



Cellulaire en moleculaire mechanismen betrokken bij littekenloze wondgenezing in de foetale huid

Samenvatting van een proefschrift

Deel 2. De rol van het immuunsysteem

M. Walraven, M.M.W. Ulrich*

Op 17 maart 2016 is Mariëlle Walraven gepromoveerd aan de Geneeskunde faculteit van de Vrije Universiteit Amsterdam. Haar proefschrift is getiteld 'Cellular and molecular mechanisms involved in scarless wound healing in the fetal skin' en het onderzoek beschreven in haar proefschrift is verricht bij de afdeling Moleculaire Celbiologie en Immunologie (MCBI) van het VUmc en in het laboratorium van de Vereniging Samenwerkende Brandwondcentra Nederland (VSBN) onder begeleiding van Magda Ulrich, Rob Beelen en Marjolein van Egmond. In dit artikel worden de belangrijkste bevindingen uit het tweede deel van haar proefschrift beschreven. Een digitale versie van haar proefschrift is te vinden in de dare-database van de VU (<http://dare.uvu.vu.nl>).

De foetale huid heeft de intrinsieke eigenschap om littekenloos te genezen. Inzicht in de processen die betrokken zijn bij deze littekenloze wondgenezing kan helpen bij het ontwikkelen van therapieën om volwassen wondgenezing te verbeteren. Studies naar foetale wondgenezing beschrijven verschillen in samenstelling van de huid, verschillen in concentraties van groeihormonen en een verminderde ontstekingsreactie tijdens de littekenloze foetale wondgenezing (1). De verminderde ontstekingsreactie tijdens de foetale wondgenezing lijkt samen te hangen met de verminderde aanwezigheid van immuuncellen in de foetale huid. Aangezien het immuunsysteem een belangrijke rol speelt tijdens de wondgenezing kan deze verminderde aanwezigheid in de foetale huid een belangrijke rol te spelen bij de littekenloze wondgenezing. In dit artikel worden de bevindingen op het gebied van het immuunsysteem in de foetale huid beschreven en wordt ingegaan op de rol die het immuunsysteem kan spelen bij littekenloze wondgenezing.

Het immuunsysteem speelt een belangrijke rol bij wondgenezing. De ontstekingsreactie die het immuunsysteem veroorzaakt is belangrijk voor het voorkomen van wondinfecties. Een verminderde immuunreactie kan leiden tot wondinfectie wat uiteindelijk leidt tot een verstoorde wondgenezing. In contrast lijkt een overmatige immuunreactie zoals die optreedt bij chronische wonden of brandwonden, echter ook tot verstoorde wondgenezing te leiden. Onder deze condities (chronische wonden en brandwon-

den) blijft de ontstekingsfase hangen in de acute fase en vindt er niet of op een laat tijdstip resolutie (remming) van deze acute ontstekingsfase plaats. Tijdige overgang naar de volgende fase, de anti-inflammatoire fase, in de wondgenezing is van belang voor een goed herstel van de huid. Onderzoeken waarbij het immuunsysteem in de vroege fase geremd wordt, laten zien dat dit kan leiden tot verbeterde wondgenezing (2,3). Bovendien is bij proefdieren aangetoond dat verbeterde wondgenezing en minder littekenvorming optreden bij dieren die een immuuncel missen die in de acute fase van de ontstekingsreactie belangrijk is (4). Deze onderzoeken laten het belang van een goed gereguleerde ontstekingsreactie tijdens de wondgenezing zien. Bij de foetale wondgenezing is de regulatie van deze immuunreactie kennelijk optimaal waardoor littekenloze genezing op kan treden in de foetale huid.

De verminderde ontstekingsreactie tijdens foetale wondgenezing lijkt samen te hangen met een verminderde aanwezigheid van immuuncellen in de foetale huid. In een recent gepubliceerd artikel hebben we aangetoond dat er inderdaad significant minder immuuncellen aanwezigheid zijn in de gezonde foetale huid vergeleken met de gezonde volwassen huid (5). Hiervoor hebben we verschillende soorten immuuncellen bestudeerd van zowel het naïeve als van het aangeleerde immuunsysteem. Zo zijn er in de gezonde foetale huid erg weinig macrofagen te zien terwijl deze in grote aantallen voorkomen in de volwassen huid.

Macrofagen kunnen voorkomen in verschillende vormen. M1 dat pro-inflammatoir is en in de acute ontstekingsfase aanwezig is en de M2, de ontstekingsremmende vorm. Deze laatste ontstekingsremmende vorm komt verhoudingsgewijs ook vaker voor in de foetale huid. Ook mestcellen, dendritische cellen en Langerhans-cellen komen significant minder voor in de foetale huid. Tot slot zijn van het aangeleerde immuunsysteem geen B-cellen te vinden in zowel de volwassen als de foetale huidsamples. T-cellen worden wel gezien in beide huidsamples maar komen ook significant meer voor in de volwassen huid. Gezamenlijk laten deze immunohistochemische kleuringen zien dat er veel minder immuuncellen aanwezig zijn in de foetale huid vergeleken met de volwassen huid. Vermoedelijk leiden deze significante verschillen tot een verminderde (acute) ontstekingsreactie in de foetale huid.

De verminderde aanwezigheid van immuuncellen in de foetale huid komt niet door een onderontwikkeld immuunsysteem in de foetus. Vanaf vijftien weken gestatie zijn alle cellen van het immuunsysteem aanwezig in de circulatie en tijdens de 17^e tot en met de 24^e week gestatie zijn de aantallen immuun-voorloper cellen (dit zijn de cellen die differentiëren naar de verschillende immuuncellen) zelfs veel hoger in het foetale bloed vergeleken met het bloed van pasgeborenen (6-8). Om deze bevindingen te verifiëren in onze eigen samples hebben we immuuncellen aangekleurd met een algemene immuuncel-marker, namelijk CD45. Zoals verwacht bevatte de foetale huid rond achttien weken gestatie weinig CD45-positieve cellen vergeleken met de volwassen huid. De lymfeklieren van een foetus bij achttien weken gestatie bevatten echter wel volop CD45-positieve cellen, vergelijkbaar met een volwassen lymfeklier (5). Deze resultaten bevestigen dat de verminderde aanwezigheid van immuuncellen in de foetale huid niet komt door een onderontwikkeld immuunsysteem.

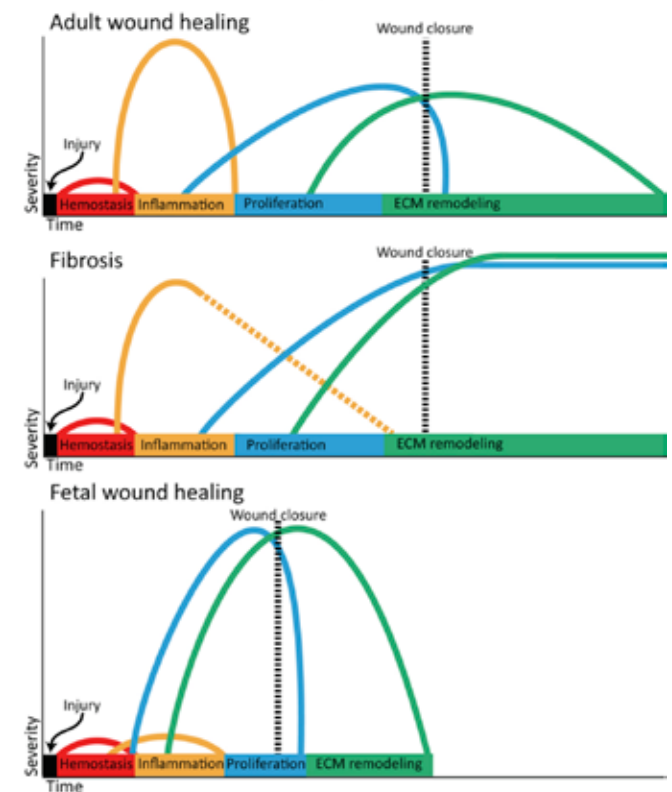
De verminderde aanwezigheid van immuuncellen in de foetale huid komt ook niet door een gebrek aan bloedvaten waardoor de immuuncellen naar de huid kunnen transporteren. Aankleuring van endotheelcellen en gladde spiercellen in de wanden van bloedvaten laat zien dat de foetale huid een vatenstelsel heeft dat vergelijkbaar is met de volwassen huid. Hierdoor zullen immuuncellen dus wel in staat zijn de foetale huid te bereiken.

Cytokines spelen een belangrijke rol bij de ontstekingsreactie, ze trekken immuuncellen aan en activeren deze cellen (5). In ons onderzoek hebben we enkele van deze cytokines gemeten en gevonden dat de concentratie van een aantal lager is in foetale huid dan in de volwassen huid. De mix van cytokines die juist wel en niet aanwezig zijn in de foetale huid lijkt een omgeving te creëren waarin de acute

ontstekingsreactie onderdrukt wordt. Dit kan mede komen doordat immuuncellen aanwezig zijn die de acute ontsteking onderdrukken zoals bijvoorbeeld M2-macrophagen. Samenvattend bevat de foetale huid tijdens het tweede trimester van de zwangerschap dus weinig immuuncellen terwijl het immuunsysteem in deze periode toch al volop ontwikkeld is. Bovendien bevat de foetale huid vooral ontstekingsremmende cellen. Hierdoor zal de ontstekingsreactie na een verwonding veel minder snel en heftig op gang komen in de foetale huid vergeleken met de volwassen huid.

Deze data samengevoegd met de data over de foetale fibroblast en littekenloze wondgenezing (beschreven in de voorgaande editie van WCS Nieuws) hebben geleid tot de ontwikkeling van verschillende modellen voor littekenloze, gewone en littekenvormende genezing. Deze modellen

Alterations in wound healing phases



Afbeelding 1. Fases van de wondgenezing. De verschillen in fases van de wondgenezing tussen volwassen wondgenezing (bovenste panel), verstoorde wondgenezing die resulteert in hypertrofe littekens (middelste panel) en foetale wondgenezing (onderste panel). De verschillende fases van de wondgenezing worden beschreven in dit model: hemostase (rood), ontstekingsreactie (geel), weefselherstel (blauw) en weefselremodellering (groen). Figuur uit hoofdstuk 7 (Discussion) van het proefschrift 'Cellular and molecular mechanisms involved in scarless wound healing in the fetal skin'.

betreffen de verschillende fases van de wondgenezing in de foetale huid en de volwassen huid en zijn weergegeven in afbeelding 1; de fases van de wondgenezing zijn hemostase (rood), ontstekingsreactie (geel), weefselherstel (blauw) en weefselremodellering (groen). Wanneer de fases van de wondgenezing bekeken worden zal de ontstekingsreactie in de foetale huid langzaam op gang komen. Dit is in tegenstelling tot de fases van weefselherstel en weefselremodellering, dit zijn de fases waarin de myofibroblasten de wond sluiten en deze fases zullen in de foetale huid juist sneller verlopen. In de vorige editie van WCS is besproken dat de foetale huid een omgeving is waarin veel wondgenezingsfactoren, zoals fibronectine en TGF- β , al aanwezig zijn. Hierdoor zullen foetale fibroblasten snel in myofibroblasten kunnen differentiëren en dit kan leiden tot snel weefselherstel. Inderdaad laten experimenten met gekweekte foetale fibroblasten zien dat deze cellen sneller myofibroblast worden vergeleken met volwassen fibroblasten (vorige editie WCS). In het onderste panel van afbeelding 1 is daarom te zien dat de ontstekingsreactie tijdens de foetale wondgenezing langzaam op gang komt terwijl de fases van weefselherstel en weefselremodellering juist snel en heftig verlopen. Door deze de snelle overgang van de ontstekings- naar de wondherstelfase, zal de acute ontstekingsreactie eerder uitdoven. Het groeihormoon transforming growth factor- β (TGF- β) lijkt ook een belangrijke rol te spelen bij het onderdrukken van de ontstekingsreactie en het stimuleren van het weefselherstel. Het verloop van de fases van de wondgenezing in de foetale huid is in sterk contrast met de fases van de wondgenezing tijdens ernstige hypertrofe littekenvorming (middelste panel). Tijdens deze ernstig verstoorde vorm van wondgenezing is de immuunreactie juist heftig en langdurig en blijven de fases van weefselherstel en weefselremodellering juist langer doorgaan doordat myofibroblasten het wondbed niet verlaten na sluiting van de wond.

Concluderend wijzen de in het proefschrift beschreven data er op dat foetale wondgenezing via dezelfde fases verloopt als volwassen wondgenezing. Deze fases verschillen alleen in duur en heftigheid (afbeelding 1). Wondgenezingstherapieën die de immuunreactie verminderen en het weefselherstel bevorderen kunnen dus mogelijk positieve effecten hebben op de volwassen wondgenezing. Studies naar foetale wondgenezing kunnen verdere aanknopingspunten geven naar methoden om de immuunreactie te verminderen en de wondsluiting juist te stimuleren.

Literatuur

1. Walraven M, Gouverneur M, Middelkoop E et al. **Altered TGF- β signaling in fetal fibroblasts: what is known about the underlying mechanisms?** Wound Repair and Regeneration, 2014;22:3-13.
2. Wilgus TA, Vodovotz Y, Vittadini E et al. **Reduction of scar**

3. **formation in full-thickness wounds with topical celecoxib treatment.** Wound Repair and Regeneration, 2003;11:25-34.
3. Canesso MCC, Vieira AT, Castro TBR et al. **Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota.** Journal of Immunology, 2014;193:5171-80.
4. Martin P, D'Souza D, Martin J et al. **Wound Healing in the PU.1 Null Mouse - Tissue Repair Is Not Dependent on Inflammatory Cells.** Current Biology, 2003;13:1122-8.
5. Walraven M, Talhout W, Beelen R et al. **Healthy human second-trimester fetal skin is deficient in leukocytes and associated homing chemokines.** Wound Repair and Regeneration, 2016; (In press).
6. Shields LE, Andrews RG. **Gestational age changes in circulating CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells in fetal cord blood.** American Journal of Obstetrics and Gynecology, 1998;178:931-7.
7. George JF, Schroeder HW. **Developmental regulation of D beta reading frame and junctional diversity in T cell receptor-beta transcripts from human thymus.** Journal of Immunology, 1992;148:1230-9.
8. Mold JE, McCune JM. Chapter 3 - Immunological Tolerance During Fetal Development: From Mouse to Man. In: Frederick WA, editor. *Advances in Immunology*. Volume 115 ed. Academic Press; 2012. p. 73-111.

* Mariëlle Walraven, PhD-student, Moleculaire Celbiologie en Immunologie, VU Medical Center, Amsterdam
 Magda M.W. Ulrich, hoofd pre-klinisch onderzoekslab, Vereniging Samenwerkende Brandwondcentra Nederland, Beverwijk

Contact

ma.walraven@vumc.nl of mulrich@burns.nl