

Ontwikkeling van een *in vitro*- BRANDWONDMODEL

Marcel Vlig¹, Neeltje A Coolen^{1,2}, Kelly CWM Schouten¹,
Esther Middelkoop^{1,2} en Magda MW Ulrich^{1,2}

¹ Vereniging Samenwerkende Brandwondencentra Nederland, postbus 1015, 1941 EA Beverwijk

² Afdeling Plastische, Reconstructieve en Handchirurgie, Vrije Universiteit Amsterdam

Inleiding

Hoewel veel vooruitgang is geboekt bij de behandeling van diepe brandwonden, genezen deze nog steeds met ernstige hypertrofe littekens (sterke opzwellen van de huid). In het onderzoek naar wondgenezing en voor de ontwikkeling van betere behandeltechnieken wordt gebruik gemaakt van experimentele modellen. Door gebruik te maken van huid- en wondmodellen, kan de genezing in detail worden bestudeerd en kunnen op verschillende tijdstippen interventies worden toegepast. Zo bieden deze modellen de mogelijkheid nieuwe farmaca te testen. Er zijn verschillende modellen, zowel *in vivo* als *in vitro* (1-3).

In vivo-studies worden zowel in dier als mens (1-4) uitgevoerd, maar hebben belangrijke nadelen. Het gebruik van humane modellen is, naast de ethische bezwaren, beperkt door de hoge genetische variatie en de beperkte beschikbaarheid. Daarom wordt er vaak gebruik gemaakt van proefdieren, zoals muizen, ratten en varkens, om wondgenezing te bestuderen (1,3,5,6). Muizen en ratten hebben als voordeel dat er veel dieren en variaties bestudeerd kunnen worden; ze zijn eenvoudig te huisvesten en goed hanteerbaar. De genetische variatie wordt beperkt door het gebruik van inteeltstammen en ze kunnen genetisch gemodificeerd worden. Een belangrijk nadeel is echter dat de wondgenezing voornamelijk via wondcontractie verloopt en minder via weefselregeneratie.

hypertrofe littekens: sterke opzwellen van de huid

Het varkensmodel laat qua wondgenezing meer overeenkomsten zien met de mens. Dit diermodel kent echter ook nadelen: het Yorkshire-varken, de meest gebruikte soort, vormt geen hypertrofe littekens. Het Red Duroc-varken ontwikkelt deze wel, maar dit dier wordt nog maar zeer weinig gebruikt voor studies naar de vorming van hypertrofe littekens (7). Bovendien zijn de kosten hoog en kunnen er meestal maar weinig dieren gehuisvest worden.

Een *in vitro*-model kent deze beperkingen niet en is sneller, goedkoper, beter te

controleren en te manipuleren. Daarnaast kent een *in vitro*-model minder ethische bezwaren dan een *in vivo*-model (8). Er zijn simpele *in vitro*-modellen die vaak bestaan uit één laag huidcellen (monolayer): keratinocyten (opperhuidcellen) van de opperhuid (epidermis) of fibroblasten (bindweefselcellen) uit de dermis (lederhuid) (9,10). Deze (twee-dimensionale) modellen worden gebruikt voor cytotoxiciteit-, migratie- en proliferatietesten.

Er zijn ook driedimensionale modellen, bestaande uit een matrix met fibroblasten al dan niet in combinatie met een epidermis (11). Deze modellen zijn complexer maar bieden meer mogelijkheden. Met deze modellen kan men behalve contractie, eiwitsynthese en celdeling ook de interactie tussen celtypen bestuderen. Daarnaast is het mogelijk op modellen met een epidermis, de uitgroei van de epidermis te bestuderen na verwonding (12, 13). Het belangrijkste nadeel van deze modellen is dat systemische factoren, zoals de ontstekingscomponent, ontbreekt. Bovendien blijven deze modellen vaak beperkt tot twee celtypen en bestaat de matrix vaak uit een rattenstaart-collageengel of een andere artificiële matrix. Ondanks deze nadelen, kunnen deze modellen goed gebruikt worden om in detail te kijken naar de effecten op individuele cellen.

Het doel van deze studie is een *in vitro*-wondmodel te verbeteren.

Hiervoor hebben we een *ex vivo*-derdegraads brandwondmodel ontwikkeld dat gebaseerd is op het *in vitro* kweken van humane huid. Alle eigenschappen van de huid zijn in dit model vertegenwoordigd: behalve fibroblasten en keratinocyten ook endotheelcellen en gladde spiercellen (als complete vaatstructuur) en Langerhanscellen. De matrix bestaat uit normale huid met alle extracellulaire matrix-eiwitten en andere componenten.

Om te onderzoeken of het kweken van huid geen nadelige gevolgen heeft op de huidcellen is na 21 dagen kweek de viabiliteit van de niet-verwonde huid bestudeerd en vergeleken met ongekweekte huid. Het genezingsproces is gedurende 21 dagen gevolgd en verschillende parameters, zoals reëpithelialisatie, celdifferentiatie en migratie zijn met histochemische en immunohistochemische analyses bestudeerd. Om te onderzoeken of dit model uitgebreid kan worden met andere factoren hebben we een bacteriële infectie gesimuleerd door lipopolysaccharide (LPS) van *Pseudomonas aeruginosa* toe te voegen.

Materiaal en Methode

Brandwondmodel

De gebruikte gezonde huid was afkomstig van zes humane donoren die een buikwandcorrectie (abdominale dermolipectomie) ondergingen. Alle donoren gaven hier mondeling toestemming voor. Van deze huid werd met behulp van een dermatoom (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Duitsland) een 0.5 mm

dikke Split-thickness skin graft afgenomen, deze werd in vierkantjes van 1 cm² grootte gesneden en in een petrischaal gelegd.

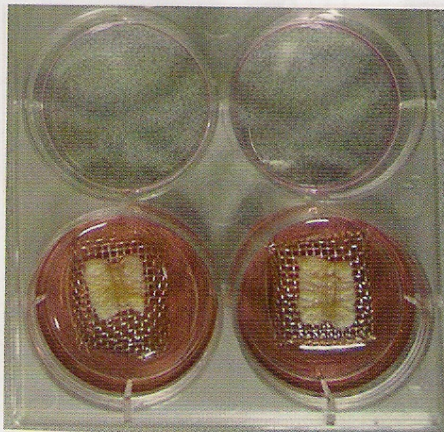
Binnen 24 uur na donatie van de huid werden brandwonden aangebracht met een regelbare soldeerbout (HQ, Niehoff, Denekamp, Nederland) waar een koperen plaatje (2x10 mm) aan bevestigd was (Afb. 1). De temperatuur van de soldeerbout werd gemeten met een thermometer (K-type, Farnell In One, Utrecht, Nederland). Bij een temperatuur van 95°C werd het koperen plaatje 10 seconden op de huid geplaatst, zonder het uitvoeren van druk. Vervolgens werden de verbrande stukjes huid op een roestvrij stalen raster in een 6-wellsplaat gelegd. De wells werden zo gevuld dat de huid met de onderzijde (lederhuid) in contact stond met het kweekmedium en de bovenzijde (opperhuid) aan de lucht was blootgesteld (Afb. 2). Zo ontstond een natuurlijke situatie. Het kweekmedium (voor ingrediënten zie Tabel 1) werd tweemaal per week vervangen. Per donor

component	producent
Dulbecco's Modified Eagle's Medium/ Ham's F12 (3:1)	Invitrogen, Paisley, UK
2% fetal calf serum	Hyclone, Logan, UT
1 mM hydrocortisone	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
1 mM isoproterenol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
0,1 mM insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
1,0 x 10 ⁻⁵ M L-carnitine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
1,0 x 10 ⁻² M L-serine	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
1 mM DL- α -tocopherol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
130 mg/mL ascorbic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
lipid supplement (25 mM palmitic acid, 15 mM linoleic acid, 7 mM arachidonic acid, and 24 mM bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin	Invitrogen, Paisley, UK



Afbeelding 1. Voor het maken van de brandwond wordt een soldeerbout gebruikt met een koperen plaatje. De temperatuur van dit plaatje kan worden afgelezen met behulp van een thermometer.

Tabel 1. Bestanddelen van het medium voor het brandwondmodel.



werden tien stukjes huid, vijf tijdstippen in duplo, ingezet. Op dag 0 (direct na verbranding) en 1, 7, 14 en 21 dagen na kweek werden de stukjes huid verwerkt voor (immuno-) histochemie.

Afbeelding 2. Na het maken van de wond wordt de huid op een metalen raster gelegd en in een 6-wellsplaat gezet. Vervolgens wordt de well gevuld met kweekmedium tot de onderzijde van de huid in contact staat met het medium.

Histologie

De monsters werden door midden gesneden (haaks op de brandwond), gefixeerd in 4% formaline en ingebed in paraffine. Vervolgens werden 4 µm coupes gesneden voor hematoxilline en eosine (HE) kleuring en (immuno-) histochemische kleuringen. Als controle werden bipten van normale gezonde huid direct gefixeerd in 4% formaline.

Met digitale beeldanalyse (NIS-ELEMENTS, NIKON) werd de uitgroei van de epidermis gemeten als maat voor wondgenezing.

Viabiliteitsassay

De aanwezigheid van RNA werd bepaald om de viabiliteit van de keratinocyten en fibroblasten te analyseren. Hiervoor werden 4 µm coupes gekleurd met 0.1% Pyronine Y (Sigma-Aldrich) in 0.2 M sodium acetate buffer pH 4.

Immunohistochemie

Kleuringen werden uitgevoerd voor Heat Shock Protein 47 (Hsp47, Stressgen, Victoria, Canada). Hsp47 kleurt alleen de viabele fibroblasten in de dermis (14). Het fungeert als een chaperone-eiwit tijdens biosynthese en de secretie van pro-collageen en is aanwezig in fibroblasten (15).

Coupes werden geïncubeerd met antilichaam tegen Hsp 47 (verdunding 1:100), en daarna geïncubeerd met konijn-anti-muis biotine (DAKO). De coupes werden vervolgens gekleurd door eerst te incuberen met AB-Complex (DAKO), waarna de kleuring zichtbaar werd gemaakt met 3,3'-diaminobenzidine substraat (DAB, DAKO). Dit leverde een bruine neerslag op de plaats van de kleuring. De coupes werden vervolgens gekleurd met hematoxilline, ontwaterd en ingesloten.

Celdeling in het wondmodel

Om te bepalen of zich delende cellen in het wondmodel bevonden werd er, 24 uur voor het stoppen op een tijdstip, bromodeoxyuridine (BrdU) toegevoegd. BrdU wordt ingebouwd in het DNA van delende cellen. Vervolgens kan BrdU met immunohistochemie worden aangetoond. Coupes van 4 µm dik werden geparaffineerd, gerehydrateerd en behandeld met pepsine (0.25%, Sigma-Aldrich) gedurende 15 min bij 37°C. Het cellulaire DNA werd gedeneureerd in 2 M HCl gedurende 30 min en geneutraliseerd in 0.1 M Borax (Sigma-Aldrich). De coupes werden vervolgens geïncubeerd met een monoklonaal anti-BrdU antilichaam (MP Biomedicals, Illkirch, France) en de kleuring werd verder afgerond zoals beschreven staat bij immunohistochemie.

Invloed van lipopolysaccharide (LPS) op het brandwondmodel

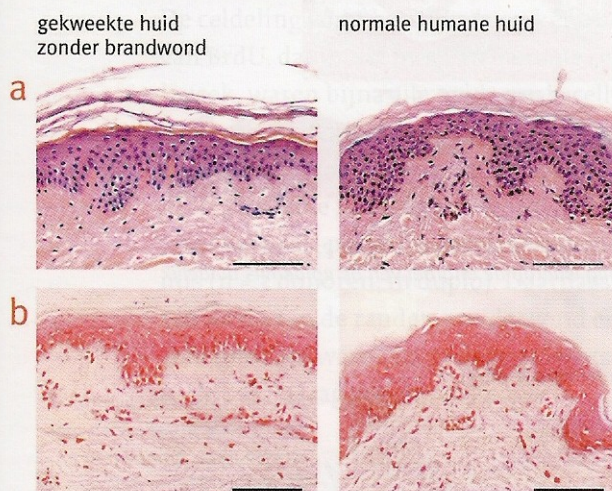
Om te kijken of het wondmodel beïnvloed kon worden, werd een nieuw experiment ingezet (n = 5 donoren, in viervoud) met of zonder LPS van *Pseudomonas aeruginosa* (Sigma-Aldrich). Direct na verbranding werd 10 µL (20ng/ml) LPS op

de wond aangebracht, bij de controle werd 10 μ L PBS aangebracht. De modellen werden vervolgens ook 21 dagen in kweek gehouden en vervolgens gefixeerd in 4% formaline.

Statistische analyse

Alle data wordt weergegeven als de mediaan van ten minste drie experimenten die in duplo werden uitgevoerd. Significantie werd berekend met behulp van de Wilcoxon Signed Rank test, waarbij p -waarden van < 0.05 als significant werden beschouwd.

Resultaten



Afbeelding 3. HE-kleuring van de gekweekte huid zonder brandwond na 21 dagen kweek en normale humane huid (a). De aankleuring van RNA (b) laat zien dat na 21 dagen kweek (links) nog steeds levende cellen aanwezig zijn in de ongebrande huid, rechts ter controle normale humane huid.

Validiteitsassay

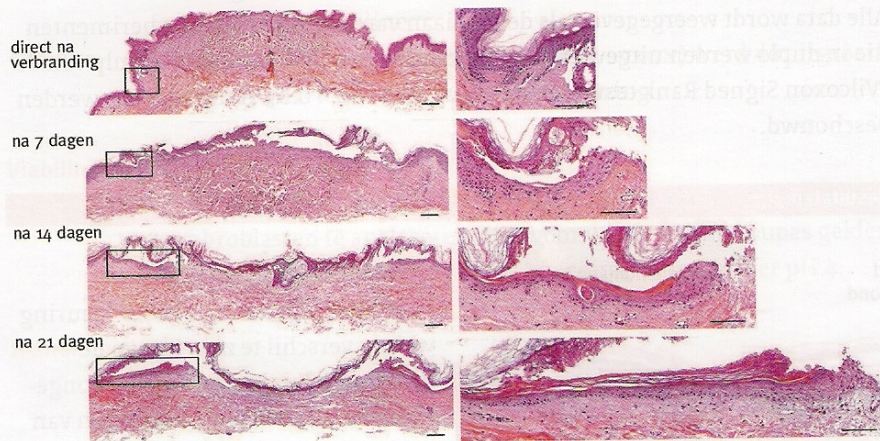
In afbeelding 3a is met de HE-kleuring weinig verschil te zien tussen de gekweekte huid na 21 dagen en onge-kweekte controlehuid. Alle lagen van de epidermis zijn zichtbaar en er zijn geen aanwijzingen voor degradatie van de epidermis. Het enige verschil is dat de bovenste laag van de epidermis (*stratum corneum*) meer lagen telt in vergelijking met de controlehuid. Ook het resultaat van de RNA-kleuring (Afb. 3b) laat geen verschil zien tussen de gekweekte huid na 21 dagen kweek en de controlehuid.

Histologie van de brandwond

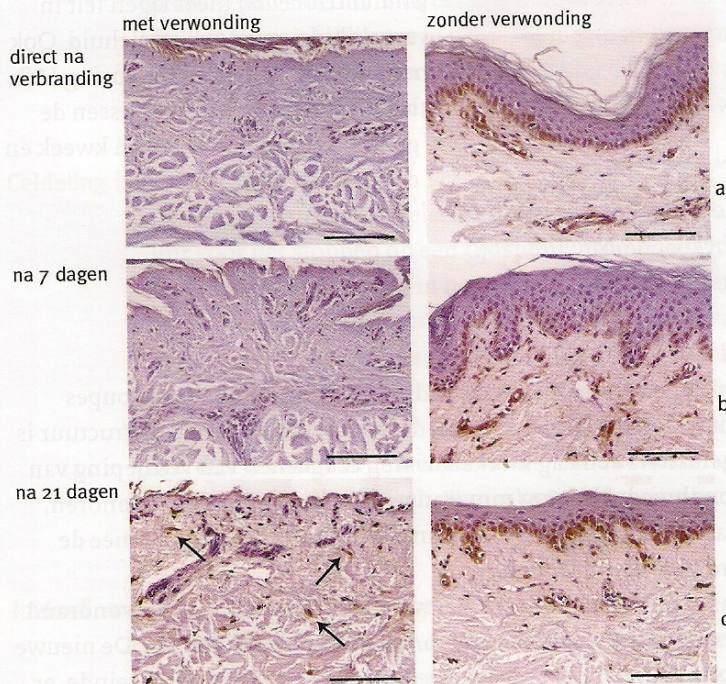
Het wondgebied dat ontstaat door verbranding is zichtbaar op de HE-coupees (Afb. 4). De epidermis heeft losgelaten van de dermis en de collageenstructuur is behoorlijk aangetast. Na een dag kweken, waren er tekenen van verdieping van de wond. De wondbreedte is 3,872 mm (range 3,417-3,957 mm, $n = 3$ donoren, in duplo), dit was bijna twee keer groter dan het koperen plaatje waarmee de brandwond werd gemaakt (2,000 mm).

Na een week was zichtbaar dat de uitgroei van de epidermis vanaf de wondrand was begonnen en dat deze naar het midden van de wond trok (Afb. 4). De nieuwe epidermis bestond uit verschillende lagen en was afgerond aan het uiteinde, er waren geen differentiërende keratinocyten zichtbaar (Afb. 4, vergroting). Na

zeven dagen was 28% (range 16-34%, n = 4 donoren, in duplo) van het oorspronkelijke wondgebied gesloten; na 14 dagen was het 39% (range 33-41%, n = 5 donoren, in duplo) en na 21 dagen 52% (range 43-55%, n = 5 donoren, in duplo).



Afbeelding 4. HE-kleuring van de brandwond direct na verbranding en na 7, 14 en 21 dagen kweek (schaal is 200 μm). De rechter foto is een uitvergroting waarop de uitgroei van de epidermis duidelijk zichtbaar is (schaal is 100 μm).



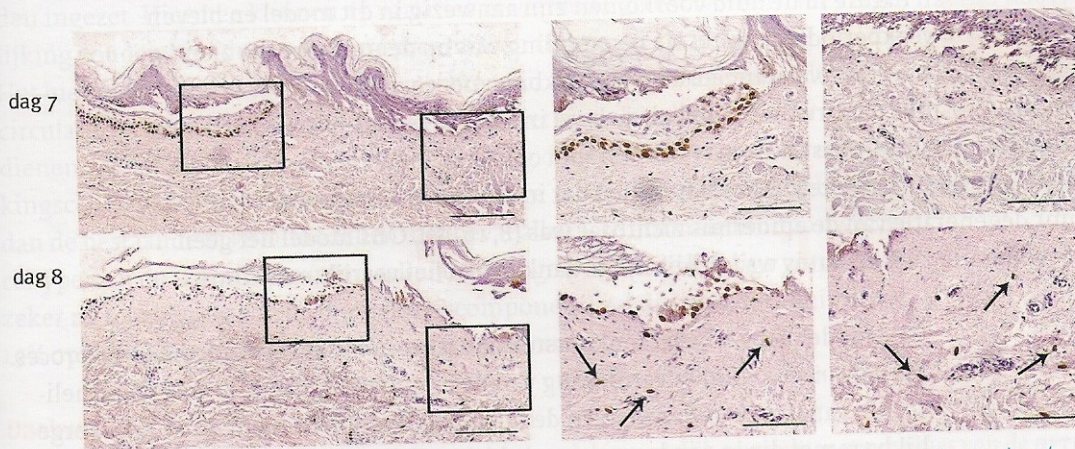
Afbeelding 5. Aankleuring van viabele fibroblasten met Hsp 47 in de brandwond en de niet-verwonde deel van de huid. Direct na verbranding (a) is er geen Hsp47 in de wond zichtbaar, na zeven dagen (b) evenmin, maar na 21 dagen (c) zijn er wel viabele fibroblasten in het wondgebied (Schaal is 100 μm).

Aanwezigheid van fibroblasten in het wondgebied

Om fibroblasten in het wondgebied aan te tonen, werden de coupes gekleurd voor Heat Shock Protein 47 (Hsp47). In de niet-verwonde huid waren levende fibroblasten zichtbaar, dit was echter niet het geval in het wondgebied direct na het aanbrengen van de brandwond (Afb. 5a, n = 3 donoren, in duplo). Na zeven dagen kweek was deze situatie niet veranderd (Afb. 5b, n = 4 donoren, in duplo), maar op dag 14 waren er enkele positieve fibroblasten zichtbaar aan de randen van het wondgebied (niet weergegeven). Na 21 dagen kweek waren er duidelijk Hsp47 positieve cellen aanwezig in het hele wondgebied (Afb. 5c, n = 5 donoren, in duplo).

Celdeling in het wondmodel

De celdeling van fibroblasten en keratinocyten werd aangetoond door toevoegen van BrdU, dat in het DNA van delende cellen wordt ingebouwd. Na zeven dagen kweek, waren bijna alle epidermale cellen, de basale en parabasale keratinocyten, in de nieuw gevormde epidermis positief gelabeld voor BrdU (Afb. 6) (n = 3 donoren, in duplo). In het wondgebied zelf en aan de randen van de wond konden geen gelabelde fibroblasten worden aangetoond. Na 21 dagen kweek konden er nog veel BrdU positieve keratinocyten worden aangetoond in de nieuwe epidermis (n = 3 donoren, in duplo). Daarnaast waren nu ook gelabelde fibroblasten aanwezig aan de randen van de wond en in het wondgebied zelf (Afb. 6). In de controlehuid waren na 21 dagen slechts enkele positieve keratinocyten zichtbaar in de basale laag van de epidermis (niet weergegeven).

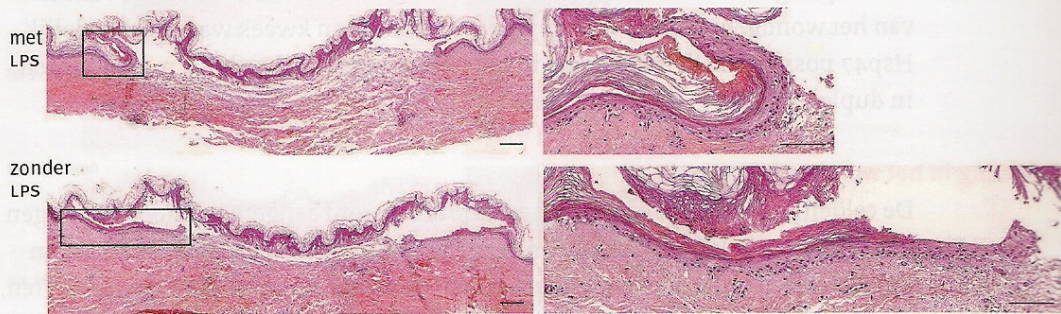


Afbeelding 6. Delende cellen in het wondmodel na 7 en 21 dagen aangekleurd door BrdU. De linker foto's geven een overzicht van de brandwond en de delende cellen (schaal 200 μm) (n=3, in duplo).

De rechter foto's zijn een vergroting van de wondrand, de BrdU positieve cellen zijn met pijltjes aangegeven. (Schaal 100 μm)

Invloed van LPS op de genezing van het wondmodel

Het toevoegen van LPS aan het model resulteerde in een verminderde uitgroei van de epidermis (Afb. 7). De nieuw gevormde epidermis in het model met LPS bedekte voor 39% (range 33-56%, n = 5 donoren, in viervoud) het wondgebied na 21 dagen. Ter vergelijking, het onbehandelde model bedekte significant meer wondgebied ($p < 0.05$), namelijk 48% (range 41-93%, n = 6) na 21 dagen kweek.



Afbeelding 7. Effect van LPS op de wondgenezing in het brandwondmodel (n = 5 donoren, in viervoud). Links zijn overzichtfoto's van de wond en de uitgroei van de epidermis weergegeven (schaal 200 μm).

In de rechter foto is de uitgroei van de epidermis is meer detail zichtbaar (schaal 100 μm).

Discussie

In deze studie hebben we een brandwondmodel ontwikkeld, waarbij ex vivo-huid werd verwond en vervolgens drie weken in kweek werd gehouden. Alle celtypen die van nature in de huid voorkomen zijn aanwezig in dit model en bleven de gehele kweekperiode in leven. Na verwonding was op de HE-coupees te zien dat de gehele dermis was aangedaan, vergelijkbaar met een derdegraads brandwond. Ondanks de verwonding bleek de huid in staat te reëpitheliseren vanaf de wondranden, daarnaast waren de fibroblasten ook in staat om het wondgebied in te migreren. Eerdere studies lieten zien dat in een *in vitro*-huidmodel al na 72 uur degeneratie van de epidermis zichtbaar was (8, 16-18). Ons model liet geen degeneratie zien en dat is waarschijnlijk te danken aan het verrijkte medium.

Ons model liet veel overeenkomsten zien met het *in vivo*-wondgenezingsproces. Evenals *in vivo* vond er verdieping van de brandwond plaats. Er was reëpitheliseren vanaf de wondranden en de morfologie van deze nieuwgroei was vergelijkbaar met die in een humane wond (19,20). De uitgroei van de epidermis was echter trager dan de uitgroei *in vivo*, namelijk $\approx 50 \mu\text{m}/\text{dag}$ in dit model tegenover $150-300 \mu\text{m}/\text{dag}$ *in vivo* (19,21). Dit is waarschijnlijk het gevolg van het ontbreken van ontstekingscellen die groeifactoren uitscheiden en zo proliferatie en migratie van cellen stimuleren en de reëpithelialisatie versnellen. In het kweekmedium zitten echter ook antibiotica waarvan bekend is dat ze de proliferatie kunnen remmen.

De fibroblasten in de dermis van ons model waren, net als in de normale wondgenezing, in staat om het wondgebied in te trekken vanaf de randen van het wondgebied. De migratie was echter trager dan bij de normale wondgenezing, wat waarschijnlijk ook weer het gevolg is van het ontbreken van chemotactische factoren van ontstekingscellen.

Om te laten zien dat ons model uitgebreid kan worden met andere belangrijke factoren die invloed hebben op wondgenezing en littekenvorming, is LPS toegevoegd om een bacteriële infectie na te bootsen. LPS heeft een slechte invloed op de wondgenezing (22,23). Het toevoegen van LPS aan ons brandwondmodel vertraagde inderdaad reëpithelisatie. Daarmee lijkt dit brandwondmodel zeer geschikt voor het bestuderen van effecten van verschillende topicale middelen op de reëpithelisatie.

Ons brandwondmodel toont veel overeenkomsten met de normale *in vivo*-wondgenezing. Het model is echter nog geen complete weergave van de *in vivo*-situatie door het ontbreken van systemische componenten zoals de ontstekingsreactie. Momenteel onderzoeken we de mogelijkheid om ook deze component toe te voegen.

Naast het bestuderen van het mechanisme van wondheling, biedt dit model de mogelijkheid om het effect van schadelijke stoffen, farmaca en cosmetische producten te bestuderen. Zo kan ons brandwondmodel bijdragen aan de vervanging of het verminderen van het gebruik van kleine proefdieren. In theorie kunnen vanuit een buikwandcorrectie van 10x10 cm, 100 huidstukjes van 1 x 1 cm worden ingezet. Hiermee kunnen 25 variaties in viervoud getest worden. Ter vergelijking zouden hier dus 100 kleine proefdieren tegenover staan.

Het hier beschreven huidmodel mist echter een aantal factoren, zoals bloedcirculatie en een ontstekingsreactie, dus kan het niet als volledige vervanging dienen. We proberen ons model te verbeteren door het toevoegen van ontstekingscellen of ontstekingsfactoren. Het huidige model is in ieder geval beter dan de bestaande *in vitro*-modellen: het bevat alle in de normale huid aanwezige celtypen en de natuurlijke (extracellulaire) omgeving. In de huidige vorm (maar zeker na toevoeging van de ontstekingscomponent) zal dit model o.i. minimaal 15% op onze kleine proefdieren kunnen besparen.

**Alweer
100 kleine
proefdieren
minder.**

Dankwoord

De ontwikkeling van dit brandwondmodel is mogelijk gemaakt met subsidies van de DPTE (Dutch Program for Tissue Engineering) en de Nederlandse Brandwonden Stichting.

Literatuur

De lijst is bij de eerste auteur verkrijgbaar: mvlig@burns.nl