

OXIDATIEVE STRESS IN CHRONISCHE VENEUZE ULCERA

Vertaling door de studenten van de cursus weefselherstel schooljaar 2005-2006

Meinhart Wlascheik, PhD; Karin Scharfetter-Kochanek, MD
Wound Repair and Regeneration, September-October 2005, volume 13, number 5, p.452-461.

Veneuze ulcera komen veel voor en veroorzaken aanzienlijke morbiditeit in de bevolking. Aangezien genezing langzaam kan zijn of nooit kan worden bereikt, leiden de ulcera (zweren) tot blijvende en een substantieel verbruik van de klinische middelen in de gezondheidszorg. Grote inspanningen zijn geleverd om weefselherstel (genezing) van chronische veneuze ulcera te versnellen echter met beperkt succes. Dit kan gedeeltelijk toe te schrijven zijn aan de beperkte kennis van microbiologie van chronische wonden. In feite is de enorme invloed van de microbiologische condities van de wonde op het resultaat van wondheling meer en meer duidelijk geworden. De oxidatieve stress ten gevolge van een onevenwichtigheid in de pro-oxidant-anti-oxiderende homeostase in chronische wonden wordt verondersteld een zeer belangrijke rol te spelen waardoor de opeenvolging van gebeurtenissen definitief resulteren in een niet genezende wonde. De meerderheid van reactieve zuurstofradicalen worden waarschijnlijk het meest vrijgegeven door de neutrofielen en macrofagen en tot een onbekende omvang van lokale fibroblasten en endotheelcellen. Aangezien de ontstekingsfase bij chronische wonden niet stopt, gaat de vrijgave van reactieve zuurstofsoorten over een lange tijdsperiode door met verdere blijvende schade en daardoor blijft de ontsteking verder gaan. In dit artikel, zullen wij kritisch de recente bevindingen bespreken die de rol van oxidatieve stress (spanning) in de pathofysiologie van het niet genezen van chronische veneuze ulcera steunen. (WOUND REP REG 2005; 13:452-461)

Inleiding

De veneuze ulcera zijn in de meeste gevallen uiteindelijk het (definitieve) resultaat van chronische veneuze insufficiëntie. De ulcera of zweren kunnen als wonden met een "fullthickness" (= zowel epidermis als dermis beschadigd) en een "langzame helende tendens" (= chronisch) worden gedefinieerd. De veneuze ulcera (aderlijke beenzweren) zijn veel voorkomend en veroorzaken aanzienlijke morbiditeit in de bevolking. De chronische ulcera van het onderbeen hebben een prevalentie van 3-5% in de bevolking van meer dan 65 jaar oud met een verhoging van zelfs 12% bij de bevolking van meer dan 70 jaar oud.¹ De incidentie van ulceratie neemt toe door de toenemende vergrijzing en de verhoogde risicofactoren bij aderverkalking zoals het roken, zwaarlijvigheid, en diabetes. Aangezien helen langzaam kan zijn of nooit kan worden bereikt, leiden de ulcera (zweren) tot blijvende en wezenlijke kosten die steeds zwaarder gaan wegen op de gezondheidszorgmiddelen. In het Verenigd Koninkrijk, werden de behandelingskosten voor veneuze ulcera in 1997 geschat op 400 miljoen Pond per jaar.² Wegens de toenemende vergrijzing van de wereldbevolking en het overwicht van chronische aderlijke ziekten met leeftijd gecorreleerd is, is het voorspelbaar dat de financiële druk op de maatschappij voor de behandeling van deze ziekten zal stijgen. Grote inspanningen zijn geleverd om het genezingsproces te versnellen bij chronische beenzweren, maar met beperkt succes. Dit kan gedeeltelijk toe te schrijven zijn aan de beperkte kennis van de pathofysiologie van chronische wonden en de rol van hun micromilieu.

Andere factoren die een rol spelen in de gestoorde wondheling als aanvulling op de lokale en systemische factoren zoals veneuze insufficiëntie, ischemie, en malnutritie zijn verminderde concentratie aan groeifactoren, verhoogde proteolyse en de aanwezigheid van verouderde cellen. Ondanks dat men het exacte onderliggende mechanismen die aan de basis liggen van gestoorde wondheling nog niet kent, komt steeds meer naar boven dat toxische concentraties van reactieve zuurstof radicalen (ROS) samengaan met een verhoogde concentratie aan vrij ijzer in het weefsel en een vijandig proteolytische (= eiwit afbrekend) micro-omgeving de hoofdoorzaak vormen van de weefselafbraak in chronisch veneuze ulcera.

Woord en terminologie verklaringstabel

AUR	Allantoin: uric acid ratio (allantoïne : urinezuur verhouding)
DUOX	Dual oxidase (dubbel oxidase)
ICAM-1	Intercellulaire adhesie molecule-1
iNOS	Induceerbare NOS
MMP	Matrix metalloproteïnase
MT1-MMP	Membraan type 1-MMP
mtDNA	Mitochondriaal DNA
NO	Nitric oxide (Stikstofmonoxide)
NOS	NO synthase
NOX	NADPH oxidase
PDGF	Platelet-derived growth factor (van de bloedplaatjes afgeleide groeifactor)
Phox	Phagocyt oxidase
ROS	Reactieve oxygen species (reactieve & niet reactieve zuurstof moleculen)
SOD	Superoxide dismutase (enzym dat zuurstofradicalen kan wegvangen)
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases (metalloproteïnase remmers van het weefsel)
VCAM-1	Vascular intercellular adhesion molecule-1
Incidentie	het percentage v.h. aantal nieuwe gevallen gedurende een bepaalde periode

Biochemie van oxidatieve stress en zijn pathofysiologische consequenties.

De term oxidatieve stress werd geïntroduceerd door Helmut Sies⁵ en omschreven als ‘een verstoring in de pro-oxidant-anti-oxidant balans in het voordeel van de pro-oxidant reacties dat kan leiden tot schade’. Oxidatieve stress wordt geregeld (in evenwicht gehouden) door ROS die in principe betrokken zijn in normale fysiologisch regulerende processen, maar die ernstige schade kan veroorzaken aan de celcomponenten. Deze schade is gemedieerd door zowel radicale als niet radicale ROS zoals het superoxide anion en hydroxyl radicalen alsook ‘singlet’ (= één) zuurstofatoom en hydroxyl peroxide. Waterstofperoxide (H₂O₂ of zuurstofwater) is in staat om vrij vlug doorheen celmembranen te gaan en samen met metaal ionen zoals ijzer en koper het zeer toxische hydroxyl radicaal te laten ontstaan dewelke in staat is om de peroxidatie van de vetzuren in het celmembraan in gang te zetten. Voor meer details van de biochemische paden betrokken in de ROS vorming refereren wij naar het werk van Halliwell en Gutteridge.⁶ ROS gemedieerde paden zijn recent in detail terug bekeken door Droge⁷ en Forman en andere⁷.

ROS zijn waarschijnlijk betrokken in alle stadia van het wondhelingsproces. Migratie, adhesie, proliferatie, neovascularisatie, remodelering en apoptose (= geprogrammeerde cel

dood) zijn belangrijke processen die in de helende wonde plaatsvinden en gereguleerd of minstens gemedieerd worden door ROS. Door de verstoring van de onderliggende processen kan zuurstof stress leiden tot een verstoorde wondheling. Verhoogde ROS concentraties in chronische wonden worden verantwoordelijk gesteld voor de reeks destructieve van processen die uitmonden in het niet helen van de wonden. De meerderheid van de ROS worden meest waarschijnlijk vrijgegeven door de neutrofielen en de macrofagen en tot een onbekende omvang door lokale fibroblasten en endotheelcellen. Er zijn een groot aantal bronnen van ROS in chronische wonden. Verlengde inflammatie met neutrofielen die migreren in het beschadigde weefsel en via de oxidatieve spring reactie (= oxidatieve burst reaction) superoxide anionen vrijzetten, hypoxie, ischemie en reperfusie zijn belangrijke mechanismen die resulteren in oxidatieve stress. Aanvullend op de inflammatoire cellen, kunnen andere cellen zoals de fibroblasten ROS produceren wanneer ze gestimuleerd worden door proinflammatoire cytokines.⁹ Aangezien de inflammatoire fase bij chronische wonden niet stopt, blijft de hoeveelheid ROS over een langere periode aanwezig, met een continue schade en het onderhouden van de inflammatie fase als gevolg (vicious circle). Een toegenomen hydrostatische druk door de veneuze kleppen insufficiëntie veroorzaakt een toegenomen en activatie van een reeks van adhesie moleculen en hun tegengestelde receptoren zoals de selectines, Beta-1 en Beta-2 integrines, de induceerbare intercellulaire adhesiemolecule-1 (ICAM-1) en de vasculaire endotheel cel adhesie molecule-1 (VCAM) alzo verhogen deze continue extravasatie van geactiveerde leukocyten. Na de initiële piek expressie worden de vasculaire ICAM-1 en VCAM-1 vrijgave niet meer naar beneden, naar normale hoeveelheden teruggebracht.¹⁰ ROS verhogen de leukocyten adhesie die op zijn beurt de expressie van de endotheliale receptor gp 100MEL-14 versterkt, waardoor de emigratie van inflammatoire cellen in het wondweefsel versterkt wordt.¹¹

Langerhans cellen, T cellen en macrofagen worden elk gerekruteerd via meer dan één moleculaire adhesie wijze (pad) naar de diverse regio's van de chronische veneuze ulcera.¹² De up regulatie van deze adhesie moleculen kunnen bijdragen tot een verhoogde verkleving en extravasatie van leukocyten in chronische veneuze insufficiëntie.

Zelfs in de venen ter hoogte van de armen worden er leukocyten gevonden die opnieuw geactiveerd werden en een verhoogde vrijgave van superoxide anionen demonstreerden.^{13, 14} Wanneer ROS zich op een plaats bevinden in toxischer concentraties dan kan dat leiden tot een reeks van pathologische effecten waaronder ook een beschadiging van endotheelcellen met een verdere up regulatie van ICAM-1, omdat de ICAM-1 promotor een ROS consensus sequentie heeft.¹⁵ Daardoor worden er meer leukocyten naar de wonde toe gerekruteerd. Verhoogde ROS hoeveelheden blijken ook keratinocyten migratie in vitro tegen te werken, waardoor mogelijks een vertraagde reepithalisatie in wonden kan verklaard worden.¹⁶

Superoxide anionen in samenwerking met stikstofmonoxide vormen de toxische peroxinitriet dewelke bijdraagt tot weefselbeschadiging en het onderhouden van de inflammatie reactie. Interessant is dat de induceerbare vorm van stikstofmonoxide (NO)-synthase (NOS) en arginase beiden verantwoordelijk zijn voor de vorming van NO; beiden zijn sterk verhoogd in chronische veneuze ulcera.¹⁷ In tegenstelling tot normale fibroblasten synthetiseren wond fibroblasten NO via induceerbare NOS (iNOS) waardoor collageen synthese en contractiele activiteiten worden gereguleerd.¹⁸ In endotheelcellen NOS en iNOS nul muizen (= muizen die genetisch gewijzigd zijn en dus deze stoffen niet kunnen aanmaken) is een vertraagde wondheling gezien.¹⁹ Samen met de observatie dat NO de expressie van vasculair endotheel groefactor in normale wondheling opgang trekt, wordt NO gezien als een promotor voor wondheling.²⁰ Ondanks deze kennis is het duidelijk dat de bronnen van NO en superoxide anionen in chronische wonden van diverse bronnen kunnen komen. Hierdoor is de rol van NO en de daarbij gepaard gaande chemische reacties in veneuze ulcera nog niet duidelijk.

Detectie van ROS (Reactive Oxygen Species of vrije zuurstof radicalen) en ROS-producten (afgeleiden) in chronische veneuze ulcera

Het meten van oxidatieve stress in wonden wordt bemoeilijkt door de korte halfwaarde tijd en de hoge reactiviteit van ROS. Daarom meet men de oxidatieve schade van DNA, proteïnen en vetten voor het vaststellen van oxidatieve stress. De klassieke methode maakt gebruik van de tussenproducten of eindproducten van vetperoxidatie zoals: malondialdehyde of isoprostane, of DNA schade zoals hydroxydesoxyguanosine, eiwitoxidativa met de detectie van nitrotyrosine resten en andere. James et al.²¹ maten het allantoïne / urinezuur percent verhouding (ratio) of AUR afgekort. Allantoïne en urinezuur zijn stabiele oxidatie producten en werden gemeten in chronisch wondvocht van 10 patiënten en vergeleken met acuut wondvocht en plasma waarden gebruik makend van HPLC (Hoge druk licht chromatografie). In chronisch wondvocht, the gemiddelde AUR was vijfvoudig verhoogd wat wees op sterke oxidatieve stress bij neutrofielen. Metingen van de totale antioxidatie capaciteit toonden geen significante verschillen met het plasma. Yeoh – Ellerton en Stacey²² maten 8-isoprostane waarden met enzym immuno analyse, en gas chromatografie/massa spectrometrie en de totale antioxidant status gebruik makend van de vermindering in oxidatie van een specifiek substraat.

Isoprostanes zijn prostaglandine lijkende moleculen die gegenereerd worden door oxidatie van onverzadigde vetzuren aanwezig in membraam fosfolipiden. De waarden van 8-isoprostane bij veneuze ulcera waren significant verhoogd in vergelijking met het wondvocht van acute wonden. In chronisch wondvocht werd een hogere antioxidant status vastgesteld gebruik makend van een commercieel beschikbaar analysesysteem. De auteurs vermelden dat voor de interpretatie van de totale antioxidatie status van het chronisch wondvocht meer gedetailleerde kennis over de pathofysiologie van chronische wonden nodig is.

Verminderde antioxidant verdediging in chronische veneuze ulcera.

De huid is uitgerust met een uitgebreid arsenaal van laag moleculair gewicht antioxidantia en enzymen die een netwerk van redox actieve antioxidantia bouwen. Antioxidantia bescherming komt van componenten gesynthetiseerd 'in vivo' door de cellen die vetzuren, urinezuur, coenzym Q, glutathion en andere bevatten, maar de antioxidantia verdediging is ook afhankelijk van bescherming door componenten die worden geleverd via voedselinname zoals ascorbine zuur (vit C), vitamine E en tocopherol. In normaal helende huidwonden bij ratten werd in het wondhelingsproces een vermindering en gereduceerd glutathion, vit c en vit E vastgesteld.²³ De verwondingen resulteerden in een 60-70% vermindering in antioxidant waarden die niet normaliseerden tot dag 14. In wonden van streptozotocine geïnjecteerde jonge diabetisch ratten waren op dag 7 de waarden van glutathion verminderd in tegenstelling tot vitamine E, die verhoogde waardes vertoonden.²⁴ Bij patiënten met chronische veneuze ulcera werden significante lagere waarden van vitamine A en vitamine E gevonden.²⁵ Ägren et al.²⁶ toonde aan dat patiënten met beenulcera lagere waarden hadden van Selenium, Zink en ijzer in combinatie met verhoogde serum koper waarden. Selenium is een belangrijke cofactor van het enzym glutathionperoxidase en koper is belangrijk als een transitie metaal dat in staat is tot het sturen van de Fenton reactie die de hydroxyl radicalen levert. Of deze deficiënties (tekorten) in de antioxidatieve verdediging de verklaring zijn waarom acute wonden chronisch worden als oorzaak of het gevolg zijn van vertraagde wondheling is niet duidelijk.

De antioxidant enzymen zijn gelokaliseerd in specifiek subcellulaire compartimenten en vertonen afzonderlijke substraten. De belangrijkste antioxidant enzymen zijn superoxide dismutase (SOD), glutathionperoxidase en catalase.⁶ Bij zoogdieren zijn drie verschillende SOD's teruggevonden die de dismutatie van superoxide anion katalyseren tot waterstofperoxide als een eerste lijn van antioxidatieve stress (= eerste lijn van verdediging tegen de vrije zuurstofradicalen). Het SOD1 gen codeert voor het cytosolisch koper (koper in de cel), zink SOD vertegenwoordigt het dominante SOD in cellen en weefsels en bestaat uit 70-80% van de totale SOD activiteit. Het SOD2 gen codeert voor mitochondriaal gelokaliseerd mangaan-SOD. Extracellulair SOD (SOD3) is aanwezig in significante hoeveelheden alleen in specifiek weefsels zoals nierweefsel, vetweefsel en longweefsel. Er is beperkte kennis over de activiteit van de antioxidant enzymen in chronische wonden. Metingen van glutathionperoxidase activiteit in het bloed van patiënten met veneuze ulcera toonden een vermindering met 15%. Bij patiënten met chronische wonden was de Superoxide vrijzetting bij neutrofielen verhoogd tot 170%.²⁷ Acute huidwonden bij muizen vertoonden verhoogde waarden van SOD1 en SOD2, catalase als ook een glutathionperoxidase gemeten bij 'in situ' hybridizatie en RNase protectie analyse. De auteurs zagen een sterke correlatie tussen mRNA en proteïnewaarden, zeker voor SOD2.²⁸ Deze data laten toe te concluderen dat in helende wonden een antioxidatieve verdedigingssysteem nodig is voor neerwaartse regulatie en het limiteren van oxidatieve stress die meestal aanwezig is bij ontstekende wonden en zeker in de wonden waar er veel necrose of infectie aanwezig zijn. Voor chronische wonden zoals beenulcera is er een enorm gebrek aan kennis over de antioxidatieve verdediging bij deze wonden.

Aanwezigheid van inflammatoire cellen in het weefsel bij veneuze beenulcera.

Chronische beenulcera slagen er niet in om het normale patroon van wondheling zoals inflammatie, granulatie, maturatie te volgen in plaats daarvan blijven zij in een staat van chronische inflammatie met beperkte tekens van heling. Er is steeds meer bewijs dat de aanwezigheid van neutrofielen en macrofagen²⁹ in samenwerking met verhoogde vrijgave van ROS – verhogende ijzer afzettingen in het ulcerweefsel³⁰ en ulcervocht³¹ een grote rol spelen in de het ontstaan van een prooxidant proteolytisch micro-omgeving in chronische veneuze beenulcera. (Dus een milieu waar er veel stuk wordt gemaakt door de vrije zuurstof radicalen en door enzymen die vooral weefsel afbreken).

De hoofd kenmerken van de eerste fase van het normale wondheling zijn ontsteking en debridement, hoofdzakelijk afhankelijk van de cellulaire immunitaire reactie. Na de verwonding, zijn de lymfocyten, granulocyten en macrofagen aangetrokken tot in het wondweefsel. De lymfocyten en granulocyten hebben een belangrijke functie om bacteriën te elimineren. Macrofagen zijn betrokken bij de ontstekingsreactie evenals de daarop volgende granulatiefase bij het helen van de wond.

Bij het fysiologisch (normale) helen van wonden, verdwijnen de lymfocyten en granulocyten van het wondweefsel binnen een paar dagen. In niet helende veneuze ulcera, blijven de ontstekingscellen in het wondweefsel en vertonen een veranderde samenstelling in vergelijking met acute wonden. CD20+ de B-cellen, CD68+ macrofagen, en de plasmacellen zijn in hoge aantallen aanwezig in de chronische wond. De verhouding van CD4+ en CD8+ T-Lymfocyten is beïnvloed naar CD4+ T-cellen.³²

De T-lymfocyten overheersen het gebied ver van de wondrand. Ongeveer 30% van de ontstekingscellen zijn CD8+ cellen zijn terug te vinden over de gehele chronische wond. Het centrum en de rand van het ulcus worden overheerst door macrofagen, volgens Rosner et al²⁹.

In een studie door Moore et al.³³, waren de B-Cellen en de NK-cellen vrij zeldzaam. In de wondrand, werden de witte bloedlichaampjes CD45+ leukocyten teruggevonden in hoogste aantal.

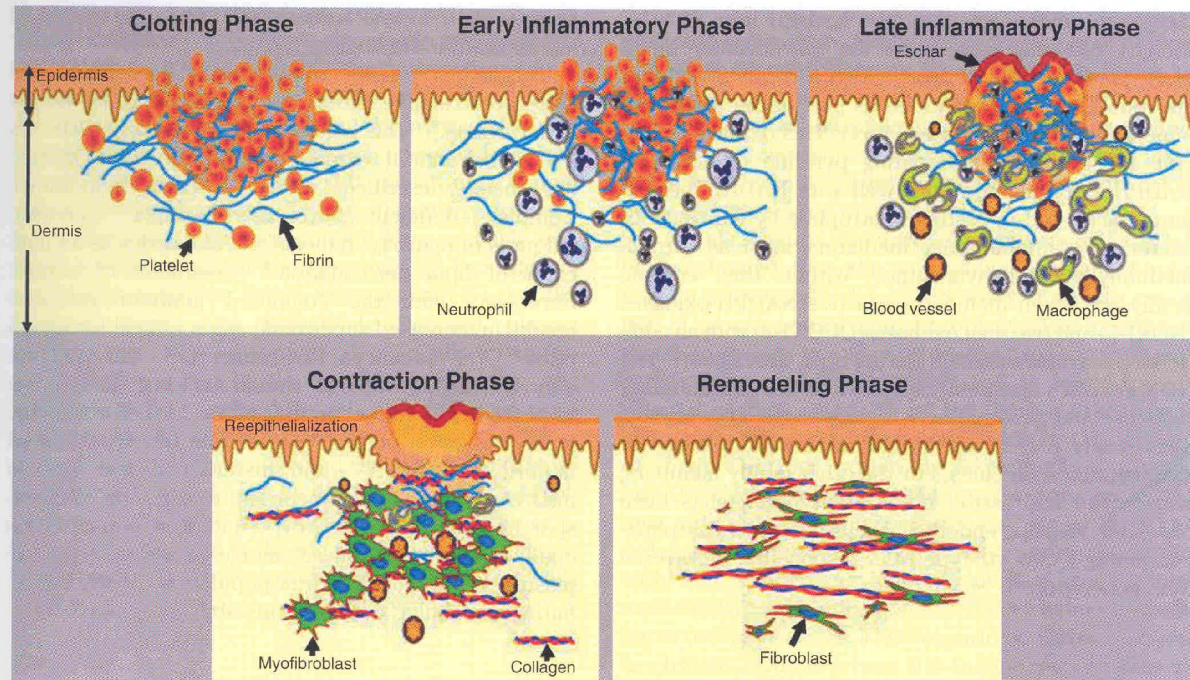


FIGURE 1. Different, partly overlapping, phases during physiological wound healing. The first wound coverage is formed within the inflammatory phase as an eschar by a blood clot. Emigration of neutrophils and other inflammatory cells like activated macrophages from the blood compartment is regulated by chemotactic attraction. In chronic wounds, the inflammatory phase of wound healing is prolonged and often persists. Subsequent phases of wound healing such as the formation of a capillary-rich granulation tissue, a fibroblast-rich restoration tissue, and finally the scar are significantly delayed or do not occur at all.

In een recente studie analyseerde, Theilgaard-Monch et al.³⁴ de veranderingen in het transcriptieprogramma van menselijke neutrofielen in een acute wonde. Zij ontdekten een verhoging (up regulatie) van antiapoptotische genen (apoptose is geprogrammeerde celdood) samengaat met de vermindering (down regulatie) van pro-apoptische genen evenals de inductie van cytokine en chemokine genen typisch voor chemotaxi (via chemische stoffen op afstand cellen aantrekken) van de macrofagen.

Hoewel de verschillen in de samenstelling van ontstekingsinfiltraat in chronische veneuze ulcera zijn beschreven, zijn in het algemeen het aantal ontstekingslymfocyten en granulocyten verhoogd in de chronische wonde wat resulterend in een gestoorde verlenging van de ontstekingsfase die de vereiste verdere stappen in het wond helende proces schaadt.

OXYDATIEVE UITBARSTING VAN ONTSTEKINGSCELLEN

De eerste immuundefensie tegen microbiële besmetting is het vrijmaken van hoge hoeveelheden ROS (vrije zuurstof radicalen) door neutrofielen en macrofagen. Dit type uitbarsting is toe te schrijven aan de activering van het NADPH-Oxidase complex binnen het plasmamembraan. Het geactiveerde complex, na migratie en assemblage van celcomponenten aan het plasmamembraan, oxideert NADPH in NADP⁺, daardoor verminderend de zuurstofhoeveelheid op de extracellulaire membraanoppervlakte.

Voor fagocyten, is de katalytische subeenheid gp91phox geïdentificeerd als deel van de fagocyt oxidase met meerdere componenten (Phox). Deze oxidase is specifiek voor het elektron-schenkende pyridinedinucleotide NADPH en werkt niet goed met NADH. Het systeem wordt geactiveerd in rustende neutrofielen door blootstelling aan bacteriën of

ontstekingsbemiddelaars zoals formyl-methionylleucylphenylalanine. Binnen deze enzym familie zijn zeven leden, met vijf NADPH-Oxidasen (NOX1-5) en twee dubbele oxidasen (DUOX1-2) met een extra peroxidasedomein die beschreven zijn³⁵. De NOX enzymen zijn hoofdzakelijk betrokken in de ontstekingsreactie en bij het signaleren, terwijl de DUOX-enzymen bovendien een rol in oxidatieve wijzigingen van extracellulaire moleculen spelen. Voor de andere familieleden, is een wijdverspreide aanwezigheid (uitdrukking) in verschillende organen waargenomen. Vasculaire endotheelcellen bezitten een gp91phox bloedlichaampje-type NOX die verantwoordelijk is voor de ROS productie in de arteriën.³⁸ De graad van oxidatieschade voorkomend in het mitochondriumDNA (mtDNA) is 10 tot 20 maal hoger dan in het nucleaire DNA.⁴⁰

Er wordt verondersteld (hypothese) door Bandy en Davison dat mitochondriale mutaties zich kunnen blijven herhalen en vermeerderen door de oxidatiestress.⁴¹

De verhoogde totstandkoming van ROS (reactieve zuurstofdeeltjes) via het mitochondriale oxidatieve fosforilatiesysteem onder verschillende omstandigheden werd beschreven.

Complex-I-deficiënte fibroblasten produceren verhoogde hoeveelheden hydroxylradicalen en aldehyden als indicator van vetperoxidatie.⁴²

De behandeling van controle fibroblasten met de complex-I remmer 'rotenone' gaf als resultaat verhoogde metingen betreffende de vorming van superoxide anionen radicalen.⁴³

De verhoogde ROS generatie zal niet alleen leiden tot verdere mtDNA mutaties, maar ook tot een toename van de mitochondriale massa, verder verhogen van de ROS productie per cel⁴⁴, remmen van de mitochondriale aanvoer van proteïnen⁴⁵ en een verstoring met afwijkingen in de mtDNA populatie⁴⁶.

Overeenstemmend met de verminderende "hotspot hypothese" van de Grey⁴⁷ zouden beschadigde mitochondria een selectief voordeel kunnen hebben resulterend in heteroplasmie (*ook heteroformie = vorming van weefsel, dat in bouw afwijkt van dat waaruit het ontstaat*) van de mitochondriale populatie, tenslotte leidend tot cellulaire en weefselonstabiliteit.

ROS-PRODUCTIE DOOR FENTON CHEMIE

IJzer is het meest getransporteerd of transitief metaal in het menselijk lichaam.

Er wordt aangenomen dat Redoxtransport van ijzer via Fenton chemie leidt tot het meest giftig hydroxyl radicaal. Ferro-ijzer wordt geoxideerd door waterstofperoxide tot ferri-ijzer en daardoor ontstaat de hydroxyl radicaal. Hoewel het uiteindelijk bewijs voor het bestaan van deze reactie 'in vivo' nog steeds niet is geleverd en het bestaan van bruikbaar vrij ijzer in de biologische omgeving betwistbaar is, bestaat er zekerheid dat er ijzer vrijkomt tenminste onder condities van verhoogde oxidatiekracht in vitro en bevorderende pro-oxidatieve condities.

Volgens UVA/B bestraling van fibroblasten, wordt ijzer vrijgegeven uit ferritine (*eiwit-ijzercomplex, vorm van oplosbaar ijzer, opgeslagen in lever, milt beenmerg en darm*), waarschijnlijk resulterend in de Fentonreactie.

Het gebruik van ijzerverbindingen en hydroxylradicalenremmers na UVB bestraling, toonde een vermindering van ROS-afhankelijke matrix metalloproteinases en de productie van vetperoxidatieproducten zoals malondiadehyde en 4-hydroxynonenal⁴⁸ aan.

UVA bestraling veroorzaakt de onmiddellijke vrijlating van vrij ijzer via de proteolyse van ferritine⁴⁹. Deze loslating kwam overeen met een duidelijke lekkage van lysosomaal proteases als gevolg van oxidatieschade.

Voor veneuze beenulcera zijn alleen beperkte gegevens betreffende het gehalte vrij ijzer en het voorkomen van Fenton chemie beschikbaar. Veneuze lekkage door

endothelcelbeschadiging kan de oorzaak zijn van het vrijkomen van sereuze vloeistof, waarin proteïnen en erythrocyten, die een grote hoeveelheid hemoglobinegebonden ijzer kunnen bevatten. Hierop volgend kan de vernietiging van rode bloedcellen, hemoglobineloslatting leiden tot een verhoging van vrij en gebonden ijzer binnen in het ulcus.

Wenk et al.³¹ heeft het totale ijzerniveaus in chronische wondafscheidingen gemeten gebruik makend van een atoom absorptie spectroscopie en stelde een viervoudige verhoging vast bij chronisch wondvocht in vergelijking met acuut wondvocht. In een model in vitro werd vastgesteld dat het ijzer bindende desferrioxamine de ijzer gedreven inductie van tussenliggende collagenase onderdrukte en de verhoging van de lipideperoxidatie via malondialdehyde in fibroblasten verminderde. De hoeveelheid vrij ijzer en ijzer in de Fenton reactie die uit beschikbaar ijzer komt was niet te bepalen. In een andere studie van Yeo-Ellerton en Stacey, werden de totale ijzerniveaus gemeten gebruik makende van de ferrozineanalyse en inductief gekoppeld plasma atoomemissie spectrometrie . Er werden geen significante verschillen in het totale ijzerniveaus in verschillende chronische en acute wondvochten vastgesteld²². Niettemin, het positief bevleken van ijzer met Pruisisch blauw in dermis van de ulcusrand en de ulcusbasis (Figuur 2) bevestigde de bevindingen van Ackerman et al³⁰ van hoge niveaus van hemosiderin in veneuze ulcera. Het bestaan van een verhoogde concentratie aan ijzer in het ulcusweefsel in combinatie met verhoogde oxidatieve spanning van ontstekingscellen kan resulteren in verdere permanente weefsel schade.

DE OUDER WORDENDE FIBROBLASTEN KUNNEN BETROKKEN ZIJN IN HET AGRESSIEF MILIEU VAN DE VENEUZE BEEN ULCERA

Hoewel controversieel , is er meer en meer bewijsmateriaal dat replicatieve veroudering (= *cellen die door hun hoge leeftijd niet meer delen of dat veel minder gemakkelijk gaan doen. replicatie of delen*) of minstens cellulair phenotype nagebootste replicatieve veroudering ook kan voorkomen ‘in vivo’ in chronische wonden met een ononderbroken accumulatie van ouder wordende cellen in het weefsels, waar de veranderingen van hun functioneel fenotype zoals over-expressie van matrix-degraderende metalloproteases mogelijks bijdragen tot leeftijd afhankelijke pathologie van het verbindingsweefsel van de huid . Het kennis of de wetenschap dat, ROS betrokken is bij replicatieve veroudering evenals het intrinsieke en extrinsieke verouderen komt uit verscheidene modellen in celbiologie en ook uit natuurlijk voorkomende genetische afwijkingen, en genetisch gemodificeerde organismen.

In deze context, tonen experimenten ‘in vitro’ met fibroblasten aan dat de antioxidant α - phenyl-t-butyl nitron substantieel de overstap naar groei (*niet meer of minder delen*) veroudering wezenlijk vertraagd bij spontaan verouderende fibroblasten. De hypothese dat oxidatief metabolisme , het verouderen proces stuurt, is reeds weerlegd door Harman⁵¹ en is gebaseerd op de berekening dat ongeveer 2% van de opgenomen zuurstof chemisch is gereduceerd in de mitochondria door toevoeging van enkelvoudige elektronen ,welke opeenvolgend in ROS worden omgezet. Daaraan toegevoegd , is de omzetting van de hoeveelheid zuurstof in radicalen overschat door ten minste één grootorde. Niettemin, in de omstandigheden met hoge hoeveelheden ROS, kunnen de cellulaire antioxidatieve capaciteiten overweldigend zijn , resulterend in oxidatieve stress. Dit scenario kan ontstaan als, in chronische wonden, de inflammatoire fase behouden blijft.

Fibroblasten van chronische wonden ondergaan morfologische en functionele veranderingen vergelijkbaar aan cellulaire replicatieve groeistop van oude fibroblasten in vitro. Op het einde

van hun beperkte prolifererende mogelijkheid (*mogelijkheid om zich te delen*), vertonen oude fibroblasten, in vitro, een onomkeerbare stopzetting van de proliferatie in de G1 fase van de celcyclus, samen met de een toename van het cytoplasma. De cel reageert niet meer op de groeifactoren en vertoont veranderingen in de expressie van het patroon van de genen, zoals verhoogde activiteit van collagenase en nieuwe uiting van de met veroudering geassocieerde β -galactosidase.

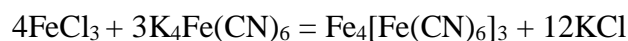
FIGUUR 2. Chronische veneuze ulcus van het onderbeen. Je kan de scherp afgeijnde ulceratie met fibrinebeslag zien. Er is verharde huid rond de ulcus, roodheid en hyperpigmentatie ten gevolge van hemosiderine afzetting. Op de vergroting kan je de basis van het ulcus zien met positieve verkleuring met Pruisisch blauw, wat aanwezigheid van ijzer in het weefsel bevestigt.



(Inductief gekoppeld plasma of ICP (Inductively coupled plasma) ook wel ICP-AES, is een analytische techniek die de element-samenstelling van een monster kan vaststellen.

Bij de icp wordt gebruik gemaakt van licht dat door een atoom, ion of molecuul wordt uitgezonden wanneer hij van een hogere energietoestand naar een lagere energie toestand gaat. Het wordt met behulp van een plasma in een hogere energietoestand gebracht. Dit plasma heeft een temperatuur van 4000-5000 K. Bij ICAP (Inductively Coupled Argon Plasma) wordt m.b.v. het edelgas Argon een plasma gegenereerd dat afhankelijk van de sterkte van het elektromagnetisch veld een temperatuur kan bereiken van 6000-10000 K.

Hemosiderine vormt de opslag van ijzer in het lichaam. Het ijzer is in de ijzerstaat, en kan worden aangetoond door het los temaken van hemosiderin met hydrochloor zuur dat ijzerchloride vormt. Het ijzer reageert met kaliumferrocyanide en vorm ijzerferrocyanide. Dit is een onoplosbare, blauwe samenstelling die als Pruisisch blauw of het Berlin blue (blauw van Berlijn) bekend is. De intensiteit van de kleur geeft een beeld van de hoeveelheid, maar het is slechts kwalitatief. Andere bronnen van ferricijzer zullen ook aangetoond worden.)



De cellen worden ongevoelig voor groeifactoren en vertonen veranderingen in het patroon van de genuitdrukking zoals verhoogde uitdrukking van collagenase en de uitdrukking van de senescence-associated β - galactosidase. (Senescence = veroudering)

De eerste rapporten kwamen van Mendez e.a.⁵³ Deze toonden aan dat wondfibroblasten afgenomen uit een veneus ulcus dezelfde karakteristieken vertoonden als een oude cel. De fibroblasten bevatten met oude cellen geassocieerde β - galactosidase en tonen significant lagere groeipercentages en verhoogde hoeveelheden fibronectine.

De observatie dat de jonge bindweefselcellen grotere hoeveelheden fibronectine aanmaakten, gebaseerd op het mRNA en het eiwitniveau, is tegenstrijdig met eerdere rapporten. Vorige immunohistochemische technieken toonden aan dat het granulatiweefsel in de chronische wonden deficiënt is aan fibronectine, in vergelijking met het omringende normale Dermis⁵⁴. Als aanvulling hierop hebben Herrick e.a.⁵⁵ de samenstelling van fibronectine in vitro gemeten, na het kweken van wondfibroblasten op plastic of in collageengels en detecteerden geen enkel verschil in de samenstelling van fibronectine. Omdat de migratie en de proliferatie van fibroblasten in veneuze ulcera verminderd zijn kan de oorzaak van deze tegenstrijdigheid gezocht worden in het feit dat er verschillende fibroblastenpopulaties kunnen geïsoleerd worden in de ulcera.

Deze uitleg klopt met de recente observatie dat huidfibroblasten die geïsoleerd zijn van verschillende andere lagen van de menselijke huid op een heterogene manier collagenase en collageen uitdrukken.⁵⁶

Verdere ondersteuning voor de hypothese dat minstens een klein deel van de fibroblasten van chronisch veneuze beenulcera de verschijnselen van het ouder worden vertonen, komt van onderzoeksgegevens die aantoonden dat het wondvocht van het veneus ulcus getransformeerd in een neonatale huid fibroblasten resulteerde met een gereduceerde proliferatieve capaciteit van de neonatale fibroblasten.

Deze ontdekking suggereert dat wondvocht van chronisch veneuze ulcera groei activiteit – remmende factoren bevat.⁵⁷

Agren e.a.⁵⁸ toonden aan dat wondfibroblasten enkel beperkt reageerden op PDGF (van de plaatjes afgeleide groeifactor) zonder dat er verschil was tussen de PDGF receptoren (hadden evenveel receptoren expressie) in de gebruikte cellen. In contrast met deze studies, Stephens e.a.⁵⁹ konden de ouder wordende eigenschappen van fibroblasten in chronische wonden niet bevestigen.

De hierboven omschreven tegenstrijdigheid kan ook toegeschreven worden aan (1) de ongekaracteriseerde verschillen en gelijkenissen tussen “echte” replicatieve verouderde fibroblasten, die beperking van de ‘Hayflick’ methode ‘in vitro’ aantonen en (2) het fenotype door stimuli geïnduceerde vroegtijdige veroudering.

Deze stimuli houden in, niet ioniserende straling, hyperbare zuurstof, waterstofperoxide, en andere.⁶¹ Om de rol van de leeftijd van de ouder wordende cellen in veneuze beenulcera te begrijpen is bijkomend onderzoek nodig. Ouder wordende fibroblasten dragen bij tot de ROS productie via intracellulaire vorming van ROS als een reactie op PDGF of transformerende groeifactoren,⁶² evenals door extracellulaire vorming via Rac – 1 – gemedieerde paden, vermoedelijk met de betrokkenheid van verschillende NOX enzymen.³⁵

Verbeterde proteolyse in veneuze beenulcussen

ROS zijn gekend om het selectief beïnvloeden van signaliserende paden (pathways) resulterend in de activatie van transcriptie factoren die de expressie controleren van een verscheidenheid van chemokines, pro-inflammatoire cytokines zoals interleukine – 1 en – 6, tumor necrose factor alfa^{63, 64} en interleukine – 8, en proteolytische enzymen inclusief leden

van serine protease en matrix – metalloproteasen (MMP) families met MMP – 8 als het meest prominent lid.⁶⁶⁻⁷⁰

In feite wordt de enorme impact van de conditie van het micro-milieu op het resultaat van wondheling meer en meer duidelijk.

Verskillende uitvoerige studies tonen dat de proteolytische activiteit of MMP's en serine proteasen significant verhoogd zijn in chronische wonden,^{31, 66, 71-78} aldus bijdragend tot de degradatie van de extracellulaire matrix,⁷¹ groeifactoren,⁷⁹⁻⁸¹ en mogelijk ook hun receptoren. Verbeterde uitdrukkingen van EMMPRIN / CD 147, dit is de extracellulaire MMP inductor, en ook de verbeterde uitdrukking van de membraan-verbindend membraan type 1 (MT1) – MMP en MT 2 MMP zijn gedetecteerd in biopten van het wondweefsel van veneuze beenulcera, suggererend dat geremde activiteit van inductoren van MMPs en MT-MMP's iets te maken kunnen hebben met de verhoogde turnover van de extra cellulaire matrix in chronische beenwonden.⁸²

De tegenwerkende (counteracting) weefsel inhibitoren of metalloproteases (TIMP) zijn gevoelig om geïnactiveerd te worden door oxidatiemiddelen. Daarbij veranderen ze de proteolytische balans naar degradatie van het wondweefsel.⁸³

De uitdrukkningsniveaus (het voorkomen) van TIMP -1 zijn verminderd in chronisch wondvocht.⁶⁷ In tegenstelling tot deze onderzoeksgegevens van wondvocht, zijn er in geïsoleerde chronische wondfibroblasten verhoogde hoeveelheden van TIMP -1 en -2 geobserveerd in vitro.⁸⁴

Wegens de ontbrekende inflammatoire cellen in de in vitro studies, kan het geobserveerde uitdrukkningspatroon van TIMP 's verschillend zijn in vivo. In de regulatie van MMP's en TIMPs is, oxidatieve stress betrokken in verschillende door signalen gestuurde processen.^{48,85-90} MMP uitdrukking kan verhoogd worden in fibroblasten die blootgesteld zijn aan een atoom zuurstof,⁹¹ waterstofperoxide⁸⁷ via de ijzer afhankelijke Fenton reactie opgewekte hydroxyl radicalen,⁴⁸ of door de slechte verdediging van het antioxidatiesysteem.⁸⁶

Terwijl de pro-inflammatoire cytokines op zijn minst gedeeltelijk leucocyt apoptosis onderdrukken en de uitdrukking van adhesie moleculen verhoogt, dus de algemene ontsteking verhoogt, draagt serine protease, zoals neutrofielen elastase, macrofagen elastase, cathepsines en MMPs, wezenlijk bij tot de degradatie (afbraak) van onlangs samengestelde extracellulaire matrix proteïnen,⁷⁷ groeifactoren⁷⁹⁻⁸¹ en inhibitoren van beide serine proteasen en MMPs.⁷³⁻⁷⁴ Serine proteasen, zoals neutrofiel en macrofagen elastase die ontstaan door ROS, kunnen verschillende MMPs activeren.⁹²

In toevoeging, ten minste in vitro, zijn direct denaturerende gevolgen van hydroxyl radicalen⁹³, hypochloorzuur, en Nitro chloramines,⁹⁴ producten van neutrofielen / macrofagen, op collageen beschreven.

Conclusie

Door de beperkingen inzake methodologie en de complexe biochemie van oxidatieve stress in vivo, zijn er nog veel vragen met betrekking tot de rol van oxidatieve stress in de pathofysiologie van chronische veneuze ulcera onbeantwoord. Er is bewijs uit zowel studies in vitro als in vivo dat ROS een prominente rol speelt in het verstoren van de oxidant/antioxidant balans in de agressieve micro-omgeving aanwezig bij chronische veneuze ulcera.

Samenvattend kan men stellen dat er voldoende bewijs is dat ROS betrokken zijn in diverse niveaus in de pathogenese en de pathofysiologie van chronische veneuze ulcera.

Referenties

1. Marklund B, Sulau T, Lindholm C. Prevalence of non-healed and healed chronic leg ulcers in an elderly rural population. *Scand J Prim Health Care* 2000;18:58-60.
2. Ruckley CV. Socio-economic impact of chronic venous insufficiency and leg ulcers. *Angiology* 1997;48:67-9.
3. Kosmadald MG, Gilchrest BA. The demographics of aging in the venous leg ulcers. United States: implications for dermatology. *Arch Dermatol* 2002;138:1427-8.
4. Oeppen J, Vaupel JW. Demography. Broken limits to life expectancy. *Science* 2002;296:1029-31.
5. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. New York: Academic Press, 1991.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999.
7. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47-95.
8. S. Forman HJ, Torres M, Fukuto J. Redox signaling. *Mol Cell Biochem* 2002;235:49-62.
9. Meier B. Superoxide generation of phagocytes and nonphagocytic cells. *Protoplasma*, 2001;217:117-24.
10. Peschen M, Lahaye T, Hennig B, Weyl A, Simon JC, Vanscheidt W. Expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, LFA-I and VLA-4 in the skin is modulated in progressing stages of chronic venous insufficiency. *Acta Derm Venereol* 1999;79:27-32.
11. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEI-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989;245:1238-41.
12. Rosner K, Ross C, Karlsmark T, Skovgaard GL. Role of LFA-I/ICAM-1, CLA/E-selectin and VLA-4/NCAM-1 pathways in recruiting leukocytes to the various regions of the chronic leg ulcer. *Acta Derm Venereol* 2001;81:334-9.
13. Whiston RJ, Hallett MB, Davies EV, Harding KG, Lane IF. Inappropriate neutrophil activation in venous disease. *Br J Surg* 1994;81:695-8.
14. Weyl A, Vanscheidt W, Weiss JM, Peschen M, Schopf E, Simon J. Expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-I, and E-selectin and their ligands VLA-4 and LFA-I in chronic venous leg ulcers. *J Am Acad Dermatol* 1996;34:418-23.
15. Grether-Beck S, Olaizola-Horn S, Schriitt H, Grewe M, Jahnke A, Johnson JP, Briviba K, Sies H, Krutmann J. Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14586-91.
16. O'Toole EA, Goel M, Woodley DT. Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration. *Dermatol Surg* 1996;22:525-9.
17. Abd-El-Aleem SA, Ferguson MW, Appleton I, Kairsingh S, Jude EB, Jones K, McCollum CN, Ireland GW. Expression of nitric oxide synthase isoforms and arginase in normal human skin and chronic venous leg ulcers. *J Pathol* 2000;191:434-42.
18. Schaffer MR, Efron PA, Thornton FJ, Klingel K, Gross SS, Barbul A. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immunol* 1999;158:2375-81.
19. Weller R. Nitric oxide: a key mediator in cutaneous physiology. *Clin Exp Dermatol* 2003;28:511-4.
20. Sen CK, Khanna S, Gordillo G, Bagchi D, Bagchi M, Roy S. Oxygen, oxidants, and antioxidants in wound healing: an emerging paradigm. *Aim N Y Acad Sci* 2002;957:239-49.
21. James TJ, Hughes MA, Cheriya GW, Taylor RP. Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Rep Reg* 2003; 11: 1724.
22. Yeoh-Ellerton S, Stacey MC. Iron and 8-isoprostane levels in acute and chronic wounds. *J Invest Dermatol* 2003;121:918-25.
23. Shulda A, Rasik AM, Patnaik GK. Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defense enzymes in a healing cutaneous wound. *Free Radic Res* 1997;26:93-101.
24. Rasik AM, Shulda A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int J Exp Pathol* 2000;81:257-63.
25. Rojas AI, Philips TJ. Patients with chronic leg ulcers show diminished levels of vitamins A and E, carotenes, and zinc. *Dermatol Surg* 1999;25:601-4.
26. Agren MS, Stromberg HE, Rindby A, Hallmans G. Selenium, zinc, iron and copper levels in serum of patients with arterial and venous leg ulcers. *Acta Derm Venereol* 1986;66:237-40.
27. Edwards AT, Herrick SE, Suarez-Mendez VJ, McCollum CN. Oxidants, antioxidants and venous ulceration. *Br J Surg* 1992;79:443. [abstract].
28. Steiling H, Munz B, Werner S, Brauchle M. Different types of ROS scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res* 1999;247:484-94.
29. Rosner K, Ross C, Karlsmark T, Petersen AA, Gottrup F, Vejlsgaard GL. Immunohistochemical characterization of the cutaneous cellular infiltrate in different areas of chronic leg ulcers. *APMIS* 1995;103:293-9.
30. Ackerman Z, Seidenbaum M, Loewenthal E, Rubinow A. Overload of iron in the skin of patients with varicose ulcers. Possible contributing role of iron accumulation in progression of the disease. *Arch Dermatol* 1988;124:1376-8.
31. Wenk J, Foitzik A, Achterberg V, Sabiwalskiy A, Dissemond J, Meewes C, Reitz A, Brenneisen P, Wlaschek M, Meyer-Ingold W, Scharffetter-Kochanek K. Selective pick-up of increased iron by deferoxamine coupled cellulose abrogates the iron-driven induction of matrix-degrading metalloproteinase-I (MMP-1) and Lipid and MEI-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic peroxidation in human dermal fibroblasts in vitro-a new dressing concept. *J Invest Dermatol* 2001;116:833-9.
32. Loots MA, Larmne M, Zeegelaar J, Mekkes JR, Bos JJ, Middelkoop E. Differences in cellular infiltrate and extracellular matrix of chronic diabetic and venous ulcers versus acute wounds. *J Invest Dermatol* 1998;111:850-7.
33. Moore K, Ruge F, Harding KG. T lymphocytes and the lack of activated macrophages in wound margin biopsies from chronic leg ulcers. *Br J Dermatol* 1997;137:1884-4.
34. Theilgaard-M6nch K, Knudsen S, Folin P, Borregerd N. The transcriptional activation program of human neutrophils in skin lesions supports their important role in wound healing. *J Immunol* 2004;172:7684-93.
35. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 2004;4:181-9.
36. Goralach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 2000;87:26-32.
37. Jones SA, Wood JD, Coffey MJ, Jones OTG. The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts. *FEBS Lett* 1994;355:178-82.
38. Abd-El-Aleem SA, Ferguson MW, Appleton I, Bhowmick A, McCollum CN, Ireland GW. Expression of cyclooxygenase isoforms in normal human skin and chronic venous ulcers. *J Pathol* 2001;95:616-23.
39. Paradies G, Petrosillo G, Pistolesi M, Ruggiero FM. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* 2002;286:135-41.
40. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000;29:222-30.
41. Bandy B, Davison AJ. Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med* 1990;8:523-39.
42. Luo X, Pitkanen S, Kassovska-Bratinova S, Robinson BH, Lehotay DC. Excessive formation of hydroxyl radicals and aldehydic lipid

- peroxidation Products in cultured skin fibroblasts from patients with complex I deficiency. *J Clin Invest* 1997;99:2877-82.
43. Pitkanen S, Robinson 1311. Mitochondrial complex, I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest* 1996;98:345-51.
 44. Lee HC, Yin PH, Chi CW, Wei YH. Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J Biomed Sci* 2002;9:517-26.
 45. Wright G, Terada K, Yano M, Sergeev I, Mori M. Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation. *Exp Cell Res* 2001;263:107-17.
 46. Diaz F, Bayona-Bafaluy MP, Rana M, Mora M, Hao H, Moraes CT. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucl Acids Res* 2002;30:4626-33.
 47. de Grey AD. The reductive hotspot hypothesis of mammalian aging: membrane metabolism magnifies mutant mitochondrial mischief. *Eur J Biochem* 2002;269:2003-9.
 48. Brenneisen P, Wenk J, Klotz OL, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP) -1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 1998;273:5279-87.
 49. Pourzand C, Watkin RD, Brown JE, Tyrrell RM. Ultraviolet A radiation induces immediate release of iron in human primary skin fibroblasts. the role of ferritin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6751-6.
 50. Campisi J. Replicative senescence: An old lives tale? *Cell* 1996;84:497-500.
 51. Harman D. Aging. A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956;11:298-300.
 52. Fridovich I. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell* 2004;3:13-6.
 53. Mendez MV, Stanley A, Park HY, Shon K, Phillips T, Menzoian JO. Fibroblasts cultured from venous ulcers display cellular characteristics of senescence. *J Vasc Surg* 1998;28:876-83.
 54. 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;141:1085-95.
 55. Herrick SE, Ireland GW, Simon D, McCollum CN, Ferguson MW. Venous ulcer fibroblasts compared with normal fibroblasts show differences in collagen but not fibronectin production under both non-nal and hypoxic conditions. *J Invest Dermatol* 1996;106: 187-93.
 56. Ali-Bahar M, Bauer B, Tredget EE, Ghahary A. Dermal fibroblasts from different layers of human skin are heterogeneous in expression of collagenase and types I and III procollagen mRNA. *Wound Rep Reg* 2004;12:17542.
 57. Mendez MV, Raffetto JD, Phillips T, Menzoian JO, Park HY. The proliferative capacity of neonatal skin fibroblasts is reduced after exposure to venous ulcer wound fluid: a potential mechanism for senescence in venous ulcers. *J Vasc Surg* 1999;30: 734-43.
 58. Agren MS, Steenfos HH, Dabelsteen S, Hansen JB, Dabelsteen E. Proliferation and mitogenic response to PDGF-BB of fibroblasts isolated from chronic venous leg ulcers is ulcer-age dependent. *J Invest Dermatol* 1999;112:463-9.
 59. Stephens P, Cook H, Hilton J, Jones CJ, Houghton MF, Wyllie FS, Skinner JW, Harding KG, Kipling D, Thomas DW. An analysis of replicative senescence in dermal fibroblasts derived from chronic leg wounds predicts that telomerase therapy would fail to reverse their disease-specific cellular and proteolytic phenotype. *Exp Cell Res* 2003;283:22-35.
 60. Wlaschek M, Ma W, Jansen-Durr P, Scharffetter-Kochanek K. Photoaging as a consequence of natural and therapeutic ultraviolet irradiation-studies on PUVA-induced senescence-like growth arrest of human dermal fibroblasts. *Exp Gerontol* 2003;38: 1265-70.
 61. Toussaint O, Medrano EE, von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 2000;35:927-45.
 62. Berg C, Trofast C, Bengtsson T. Platelets induce reactive oxygen species-dependent growth of human skin fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 2003;82:565-71.
 63. Tarmizzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Rep Reg* 1996;4:321-5.
 64. Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Rep Reg* 2000;8:13-25.
 65. Senet P, Bon FX, Benbunan M, Bussel A, Traineau R, Calve, F, Dubertret L, Dosquet C. Randomized trial and local biological effect of autologous platelets used as adjuvant therapy for chronic venous leg ulcers. *J Vasc Surg* 2003;38:1342-8.
 66. Agren MS, Eaglstein WH, Ferguson MW, Harding KG, Moore K, Saarialho-Kere UK, Schultz GS. Causes and effects of the chronic inflammation in venous leg ulcers. *Acta Derm Venereol (Suppl) (Stockholm)* 2000;210:3-17.
 67. Bullen EC, Longaker MT, Updike DL, Benton R, Ladin D, Hou Z, Howard EW. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 1995;104:236-40.
 68. Nwomeh BC, Liang HX, Cohen IK, Yager DR. MMP-8 is the predominant collagenase in healing wounds and nonhealing ulcers. *J Surg Res* 1999;81:189-95.
 69. Ravand L, Kähäri VM. Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *Int J Mol Med* 2000;6:391-407.
 70. Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Rep Reg* 1999;7:442-8.
 71. 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;98:410-6.
 72. Wysocki AB, Staiano-Koiko L, Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels. of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 1993;101:64-8.
 73. Rao CN, Ladin DA, Liu YY, Chilukuri K, Hou ZZ, Woodley DT. Alpha I-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;105:572-8.
 74. Grinnell F, Zhu M. Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. *J Invest Dermatol* 1996;106:335-41.
 75. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Rep Reg* 1996;4:411-20.
 76. Weckroth M, Vaheri A, Lauharanta J, Sorsa T, Kontinen YT. ,P.: Matrix metalloproteinases, gelatinase and collagenase, in chronic leg ulcers. *J Invest Dermatol* 1996;106:1119-24.
 77. Herrick S, Ashcroft G, Ireland G, Horan M, McCollum C, Ferguson M. Up-regulation of elastase in acute wounds of healthy aged humans and chronic venous leg ulcers are associated with matrix degradation. *Lab Invest* 1997;77:281-8.
 78. Saarialho-Kere UK. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP expression in chronic ulcers. *Arch Dermatol Res* 1998;290:S47-54.
 79. Wlaschek M, Pens D, Achterberg V, Meyer-Ingold W, Scharffetter-Kochanek K. Protease inhibitors protect growth factor activity in chronic wounds. *Br J Dermatol* 1997;137:646. [Letter].
 80. Yager D, Chen SM, Ward SI, Olutoye OO, Diegelmann RF, Cohen IK. 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 Rep Reg* 1997;5:23-32.
 81. Lauer G, Sollberg S, Cole M, Haase I, Sturzebecher J, Mann K, Krieg T, Eming S. Expression and proteolysis of vascular endothelial

- growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 2000;115:12-8.
82. Norgauer J, Hildenbrand T, Idzko M, Panther E, Bandemir E, Hartmann M, Vanscheidt W, Herouy Y. Elevated expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) and membrane-type matrix metalloproteinases in venous leg ulcers. *Br J Dermatol*. 2002;147:1180-6.
 83. Stricklin GP, Hoidal JR. Oxidant-mediated inactivation of TIMP. *Matrix Suppl* 1992;1:325.
 84. Cook H, Davies KJ, Harding KG, Thomas DW. Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 2000;115:225-33.
 85. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C53-60.
 86. Wenk J, Brenneisen P, Wlaschek M, Poswig A, Briviba K, Oberley TD, Scharffetter-Kochanek K. Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1 mediated induction of matrix-metalloprotease-1/MMP-1. *J Biol Chem* 1999;274:25869-76.
 87. Brenneisen P, Briviba K, Wlaschek M, Wenk J, Scharffetter-Kochanek K. Hydrogen peroxide (H₂O₂) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 1997;22:515-24.
 88. Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, Schieffer B. Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD (P) H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res* 2003;92:e80-6.
 89. Weiss SJ, Peppin G, Ortiz X, Ragsdale C, Test ST. Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils. *Science* 1985;227:747-9.
 90. Ranganathan AC, Nelson KK, Rodriguez AM, Kim KH, Tower GB, Rutter JL, Brinckerhoff CE, Huang TT, Epstein CJ, Jeffrey JJ, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H₂O₂-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2001;276:14264-70.
 91. Wlaschek M, Wenk J, Brenneisen P, Briviba K, Schwarz A, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro. *FEBS Lett* 1997;413:239-42.
 92. Doring G. The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:S114-7.
 93. Arisawa S, Arisawa T, Ohashi M, Nitta Y, Ikeya T, Asai J. Effect of the hydroxyl radical on fibroblast-mediated collagen remodelling in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23:222-8.
 94. Davies JM, Horwitz DA, Davies KJ. Potential roles of hypochlorous acid and N-chloroamines in collagen breakdown by phagocytic cells in synovitis. *Free Radic Biol Med* 1993;15:637-43.