

Toepassing van groeifactoren bij wondgenezing: fictie of realiteit?

R. P. DUTRIEUX, C. J. W. VAN GINKEL EN W. WESTERHOF

INLEIDING

In 1962 extraheerden Cohen en Taylor uit muizespeekselklieren een polypeptide van 6000 D dat in staat bleek proliferatie en differentiatie van keratinocyten te bevorderen.¹ Zij noemden deze stof 'epidermal growth factor' (EGF). Sindsdien is de kennis over EGF en soortgelijke groeifactoren sterk toegenomen. Bekend is inmiddels dat deze stoffen van belang zijn bij de fysiologische wondgenezing. De laatste jaren zijn deze factoren, met name de humane groeifactoren, met behulp van DNA-recombinant-methoden op ruime schaal beschikbaar gekomen. Wellicht kan lokale of algemene applicatie van deze factoren tot versnelde genezing leiden van pathologische wonden, zoals ulcera cruris en ulcera bij decubitus en diabetes mellitus, en van fysiologische wonden na operatie of trauma, met alle economische en psychologische voordelen van dien.

GROEIFACTOREN

Polypeptide groeifactoren. Van epidermal growth factor werd in 1972 de exacte aminozuurvolgorde bepaald.² Later bleken verschillende stoffen zowel qua structuur als qua biologische activiteit gedeeltelijk of geheel identiek te zijn met EGF, zoals het uit menselijke urine geïsoleerde urogastrone^{3,4} en de 'transforming growth factor-alpha' (TGF- α) dat in getransformeerde cellen wordt aangetroffen.⁵ Deze stoffen bevorderen de groei en de differentiatie van keratinocyten, fibroblasten en endotheelcellen van de huid. EGF oefent zijn werking uit via binding aan een specifieke membraanreceptor die op veel celsoorten aanwezig is. EGF wordt in vele lichaamsvloeistoffen gevonden, onder andere in het speeksel van de mens,⁶ hetgeen de neiging tot het likken van wonden als nuttig doet voorkomen.⁷

Een tweede groep wordt gevormd door stoffen met elk een specifiek effect op fibroblasten: 'platelet derived growth factor' (PDGF), 'fibroblast growth factor' (FGF), 'transforming growth factor-beta' (TGF- β), interleukine-2 (IL-2), interleukine-1 (IL-1), 'tumor-necrosis-factor' (TNF) en lymfotoxine (LT). Platelet derived growth factor (30 kD) bestaat uit twee niet-identieke polypeptide-ketens verbonden door disulfidebruggen. Deze stof wordt opgeslagen in de α -granula van trombocyten en komt vrij tijdens de plaatjesaggregatie. Ook komt PDGF voor in monocyten/macrofagen en beschadigde endo-

Zie ook het artikel op bl. 1873.

theelcellen. PDGF stimuleert voornamelijk de proliferatie van mesenchymcellen, zoals gladde-spiercellen van de vaatwand en fibroblasten. Voorts stimuleert PDGF de synthese door fibroblasten van extracellulaire matrix-eiwitten zoals collageen, fibronectine en proteoglycanen. Door werking van PDGF op de collagenase-activiteit van fibroblasten wordt ook de organisatie van de extracellulaire matrix beïnvloed. Bovendien verhoogt PDGF de productie van somatomedine. Fibroblast growth factor stimuleert behalve de proliferatie van fibroblasten, gladde-spiercellen van de vaatwand en endotheelcellen de productie en de organisatie van de extracellulaire matrix (collageen, proteoglycanen en fibronectine).⁸ Transforming growth factor-beta (25 kD) bezit voor fibroblast growth factor en platelet derived growth factor genoemde eigenschappen en kan fibroblasten in de wondmatrix tot contractie brengen. Deze groeifactor wordt opgeslagen in de α -granula van trombocyten en komt vrij bij plaatjesaggregatie.⁹⁻¹¹ Interleukine-1 (17 kD), interleukine-2 (15 kD), tumor-necrosis-factor (17 kD) en lymfotoxine behoren tot de cytokines; stoffen die door verschillende ontstekingscellen (voornamelijk lymfocyten en monocyten of macrofagen) geproduceerd worden en die van groot belang zijn voor de intercellulaire communicatie via humorale weg tijdens de ontstekingsreactie. Ook hebben ze een stimulerende werking op de proliferatie van fibroblasten.¹²⁻¹⁶

Een derde groep polypeptide-groeifactoren is een heterogene groep, waarvan chemische structuur en werking nog onvoldoende bekend zijn.

Proteasen. Proteasen zijn stoffen die eiwitten kunnen splitsen, maar die zich ook kunnen binden aan receptoren van cellen, o.a. fibroblasten, met als gevolg celproliferatie. Al in 1970 werd groeistimulerende capaciteit beschreven voor trypsine.¹⁷ In de wond zelf worden metalloproteïnases gemaakt, waaronder collagenase dat collageen afbreekt en daardoor migratie van fibroblasten mogelijk maakt.¹⁸ Nog niet duidelijk is of collagenase ook celproliferatie kan induceren, hetgeen voor trombine is aangehouden.¹⁹

Hormonen. Ook enkele hormonen *sensu stricto* lijken van invloed te zijn op de wondgenezing, bijvoorbeeld somatomedine dat van oudsher bekend staat als een skeletgroei regulerend hormoon.²⁰ Somatomedine wordt in wondvocht aangetroffen en stimuleert de proliferatie van fibroblasten en endotheelcellen, en de collageenproductie door fibroblasten. Andere hormonen met groei-

Academisch Medisch Centrum, afd. Dermatologie, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam.

R.P. Dutrieux, assistent-geneeskundige; dr. C.J.W. van Ginkel, dermatoloog en chemicus; dr. W. Westerhof, dermatoloog.

Correspondentie-adres: dr. W. Westerhof.

stimulerende activiteit zijn prolactine, vasopressine, insuline en groeihormoon. Polypeptide groeifactoren zijn te onderscheiden van hormonen doordat ze niet in een bepaald orgaan geproduceerd worden en meestal ter plekke werken.

FYSIOLOGISCHE WONDGENEZING

Bij de fysiologische wondgenezing onderscheidt men drie elkaar chronologisch overlappende fasen.

De reinigingsfase. Voor wat betreft groeifactoren is de betekenis van de reinigingsfase beperkt tot accumulatie van trombocyten en verschillende ontstekingscellen, zoals monocytten of macrofagen en lymfocyten.²¹⁻²³ Met de vorming van allerlei groeifactoren door deze cellen begint de proliferatiefase. Bespreking van de reinigingsfase valt verder buiten het bestek van dit artikel.

De proliferatiefase. Tijdens deze fase delen de keratinocyten zich in de wondranden, waarna ze migreren over een fibrine-fibronectinematrix naar het wondcentrum. Epidermal growth factor bevordert in de keratinocyt de produktie van fibronectine (440 kD), dat collageen en fibrine bindt en een matrix vormt waarop cel-cel- en cel-matrixadhesies tot stand komen. Voor deze interacties is het van groot belang dat keratinocyten en fibroblasten specifieke receptoren voor dit eiwit aan het oppervlak bezitten. Het is opmerkelijk dat juist bij verlies van de intercellulaire samenhang deze receptor bij de keratinocyt tot expressie wordt gebracht. Gelijktijdig met de epithelialisatie ontstaan onder invloed van angiogene stimuli nieuwe vaten in de hypoxische gebieden. Als de zuurstofspanning in deze gebieden stijgt, nemen de angiogene stimuli weer af, waardoor de nieuw gevormde vaten in regressie gaan en er een slecht gevasculariseerd litteken ontstaat.

Ook fibroblasten bewegen zich door middel van microfilamenten langs de matrix, nadat ze zich hebben losgemaakt van hun proliferatiezijde in de wondrand. Proliferatie van deze cellen geschiedt behalve onder invloed van eerder genoemde factoren door lage PO_2 .²¹

De remodeleringsfase. Ongeveer 2 à 3 weken na verwonding bereikt collageen zijn maximale dichtheid in de wond. De trekkracht neemt gedurende het hierop volgende jaar echter nog toe en bereikt uiteindelijk 80% van de trekkracht van de intacte huid. Ook wordt het in eerste instantie gevormde type III-collageen vervangen door type I-collageen, waarin de collageenfibrillen meer met elkaar verweven zijn, hetgeen het weefsel stabiel maakt. Uit onlangs verschenen literatuur komen aanwijzingen naar voren dat deze veranderingen in het collageen gestimuleerd worden door fibroblast growth factor.²⁴

DIEREXPERIMENTEEL ONDERZOEK MET GROEIFACTOREN

Een veel toegepast diermodel bestaat uit het deponeren van sponsjes in een experimentele huidwond en het veelvuldig lokaal toedienen van de te onderzoeken groeifactor, waarna op verschillende tijdstippen de sponsjes verwijderd en o.a. histologisch onderzocht worden. Diverse onderzoekers stelden vast dat epidermal growth

factor de normale wondgenezing kan versnellen door lokale bevordering van de bloeddoodstroming verhogende neovascularisatie en door stimulatie van de groei van fibroblasten en van de synthese van collageen.²⁵ Ook epidermale regeneratie raakt door EGF versneld.²⁶ Dit wijst erop dat onder fysiologische omstandigheden de aanwezige groeifactoren niet maximaal werken. Er kan worden aangetoond dat de normaal aanwezige concentratie van 40 ng EGF/g nat gewicht weefsel in een wond niet in staat is om alle EGF-receptoren te bezetten.²⁷ Ook moet men rekening houden met farmacologische eigenschappen van groeifactoren, omdat het effect van EGF dosis-afhankelijk is.²⁷ Toedieningsvormen met verlengde afgifte van EGF sorteren duidelijk meer effect dan enkelvoudige of intervalsegewijze toegediende doses.²⁸ Een verklaring hiervoor zou kunnen zijn dat DNA-synthese van de cel pas ontstaat na 8 à 10 uur continue expositie van de cel aan EGF, terwijl de halveringstijd van EGF in het wondbed circa 1 uur bedraagt. Van een enkele hoge dosis zal dus na 8 uur niet veel meer over zijn en preparaten met vertraagde afgifte zullen dus een grotere werking hebben.²⁹

Ook andere groeifactoren blijken in staat de normale wondgenezing bij proefdieren te versnellen. Lynch et al. vonden dat door het toedienen van 500 ng platelet derived growth factor op het wondbed van varkens de celdichtheid in het bindweefsel na 7 dagen met 35% toenam, voornamelijk als gevolg van een toename in het aantal fibroblasten.³⁰ Het toedienen van PDGF en EGF te zamen gaf additie van de afzonderlijke effecten bij epithelialisatie en bindweefselvorming. Ook stelden zij vast dat somatomedine alleen geen duidelijk effect sorteerde op de genezende wond, maar dat de combinatie met PDGF duidelijk synergistische resultaten opleverde die bovendien groter waren dan de effecten van de combinatie PDGF en EGF.

Transforming growth factor-beta bleek de wondgenezing bij ratten in de eerste week van gebruik twee dagen te versnellen.³¹ Ook bij gebruik van fibroblast growth factor, verkregen via DNA-recombinant-methoden, werd een, weliswaar niet duidelijk gekwantificeerde, versnelling van de wondgenezing waargenomen.²⁴

TOEPASSINGEN BIJ DE MENS

Een logische volgende stap in de experimenten met groeifactoren is de toepassing van deze stoffen bij patiënten om genezing van pathologische wonden en bekorting van de genezingsduur van fysiologische wonden te bewerkstelligen. De met behulp van DNA-recombinant-methoden in relatief grote hoeveelheden beschikbaar gekomen humane groeifactoren maken deze experimenten sinds kort mogelijk. Met deze humane groeifactoren zijn geen problemen met immunogeniteit te verwachten. Thans zijn de volgende factoren beschikbaar: epidermal growth factor, fibroblast growth factor, interleukine-1 en -2, tumor-necrosis-factor, insuline, somatomedine en (in beperkte mate) lymfotaxine. Uit in vitro-onderzoek en dierexperimenten zijn geen aanwijzingen naar voren gekomen dat groeifactoren maligne degeneratie zouden kunnen induceren.

Vooral de verwerking van groeifactoren in preparaten met vertraagde afgifte biedt veel perspectief op grond van de korte halveringstijd van groeifactoren in het wondbed. Een aantrekkelijk wondmodel wordt in dit verband gevormd door de uniforme wondjes (diameter 4 mm) die op het bovenbeen achterblijven na wegname van huidbiopten van volledige dikte voor bedekking van een ulcus cruris. Deze techniek wordt reeds vele jaren met succes in onze kliniek toegepast en is reeds eerder uitgebreid in dit tijdschrift beschreven.³² Met dit model werd onlangs aangetoond dat een eiwitvrij extract uit foetaal kalver-serum een versnelling van de wondgenezing gaf. De effecten van groeifactoren op de ulcusbodem zijn moeilijk te onderzoeken, omdat de oorzaken van ulcus cruris zo verschillend zijn en omdat de onderzoeken slechts kleine aantallen patiënten betreffen. Platelet derived growth factor, geïsoleerd uit het bloed van de patiënt zelf, lijkt evenwel de genezingsduur van ulcus cruris – ongeacht de oorzaak – aanzienlijk te bekorten.³³

BESCHOUWING

Tegen de achtergrond van vele positieve bevindingen bij dierexperimenteel onderzoek met groeifactoren staat de vraag centraal of in de toekomst lokale toediening van groeifactoren klinische relevantie voor de wondgenezing zal hebben. Voor de beantwoording van deze vraag zal door uiteenlopende disciplines nog veel onderzoek verricht moeten worden. De analytisch-chemicus zal voldoende specifieke en sensitieve meetmethoden moeten ontwikkelen om onder verschillende pathologische condities aanwezige groeifactoren te kunnen kwantificeren en eventuele deficiënties te kunnen vaststellen. De biochemicus zal de kennis aangaande fundamentele biologische effecten van groeifactoren moeten uitbouwen en met DNA-recombinant-methoden het aanbod van humane groeifactoren moeten vergroten. Het ligt op de weg van de farmaceut om de groeifactoren in klinisch toepasbare, stabiele preparaten met een vertraagde afgifte te verwerken. De clinicus tenslotte zal met uitgebreide trials moeten bepalen welke groeifactoren in welke dosering en toedieningsvorm de wondgenezing bij de patiënt kunnen bevorderen.

LITERATUUR

- 1 Cohen S. Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new born animal. *J Biol Chem* 1962; 237: 1555-62.
- 2 Savage jr CR, Inagani T, Cohen S. The primary structure of epidermal growth factor. *J Biol Chem* 1972; 247: 7612-21.
- 3 Gregory H. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. *Nature* 1975; 257: 325-7.
- 4 Franklin TJ, Gregory H, Morris WP. Acceleration of woundhealing by recombinant human urogastrone (epidermal growth factor). *J Lab Clin Med* 1986; 108: 103-8.
- 5 Schultz GS, White M, Mitchell R, et al. Epithelial wound healing enhanced by transforming growth factor-alpha and vaccinia growth factor. *Science* 1987; 235: 350-2.
- 6 Gregory H. In vivo aspects of urogastrone-epidermal growth factor. *J Cell Sci* 1985; (suppl) 3: 11-7.
- 7 Sheretz EF. Why Sadie licks her wounds. *Arch Dermatol* 1988; 124: 1499-1500.
- 8 Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987; 8: 95-114.
- 9 James R, Bradshaw RA. Polypeptide growth factors. *Annu Rev Biochem* 1984; 53: 259-92.
- 10 Folkman J, Klagsburn M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235: 442-7.
- 11 Montesano R, Orci L. Transforming growth factor-beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts. Implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4894-7.
- 12 Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I. Interleukine I, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* 1982; 128: 2177-82.
- 13 Dower SK, Kronheim SR, March CJ, et al. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukine I. *J Exp Med* 1985; 162: 501-15.
- 14 Vilček J, Palombella VJ, Henriksen-Destefano D, et al. Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 1986; 163: 632-43.
- 15 Le J, Vilček J. Tumor necrosis factor and interleukine I: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest* 1987; 56: 234-48.
- 16 Cuturi MC, Murphy M, Costa-Giomi MP, Weinmann R, Perussia B, Trinchieri G. Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1987; 165: 1581-94.
- 17 Burger MM. Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. *Nature* 1970; 227: 170-1.
- 18 Kodama S, Kishi J, Obata K, Iwata K, Hayakawa T. Monoclonal antibodies to bovine inhibitor. *Coll Relat Res* 1987; 7: 341-50.
- 19 Scher W. The role of extracellular proteases in cell proliferation and differentiation. *Lab Invest* 1987; 57: 607-33.
- 20 Underwood LE, Ercole AJ d', Clemmons DR, Wyk JJ van. Paracrine functions of somatomedins. *Clin Endocrinol Metab* 1986; 15: 59-77.
- 21 Kanzler MH, Gorsulowsky DC, Swanson NA. Basic mechanism in the healing cutaneous wound. *J Dermatol Surg Oncol* 1986; 12: 1156-64.
- 22 Falanga V, Zitelli JA, Eaglstein WH. Wound healing. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 559-62.
- 23 Nathan CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79: 319-26.
- 24 McGee GS, Davidson JM, Buckley A, et al. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res* 1988; 45: 145-53.
- 25 Laato M. Effect of epidermal growth factor on blood flow and albumine extravasation in experimental granulation tissue. *Acta Chir Scand* 1986; 152: 401-5.
- 26 Brown GL, Curtsinger L, Brightwell JR, et al. Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. *J Exp Med* 1986; 163: 1319-24.
- 27 Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Woodward SC. Epidermal growth factor increases granulation tissue formation dose dependently. *J Surg Res* 1987; 43: 322-8.
- 28 Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Wolt TB, Woodward SC. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 7340-4.
- 29 Laato M, Niinikoski J, Gerdin B, Lebel L. Stimulation of wound healing by epidermal growth factor. A dose-dependent effect. *Ann Surg* 1986; 203: 379-81.
- 30 Lynch SE, Nixon JC, Colvin RB, Antoniades HN. Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7696-700.
- 31 Mustoe TA, Pierce GF, Thomason A, Gramates P, Sporn MB, Deuel TF. Accelerating healing of incisional wounds in rats induced by transforming growth factor-beta. *Science* 1987; 237: 1333-6.
- 32 Jansen FC, Westerhof W, Cormane RH. Transplantatie van autologe huidbiopten: een doeltreffende klinische behandeling van het ulcus cruris. *Ned Tijdschr Geneesk* 1986; 130: 1230-3.
- 33 Knighton DR, Fiegel VD, Austin LL, Ciresi KF, Butler EL. Classification and treatment of chronic non-healing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors. *Ann Surg* 1986; 204: 322-30.

Aanvaard op 12 juni 1989