

ALGEMENE SAMENVATTING

De behandeling van een urogenitale verzakking oftewel *pelvic organ prolapse* (POP) is een grote uitdaging voor (uro-)gynaecologen en urologen wereldwijd, omdat het een veel voorkomende aandoening is zonder optimale behandeling. De meest voorkomende soort verzakking bij vrouwen is een blaasverzakking, de zogenaamde cystocele. Bij een blaasverzakking puilt de blaas uit in de schede. Dit is het gevolg van een defect in het vaginale bindweefsel dat de blaas op zijn plek moet houden. Dit bindweefsel bestaat uit compacte extracellulaire matrix (ECM) die constant aangemaakt en geremodelleerd wordt door fibroblasten. De sterkte van het weefsel hangt af van de homeostase tussen productie en afbraak van de matrix. Deze homeostase lijkt in het vaginaweefsel van patiënten met POP verloren te zijn gegaan; de ECM van verzakt vaginaweefsel blijkt een afwijkende compositie en afwijkende mechanische eigenschappen te hebben. Toch is er weinig bekend over de rol van fibroblasten en hun interacties met de ECM in het ontstaan en de ontwikkeling van POP. Het doel van dit proefschrift was om meer inzicht te krijgen in de pathogenese van POP door het identificeren van verschillen in het gedrag van de cellen, de compositie van de matrix en cel-matrix interacties in vaginaweefsels van vrouwen met en zonder POP. De hypothese was, dat de meeste patiënten met POP een defect ontwikkelen in cel-matrix interacties als gevolg van het oprekken van het weefsel tijdens het verzakken.

Deze hypothese werd op meerdere manieren getoetst. In **hoofdstuk 2** wordt een dynamisch *in-vitro* model beschreven waarbij de mechanorespons van vaginale fibroblasten werd getest op met synthetisch collageen I gecoate, of niet-gecoate substraten. In het *in-vitro* model worden de geïsoleerde vaginale fibroblasten gerekt door een continue fysiologische rek toe te passen die de ademhaling, die de vaginale wand continue belast, nabootst. Uit het experiment bleek dat fibroblasten uit weefsel van patiënten met een verzakking een lagere mechanorespons hadden dan cellen van controle weefsel. Dit was te zien aan een vertraagde ordening haaks in de richting van de uitgeoefende kracht, op platen bedekt met collageen I en een lagere uitscheiding en activering van matrix metalloprotease-2 (MMP-2) na cyclische mechanische belasting op onbedekte platen.

In **hoofdstuk 3** werden de functionele karakteristieken van vaginale fibroblasten geëvalueerd door gebruik te maken van het model uit **hoofdstuk 2** en een contractie-assay. Om het effect van POP te bestuderen werden fibroblasten verzameld uit een zeer strict cohort van patiënten dat alleen Kaukasische, premenopausale vrouwen met en zonder cystocele bevatte, zodat de effecten van veroudering werden uitgesloten. Om onderscheid te kunnen maken tussen verworven en aangeboren defecten werden bovendien bipten genomen van verzakt en niet-verzakt vaginaweefsel van dezelfde vrouw, zodat elke patiënt haar eigen controle was. Resultaten lieten zien dat de contractie van collageen door fibroblasten uit verzakt weefsel verminderd is ten opzichte van niet-verzakt weefsel. Bovendien scheidden fibroblasten uit verzakt weefsel minder MMP-2 uit dan fibroblasten uit niet-verzakt weefsel, op zowel met collageen I bedekte als op onbedekte platen. Samen laten de resultaten uit de **hoofdstukken 2 en 3** zien dat fibroblasten van vrouwen met een verzakking minder contractiele capaciteiten en een lagere mechanorespons hebben dan cellen verkregen uit niet-verzakt weefsel en dan voornamelijk op onbedekt platen. Hieruit

trekken we de conclusie dat fibroblasten gevoelig zijn voor mechanische belasting. Ook wordt het gedrag van de fibroblast beïnvloed door de omgeving waarin de cel zich bevindt (cel-matrix interactie). In verzaakt weefsel is deze cel-matrix interactie aangetast. Er werden geen verschillen gevonden in de functionaliteit van fibroblasten verkregen uit niet-verzaakt weefsel van vrouwen met een verzakking en gezonde controles. Hieruit concluderen we dat in onze onderzoekspopulatie, de veranderingen in de functionele eigenschappen van fibroblasten eerder het gevolg (verworven) dan de oorzaak (intrinsiek/ aangeboren) van de verzakking zijn.

De resultaten beschreven in **hoofdstuk 4** wijzen ook in de richting van verworven veranderingen in de matrixcompositie van verzaakt weefsel vergeleken met niet-verzaakt vaginaweefsel. Biopten van hetzelfde onderzoekscohort als in **hoofdstuk 3** werden histologisch en biochemisch met elkaar vergeleken en evenals bij de cellulaire functionaliteit werden er geen verschillen gevonden tussen niet-verzakte vaginaweefsels van vrouwen met een verzakking vergeleken met hetzelfde weefsel van gezonde controles. Resultaten lieten een toename zien in pyridinoline collageen crosslinks, een stijging van het aantal gladde spiercellen en een trend naar meer collageen III en elastine in verzaakt vaginaweefsel in vergelijking met niet-verzakte weefsels van dezelfde patiënt. Omdat de meeste geïncubeerde patiënten in de cohort uit de **hoofdstukken 3 en 4** een verkregen defect hadden, werd in **hoofdstuk 5** een *microarray* analyse uitgevoerd om specifieke biologische processen (*pathways*) gerelateerd aan POP te identificeren. Een clusteranalyse liet zien dat de meeste ontregelde genen geclusterd waren in twee *pathways*: (i) “het ECM/integrine *pathway* cluster” en (ii) “het gladde spiercel/contractie *pathway* cluster”. Relateren we deze uitkomsten aan de immunohistochemische uitkomsten van de samenstelling van de ECM beschreven in hoofdstuk 4, dan valt op dat de groep vrouwen met de grootste toename in gladde spiercellen, ook behoort tot de groep met verhoogde activiteit in het gladde spiercel/contractie *pathway* cluster. Deze resultaten leveren bewijs voor het bestaan van inter-individuele verschillen tussen niet-verzaakt en verzaakt weefsels en impliceren verschillende compensatiemechanismen van het weefsel als reactie op externe stimuli zoals mechanische belasting.

Het is bekend dat de matrix van verzaakt weefsel stijver is dan niet-verzaakt weefsel van gezonde vrouwen. Omdat de meeste patiënten met een verzakking postmenopausal zijn, beschrijft **hoofdstuk 6** een *in-vitro* experiment om te onderzoeken wat de effecten zijn van POP en menopausale status op de capaciteit van vaginale fibroblasten om matrix te produceren en remodeleren. Het bleek dat de aanwezigheid van POP de kwaliteit van de matrix geproduceerd door vaginale cellen vermindert. Aangedane fibroblasten verkregen uit weefsel van postmenopausale vrouwen met een verzakking produceerden stijvere matrices met meer collageen en vezels en met een mindere anisotropische oriëntatie vergeleken met matrices geproduceerd door fibroblasten van gezonde controles. Vergelijkbaar met normale wondgenezing was er een tijdelijke stijging van een myofibroblastisch fenotype, die weer verloren ging na de piek van weefsel remodelering. Deze data suggereren dat een veranderde matrixproductie in verzaakt weefsel geen gevolg

lijkt te zijn van abnormale fenotypische veranderingen richting myofibroblasten. Echter, deze resultaten zijn verkregen op kunstmatige substraten. Daarom heb ik in **hoofdstuk 7** een nieuw celkweekstelsel geïntroduceerd waarbij gebruik is gemaakt van gezond en verzakt vaginaal voorwandweefsel waaruit de cellen zijn verwijderd. Door toevoeging van gezonde en door verzakking aangedane fibroblasten aan deze gedecellulariseerde weefsels, kunnen we de effecten van verzakking op de cel-matrix interactie bestuderen. De effecten van verzakt en niet-verzakt weefsel op de fenotypische overgang van fibroblast naar myofibroblast verkregen uit verzakte en niet-verzakte weefsels werden onderzocht. In deze pilotstudie hebben we succesvol gebruik gemaakt van gedecellulariseerde vaginale wandweefsels als *in vitro* kweekstelsel om cel-matrix interacties te bestuderen in POP. Fibroblasten overleefden en migreerden in de exogene gedecellulariseerde matrices, waarbij de gezonde controle cellen beter hechtten dan de uit verzakt weefsel verkregen cellen. De stijvere muscularis laag van de gedecellulariseerde matrices induceerde myofibroblastdifferentiatie van door POP aangedane fibroblasten, maar niet van controle fibroblasten en de differentiatie was nadrukkelijker in de POP matrices dan in controle matrices. Hieruit concluderen we dat de ontwikkeling van fibroblast naar myofibroblast afhankelijk is van de omgeving (de ECM) en lijkt te zijn aangetast in cellen verkregen uit verzakt vaginaal voorwandweefsel.

Alles tezamen leveren resultaten uit dit proefschrift bewijs voor verworven veranderingen in celgedrag, weefselcompositie en cel-matrix interacties bij premenopausale Kaukasische vrouwen met een verzakking van de blaas. De verkregen cellulaire veranderingen lijken permanent te zijn, omdat ze zelfs gevonden worden nadat de cellen *in vitro* verscheidene kweekrondes hadden doorlopen. Bovendien hebben we twee verschillende moleculaire biologische processen geïdentificeerd die bij zouden kunnen dragen aan het aanpassingsproces van het weefsel in geval van een verzakking. Deze nieuwe kennis is van belang voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen van verzakkingen. In de toekomst zou met gebruikmaking van op autologe cellen gebaseerde *tissue engineering*, het aangedane bindweefsel van de bekkenbodem kunnen worden hersteld. Nieuwe behandelingen zouden zich naast herstel van de anatomie en functie van de bekkenbodem, ook moeten richten op het optimaliseren van de extracellulaire matrix en de functionaliteit van de betrokken cellen in het steunweefsel van de bekkenbodem. Ziekte specifieke *in-vitro* modellen kunnen hierbij een belangrijke rol spelen.