

De extracellulaire matrix: een review van zijn rol in acute en chronische wonden

Gregory S. Schultz; Phd; prof of obstetrics and gynecology/ University of Florida, Gainesville, USA

Glenn Ladwig,MS,LLD; graduate student research assistant/ University of Florida, Gainesville, USA

Anette Wysocki, Phd, RN, prof school of Nursing and department of surgery, University of Mississippi medical Center, Jackson,MS, USA

Augustus 2005

Vrij vertaald en bewerkt door Van der Heggen Erwin,
Hoofdverpleegkundige heelkunde,
AZ Alma Campus Sijsele

Sleutelwoorden

1. de extracellulaire matrix (ECM) is de grootste component van de normale huid en geeft de huid zijn unieke elasticiteit, rekbaarheid en samendrukbaarheid.
2. in acute wonden levert de voorlopige matrix, die fibrine en fibronectine bevat, een houvast voor cellen die naar de wonde komen. Daarnaast stimuleert de voorlopige matrix deze cellen om te proliferezen, differentiëren en nieuwe ECM aan te maken.
3. chronische wonden bevatten verhoogde niveaus van inflammatoire cellen en geven aanleiding tot verhoogde niveaus van proteasen, die de ECM componenten, de groeifactoren en de receptoren lijken af te breken, die wel noodzakelijk zijn voor de heling.
4. het inzicht in het belang om een functionele ECM te bekomen in chronische wonden heeft tot technische vooruitgang geleid. De ontwikkeling van producten die verhoogde protease niveaus verminderen of die bijdragen tot functionele ECM eiwitten helpen daarbij het helingsproces te vergemakkelijken.

Abstract

De ECM is de grootste component van de dermale huidlaag en de synthese van ECM vormt een sleutelrol in de wondheling, zeker daar waar een groot weefselverlies optrad en primaire sluiting belet.

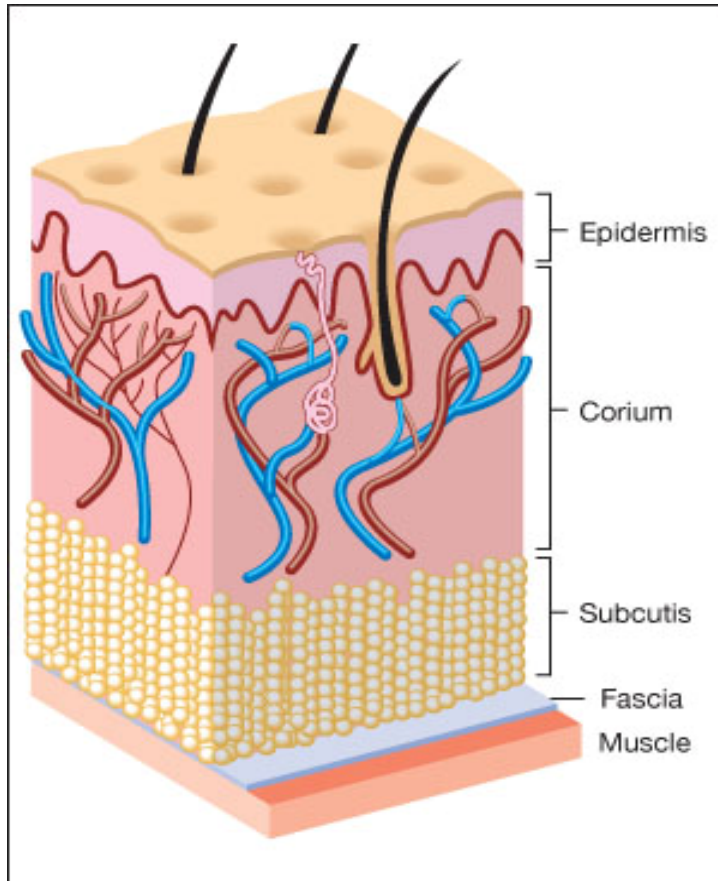
Dit artikel bespreekt de eiwitten die in de ECM van de normale huid zitten en die belangrijk zijn in de genezing van acute en chronische wonden. Aansluitend wordt de theorie besproken van de hoge concentraties aan proteasen, die men vindt in chronische wonden en die de heling hinderen door de essentiële componenten van de ECM af te breken. In deze discussie worden data gebruikt van cel cultuur experimenten en immunohistochemische analyses van wondbiopten .

Door deze nieuwe theorieën zijn nieuwe verbanden ontwikkeld, die gemaakt zijn om de verhoogde concentraties van proteasen in wondvocht te reduceren; deze verbanden voorzien een competitief substraat (collageen) en daardoor verminderen ze de proteolytische afbraak van essentiële ECM bestanddelen (fibronectine) en platelet-derived groeifactoren (PDGF). Andere nieuwe benaderingen includeren het lokaal behandelen van chronische wonden met middelen die de synthese van metalloproteinasen verminderen (MMP); zo is er een mengeling van metaal kationen en een behandeling met unieke eiwitten (amelogenine) om de aangetaste ECM te vervangen.

Klinische en labo data tonen duidelijk aan dat bestanddelen van de ECM een belangrijke rol spelen in de heling van normale huid en dat de afbraak van ECM bestanddelen de wondheling belet. Dit heeft tot de ontwikkeling van nieuwe therapieën geleid die mikken op de verminderde afbraak van ECM of het versterken van onbeschadigde ECM.

De extracellulaire matrix van de normale huid

De grootste component van de normale huid is de ECM, een gel-achtige matrix gemaakt door de cellen die er rond liggen (zie figuur 1)



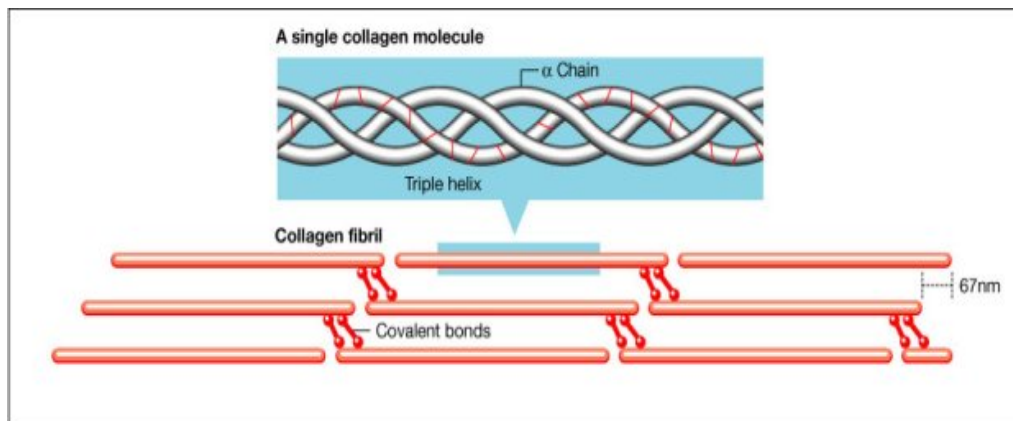
De ECM is samengesteld uit een reeks polysacchariden, water en collageen eiwitten, die de huid haar merkwaardige eigenschappen bezorgt⁽¹⁾⁽²⁾ De sterkte waarbij normale huid breekt benadert deze van staal en toch heeft de huid een substantiële elasticiteit en samendrukbaarheid. Deze eigenschappen zijn te wijten aan de combinatie van twee hoofdbestanddelen van ECM moleculen, die afgescheiden worden door de fibroblasten en de epidermale cellen:

- fibreuze structurele eiwitten zoals collageen, elastine en laminine, die de ECM haar sterkte en haar veerkracht geven.
- proteoglycanen, zoals dermatansulfaat en hyaluron, die typisch samengesteld zijn uit multiple glucosamineglycaan ketens (gevormd door herhaalde disacharide eenheden). Extracellulaire proteoglycanen zijn lange, zwaar gehydrateerde molecules, die de schokken opvangen in de ECM

Aanvullend dient de ECM als een stelling of een structurele steun voor de cellen, regelt ze de celfuncties door celadhesie, smeert ze de cellen én zorgt ze voor een transportsysteem voor voedsel en afvalproducten.

Collageen

De grootste groep van fibreuze ECM moleculen is de collageen familie, die minstens 16 verschillende types collageen bevatten. Collageen in de dermale matrix is voornamelijk samengesteld uit type 1(80-85%) en type 3 (8-11%) collageen, welke beiden fibrillair of staafvormig zijn. De rekbaarheid van de huid is voornamelijk te wijten aan deze fibrillaire collageen moleculen. Deze collageenen vormen zichzelf om in microfibrillen in een hoofd –staart arrangement en een verbluffende zij-aan-zij opstelling. Collageen moleculen doen aan cross-linking met aangrenzende collageen moleculen, wat bijkomende sterkte en stabiliteit biedt aan de collageen fibers (zie figuur 2)



Figuur 2: de structuur van een typische collageen molecule. Het bovendeel toont een collageen molecule, die altijd bestaat uit 3 eiwitketens. Iedere keten is een alfa helix; in type 1 collageen moleculen zijn er 2 alfa- 1 ketens en 1 alfa- 2 keten, die afgekort worden als $\alpha 1(I)$ en $\alpha 2(I)$. Deze 3 eiwitketens (opgerold in een triple helix) maken een collageen molecule. De rode lijn die getoond wordt in een van de strengen van de triple helix toont de alfa helix winding van de peptide ruggegraat van deze peptide keten. Elke triple helix collageen molecule is 300 nm lang en vormt een staafje. Collageen moleculen groeperen spontaan in een hoofd-staart opstelling, met een smalle gleuf die het hoofd van de ene molecule scheidt met de staart van de andere molecule én met een zij-aan-zij opstelling. Aangrenzende collageen molecules zijn ongeveer 67 nm verwijderd, of iets minder dan een vierde van de lengte van 1 molecule. De zijdelingse bindingen worden veroorzaakt door covalente bindingen (de rode baren) tussen het N-einde van een molecule en het C-einde van de aangrenzende molecule .

(Overgenomen van Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG, Biochemistry. San Francisco,CA: Benjamin Cummings, 1999)

Type 4 collageen moleculen combineren met andere gespecialiseerde ECM moleculen, zoals laminine en proteoglycanen om een blad-achtige structuur te vormen, bekend als het basaal membraan (basaal lamina), waaraan de epidermale cellen zich hechten. Dit scheidt de epidermis van de dermis en het omringt de bloedvaten.

Laminine is een lang eiwit gemaakt van 3 polypeptide ketens die een kruisvormige molecule vormen. De 4 uiteinden van het kruis bevatten gespecialiseerde gebieden die binden met type 4 collageen moleculen, heparaan sulfaat proteoglycanen en specifieke eiwitten in het plasma membraan van cellen die integrine receptoren genoemd worden. Dit laat laminine toe om te werken als een multi-adhesief matrix eiwit door bruggen te vormen tussen cellen en het basaal membraan.

Elastine

Veel weefsels als de huid, de long en de bloedvaten moeten zowel sterk als elastisch zijn om degelijk te kunnen werken. Een netwerk van elastische fibers in de ECM van deze weefsels geeft hun de vereiste veerkracht om te terug te keren in hun oorspronkelijke vorm na uitrekking.

Het hoofdbestanddeel van deze elastische fibers is de elastine molecule, die cross-links veroorzaakt tussen aanpalende elastine moleculen. Deze moleculen vormen een kern van elastische vezels en zijn bedekt door fibrilline, een lange glycoproteïne die met elastine bindt en die essentieel is voor de integriteit van de elastische vezels.

Fibronectine

Dit is een ander belangrijk glycoproteïne dat zowel in plasma als in de weefsels aanwezig is. Fibronectine heeft verschillende functies, die hen toelaat om te interageren met verschillende extracellulaire substanties, zoals collageen, fibrine, heparine en specifieke membraanreceptoren op ontvankelijke cellen.

Fibronectine heeft verschillende types van bindingen voor collageen, fibrine moleculen én heparine sulfaat en laat aldus toe om verschillende types van ECM molecule met elkaar te binden. Het bevat ook een belangrijk celbindings domein gebaseerd op 3 aminozuren: ARG-GLY-ASP (RGD).

Specifieke integrine receptoren in het plasmamembraan van de cel herkennen deze RDG sequens van aminozuren in de fibronectine moleculen. De binding van fibronectine moleculen aan integrine receptoren op cellen leidt tot de stimulatie van belangrijke pathways die cel adhesie, migratie en differentiatie promoten. Deze eigenschappen stellen fibronectine in staat om een belangrijke rol te spelen in de celadhesie en om signalen uit te wisselen tussen cellen en componenten van de ECM.

Glycosaminoglycanen

Glycosaminoglycanen (GAGs) zijn samengesteld uit polysacharide ketens, gebaseerd op herhaalde disacharide eenheden en zijn sterk hydrofiel. GAGs zijn hoog negatief geladen en daarom trekken ze osmotisch Na^+ aan. Dit veroorzaakt een groot aanbod aan water naar die structuur. Dit resulteert in GAGs die een enorm volume halen relatief tot hun massa en die gel vormen in lage concentraties. De hydrofiele aard van GAGs veroorzaakt een zweldruk of turgor die de ECM in staat stelt om bestand te zijn tegen compressie krachten. De kraakbenige matrix van het kniegewricht bv, kan drukken weerstaan van honderden atmosfeer omdat het een hoog GAG gehalte heeft.

Hyaluronzuur (HA), een hoofdcomponent van de ECM is een lange GAG dat water aantrekt en wordt gevonden in verhoogde hoeveelheden bij beschadigde en groeiende weefsels. HA stimuleert de productie van cytokines door macrofagen, die daardoor de angiogenese promoten.

Proteoglycanen

Proteoglycanen houden water op en vormen een gel-achtige substantie waardoor ionen, hormonen en nutriënten vrij kunnen bewegen. Gezien de grote aanwezigheid en de structurele diversiteit van proteoglycaan moleculen zou het verrassend zijn als hun functie enkel maar gelimiteerd zou zijn tot het smeren van de cellen.

Perlecan is een proteoglycaan dat aanwezig is in het basaal membraan waar het een gel vormt.

De epidermale cellen van de huid halen hun metabole nutriënten van de dermis door de diffusie van moleculen door het basaal membraan. Proteoglycanen zouden een rol kunnen spelen in de selectieve filtering van moleculen die door het basaal membraan mogen onder de epidermale cellen.

Proteoglycanen schijnen ook een belangrijke rol te hebben in het reguleren van signalen tussen cellen. Heparine sulfaat ketens van proteoglycanen bv binden met verschillende groeifactoren als fibroblast groeifactor (FGF) en helpen hen om te binden met hun eigen specifieke cel oppervlakte receptoren ⁽³⁾⁽⁴⁾.

Proteoglycanen kunnen ook chemokines binden aan de oppervlakte van endotheelcellen en daardoor de inflammatoire respons verlengen. Alhoewel groeifactoren typisch binden met GAGs ketens van proteoglycanen, kunnen leden van de transforming growth factor- beta (TGF- β) familie binden aan de kernproteïnen van het decorine proteoglycaan.

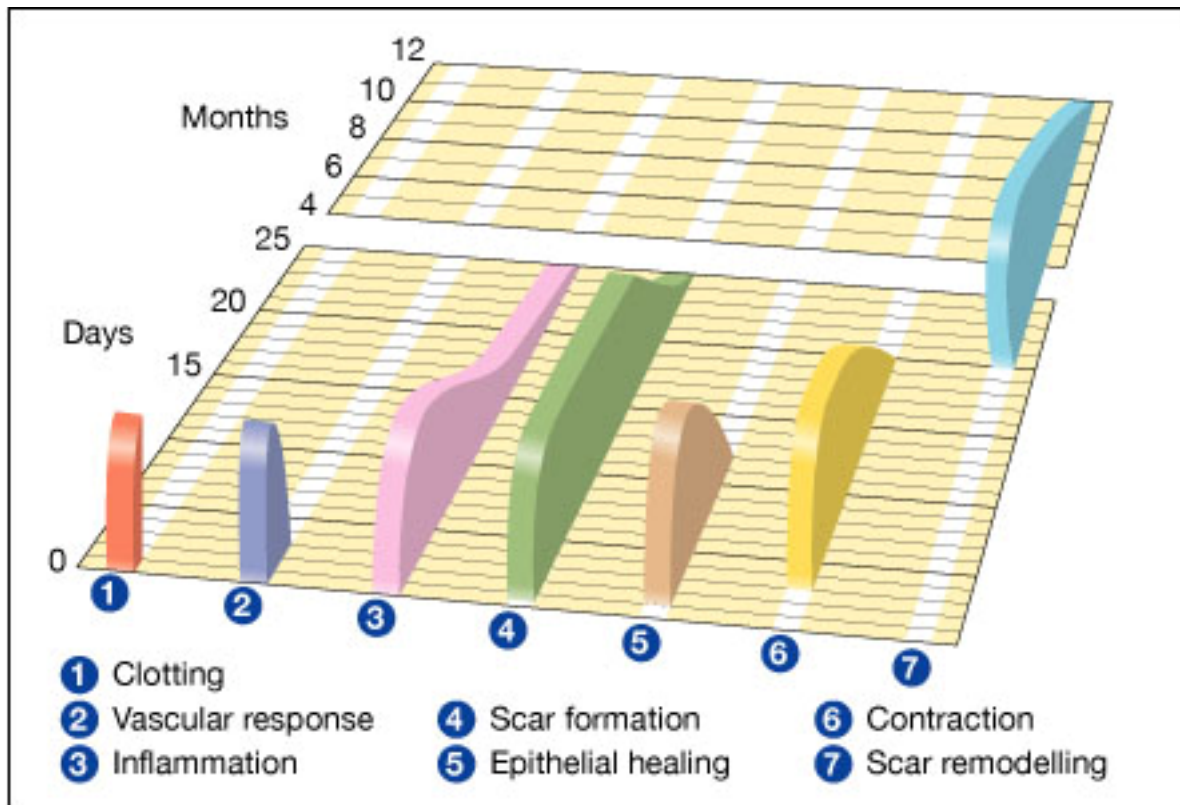
TGF- β verhoogt onmiddellijk littekenvorming door de aanmaak van collageen, fibronectine en lysyl oxidase te bevorderen én de aanmaak van MMP (die de ECM afbreken) te reduceren. TGF- β is tevens chemotactisch

voor macrofagen en neutrofielen, wat het inflammatoir proces verlengt en bijdraagt tot littekenvorming. Wanneer TGF- β zich bindt met het kern proteïne van decorine is het niet in staat om te interageren met zijn normaal receptor eiwit op de doelcellen, die de werking van TGF- β verhinderen.

Proteoglycanen, als Syndecane, beschermen elastase tegen de inhibitie door alfa-1-proteinase inhibitoren, wat laat veronderstellen dat zij de proteolytische omgeving van wonden modifiëren.

De Extracellulaire matrix in acute wonden

Acute wonden helen normaal in een geordende en efficiënte manier door het doorlopen van 4 verscheidene maar overlappende fases: hemostase, inflammatie, proliferatie en remodellering (zie figuur 3) ⁽⁶⁾



Hemostase en de voorlopige matrix

De bloedklonter die zich vormt bij een verwonding is noodzakelijk om de bloeding te stoppen. Deze klonter speelt echter meerdere belangrijke rollen in de wondheling door een reeks van plasma- en cel afgescheiden bestanddelen af te zetten aan de wondoppervlakte. Vervolgens banen de epidermale cellen zich een weg onder de klonter en over het granulatiweefsel, welke een dichte concentratie bevat aan macrofagen, fibroblasten en nieuw gevormde bloedvaten, gelegen in een losse matrix van fibrine, fibronectine, collageen en andere ECM eiwitten.

De stimulatie van de stollingscascade resulteert in het proteolytisch splitsen van fibrinogeen door het trombine enzym. Hierdoor wordt een onoplosbare fibrineklonter gevormd die beschadigd weefsel samenhoudt en die de voorlopige matrix levert. De klonter bevat tevens fibronectine moleculen die aanwezig zijn in plasma en die binden aan fibrine door fibrine -specifieke bindingsplaatsen.

Ongeveer 3 dagen na verwonding beginnen de fibroblasten nieuwe integrine receptoren aan te maken. Vanaf de vierde dag migreren de fibroblasten naar de voorlopige matrix als onderdeel van de angiogenese en als antwoord op de chemotactische groeifactoren, die losgelaten worden in de zone rond de wonde en het subcutaneus weefsel. Door gebruik te maken van een in vitro model ontdekte men dat fibronectine noodzakelijk was voor de fibroblast om nieuwe integrine receptoren aan te maken én om effectieve migratie te hebben over een collageen-fibrine matrix . De integrine receptoren maken nieuwe intracellulaire signalen aan die de fibroblast migratie doen stoppen. Groeifactoren en eiwitten, die in de voorlopige matrix zitten helpen om de fibroblasten te stimuleren om zich te prolifereren, en om nieuw collageen én andere ECM bestanddelen aan te maken.

Op die manier functioneert de voorlopige matrix zich meer dan alleen maar als een inerte stelling waarop littekenweefsel zich kan vastzetten. Het werkt als een reservoir om groeifactoren vast te houden en geeft actieve signalen aan fibroblasten, epidermale- en vasculaire endotheelcellen om zich om te vormen naar geactiveerde wondcellen, die de wonde willen sluiten door middel van hun integrine receptoren.

De inflammatie fase

Neutrofielen: deze zijn de eerste inflammatoire cellen om te reageren op de oplosbare mediators die door de bloedplaatjes en de stollingscascade losgelaten worden. Ze beginnen hun reis vanuit de vascularisatie naar het beschadigd weefsel door zich eerst vast te hechten aan de vasculaire endotheelwand via hun oppervlakte integrinereceptoren. Daar laten ze elastase en collagenase vrij die hun migratie vergemakkelijken door het basaal membraan dat de endotheliale cellen omringt. Daarnaast vergemakkelijken ze ook hun migratie naar de ECM. Hun eerste doel is de eerste lijnsdefensie op te stellen tegen infectie door fagocytose en door bacteriën te doden. Daarnaast breken ze nog vreemd materiaal af en dood weefsel. Neutrofielen produceren ook inflammatoire mediators en laten die ook los, zoals Tumor Necrose Factor alfa (TNF- α) en Interleukine-1 (IL-1), die andere fibroblasten en epitheelcellen aanmaken en activeren. Neutrofielen produceren en bevatten hoge concentraties aan destructieve proteasen en vrije zuurstofradicalen, die ze gebruiken om gefagociteerde materialen te verteren. Bij hun onafwendbare dood laten de neutrofielen deze substanties los in het lokaal wondgebied. Dit kan een uitgebreide schade veroorzaken en de inflammatoire fase verlengen. De persisterende aanwezigheid van hoge concentraties aan bacteriën in een wonde kan bijdragen tot chroniciteit door de voortdurende aanmaak van neutrofielen en hun loslating van proteasen, cytokines en intracellulaire inhoud.

Monocyten/ macrofagen: de neutrofielen zijn meestal opgebruikt in een wonde na 2 of 3 dagen en worden vervangen door weefsel macrofagen. Macrofagen beginnen als circulerende monocytten die naar de wonde getrokken worden; dit proces begint ongeveer 24 uur na verwonding door zowel oplosbare mediators als door afbraak componenten van ECM, zoals collageen en fibronectine fragmenten. Monocyten binden aan de ECM door integrine receptoren en differentiëren onmiddellijk tot weefsel macrofagen. Serumfactoren en fibronectine komen tussen in deze differentiatie. Weefselmacrofagen hebben een dubbele rol in het helingsproces. Ze zijn zeer actieve fagocyten en dwalen over de wondoppervlakte, verteren de bacteriën, niet vitaal weefsel en opgebruikte neutrofielen. Neutrofielen produceren alsook collagenasen en elastase om hen te helpen niet leefbaar weefsel af te breken. Ze zijn in staat om de proteolytische afbraak van weefsel te reguleren in de wonde door de aanmaak en de afscheiding van inhibitoren voor deze enzymen.

Oplosbare mediators: macrofagen komen ook tussen in de overgang van de inflammatoire fase naar de proliferatiefase van de wondheling. Deze rol is even belangrijk als hun fagocytose rol. Ze laten een brede waaier los van groeifactoren en cytokines, zoals TNF- α , TGF- β , PDGF, IL-1, Interleukine-6 (IL-6) en FGF. Sommige van deze oplosbare mediators recruter en activeren fibroblasten, die er voor zorgen dat een nieuwe matrix gemaakt wordt en dat deze neergezet én georganiseerd raakt. Andere oplosbare mediators promoten de angiogenese.

De proliferatie fase

Gedurende de herstelfase wordt de voorlopige matrix geremodelleerd en vervangen door littekenweefsel. Dit littekenweefsel bevat nieuwe collageenfibers, proteoglycanen en elastinevezels die de structuur en de functie van het weefsel gedeeltelijk herstellen. Dit wordt bereikt door de migratie, proliferatie en differentiatie van epitheliale cellen, dermale fibroblasten en vasculaire epitheelcellen van aangrenzend niet beschadigd weefsel en stamcellen die ontstaan in het beenmerg en circuleren naar het wondgebied.

Fibroblasten in de normale dermis zijn typisch in rust en zeldzaam, dit in contrast met deze in de voorlopige wondmatrix en granulatieweefsel; daar zijn ze zeer actief en in grote getale aanwezig. Fibroblasten migreren naar de wonde als antwoord op de oplosbare cytokines en groeifactoren, die initieel loskomen van bloedplaatjes, als deze degranuleren; in een latere fase komen ze van de macrofagen in de wonde. Ze bevatten PDGF, TGF- β , en FGF.

De richting van de beweging van de fibroblasten is bepaald door de concentratiegraad van chemotactische factoren en de opstelling van de fibrillen in de ECM. Ze beginnen te bewegen door eerst te binden aan matrix componenten, zoals collageen, fibronectine, vitronectine en fibrine via hun celoppervlakte receptoren. Terwijl het ene eind van de fibroblast gebonden blijft aan de matrixcomponente verlengt de cel een cytoplasmatische projectie om een andere bindplaats te vinden. Als deze gevonden is breekt de originele band door proteasen vanuit de fibroblast en vervolgens gebruikt de cel het cytoskelet netwerk van actine fibers om vooruit te komen. Deze proteasen worden Matrix Metalloproteasen genoemd (MMP) en zijn noodzakelijk voor de migratie van cellen doorheen de ECM.

De meest belangrijke van deze MMP's zijn: **collagenase** (MMP-1), dat intact collageen splitst op een plaats; **gelatinasen** (MMP-2 en MMP-9), die gedeeltelijk gedenatureerd eiwit afbreken (gelatine); **stromelysine** (MMP3), dat multiple eiwitsubstraten in de ECM afbreekt. Aanvullend verwijderen de MMP's collageen en andere ECM componenten die gedenatureerd werden door de kwetsuur. Dit is belangrijk omdat de collageen moleculen moeten interageren met elkaar op een zeer specifieke wijze om de degelijke collageen fibril te vormen (zie figuur 2). Gedeeltelijk afgebroken collageen moleculen zullen niet binden op een degelijke manier met nieuwe collageen moleculen die gemaakt werden in de littekenvorming en aldus resulteren in een slecht georganiseerde, zwakke ECM. De afgebroken collageen moleculen moeten dus verwijderd worden door een gecontroleerde actie van de MMP's. Dit lijkt op een stenen muur die hersteld moet worden. Wanneer een gat moet gemaakt worden in een stenen muur om een nieuwe deur of een venster te maken, dan moet het einde van de rij stenen ook voorbereid worden om een perfecte lijn te verkrijgen met de nieuwe stenen die moeten bijgevoegd worden om een correcte structuur te verkrijgen. MMP's

knabbelen aan de gedenuatureerde matrix om een intacte functionele matrix te bekomen. Dit proces moet echter nauwgezet gecontroleerd worden door weefsel inhibitoren voor metalloproteinasen (TIMPs) zodat de MMP's belet worden intacte , functionele matrix af te breken.

Fibrine peptiden die afgebroken worden door de proteolytische enzymen kunnen de vasculaire permeabiliteit doen toenemen en de angiogenese inleiden. Peptiden van fibronectine, collageen en elastine kunnen celmigratie aanzetten, beïnvloeden de celproliferatie en leiden tot arteriolaire dilatatie (^{11,12,13}). De gecontroleerde acties van proteasen van ECM componenten spelen een sleutelrol in de regulatie van de angiogenese en vele andere aspecten van de normale wondheling, inclusief de migratie van cellen naar een wonde.

Het proces van angiogenese wordt gestimuleerd door lokale factoren in de micro wondomgeving, zoals lage zuurstofspanning, lage pH en hoge lactaatconcentraties (¹⁴). Verschillende groeifactoren , zoals b-FGF, TGF- β en vasculaire endotheliale groeifactor (VEGF) zijn eveneens krachtige angiogenetische signalen voor de endotheliale cellen. Nu is geweten dat de zuurstofgraad in weefsels direct de angiogenese regelt door te interageren met zuurstof gevoelige eiwitten die de transcriptie regelen van de angiogenetische en anti-angiogenetische genen. De aanmaak van VEGF, bv door capillaire endotheliale cellen wordt verhoogd door hypoxie dmv de activatie van de recent geïdentificeerde transcriptie factor HIF (hypoxia-inducible factor), die zuurstof bindt (¹⁵) . Wanneer de hoeveelheid zuurstof daalt rond de capillaire endotheliale cellen verhoogt de concentratie HIF in de cel. HIF-1 bindt aan de specifieke DNA sequens en stimuleert de transcriptie van specifieke genen zoals VEGF, die de angiogenese stimuleert. De regulatie van de angiogenese betreft zowel de stimulerende factoren zoals VEGF, als de anti-angiogenetische factoren zoals angiostatine, endostatine, trombospondine en pigment -epitheel - gederiveerde factoren.

De cellen die de nieuwe capillairen vormen werden verondersteld te ontstaan uit vooraf bestaande capillaire endotheelcellen. Uit dierexperimenten blijkt duidelijk dat de angiogenetische factoren de endotheliale cellen, die naast een ischemische zone liggen aansporen om te migreren naar de matrix om daar nieuwe vaatjes aan te maken. Recente gegevens echter laten veronderstellen dat sommige cellen die nieuwe bloedvatjes aanmaken eigenlijk van de beenmerg stamcellen komen, die in de bloedstroom circuleren. Men noemt ze haemoangioblasten (¹⁶) . Verder zouden deze van beenmerg afgeleide cellen bijdragen tot zowel collageen type 1 en 3 , terwijl de residerende populatie cellen alleen type 1 collageen overschrijft (¹⁷) . Angiogenetische factoren worden losgelaten bij een verwonding of ischemie en zorgen er voor dat haemoangioblasten migreren naar de ECM en differentiëren tot capillair endotheelcellen. De migratie van deze cellen naar de matrix veronderstelt de lokale secretie van proteolytische enzymen , vooral MMP's. Wanneer een top van deze nieuw gevormde knopjes endotheel vaatjes in contact komt met een ander vormt

zich een kloof. Als dit blijft gebeuren wordt dit het lumen van het zich ontwikkelend bloedvat en een compleet nieuw bloedvat vormt zich. Dit proces gaat door totdat het capillair systeem voldoende hersteld is en de weefseloxygenatie en de metabole noden in orde zijn. Het zijn deze nieuwe capillaire vaatjes, die in een losliggende matrix liggen die granulatiweefsel geven met zijn typisch oneffen of granulaire structuur.

Nadat de fibroblasten gemigreerd zijn naar de voorlopige matrix, profileren ze en beginnen nieuw collageen, elastine, proteoglycanen en andere componenten aan te maken, die granulatiweefsel bevat. PDGF en TGF- β zijn 2 belangrijke groeifactoren die de aanmaak van ECM genen en proteasen in de fibroblast regelen. Recente gegevens tonen aan dat een nieuwe groeifactor, bindweefsel groeifactor genaamd, tussenkomt in vele effecten van TGF- β bij de synthese van ECM ⁽¹⁸⁾.

Remodellering

Dit is de eindfase van de wondheling. Het rijper worden van het granulatieweefsel heeft betrekking tot het verminderen van het aantal capillairen als kleinere bloedvaten aggregeren tot grotere, en het aantal GAGs en proteoglycanen daalt. De dichtheid aan cellen en de metabolische activiteit dalen in deze maturatie. Er gebeuren ook veranderingen in het type, aantal en structuur van het collageen, wat leidt tot een verhoging van de strekkracht van de weefsels. In het begin wordt in hoge concentraties type 3 collageen gemaakt, maar het wordt vervangen door type 1 collageen, het dominante fibrillaire collageen in de huid. De strekkracht van nieuwe geëpithelialiseerde huid is slechts 25 % van normaal weefsel ⁽¹⁹⁾ .

Genezen huid is daarom nooit zo sterk als ongeschonden weefsel. De strekkracht wordt eerst versterkt door de reorganisatie van collageen fibers die willekeurig verspreid worden gedurende de granulatie en door verhoogde covalente cross-linking van de collageen moleculen door het lysyl oxidase enzyme, dat door de fibroblasten afgescheiden wordt in de ECM. Na verschillende maanden zal de verandering in de collageen organisatie in het hersteld weefsel traag stijgen totdat de strekkracht maximaal 80 % haalt van normaal weefsel.

Remodellering van de ECM eiwitten gebeurt door de werking van verschillende groepen van proteolytische enzymes, geproduceerd door de cellen in het wondbed op verschillende tijden in het helingsproces. Twee van de meest belangrijke families zijn de MMP's en de serine proteasen. Specifieke MMP proteasen die noodzakelijk zijn voor de heling zijn de collagenasen, die intacte fibrillaire moleculen afbreken. De gelatinasen breken beschadigde fibrillair collageen moleculen af. De stromelysines breken de proteoglycanen af. Een belangrijk serine protease is neutrofiële elastase die bijna alle types eiwit moleculen kan afbreken. Onder normale condities worden de destructieve werking van proteolytische enzymes zorgvuldig geregeld door specifieke enzyme inhibitoren die door de cellen in het wondbed aangemaakt worden. Het zijn de TIMPs die de MMPs inhiberen.

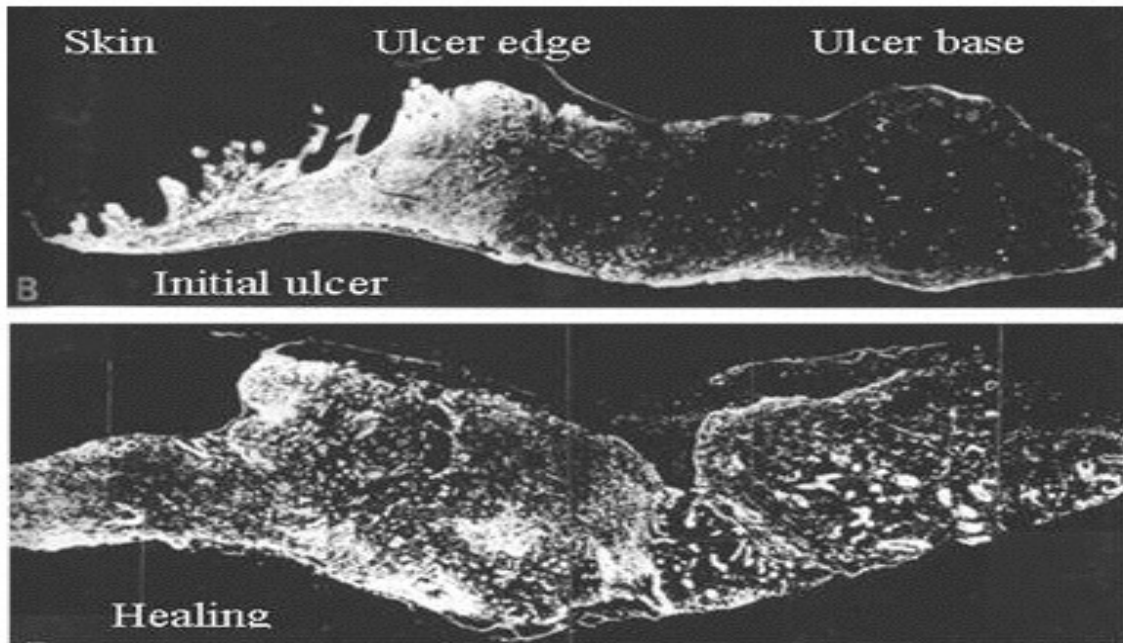
De extracellulaire matrix in chronische wonden

Alle chronische wonden beginnen als een acute wonde met een fibrine klonter, maar in plaats van de 4 fasen te doorlopen van de heling geraken ze "gevangen" in een verlengde inflammatoire fase. Er werd gesteld dat deze verlengde inflammatoire fase verhoogde niveaus veroorzaakt van MMPs, elastase en trombine die de bestanddelen van de ECM vernietigen en schade aanbrengen aan de groeifactoren en hun receptoren die essentieel zijn voor de heling⁽²⁰⁾. Andere factoren die kunnen bijdragen tot het falen van de heling van sommige wonden zijn de concentraties van de vrije zuurstofradicalen, die deze essentiële componenten chemisch wijzigen⁽²¹⁻²²⁾

Histologische veranderingen in chronische wonden

Niet helende chronische wonden: Herrick, ea⁽²³⁾ onderzochten opeenvolgende veranderingen in de locatie en de concentraties van sleutel-eiwitten in de ECM tijdens de heling van chronische veneuze beenulcera, zoals fibronectine. Zij onderzochten bipten genomen aan de basis van het ulcus, de rand en de omliggende huid voor en na behandeling met compressietherapie en stelden het volgende vast:

- talrijke kleine en medium grote bloedvaten waren omgeven door opvallende fibrine cuffs, die concentrisch gelaagde structuren bevatten rijk aan fibrine, collageen en laminine.
- De chronische basis van het ulcus was bedekt met een laag fibrineus exsudaat van variabele dikte, dat talrijke polymorfonucleaire leucocyten bevatte.
- Geëxtravaseerde rode bloedcellen, kleine perivasculaire afzetting van haemosiderine en macrofagen waren aanwezig in de randen van het ulcus, de basis en de omliggende huid.
- Fibronectine was opmerkelijk afgenomen aan de basis van het ulcus en praktisch afwezig aan de centrale basis van het ulcus en in de fibrineuze exsudaten, uitgezonderd in de fibrine cuffs rond de bloedvaten. Immuno onderzoek voor fibronectine toonde een diffuus patroon in de ECM van de omliggende huid met een puntjes patroon op de epidermale-dermische junctie (figuur 4).
- Collageen 1 en 3 waren evident aanwezig in de ECM van de omliggende huid. In de basis van het ulcus waren bundels collageen 3 zichtbaar, die parallel lagen met de oppervlakte en die differentieerden tussen het fibrineus exsudaat en de oppervlakte van het granulatieweefsel. Collageen 1 was minder evident in de basis van het ulcus, maar was aanwezig in het basaal membraan aan de rand van het ulcus.



Figuur 4: immunohistologisch beeld van fibronectine in een initiële biopsie (bovenaanzicht) van een chronisch veneus ulcus en na 2 weken compressietherapie en epitheliale heling (onderaanzicht). Bemerkt de aanwezigheid van het immunobeeld van fibronectine in de huid en aan de rand van het ulcus, maar de afwezigheid van immunobeelden voor fibronectine in de basis van het initiële ulcus. In het helende ulcus is er een sterk immunobeeld aanwezig voor fibronectine op het ulcerbed waarover de epidermale cellen migreren, alsook aan de ulcusranden en in de omgevende huid. Dit toont aan dat de migratie van epidermale cellen overeenstemt met de aanwezigheid van fibronectine in het wondbed

{ naar Herrick ea (23) Am J Pathol 1992,141: 1085-1095}

Helende chronische wonden: na 2 weken van behandeling met compressietherapie werden de volgende belangrijke histologische veranderingen waargenomen in de veneuze ulcera:

- De epidermis van de omgevende huid was dikker dan de normale huid en hoog aan keratine.
- Het fibrineus exsudaat was dunner aan de basis van het ulcus en aanmaak van epidermis was zichtbaar.
- Nieuw gevormde bloedvaten en granulatiweefsel van verschillende maturatie waren aanwezig in de basis van het ulcus en de randen; er was een opmerkelijke toename van het aantal polymorfonucleaire leucocyten die in het weefsel kwamen. Ook de macrofagen namen in aantal toe.
- Bloedvaten omringd met fibrine, laminine, fibronectine collageen en tenascine waren minder overvloedig aanwezig zowel in de basis als in de rand van het ulcus.

- Er was enige persistentie in de extravasatie van rode bloedcellen, maar er was een opvallende stijging in de hoeveelheid haemosiderine in de omliggende weefsels.
- De hoeveelheid en verdeling van fibronectine over de basis en de randen van het ulcus was enorm verhoogd vergeleken met het oorspronkelijk biopt en het collageen 3 immunobeeld was meer uniform.

De genezing ging verder, epitheel bedekte de randen van de ulcera maar was dikwijls losgekoppeld van de onderliggende dermis. Verminderde haemosiderine en focale rode bloedcellen extravasatie werden vastgesteld in de omliggende huid en de ulcerrand. De angiogenese ging vooruit met capillairen die omringd waren met een dun laagje laminine en die overeen kwam met de dikte van een normaal basaal membraan; dikkere fibrine cuffs waren aanwezig.

Na volledige epithelialisatie was het patroon van de fibronectine en het collageen van het oorspronkelijk ulcer basis niet meer te onderscheiden van het aangrenzend omliggend weefsel. De geregenereerde epidermis kwam echter vaak los, wat een zwakke aanhechting laat vermoeden van de epidermale cellen aan het basaal membraan. De histologische studie gaf een belangrijk inzicht in de moleculaire, cellulaire en structurele abnormaliteiten die zo typisch zijn in chronische veneuze ulcera en ook in de vooruitgang van de veranderingen die gebeuren tijdens de heling.

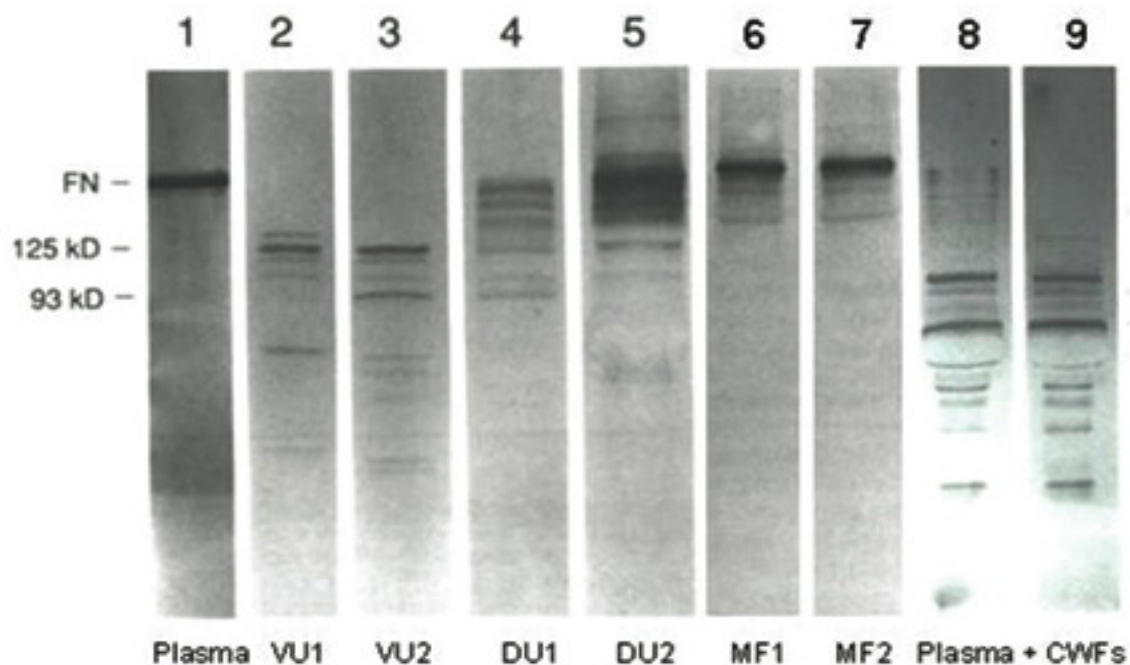
Andere studies vergeleken de verschillen in wondvocht en ECM in acute wonden en chronische diabetische en veneuze ulcera ^(24,25). De overheersende type inflammatoire cellen in het vroege helingsstadium zijn de granulocyten, lymfocyten en de macrofagen. Het hoofddoel van de granulocyten in acute wonden is het elimineren van bacteriën. De functies van de lymfocyten in acute wonden zijn minder duidelijk, maar waarschijnlijk spelen ze een sleutelrol in de activatie van de macrofagen, die belangrijk zijn in de transcriptie regulatie tussen de inflammatie en de proliferatie. Loots, ea ⁽²⁴⁾ vonden dat diabetische en veneuze ulcera duidelijk hogere aantallen granulocyten bevatten dan acute helende wonden op dag 5 tot 28 na verwonding. Niveaus van B cellen, monocyt en macrofagen waren ook duidelijk hoger in chronische wonden dan in acute wonden, vooral 28 dagen na verwonding, wanneer het inflammatoire antwoord daalt bij helende wonden. Het aantal T helper cellen was lager in chronische wonden dan in acute.

Nu pas begint men de locatie en de niveaus aan proteoglycanen in normale huid, acute en chronische wonden te bepalen. Bij een analyse van proteoglycanen in veneuze ulcera en normale huid vond men enige verschillen ⁽²⁵⁾. Algemeen stelt men dat de proteoglycanen in normale huid gelokaliseerd zijn aan het plasmamembraan van de keratinocyten terwijl bij veneuze ulcera de proteoglycanen hoofdzakelijk gelokaliseerd zijn in het cytoplasma van de keratinocyten. Daar sommige proteoglycanen

groeifactoren binden en noodzakelijk zijn voor hun interactie met de receptoren kunnen wijzigingen in de locatie en de niveaus van de proteoglycanen invloed hebben op de groeifactor systemen van de chronische wonden. Dit verrechtvaardigt verder onderzoek ⁽³⁾.

Moleculaire analyses van de ECM in chronische wonden

Onderzoeken naar de molculaire profielen van de ECM in chronische wonden gaven gegevens die voornamelijk de histologische veranderingen bevestigden, die gezien werden in de reeds beschreven studies ^(23,24,25). Een van de eerste rapporten die de moleculaire status van ECM moleculen in chronische wonden analyseerde evalueerde de stabiliteit van fibronectine en vitronectine in chronisch wondvocht ⁽²⁶⁾. (figuur 5)

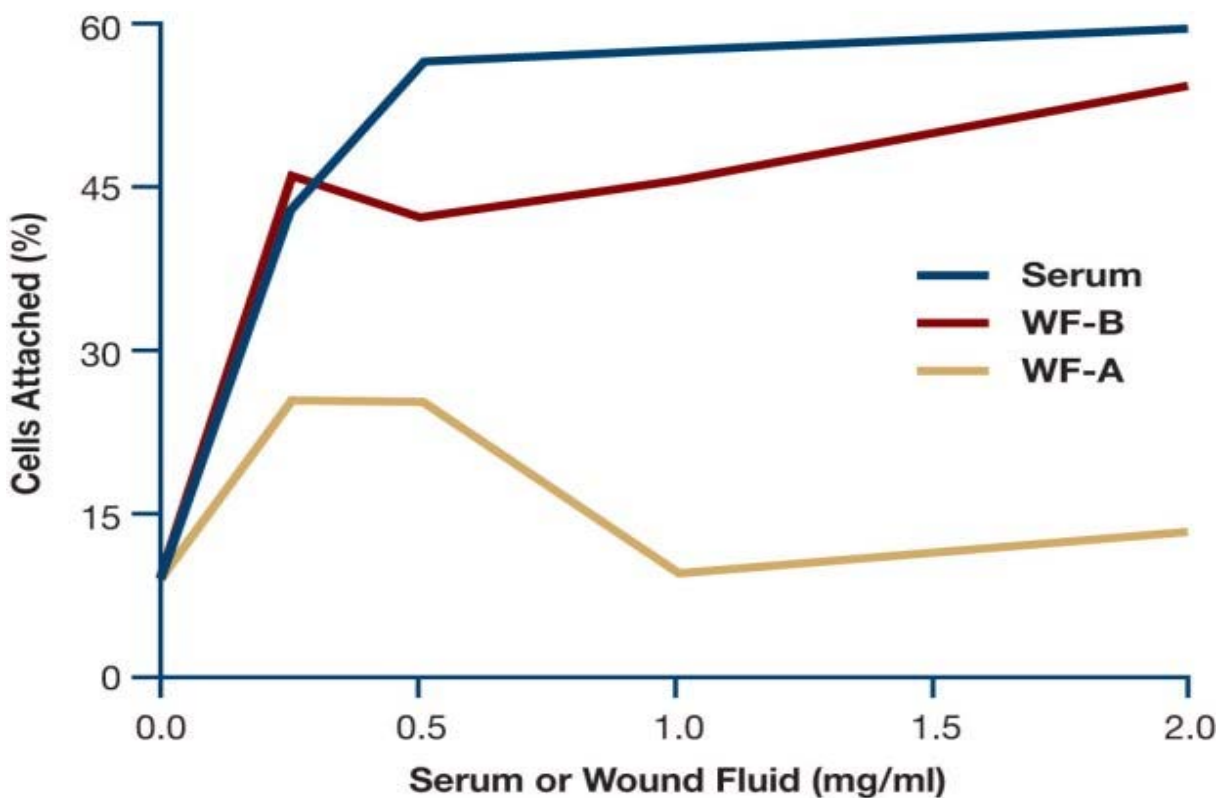


Figuur 5 : fibronectine profielen van plasmastalen en wondvocht van 2 veneuze beenulcera (VU1, VU2), 2 diabetische voetulcera (DU1, DU2), 2 acute mastectomiewonden (MF1, MF2) en van plasma fibronectine geïncubeerd met het wondvocht van 2 chronische wonden (plasma+ CWFs). Zoals u kunt zien in band 1 toont polyacrylamide gel electroforese dat fibronectine in plasma migreert als een enkele intacte band op 250 kDa. Intacte fibronectine werd ook gezien in het wondvocht van acute helende wonden (band 6 en 7). Fibronectine werd daarentegen totaal afgebroken naar lagere moleculaire gewichtsdeeltjes in wondvocht dat verzameld werd uit de 2 veneuze stase ulcera (band 2 en 3) en gedeeltelijk afgebroken in het wondvocht van de 2 chronische diabetische ulcera (band 4 en 5); de toevoeging van intacte fibronectine aan chronisch wondvocht resulteerde in de snelle afbraak van de fibronectine band (band 8 en 9)

{ naar Wysocki en Grinnell (26)}

De resultaten toonden aan dat fibronectine in plasma (controle) en helende chirurgische wonden intact was. Daarentegen was fibronectine totaal afgebroken in wondvocht van 2 veneuze stase ulcera en was het gedeeltelijk afgebroken in het exsudaat van 2 chronische diabetes ulcera. Belangrijk was dat de toevoeging van intact plasma fibronectine aan chronisch wondvocht resulteerde in de snelle afbraak van de fibronectine. Deze resultaten toonden aan dat de niveaus van intacte oplosbare fibronectine hoog waren in het wondvocht van acuut helende wonden, maar drastisch gereduceerd in het wondvocht van sommige chronische wonden. Gelijkaardige resultaten werden gevonden voor vitronectine, waar een significante vermindering geobserveerd werd voor vitronectine in chronische wonden. Deze resultaten steunden de histochemische gegevens van Herrick ea, die verminderde immunobeelden van fibronectine vond in chronisch veneuze ulcera.

Een daarop volgende studie evalueerde het effect van chronisch wondvocht voor de aanhechting van fibroblasten op met collageen bedekte culturen (figuur 6)



Figuur 6: het effect van serum en 2 chronische wondvocht stalen (WF-A, WF-B) op de aanhechting van fibroblasten aan met gelatine bedekte cultuurbodems. Bemerkt dat de fibroblasten zeer goed hechten aan de met gelatine bedekte cultuurbodems in de aanwezigheid van wondvocht B en zeer pover in de aanwezigheid van wondvocht A. Dit is te wijten aan de afbraak van het gelatine door de proteasen in het wondvocht.

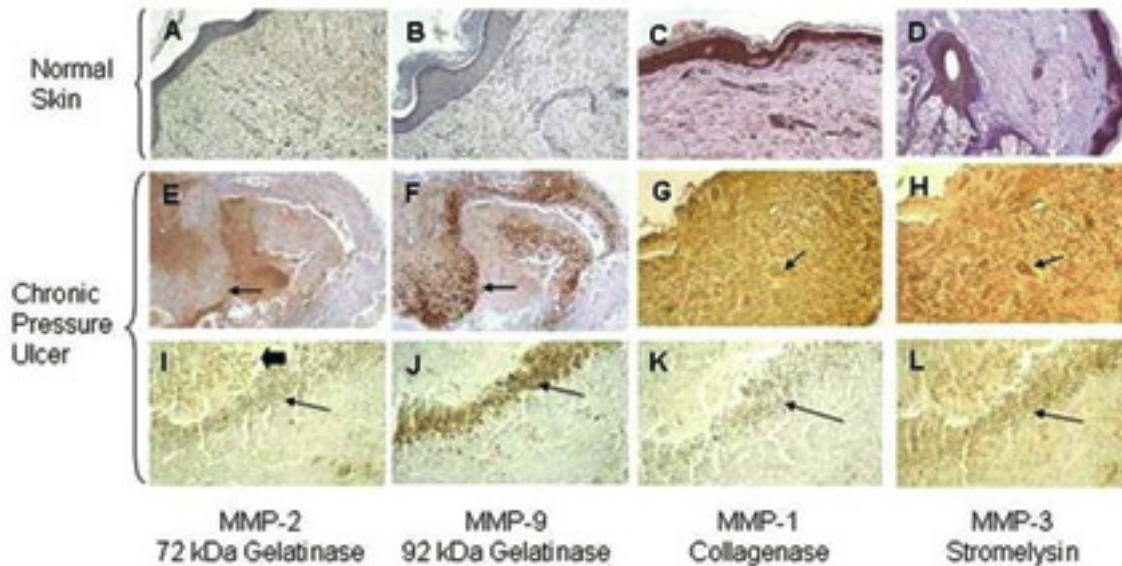
{ naar Grinnell e a(27)}

Een groot aantal van menselijke dermale fibroblasten werd toegevoegd aan een medium dat 10% serum bevatte en hechtte zich vast aan met collageen bedekte culturen. Verminderde niveaus van aanhechting daarentegen gebeurden wanneer wondvocht van 2 chronische stase ulcera toegevoegd werden aan dit medium ⁽²⁷⁾. Fibronectine en Vitronectine functioneren als cel aanhechtingen en migratiefactoren voor veel type cellen. De afbraak van deze eiwitten door de hoge protease activiteit draagt waarschijnlijk bij tot in het uitstel van de epidermale herbedekking van de wonde en de povere vorming van granulatieweefsel door de vasculaire endotheelcellen en de fibroblasten.

Er zijn geen gegevens van de elastine afbraak in chronische huidwonden, maar het is bekend dat elastase verantwoordelijk is voor de fibronectine afbraak in brandwonden ⁽²⁸⁾. Het moet nog aangetoond worden of dit eveneens wijst op de afbraakproducten van elastine in chronische wonden. De meest waarschijnlijke bron van elastase in chronische wonden komt van de polymorfonucleaire leucocyten ⁽²⁹⁾ of van de aanwezige macrofagen ⁽³⁰⁾. Ook fibroblasten kunnen elastase aanmaken, maar die actie lijkt eerder gericht op de pre-elastische fibers, met een beperkte activiteit naar volwassen dermale elastische fibers ⁽³¹⁾. Elastineafbraak of de verminderde aanmaak leidt naar een verlies van de elastolytische eigenschappen van de huid, bv bij veroudering of bij littekenweefsel.

Het bewijs van de afbraak van collageen in chronische wonden werd uitvoerig geconcludeerd uit gegevens die de MMPs niveaus meten in wondvocht verzameld uit chronische ulcera in plaats van uit analyses van vocht rechtstreeks uit collageen afbrekende producten. Verschillende studies hebben verhoogde niveaus van MMPs gemeld ^(33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45). Verder is de initiële verhouding MMP-9/ TIMP-1 in het exsudaat van chronische drukulcera omgekeerd evenredig met de heling van de drukulcers ⁽⁴⁶⁾. Analyses van de biopten van chronische drukulcera hebben aangetoond dat, vergeleken met normaal huidweefsel, de MMP niveaus sterk verhoogd zijn in de drukulcera en dat er een associatie is met de inflammatoire cellen. Zoals u kunt zien in figuur 7 is het immunobeeld voor MMP-1, MMP-2, MMP-3 en MMP-9 zeer flauw aanwezig in normale huid of zelfs afwezig. Als een opmerkelijk resultaat is het niveau van deze 4 MMPs sterk verhoogd in de biopten van chronische drukulcera. Verder is het immunobeeld voor MMP-9 en MMP-2 sterk geassocieerd met de inflammatoire cellen, die in deze

biopten sterk aanwezig zijn als een band cellen gelocaliseerd in de oppervlakkige lagen van het ulcus bed.



Figuur 7: de immunohistochemische lokalisatie van Matrix Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9, MMP-1 en MMP-3) in biopten van de normale huid (bovenste rij) en biopten van chronische drukulcera. De pijlen in paneel E,F,I,J,K en L wijzen op zones van inflammatoire cellen; de pijlen in de panelen G en H wijzen op bloedvaten. De vergroting van de panelen A tot H is 40 x en in de panelen I tot L 100 x . Bemerk de afwezigheid of de lage waarden aan MMPs in de normale huid vergeleken met het intense immunobeeld voor MMPs in de secties van de chronische drukulcera. Aanvullend is het intense immunobeeld voor MMP-2 en MMP-9 sterk geassocieerd met zones die een hoog aantal polymorfonucleaire inflammatoire cellen bevatten.

Ander proteasen kunnen ook een belangrijke rol spelen in het beschadigen van de ECM componenten en de groeifactoren. Urokinase plasminogeen activator (uPA), het serine protease, is gekend om een proteolytische cascade te activeren, die resulteert in de activatie van MMPs. Analyses van wondvocht en biopten van acute en chronische wonden vonden lagere niveaus van actief uPA en MMP-9 in acute wondenvergeleken met chronische veneuze ulcera ⁽⁴⁷⁾ . Meer belangrijk was er een tijdelijke overschakeling van de actieve naar de inactieve vorm van uPA die samenviel met de vermindering van MMP-9 gehalte, wanneer de chronische wonden begonnen te helen. Dit resultaat versterkt het belang van de natuurlijke protease inhibitoren, als alfa-1- protease inhibitor en de TIMPs in het helingsproces. Het gebrek aan de regulatie van protease activiteit in chronische wonden resulteert in de afbraak van ECM componenten en leidt tot eventuele weefselafbraak, ulceratie of huidstripping , die veel gezien worden in chronische wonden, zoals de veneuze ulcera en de drukulcera.

Therapeutische interventies met de mogelijkheid om de afgebroken ECM te corrigeren

Deze research heeft geleid tot de ontwikkeling van verschillende wondverbanden die als doel hebben de MMPs in chronische wonden te inactiveren. Een van deze verbanden (Promogran[®]), dat geoxideerde geregenereerde cellulose en collageen bevat, heeft aangetoond dat het de niveaus van MMP activiteit doet dalen en dat het exogeen PDGF afbreekt in chronisch wondvocht, *in vitro*. Waarschijnlijk gebeurt dit door te werken als een competitief substraat voor wondvochtproteasen, die de PDGF spaart ten koste van de afbraak van collageen in het verband^(49,50). Een klinische studie suggereert dat dit verband de heling van sommige chronische diabetische ulcera kan verbeteren⁽⁵¹⁾.

Fibracol[®], een product dat collageen combineert met alginaten werd ook ontwikkeld. Om wondexsudaat te absorberen werd een alginaat gebruikt en om de MMP protease activiteit te reduceren werd een competitief substraat voorzien (collageen).

Dermax[®], een verband dat een mix bevat aan metaalionen en citroenzuur werd beschreven als reducerend voor de vrije zuurstofradicalen en de niveaus van MMP-2, *in vitro*. Kleine niet gerandomiseerde studies zijn op komst om hun gebruik te evalueren in diabetische voetulcera en drululcera.

Een andere nieuwe aanpak in de ontwikkeling is wonden lokaal te behandelen met een uniek eiwit dat normaal de functies verhoogt van cel aanhechting gedurende de ontwikkeling van de tanden⁽⁵³⁾.

Dit eiwit, Amelogenine, wordt gezuiverd uit varkenstanden en werd met substantieel succes gebruikt op ongeveer 750.000 patiënten met een periodontale procedure. Amelogenine wordt geëvalueerd op zijn mogelijkheid om een dermale wondheling te promoten, gebaseerd op zijn eigenschap om een tijdelijk ECM eiwit te voorzien voor celaanhechting.

Besluit

De bestanddelen van de ECM zorgen voor de sterkte, elasticiteit en samendrukbaarheid van de normale huid. In de acute wonden speelt de voorlopige matrix, die fibrine en Vitronectine bevat, verschillende sleutelrollen, inclusief het verschaffen van een stelling om de cellen te leiden naar de verwonding.

Daarnaast stimuleert het de cellen om te proliferezen, differentiëren en nieuwe ECM te synthetiseren. Wanneer de heling verder gaat ondergaat de initiële ECM in het litteken remodellering en eventueel wordt het beschadigd weefsel hersteld in plaats van geregenereerd omdat de architectuur van het litteken nooit de architectuur van de onbeschadigde huid volledig kan reproduceren.

In sommige wonden faalt de heling in de opeenvolgende fasen en ontwikkelt zich een chronische wonde. Deze wonden zijn vaak gekenmerkt door een verhoogd niveau aan inflammatoire cellen, die geassocieerd zijn met verhoogde niveaus van proteasen. Deze lijken de ECM, de groeifactoren en de receptoren af te breken, die noodzakelijk zijn voor de heling.

Het herkennen en verwijderen van deze hinderpalen tot heling heeft geleid tot het concept van Wound Bed Preparation, dat de nood benadrukt om niet-leefbaar weefsel en gedenatureerde ECM te debrideren ⁽⁵⁴⁾. Het belang om een functionele ECM in chronische wonden terug te krijgen heeft geleid tot de ontwikkeling van verbanden die de overdreven protease activiteit reduceren en nieuwe technologieën zijn aan het onderzoeken hoe de afgebroken ECM tijdelijk vervangen kan worden in chronische wonden, wat de heling moet doen vergemakkelijken.

Het is duidelijk dat de optimale zorg en de behandeling van chronische wonden een inzicht vraagt in de sleutelrol die de ECM speelt in normale heling. Naast het erkennen hoe dit gewijzigd is in chronische wonden wordt ook veronderstelt men dat men zich de behandelingen eigen maakt om een functionele ECM te herstellen.

Compendium van gebruikte termen

- Chemokines: zijn kleine moleculen die losgelaten worden door de cellen bij de wonde of de infectie en die binden aan de receptoren aan de oppervlakte van de doelcellen; ze geven stijging van intracellulaire signalen die chemotaxis stimuleert (celbeweging naar een chemische gradiënt). Een voorbeeld van chemotaxis is de migratie van leucocyten vanuit de bloedvaten naar het weefsel.
- Chemotaxis: is de beweging van cellen of organismes bepaald door verscheidene substanties in hun omgeving. De richting van de beweging is beïnvloed door de concentratie gradiënt van de substantie.
- Cytokines: zijn kleine door de cel afgescheiden polypeptiden (eiwitten) die het gedrag van de cel beïnvloeden. Bv : de aanmaak van groeifactoren door macrofagen, de migratie van polymorfonucleaire leucocyten (neutrofielen) naar de wonde en de proliferatie van de fibroblasten. Cytokines worden voornamelijk losgelaten door polymorfonucleaire leucocyten en macrofagen gedurende de inflammatiefase en ze zijn cruciaal in de normale wondheling. Voorbeelden zijn tumor necrose factor alfa (TNF- α) en interleukine-1 beta (IL-1 β). Technisch gezien zijn groeifactoren en chemokines deelverzamelingen van cytokines, maar de term cytokine verwijst gewoonlijk naar moleculen die eerst de inflammatie beogen.
- Cytoskeleton: steunt de cel en geeft het zijn vorm. Het is samengesteld uit microtubuli en filamenten, die noodzakelijk zijn voor de bewegelijkheid van de cel en het helpt de beweging van materiaal in en uit de cel.
- Haemosiderine: is een onoplosbaar ijzer eiwit molecule samengesteld uit ijzeroxide, dat een bron is voor haemoglobine synthese en andere metabole processen. Het is een manier van ijzer stockage in de weefsels en is microscopisch zichtbaar met speciale vlekken.
- Glycosamineglycanen (GAGs): zijn lange polysaccharide ketens, gemaakt uit herhaalde disaccharide eenheden, die negatief geladen zijn en een grote hoeveelheid water kunnen vasthouden vergeleken met andere ECM moleculen. GAGs voorzien een groot deel van de compressieweerstand in de weefsels, terwijl de collageen moleculen de strekkracht verzorgen (de weerstand tot breken of scheuren). GAGs worden typisch teruggevonden gebonden aan de kerneiwitten van proteoglycanen; voorbeelden zijn dermataan sulfaat proteoglycanen, keratine sulfaat proteoglycanen en hyaluronzuur

- Glycoproteïnen: zijn eiwitten met gebonden koolwaterstoffen. Veel membraanproteïnen zijn glycoproteïnen. Ze zouden werken in een cel-aan-cel herkenning, zoals in menselijke bloedgroepen en immunorespons systemen, alsook als weerstand tegen celcompressie
- Groefactoren: zijn kleine eiwitten die gemaakt worden door cellen aan de wondrand of die losgelaten worden door granules (korrels) van plaatjes gedurende de stolling. Ze stimuleren proliferatie, migratie en differentiatie van de wondcellen, en vooral van keratinocyten, fibroblasten en vasculaire endotheelcellen, welke hun grootste doelgroep zijn. Groefactoren verschillen van cytokines en chemokines dat hun typische doelcellen geen inflammatoire cellen zijn. Voorbeelden zijn epidermale groefactor (EGF), platelet derived groefactor (PDGF) en vasculaire endotheliale groefactor (VEGF).
- Integrine receptoren: cellen antwoorden op signalen die ze krijgen van moleculen buiten de cel, die binden aan volledige membraaneiwitten en die de signalen doorgeven binnenin de cel. Ze bevatten ook cel oppervlakte chemische stoffen (receptoren) die hen in staat stellen te communiceren met andere cellen én andere cellen te beïnvloeden waarmee ze in direct contact zijn. Deze receptoren op de oppervlakte van de cel helpen hen om zich ook vast te hechten aan de ECM.
- Matrix Metallo Proteïnasen: zijn proteolytische enzymen, zoals collagenase en gelatinase, die collageen en andere matrix moleculen afbreken en hen helpen de matrix te remodelleren. MMPs zijn lid van de metalloproteïname supergroep van proteasen, die diverse proteasen bevat als TNF- α ombuigende enzymen (TACE) en angiotensine ombuigend enzym (ACE).
- Proteoglycanen: zijn eiwitten en polysachariden complexen met een hoog moleculair gewicht die karakteristiek zijn voor de structurele weefsels van de gewervelden (beenderen en kraakbeen). Ze zijn ook aanwezig in celoppervlakten en spelen een belangrijke rol in het bepalen van de visco-elastische eigenschappen van gewrichten en andere structuren die onderhevig zijn aan mechanische deformatie.

References

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: *Molecular Biology of the Cell*. New York, NY: Garland Science, 2002; 1065-125.
2. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Integrating cells into tissues. In: *Molecular Cell Biology*. New York, NY: WH Freeman & Co, 2000; 968-1002.
3. Pellegrini L, Burke DF, von Delft F, Mulloy B, Blundell TL. Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* 2000; **407**(6807): 1029-34.
4. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 1991; **64**(5): 867-9.
5. Kainulainen V, Wang H, Schick C, Bernfield M. Syndecans, heparan sulfate proteoglycans, maintain the proteolytic balance of acute wound fluids. *J Biol Chem* 1998; **273**(19): 11563-9.
6. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 1993; **166**(1): 74-81.
7. Bennett NT, Schultz GS. Growth factors and wound healing: biochemical properties of growth factors and their receptors. *Am J Surg* 1993; **165**(6): 728-37.
8. Lawrence WT. Physiology of the acute wound. *Clin Plast Surg* 1998; **25**(3): 321-40.
9. Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *J Cell Sci* 1997; **110**(Pt 7): 861-70.
10. Geer DJ, Andreadis ST. A novel role of fibrin in epidermal healing: plasminogen-mediated migration and selective detachment of differentiated keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2003; **121**(5): 1210-6.
11. Boudreau N, Bissell MJ. Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells. *Curr Opin Cell Biol* 1998; **10**(5): 640-6.
12. Ruoslahti E. Fibronectin and its integrin receptors in cancer. *Adv Cancer Res* 1999; **76**: 1-20.
13. Lukashev ME, Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol* 1998; **8**(11): 437-41.
14. Bhushan M, Young HS, Brenchley PE, Griffiths CE. Recent advances in cutaneous angiogenesis. *Br J Dermatol* 2002; **147**(3): 418-25.
15. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 2002; **8**(4 Suppl): S62-7.
16. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; **8**(6): 607-12.

17. Fathke C, Wilson L, Hutter J, Kapoor V, Smith A, Hocking A, et al. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells* 2004; **22**(5): 812-22.
18. Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 1999; **13**(13): 1774-86.
19. Levenson SM, Geever EF, Crowley LV, Dates JF, Berard CW, Rosen H. The healing of rat skin wounds. *Ann Surg* 1965; **161**: 293-308.
20. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1996; **4**(4): 411-20.
21. James TJ, Hughes MA, Cherry GW, Taylor RP. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Repair Regen* 2003; **11**(3): 172-6.
22. Moseley R, Hilton JR, Waddington RJ, Harding KG, Stephens P, Thomas DW. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* 2004; **12**(4): 419-29.
23. Herrick SE, Sloan P, McGurk M, Freak L, McCollum CN, Ferguson MW. Sequential changes in histologic pattern and extracellular matrix deposition during the healing of chronic venous ulcers. *Am J Pathol* 1992; **141**(5): 1085-95.
24. Loots MA, Lamme EN, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JD, Middelkoop E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 1998; **111**(5): 850-7.
25. Lundqvist K, Schmidtchen A. Immunohistochemical studies on proteoglycan expression in normal skin and chronic ulcers. *Br J Dermatol* 2001; **144**(2): 254-9.
26. Wysocki AB, Grinnell F. Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. *Lab Invest* 1990; **63**(6): 825-31.
27. Grinnell F, Ho CH, Wysocki A. Degradation of fibronectin and vitronectin in chronic wound fluid: analysis by cell blotting, immunoblotting, and cell adhesion assays. *J Invest Dermatol* 1992; **98**(4): 410-6.
28. Grinnell F, Zhu M. Identification of neutrophil elastase as the proteinase in burn wound fluid responsible for degradation of fibronectin. *J Invest Dermatol* 1994; **103**(2): 155-61.
29. Diegelmann RF. Excessive neutrophils characterize chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2003; **11**(6): 490-5.
30. Chapman HA, Munger JS, Shi GP. The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; **150**(6 Pt 2): S155-9.
31. Godeau G, Hornebeck W. Morphometric analysis of the degradation of human skin elastic fibres by human leukocyte elastase (EC 3-4-21-37) and human skin fibroblast elastase (EC 3-4-24). *Pathol Biol (Paris)* 1988; **36**(9): 1133-8.
32. Kamath NV, Ormsby A, Bergfeld WF, House NS. A light microscopic and immunohistochemical evaluation of scars. *J Cutan Pathol* 2002; **29**(1): 27-32.

33. Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993; **101**(1): 64-8.
34. Yager DR, Nwomeh BC. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1999; **7**(6): 433-41.
35. Yager DR, Zhang LY, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK. Wound fluids from human pressure ulcers contain elevated matrix metalloproteinase levels and activity compared to surgical wound fluids. *J Invest Dermatol* 1996; **107**(5): 743-8.
36. Yager DR, Chen SM, Ward SI, Olutoye OO, Diegelmann RF, Cohen K. Ability of chronic wound fluids to degrade peptide growth factors is associated with increased levels of elastase activity and diminished levels of proteinase inhibitors. *Wound Repair Regen* 1997; **5**(1): 23-32.
37. Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, et al. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* 1999; **7**(6): 442-52.
38. Rogers AA, Burnett S, Moore JC, Shakespeare PG, Chen WYJ. Involvement of proteolytic enzymes - plasminogen activators and matrix metalloproteinases - in the pathophysiology of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 1995; **3**(3): 273-83.
39. Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, Benton R, Ladin D, Hou Z, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 1995; **104**(2): 236-40.
40. Barone EJ, Yager DR, Pozez AL, Olutoye OO, Crossland MC, Diegelmann RF, et al. Interleukin-1alpha and collagenase activity are elevated in chronic wounds. *Plast Reconstr Surg* 1998; **102**(4): 1023-7; discussion 1028-9.
41. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* 1996; **4**(3): 321-25.
42. Harris IR, Yee KC, Walters CE, Cunliffe WJ, Kearney JN, Wood EJ, et al. Cytokine and protease levels in healing and non-healing chronic venous leg ulcers. *Exp Dermatol* 1995; **4**(6): 342-9.
43. Weckroth M, Vaheri A, Lauharanta J, Sorsa T, Kontinen YT. Matrix metalloproteinases, gelatinase and collagenase, in chronic leg ulcers. *J Invest Dermatol* 1996; **106**(5): 1119-24.
44. Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK, Yager DR. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *J Surg Res* 1999; **81**(2): 189-95.
45. Lobmann R, Ambrosch A, Schultz G, Waldmann K, Schiweck S, Lehnert H. Expression of matrix-metalloproteinases and their inhibitors in the wounds of diabetic and non-diabetic patients. *Diabetologia* 2002; **45**(7): 1011-6.
46. Ladwig GP, Robson MC, Liu R, Kuhn MA, Muir DF, Schultz GS. Ratios of activated matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in wound fluids are inversely correlated with healing of pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; **10**(1): 26-37.
47. Wysocki AB, Kusakabe AO, Chang S, Tuan TL. Temporal expression of urokinase plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor and gelatinase-B in chronic wound fluid

switches from a chronic to acute wound profile with progression to healing. *Wound Repair Regen* 1999; **7**(3): 154-65.

48. Rao CN, Ladin DA, Liu YY, Chilukuri K, Hou ZZ, Woodley DT. Alpha 1-antitrypsin is degraded and non-functional in chronic wounds but intact and functional in acute wounds: the inhibitor protects fibronectin from degradation by chronic wound fluid enzymes. *J Invest Dermatol* 1995; **105**(4): 572-8.

49. Cullen B, Smith R, McCulloch E, Silcock D, Morrison L. Mechanism of action of PROMOGRAN, a protease modulating matrix, for the treatment of diabetic foot ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; **10**(1): 16-25.

50. Cullen B, Watt PW, Lundqvist C, Silcock D, Schmidt RJ, Bogan D, et al. The role of oxidised regenerated cellulose/collagen in chronic wound repair and its potential mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; **34**(12): 1544-56.

51. Veves A, Sheehan P, Pham HT. A randomized, controlled trial of Promogran (a collagen/oxidized regenerated cellulose dressing) vs standard treatment in the management of diabetic foot ulcers. *Arch Surg* 2002; **137**(7): 822-7.

52. van den Berg AJ, Halkes SB, van Ufford HC, Hoekstra MJ, Beukelman CJ. A novel formulation of metal ions and citric acid reduces reactive oxygen species in vitro. *J Wound Care* 2003; **12**(10): 413-8.

53. Hoang AM, Klebe RJ, Steffensen B, Ryu OH, Simmer JP, Cochran DL. Amelogenin is a cell adhesion protein. *J Dent Res* 2002; **81**(7): 497-500.

54. Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. *Wound Repair Regen* 2003; **11**(Suppl 1): S1-S28.