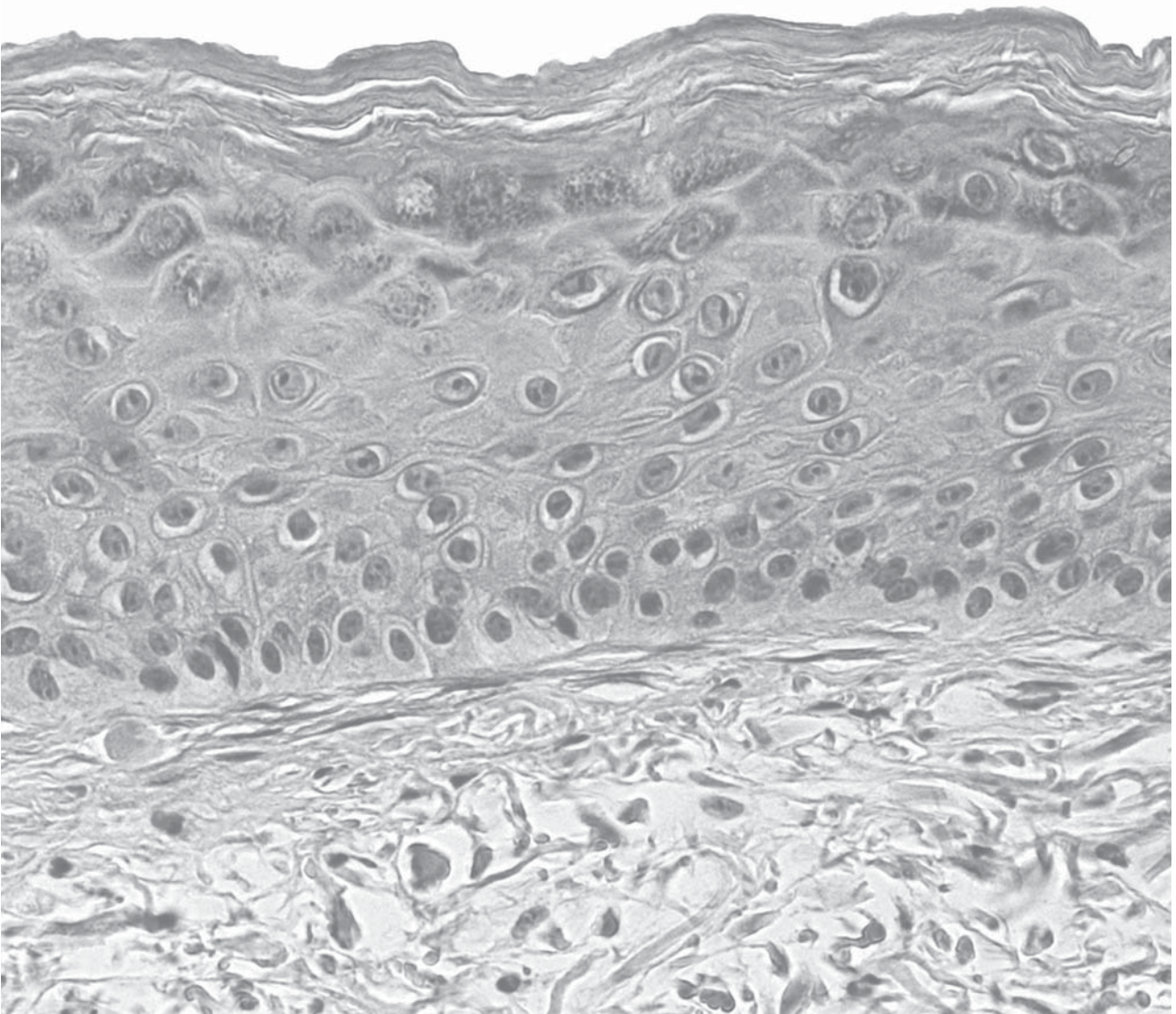
Chapter 10

Nederlandse samenvatting

List of publications

Dankwoord

About the author



NEDERLANDSE SAMENVATTING

De ontwikkeling van een in kweek gemaakt humaan hypertrofisch huidmodel

De huid is het grootste orgaan van de mens en heeft een belangrijke functie in het beschermen van het lichaam tegen indringers. Op het moment dat de huid wordt verwond, treedt het proces wondgenezing in werking. Wondgenezing is een ingewikkeld proces dat bestaat uit vier overlappende fasen: hemostase, inflammatie, proliferatie en remodelering. De huid wordt hersteld en meestal blijft een klein, niet verheven en vaak nauwelijks zichtbaar litteken achter. Dit noemen we een normotrofisch litteken. Echter bij de genezing van diepe wonden of bij personen die aanleg hebben, kan een fibrotisch litteken ontstaan. Keloïden en hypertrofische littekens zijn beide fibrotische littekens. Deze littekens zijn sterk verdikt, hard, rood en veroorzaken regelmatig jeuk en pijn. Hierdoor zijn ze niet alleen *esthetisch* storend maar kunnen ook leiden tot verminderde mobiliteit doordat ze het gebruik van onderliggende gewrichten beperken. De pathogenese van fibrose in de huid is ondanks veel onderzoek grotendeels onbekend. Onderzoek naar de oorzaak van hypertrofie wordt bemoeilijkt door gebrek aan relevante humane *in vitro* (in kweek gemaakte) modellen. Ook het gebruik van diermodellen is beperkt, doordat dieren een andere huidfysiologie hebben en nauwelijks hypertrofie in de huid ontwikkelen. Daarnaast probeert de EU het gebruik van diermodellen terug te dringen. Het doel van dit onderzoek is het ontwikkelen en valideren van een in kweek gemaakt humaan hypertrofisch huidmodel. Dit model kan worden gebruikt om de pathogenese van littekenhypertrofie te ontrafelen, mogelijk nieuwe drugtargets tegen littekenhypertrofie te identificeren en om nieuwe therapeutica te testen.

In hoofdstuk 2 vergelijken we de expressie van genen en eiwitten betrokken bij inflammatie, angiogenese (vorming van nieuwe bloedvaten uit bestaande bloedvaten) en de vorming van extracellulaire matrix (ECM) in patiënten die hypertrofische littekens in plaats van normotrofische littekens vormen. Dit doen we om meer kennis over de pathogenese van hypertrofische littekenvorming te krijgen en markers te identificeren voor het te ontwikkelen hypertrofische littekenmodel. We vonden dat hypertrofische littekenvorming samenviel met een langdurige verlaagde expressie van inflammatoire (TNF, IL-1 α , IL-1RN, CCL2, CCL3, CXCL2, CXCR2, C3 en IL-10) en angiogene (ANGPT1, FGF2 en YWHAZ) genen. Dit kwam overeen met een verlaagd eiwitniveau van inflammatoire factoren en een vertraagde infiltratie van type 2 macrofagen in patiënten die hypertrofische littekens in plaats van normotrofische littekens vormen. Daarentegen was er een verhoogde expressie van genen die betrokken zijn bij de vorming van ECM (COL3A1, TGF β 3 en PLAU) gedurende hypertrofische littekenvorming ten opzichte van normotrofische littekenvorming. De verminderde expressie van inflammatoire genen gedurende hypertrofische vergeleken met normotrofische littekenvorming suggereert een meer

immuunonderdrukkende dan immuunstimulerende reactie en kan deels het falen van immuunonderdrukkende therapieën tegen hypertrofievorming in de huid verklaren. In plaats van de momenteel vaak gebruikte immuunonderdrukkende therapieën, zijn immuunstimulerende therapieën misschien een betere strategie voor het verbeteren van de littekenkwaliteit. Onze gegevens laten zien dat de vorming van littekens een dynamisch proces is dat het best kan worden bestudeerd over een periode van tijd in plaats van op een bepaald tijdstip.

Vroeg in het project vermoedden we dat mesenchymale cellen afkomstig uit vetweefsel (ASC) meer kunnen bijdragen aan hypertrofische littekenvorming dan mesenchymale cellen uit de dermis (dermale fibroblast). Dit werd verder ondersteund door het feit dat het wondbed van derdegraads brandwonden, waar het vetweefsel bloot ligt, meestal resulteert in de formatie van een hypertrofisch litteken. Daarom hebben we in hoofdstuk 3 de reactie van ASC, dermale fibroblasten en keratinocyten bekeken wanneer ze in contact komen met brandwondenvocht. Brandwondenvocht dat verkregen is van derdegraads brandwonden bleek meerdere factoren (bijvoorbeeld CXCL8, bFGF, CCL27) te bevatten die betrokken zijn bij de wondgenezing. Het vocht zou mogelijk binnenkomende of getransplanteerde cellen kunnen activeren. Monolagen van ASC en dermale fibroblasten blootgesteld aan brandwondenvocht verhogen de secretie van factoren die betrokken zijn bij inflammatie en wondgenezing (CXCL1, CXCL8, CCL2, CCL20), maar alleen ASC reageerden na stimulatie met brandwondenvocht met het verhogen van de secretie van angiogene factor VEGF en wondgenezingsfactor IL-6. Dit wijst erop dat beide cellen inflammatie en de vorming van ECM stimuleren wanneer ze worden getransplanteerd in een wondbed, maar dat ASC potenter zijn in het stimuleren van angiogenese en wondgenezing dan dermale fibroblasten. Echter wanneer we ASC en dermale fibroblasten in een 3D huidsubstituut (met keratinocyten) inbrachten, waren de verschillen minder duidelijk dan in monolagen. Dit wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de hoge secretie van huidsubstituten door het synergistische effect tussen keratinocyten en mesenchymale cellen. Dit suggereert dat huidsubstituten gunstig zijn voor chronische wonden waarbij activering van het wondbed essentieel is voor de genezing. Dit is in lijn met de klinische resultaten die laten zien dat huidsubstituten geschikt zijn voor het genezen van chronische wonden. Uit onze gegevens blijkt dat huidsubstituten bestaande uit ASC in plaats van dermale fibroblasten waarschijnlijk meer geschikt zijn voor de behandeling van chronische wonden. De differentiële reactie in secretie van factoren van ASC en dermale fibroblasten werd ook gezien als de cellen werden blootgesteld aan rh-CCL27. CCL27 is een huidspecifieke chemokine, die ook werd gedetecteerd in brandwondenvocht. Vanuit een evolutionair standpunt kan het verschil tussen ASC en dermale fibroblasten worden beschouwd als een functie van de ASC. Levensbedreigende diepe wonden waar het vetweefsel bloot ligt, moeten namelijk

snel worden gesloten ook al resulteert dat in fibrotische littekenvorming. Keratinocyten reageerden niet door de secretie van factoren betrokken bij wondgenezing te verhogen, maar ze toonden verhoogde proliferatie en migratie na CCL27 stimulatie. Dit resulteert waarschijnlijk in een versnelde wondsluiting en suggereert dat keratinocyten gunstig zijn voor de behandeling van wonden waar snelle wondsluiting zonder stimulatie van ECM belangrijk is (bijvoorbeeld brandwonden). Dit is in overeenstemming met klinische studies bij brandwonden waar keratinocyten worden gebruikt om de wondsluiting te versnellen zonder ECM formatie te stimuleren.

In hoofdstuk 3 en 4 hebben we verder in detail het effect van CCL27 op ASC, dermale fibroblasten, keratinocyten en monocytten, endotheelcellen en granulocyten bestudeerd. CCL27 is aanwezig in verschillende wondvochten, maar de functie van CCL27 met betrekking tot wondgenezing is grotendeels onbekend. Alle onderzochte celtypen brengen de receptor voor CCL27 (CCR10) tot expressie. Naast de expressie van receptor CCR10 kunnen keratinocyten, endotheelcellen en monocytten CCL27 uitscheiden. Naast de secretie van CCL27, verhogen keratinocyten dus ook proliferatie en migratie na blootstelling aan CCL27. Monocytten reageren op CCL27 door de secretie van meer inflammatoire factoren (IL-6, CXCL1, CXCL8, CCL2 en CCL20). Hoewel granulocyten, dermale fibroblasten en endotheelcellen de receptor CCR10 tot expressie brengen, reageren ze niet op CCL27. Deze resultaten geven aan dat bij CCL27 blootstelling, keratinocyten hoofdzakelijk worden geactiveerd om wondsluiting te bevorderen. Monocytten reageren door de secretie van meer inflammatoire factoren (IL-6, CXCL1, CXCL8, CCL2 en CCL20) en versterken daardoor waarschijnlijk de immuunreactie. Daarentegen reageren ASC na CCL27 stimulatie niet alleen met de secretie van immuunfactoren (CXCL1 en CXCL8) maar ook met de secretie van factoren betrokken bij angiogenese en ECM vorming. Dit kan leiden tot verhoogde productie van ECM. Samen benadrukken deze resultaten een multifunctionele rol voor CCL27 in de wondgenezing van de huid.

Na verwonding wordt een tijdelijke fibrinmatrix gevormd die dient als een netwerk voor binnenkomende cellen (bijvoorbeeld endotheelcellen). Het is bekend dat verschillende fibrinogeenvarianten de neovascularisatie kunnen beïnvloeden. Voordat neovascularisatie plaatsvindt, is het wondbed een zuurstofarme omgeving (<5% zuurstof), oftewel hypoxisch. Hypoxie kan mogelijk littekenvorming beïnvloeden. Om de bijdrage van ASC in ongunstige littekenvorming te bestuderen, hebben we de invloed van zuurstofspanning (hypoxie 1% en normoxie 20% zuurstof) en natuurlijk voorkomende varianten van fibrinogeen op ASC proliferatie (celdeling) en differentiatie bestudeerd in hoofdstuk 5. ASC gekweekt in 1% zuurstof lieten verhoogde proliferatie en verminderde celveroudering zien vergeleken met ASC gekweekt in 20% zuurstof. De differentiatie van ASC naar adipogene en osteogene lijnen was verbeterd bij 20% zuurstof, terwijl 1% zuurstof

verbeterde chondrogene differentiatie gaf. De verschillende fibrinogeen coatings hadden geen invloed op de ASC proliferatie en differentiatie en zijn vermoedelijk geen nuttige extra toevoeging als onderdeel van de dermale matrix voor ons hypertrofische littekenmodel. Aan de andere kant verandert de zuurstofspanning het gedrag van ASC en is er meer onderzoek nodig om te bepalen hoe het littekenvorming kan beïnvloeden. Onze waarneming dat ASC proliferatie en differentiatie niet wordt beïnvloed door verschillende fibrinogeen coatings suggereert dat fibrinogeen in combinatie met ASC een geschikte matrix is voor het toepassen van weefselregeneratie. Mogelijk zijn hypoxische kweekomstandigheden gunstig voor het kweken van ASC cultuur doordat dit resulteert in verhoogde proliferatie en verminderde veroudering van de cellen.

In dit project werden twee verschillende hypertrofische littekenmodellen ontwikkeld. Een grote uitdaging is het ontkennen van een littekenmodel dat onderscheid maakt tussen de twee type fibrotische littekens: hypertrofische littekens en keloïden. In hoofdstuk 6 is een littekenmodel ontwikkeld door *in vitro* een 3D litteken te reconstrueren. Dit werd met behulp van primaire cellen, geïsoleerd van uitgesneden littekens (normale huid, normotrofische littekens, hypertrofische littekens en keloïden), gedaan. In deze tissue-engineered littekenmodellen hebben we parameters geïdentificeerd die de normale huid onderscheiden van normotrofische littekens en fibrotische littekens. Beide fibrotische littekenmodellen vertoonden een toegenomen dermale dikte, verhoogde contractie en verhoogde α -SMA kleuring in vergelijking met de normale huid en normotrofische littekenmodellen. In alle modellen was een vergelijkbare vimentine kleuring te zien wat suggereert dat er een gelijk aantal fibroblasten aanwezig was in de verschillende modellen. Het normotrofische littekenmodel en hypertrofische littekenmodel konden worden onderscheiden door een verminderde afscheiding van inflammatoire factoren (CCL5, CXCL1 en IL-6) in het hypertrofische littekenmodel vergeleken met het normotrofische littekenmodel. Interessant genoeg konden ook verschillen tussen de *in vitro* hypertrofische litteken- en keloïdmodellen worden gevonden. De factor CCL5 is verlaagd in het hypertrofische littekenmodel ten opzichte van het keloïd model. IL-18 is juist verhoogd in het hypertrofische littekenmodel ten opzichte van het keloïd model. Het gen ITGA5, dat betrokken is bij de adhesie van cellen aan de matrix, was verhoogd in het hypertrofische littekenmodel ten opzichte van het keloïd model terwijl het gen MMP1, dat betrokken is bij ECM-afbraak, juist verlaagd was bij het hypertrofische littekenmodel ten opzichte van het keloïd model. Deze gegevens tonen duidelijk aan dat we littekenmodellen kunnen ontwikkelen van verschillende soorten littekens die normale huid, normotrofische littekens, hypertrofische littekens en keloïden van elkaar onderscheiden. Het geeft aan dat de cellen geïsoleerd van littekens hun intrinsieke kenmerken behouden en het suggereert dat de pathogenese van keloïd en hypertrofie verschillend is. Jammer genoeg zijn deze *in vitro* modellen afhankelijk van uitgesneden littekens die beperkt verkrijgbaar zijn.

Daarom is in hoofdstuk 7 een tweede hypertrofisch littekenmodel ontwikkeld, bestaande uit een gereconstrueerde epidermis op een ASC bevolkte matrix. De cellen om dit model te maken, kunnen worden verkregen uit gezonde volwassen buikhuid die routinematig bij chirurgische procedures wordt verwijderd en dus in grote getale te bemachtigen zijn. In dit model zijn kwantificeerbare parameters (contractie, collageen I secretie, α -SMA kleuring, epidermale dikte, uitgroei van de epidermis, secretie van CXCL8 en IL6) geïdentificeerd en vervolgens is het model gevalideerd met een testpanel van geneesmiddelen tegen hypertrofische littekens. Interessant genoeg resulteerde de behandeling van elk geneesmiddel in een normalisering van een andere combinatie van parameters (bijvoorbeeld 5-fluorouracil verminderde de contractie en de epidermale dikte in tegenstelling tot triamcinolon dat de collageen I secretie en epidermale dikte verminderde). Dit ondersteunt klinische bevindingen dat een combinatie van de geneesmiddelen 5-fluorouracil en triamcinolon beter is voor littekenverbetering. Dat geen van de geneesmiddelen alle littekenparameters kon normaliseren, correleert met de klinische ervaring dat nog geen enkel geneesmiddel een hypertrofisch litteken naar een normale huid kan herstellen. ASC kunnen dus in combinatie met gezonde keratinocyten worden gebruikt om een *in vitro* hypertrofisch littekenmodel te genereren. Dit model kan worden gebruikt om de pathogenese van littekenhypertrofie te ontrafelen, mogelijk nieuwe drugtargets tegen littekenhypertrofie te identificeren en om nieuwe therapeutica te testen. Het model kan ook worden gebruikt om nieuwe combinaties van bestaande therapeutica, die nu worden gebruikt voor littekenverbetering, uit te testen om te kijken of ze leiden tot een verbetering van het litteken.

Ondanks al het onderzoek op het gebied van wondgenezing en littekenvorming is er nog steeds geen optimale behandeling voor fibrotische littekens. De extrapolatie van de onderzoeksresultaten wordt bemoeilijkt door niet-optimale littekenmodellen. In hoofdstuk 8 hebben we de voortgang, de beperkingen en toekomstige uitdagingen van tissue-engineered littekenmodellen besproken. Hoewel onze littekenmodellen beschreven in hoofdstuk 6 en 7 een duidelijke verbetering zijn, blijven belangrijke vragen onbeantwoord. De modellen geven bijvoorbeeld geen antwoord op de vraag waarom sommige mensen een hypertrofisch litteken ontwikkelen na een simpele chirurgische ingreep en anderen niet. Ook is er nog geen rekening gehouden met de genetische aanleg van individuen en de betrokkenheid van het immuunsysteem. Toekomstig onderzoek naar hypertrofie en keloïd littekenvorming kan mogelijk worden versneld en verbeterd door het multidisciplinair vakgebied 'organ-on-a-chip'. 'Organ-on-a-chip' kan *in vitro* geproduceerd weefsel op een natuurlijkere manier blootstellen aan verschillende celtypen die elkaar kunnen beïnvloeden onder nauwkeurig gecontroleerde omstandigheden in een microfluidic chip. Een dergelijke aanpak kan mogelijk de pathogenese van fibrotische littekens ontrafelen. Dit is een mooie uitdaging voor de toekomst.