



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

Samenvatting van een proefschrift

Deel 1. De foetale fibroblast

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

Op 17 maart 2016 is Mariëlle Walraven gepromoveerd aan de Faculteit Geneeskunde 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 eerste 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>).

Fibroblasten zijn cellen uit de bindweefsellaag van onze huid die zorgen voor opbouw en onderhoud van het bindweefsel door het produceren van bindweefseiwitten, zoals collagenen, elastine en fibronectine. Tijdens de wondgenezing spelen de fibroblasten een belangrijke rol doordat ze nieuw bindweefsel aanmaken, maar ook door het wondoppervlak te verkleinen door de wondranden naar elkaar toe te trekken. Om voldoende kracht te kunnen uitoefenen veranderen (differentiëren) fibroblasten in een speciaal soort fibroblast, genaamd de myofibroblast. Histologisch zijn myofibroblasten te onderscheiden van fibroblasten door hun sterk ontwikkelde cytoskelet met vezels die het contractiele (spier) eiwit α -smooth muscle actine (α -SMA) bevatten. Dit eiwit komt ook voor in gladde spiercellen. In afbeelding 1 is rechts een voorbeeld van zo een myofibroblast te zien, waarbij het cytoskelet met de contactuele α -SMA-vezels in groen is aangekleurd. Myofibroblasten ontstaan uit fibroblasten door een combinatie van een aantal factoren. Ten eerste is een bepaalde omgeving nodig om de fibroblast te activeren, de mechanische belasting op de cel speelt een belangrijke rol, maar ook de aanwezigheid van bepaalde eiwitten, zoals het eiwit fibronectine in het bindweefsel. Daarnaast is het groeihormoon transforming growth factor- β (TGF- β) nodig om tot myofibroblast differentiatie te leiden. Tijdens de wondgenezing produceren myofibroblasten eiwitten, zoals collageen en fibronectine, om het bindweefsel te herstellen en oefenen zij krachten uit op de randen van het wondbed. Door deze beide functies zorgen myofibroblasten voor

genezing van de wond. Onder ideale omstandigheden verdwijnen de myofibroblasten als de wond gesloten is.

Door deze beide functies zorgen myofibroblasten voor genezing van de wond

Ondanks het feit dat myofibroblasten essentieel zijn voor de wondgenezing, kunnen zij de wondgenezing ook verstoren. Langdurige aanwezigheid van myofibroblasten na sluiting van de wond is geassocieerd met littekenvorming, hypertrofie en fibrose (1,2). Tijdens deze vormen van ongecontroleerde wondgenezing blijven myofibroblasten bindweefseiwitten produceren en kracht uitoefenen op hun omgeving waardoor dikke, stugge en contractiele littekens ontstaan, de hypertrofische littekens. Doordat myofibroblasten zelf ook het eiwit fibronectine en het groeihormoon TGF- β produceren onderhouden zij een omgeving die myofibroblastdifferentiatie in stand houdt. Uiteindelijk is het waarschijnlijk deze vicieuze cirkel tussen myofibroblast en omgeving die leidt tot de vorming van hypertrofe littekens. Ingrijpen in dit proces om de vicieuze cirkel te doorbreken zou de wondgenezing kunnen verbeteren en is een veelbelovende optie voor wondgenezingstherapieën.

In tegenstelling tot hypertrofe littekens geneest de foetale huid tot in het derde trimester van de ontwikkeling littekenloos. Deze littekenloze genezing is een intrinsieke

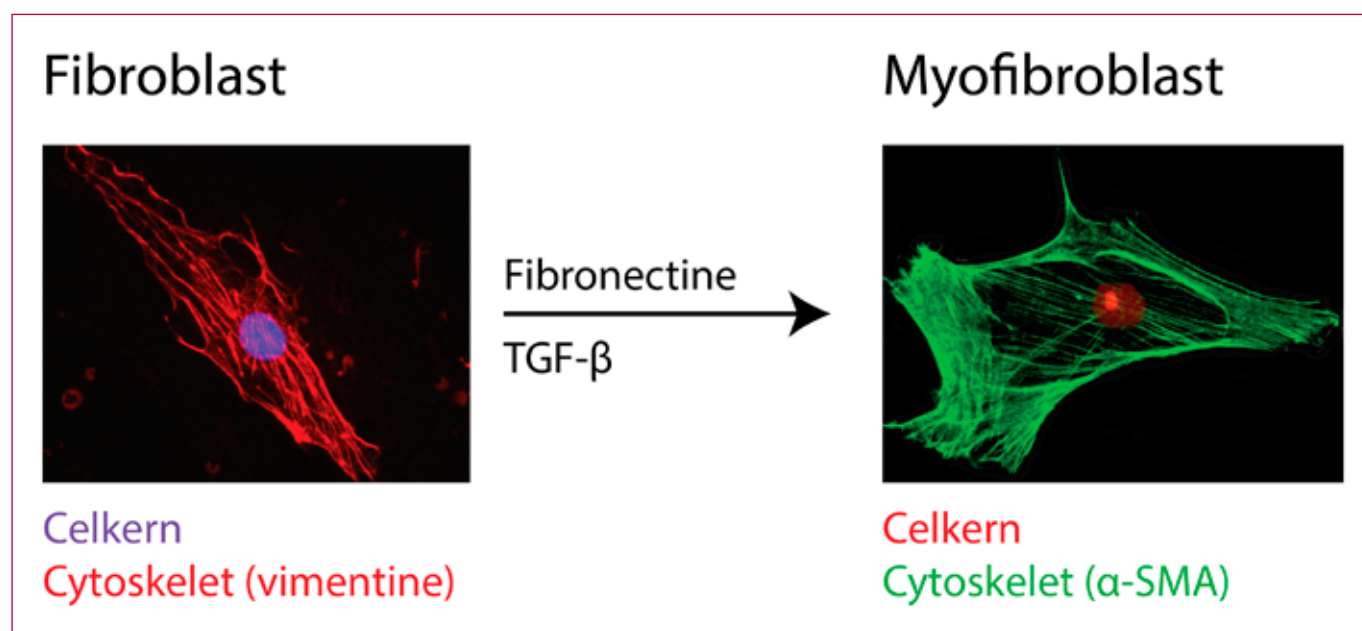
De foetale huid geneest tot in het derde trimester van de ontwikkeling littekenloos

eigenschap van de foetale huid en is onafhankelijk van omgevingsfactoren, zoals het vruchtwater (3). Net als de volwassen huid bevat de foetale huid een bindweefsellaag met fibroblasten. De huid van foetussen groeit sterk en daarom zijn de fibroblasten in de foetale huid erg actief. Aangezien fibroblasten en myofibroblasten een belangrijke rol spelen bij de aanmaak van bindweefsel en hypertrofische littekenvorming hebben wij gekeken of myofibroblasten voorkomen of geïnduceerd zouden kunnen worden in de foetale huid. Bevat de foetale huid bijvoorbeeld wel de factoren die nodig zijn voor het ontstaan van myofibroblasten?

Zoals eerder genoemd is fibronectine belangrijk bij de myofibroblastdifferentiatie. Verbazingwekkend genoeg laten immunohistochemische kleuringen zien dat de gezonde foetale huid veel fibronectine bevat, terwijl de gezonde volwassen huid alleen fibronectine bevat bij het basaal membraan (4). Daarnaast laten kweekexperimenten met uit foetale en volwassen huid geïsoleerde fibroblasten zien dat beide fibroblast-types fibronectine kunnen produceren (hoofdstuk 3 van het proefschrift). Deze data tonen aan dat de foetale fibroblast in staat is een omgeving te creëren die myofibroblastdifferentiatie bevordert.

Naast fibronectine is ook het groeihormoon TGF- β nodig voor myofibroblastdifferentiatie (5). In ons onderzoek hebben we aangetoond dat foetale huid meer TGF- β bevat vergeleken met de volwassen huid (6). Bovendien is de hele machinerie die nodig is voor de TGF- β activatie zelfs hoger aanwezig in foetale huid vergeleken met volwassen huid.

Samenvattend kunnen we dus stellen dat de factoren die nodig zijn voor myofibroblastdifferentiatie (fibronectine en TGF- β) aanwezig zijn in de gezonde foetale huid maar in mindere mate in de volwassen huid. Vreemd genoeg laten immunohistochemische kleuringen met α -SMA zien dat in de intacte foetale huid geen myofibroblasten aanwezig zijn; alleen α -SMA positieve gladde spiercellen in de bloedvaten kleuren aan (4,7). Dit roept natuurlijk de vraag op of de foetale fibroblast wel een myofibroblast kan worden en wel kan reageren op de fibronectine en TGF- β die in de omgeving aanwezig zijn. In een onderzoek beschreven in hoofdstuk 3 van het proefschrift hebben wij fibroblasten geïsoleerd uit de foetale en de volwassen huid en in vitro in een kweeschaal opgekweekt. Hierbij hebben wij gekeken naar de hoeveelheid fibronectine en TGF- β die de fibroblasten produceren en naar de hoeveelheid α -SMA die aanwezig is in de fibroblasten. Aangezien er alleen fibroblasten aanwezig zijn in de kweeschaal betekenen hoge hoeveelheden α -SMA dat er veel myofibroblasten aanwezig zijn. Uit dit onderzoek blijkt dat fibroblasten uit de foetale huid na drie dagen kweken meer fibronectine en TGF- β produ-



Afbeelding 1. Fibroblast naar myofibroblastdifferentiatie
Bindweefselcellen uit de huid (fibroblasten) kunnen veranderen in een speciaal soort fibroblast genaamd de myofibroblast. Het omgevingseiwit fibronectine en het groeihormoon TGF- β spelen hier een belangrijke rol bij. Myofibroblasten (rechts) zijn te herkennen aan hun uitgebreide cytoskelet wat positief is voor het contractiele eiwit α -SMA (in groen).

ceren in vergelijking met de fibroblasten uit de volwassen huid. Daarnaast bevatten de foetale fibroblasten ook hogere hoeveelheden α -SMA in vergelijking met volwassen fibroblasten. Deze grote hoeveelheden α -SMA positieve myofibroblasten in foetale kweken staat in tegenstelling tot de omgeving in de foetale huid maar bewijst dat foetale fibroblasten wel degelijk kunnen reageren op hun omgeving en myofibroblast kunnen worden. De hoge aantallen foetale myofibroblasten komt mogelijk door de kweekomstandigheden, waarbij de fibroblasten zich hechten aan de bodem van een plastic kweekfles. Doordat deze bodem van hard plastic is komt er een grote mechanische belasting op de fibroblasten en die mechanische belasting stimuleert mogelijk de myofibroblastdifferentiatie.

Fibroblasten uit de foetale huid produceren meer fibronectine en TGF- β in vergelijking met de fibroblasten uit de volwassen huid

Concluderend komen een aantal factoren die geassocieerd worden met littekenvorming in de volwassen huid (fibronectine en TGF- β) ook voor in de gezonde foetale huid. Aangezien er geen myofibroblasten voorkomen in de gezonde foetale huid lijken de foetale fibroblasten niet op deze factoren te reageren. Het onderzoek beschreven in het proefschrift heeft uitgewezen dat dit niet komt doordat ze niet kunnen reageren. Wanneer foetale en volwassen fibroblasten in dezelfde omgeving gekweekt worden (hoge mechanische belasting) reageren foetale fibroblasten wel en worden ze zelfs sneller myofibroblast vergeleken met volwassen cellen. Het zou interessant zijn om te bestuderen of er tijdens de foetale wondgenezing ook myofibroblasten voorkomen zoals eerder beschreven is in een foetaal schaapmodel (8). Mochten myofibroblasten ook voorkomen tijdens de foetale wondgenezing dan lijkt de myofibroblastdifferentiatie beter gecontroleerd in de foetale huid, waardoor littekenloze genezing kan optreden. Inzicht in de mechanismen die myofibroblastdifferentiatie reguleren in de gezonde en de gewonde foetale huid kan bijdragen aan de ontwikkeling van wondgenezingtherapieën. Wanneer het mogelijk is om tijdens volwassen wondgenezing de myofibroblastdifferentiatie te controleren, dan lukt het misschien om de vicieuze cirkel van myofibroblastdifferentiatie te doorbreken en de vorming van hypertrofe littekens te voorkomen.

Literatuur

1. Shin D, Minn KW. **The effect of myofibroblast on contracture of hypertrophic scar.** *Plast Reconstr Surg*, 2004;113:633-40.
2. Junker JPE, Kratz C, Tollbäck A, Kratz G. **Mechanical tension stimulates the transdifferentiation of fibroblasts into myofibroblasts in human burn scars.** *Burns*, 2008;34:942-6.

3. Longaker MT, Whitby DJ, Ferguson MW, Lorenz HP, Harrison MR, Adzick NS. **Adult skin wounds in the fetal environment heal with scar formation.** *Ann Surg*, 1994;219:65-72.
4. Coolen N, Schouten K, Middelkoop E, Ulrich M. **Comparison between human fetal and adult skin.** *Arch Dermatol Res*, 2010;302:47-55.
5. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. **The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review.** *Int J Burns Trauma*, 2012;2:18-28.
6. Walraven M, Beelen RHJ, Ulrich MMW. **Transforming growth factor-b (TGF-b) signaling in healthy human fetal skin: A descriptive study.** *J Dermatol Sci*, 2015;(78):117-24.
7. Walraven M, Talhout W, Beelen R, van EM, Ulrich M. **Healthy human second-trimester fetal skin is deficient in leukocytes and associated homing chemokines.** *Wound Repair Regen*, 2016;(In press).
8. Cass DL, Sylvester KG, Yang EY, Crombleholme TM, Adzick NS. **Myofibroblast persistence in fetal sheep wounds is associated with scar formation.** *J Pediatr Surg*, 1997;32:1017-22.

* M. Walraven, PhD-student, Moleculaire Celbiologie en Immunologie, VUmc, Amsterdam
M.M.W. Ulrich, hoofd preklinisch onderzoekslab, Vereniging Samenwerkende Brandwondcentra Nederland, Beverwijk

Contact

ma.walraven@vumc.nl