

# Gekweekte huidtransplantaten

## State of the art

R.G.C. Teepe  
Dermatoloog Ziekenhuis  
Leyenburg Den Haag

### Abstract

*Transplanteren van gekweekte autologe epidermis is een waardevol alternatief om te voorzien in het te kort aan donorplaatsen bij de behandeling van patiënten met ernstige brandwonden. Ook voor reconstructies aan het mondslijmvlies, het mastoïd en bij hypospadië is deze techniek met succes toegepast. Met de komst van genetherapie biedt deze techniek de mogelijkheid diverse thans onbehandelbare huidafwijkingen in gunstige zin te beïnvloeden, dan wel te genezen. Mede daarom is het van belang de op dit gebied in ons land aanwezige expertise te "cultiveren". Gekweekte allogene huidtransplantaten daarentegen zijn als nieuwe generatie biologisch actieve wondbedekkers de experimentele fase nog niet ontstegen. Hoewel de allograft in cryo-gepreserveerde vorm op elk gewenst moment toepasbaar is en een sterk stimulerende invloed op de wondgenezing uitoefent, is het de vraag of dit produkt in kosten- en batentermen levensvatbaar zal zijn. De auteur van dit artikel, die onlangs op dit onderwerp is gepromoveerd<sup>(1)</sup>, zal in het volgende gedeelte een overzicht geven van de stand van zaken op het gebied van gekweekte keratinocytentransplantaten.*

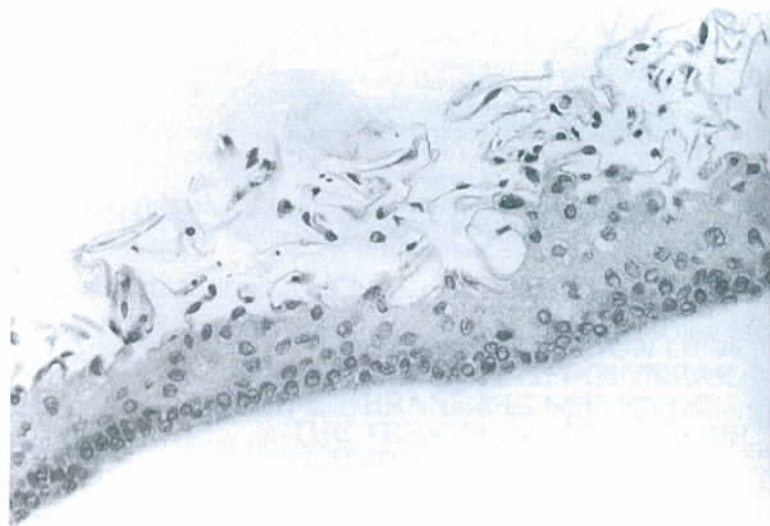
### Historie

Vele decennia hebben wetenschappers de wens gekoesterd menselijke huid in vitro te reconstrueren. Begin deze eeuw was al bekend dat individuele cellen in staat zijn in vitro te overleven. Het duurde echter tot de begin jaren vijftig voordat Billingham en Reynolds<sup>(2)</sup> als eersten aantoonde dat gekweekte epidermale celsuspensies, verkregen na trypsinisatie van de huid, in staat zijn om derdegraads huiddefecten in proefdieren te genezen. In 1951 voorzag Pickerill<sup>(3)</sup> de mogelijkheid dat gekweekte cryo-gepreserveerde huidcellen, vastgehecht aan een nylongaasje en opgeslagen in een huidbank, gebruikt zouden worden

voor wondbedekking. Pas veertig jaar later kon deze techniek in de praktijk worden toegepast. Keratinocyten zijn namelijk lang beschouwd als bijzonder lastige cellen om in vitro te kweken. De meeste pogingen liepen uit op een fiasco, veroorzaakt door overgroei met fibroblasten en door geringe proliferatie en vroege differentiatie van de keratinocyten.

### Kweekmethoden

De fundamentele doorbraak in de kweektechnologie werd eind zeventiger jaren beschreven door Rheinwald en Green<sup>(4,5)</sup>. Zij gebruikten een co-cultuur van keratinocyten en lethaal bestraalde 3T3 muizenfibroblasten in een serum-bevattend medium met diverse mitogene toevoegingen, zoals epidermale groeifactor en choleratoxine. Onder deze omstandigheden delen de huidcellen elke 17 - 18 uur en groeien uit tot individuele celkolonies. Deze kolonies expanderen en conflueren zodat na circa 10 dagen een meerlagig plaveiselepitheel is ontstaan van 4 - 6 cellagen dik. Na trypsinisatie kan de verkregen celsuspensie in een groot aantal kwekschaaltjes worden overgezet. Voor transplantatie-doeleinden worden cellen van de tweede of derde passage gebruikt. Is het kweekbakje volgegroeid, dan kan het epitheel enzymatisch als een coherent vliesje van de bodem worden losgemaakt. Dit kwetsbare laagje (fig. 1) wordt vervolgens op een vaseline of nylon gaasje vastgehecht en is dan gereed voor transplanta-



Figuur 1

tie. Uitgaande van een huidbiopsie ter grootte van 2 cm<sup>2</sup> is het op deze wijze routinematig mogelijk om binnen een periode van drie weken voldoende huid te kweken om het lichaamsoppervlak van een volwassene volledig te kunnen bedekken.

### Autografts

Patiënten met ernstige brandwonden vormen de meest voor de hand liggende indicatie voor het gebruik van gekweekte autologe epidermis. Dergelijke patiënten hebben een tekort aan donorplaatsen voor het afnemen van gespleten huidtransplantaten. Als belangrijkste voordeel van de huidkweekmethode geldt de enorme oppervlakte-expansie die ermee bereikt kan worden (circa 1:6.000). Nadeel is dat drie tot vier weken benodigd zijn voordat de kweken klaar zijn. In die periode moet het verbrande weefsel volledig worden gedebrideerd en het wondbed ontvankelijk gemaakt voor de gekweekte transplantaten. Uit ons onderzoek, in samenwerking met de drie



Figuur 2A

Nederlandse Brandwonden Centra te Beverwijk, Rotterdam en Groningen, is duidelijk gebleken dat de autograft een waardevol alternatief is naast de standaardbehandeling met het gespleten autologe huidtransplantaat. In het bijzonder geldt dit voor kinderen met zeer uitgebreide derdegraads brandwonden. Op een goed voorbereid wondbed kan thans een acceptatie van 80% worden bereikt (fig. 2A-C). Gebruik van antimicrobiële middelen, die zowel effectief zijn tegen de veel voorkomende micro-organismen bij brandwonden, als



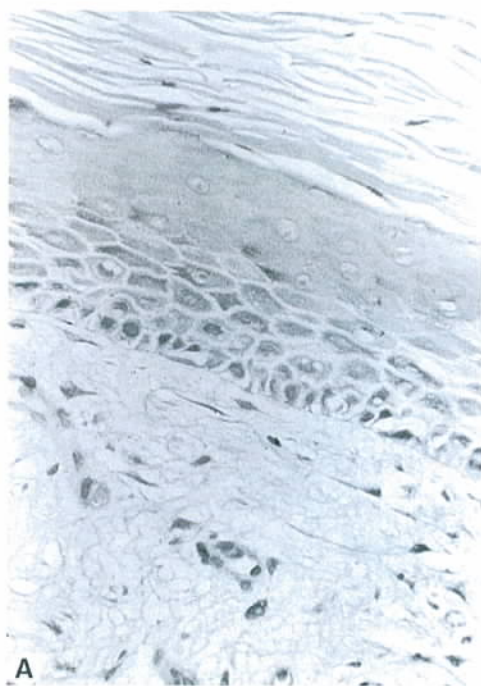
Figuur 2B



Figuur 2C

niet toxisch zijn voor de gekweekte huidcellen, is hierbij van groot belang. In dit verband heeft uitvoerig door ons verricht cytotoxiciteitsonderzoek tot diverse klinisch bruikbare adviezen geleid. Follow-up tot vier jaar na de transplantatie toonde aan dat de nieuwgevormde huid soepel, glad en plooibaar was. Littekenvorming en contractie deden zich in dezelfde mate voor als bij gebruikelijke huidtransplantaten. Bijwerkingen van de behandeling met kweekhuid hebben zich tot dusver niet voorgedaan. Onze conclusie dat trans-

plantatie met autologe kweekhuid een plaats verdient binnen de behandelingsmogelijkheid van de brandwondchirurg, stemt overeen met de bevindingen in de Verenigde Staten, waar gekweekte autografts in 80 grote brandwondencentra sinds enkele jaren routinematig worden toegepast. In diverse Europese landen, Japan en Mexico vindt dit initiatief thans navolging. Niet alleen huidcellen, ook mucosa-epitheel wordt in diverse centra met succes toegepast, ondermeer bij reconstructies aan het mondslimvlies, ter bedekking van mastoïdcaviteiten voor de behandeling van chronisch otorrhoëa en bij de behandeling van hypospadie. Autografts konden tot voor kort gefabriceerd worden op het laboratorium Huidziekten van het Academisch Ziekenhuis te Leiden. Met het opdrogen van de subsidie voor het "huidcelkweekproject" is toepassing van deze effectieve therapie in ons land helaas niet meer mogelijk en dreigt een waardevolle investering in kennis en ervaring verloren te gaan.



**A**  
Figuur 3

Mocht de nood aan de man zijn, dan kunnen autografts, tegen een aanzienlijk bedrag, geleverd worden door het bedrijf BioSurface Technology, Inc. te Boston, USA.

### Histologie

Op microscopisch niveau toont de autologe kweekhuid een aantal markante verschillen met de normale huid. Huidadnexen ontbreken volledig en retelijsten worden eerst na jaren aangelegd (fig. 3). De ontwikkeling van basale

membraamcomponenten, met name de verankerende weefsels, verloopt traag en verklaart mede de verhoogde kwetsbaarheid van kweekhuid in de eerste maanden na transplantatie. Bepaalde differentiatie-specifieke keratinen in de cellen, zoals cytokeratinen 6 en 16, blijven tot jaren na transplantatie aantoonbaar, hetgeen wijst op verhoogde celdelingsactiviteit. Dit kan mede het gevolg zijn van de afwezigheid van een modulerende factor uit de dermis, die deze activiteit juist moet uitschakelen.

### Rol van de dermis

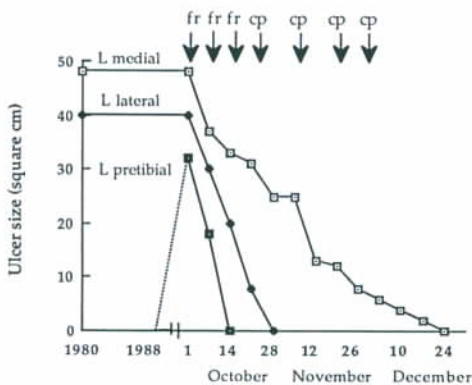
Uit talrijk experimenteel en klinisch onderzoek is gebleken dat bepaalde factoren uit de dermis zowel de acceptatie van kweekhuid als de kwaliteit en het cosmetisch aspect van het transplantaat gunstig beïnvloeden. Het is klinici bekend dat dikke huidtransplantaten tot cosmetisch betere resultaten en minder contractie leiden dan dunne transplantaten. Vandaar dat chirurgen met enige scepsis de transplantaties met het vliedunne kweekmateriaal hebben gevolgd. Met name vanuit deze hoek wordt aangedrongen op de ontwikkeling van zogenaamde composiet-materialen. Deze materialen zijn samengesteld uit een dermaal equivalent, zoals een collageenmatrix ingezaaid met fibroblasten en voorzien van een toplaag van gekweekte keratinocyten. Met deze composieten wordt beoogd de wond in een of twee transplantatieprocedures permanent te bedekken. Hoewel wereldwijd aan de ontwikkeling van kweekhuid wordt gewerkt, staat de ontwikkeling ervan nog in de kinderschoenen. Vele problemen moeten nog worden opgelost, zoals de biocompatibiliteit van de gebruikte materialen en ook adequate diffusie van nutriënten voor de kwetsbare huidcellen is een kritische stap.

### Allografts

Klinisch onderzoek maakte aanvankelijk aannemelijk dat allografts niet werden afgestoten. "Allograft survival" werd toegeschreven aan het verdwijnen in kweek van Langerhans cellen, zoals bepaald door de afwezigheid van HLA-DR antigenexpressie. Hooggespannen klinische verwachtingen bleken helaas gebaseerd op een foutief concept. Onderzoek met DNA finger printing en sex-chromosoomanalyse stelde later definitief vast dat allogene donorcellen na één week worden vervangen door gastheercellen. Ondanks de kortdurende overleving zijn allografts waardevol als biologisch actief wondverband, die zowel in verse als cryo-gepreserveerde vorm een stimulerend effect uitoefenen op de genezing van chronische huidulcera. Dit is met name aangetoond bij de

behandeling van tweedegraads brandwonden, donorplaatswonden, ulcera cruris, en andere oppervlakkige verwondingen. In gecontroleerd en gerandomiseerd onderzoek bij patiënten met ulcera cruris en donorplaatswonden hebben wij aangetoond dat allogene kweekhuid, in vergelijking met synthetische wondverbanden, de wondgenezing sterk stimuleert, terwijl de wondpijn significant vermindert.

De versnelde wondgenezing treedt op in de wondranden en restanten van huid-adnexen in het wondbed (fig. 4A-D). Allografts zijn tot dusver in fase 2 onderzoek experimenteel toegepast. Cryogepreserveerde allografts zullen naar verwachting binnen enkele jaren commercieel verkrijgbaar zijn.



Figuur 4B

### Werkingsmechanisme

Een precieze verklaring voor de heilzame werking van allografts is op het ogenblik niet bekend. Het is duidelijk dat zowel allo- als autografts, naast wondbedekking, andere gunstige effecten op de wondgenezing uitoefenen. Verondersteld wordt dat dit effect berust op de productie van groeifactoren (cytokines), die door de gekweekte donorhuidcellen worden afgescheiden, zolang deze in leven blijven. Cytokines brengen de migratie en proliferatie van residente keratinocyten op gang, moduleren de ontstekingsreactie en stimuleren de fibroblastengroei en matrixvorming. Gekweekte keratinocyten expresseren vanwege hun hyperproliferatieve status een repertoire aan cytokines die de genoemde effecten bewerkstelligen, sommige zelfs op een autocriene wijze (tabel I en II).

### Toekomstige ontwikkelingen

Fundamenteel nieuwe therapieën voor vele erfelijke ziekten liggen binnen het bereik van de klinische geneeskunde. Met het in kaart brengen van genetisch bepaalde afwijkingen is het mogelijk de chromosomale plaats van het defecte



Figuur 4A



Figuur 4C



Figuur 4D

gen te localiseren. Defecte genen die ten grondslag liggen aan diverse verhoeringsstoornissen van de huid, zoals epidermolysis bullosa simplex en epidermolytische hyperkeratosis, zijn al gekarakteriseerd. Identificatie van

**Tabel 1. Cytokines geproduceerd door menselijke keratinocyten**

Growth factors	
bFGF	Basic fibroblast growth factor
PDGF AA and BB	Platelet derived growth factor
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor- $\alpha$
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor- $\alpha$
Interleukins	
IL-1 $\alpha$ and $\beta$	Epidermal cell-derived thymocyte activating factor (ETAf)
IL-6	Epidermal cell natural killer cell augmenting factor (ENKAF)
IL-8	Neutrophil activating protein
Colony stimulating factors	
GM-CSF	Granulocyte-macrophage CSF
G-CSF	Granulocyte CSF
M-CSF	Macrophage CSF
Interleukin 3	Interleukin 3 (multi-CSF)

**Tabel 2. Cytokines geproduceerd door andere cellen die een effect uitoefenen op keratinocyten**

IL-4	Interleukin 4
KGF	Keratinocyt growth factor
IFN- $\alpha$	Interferon $\alpha$
IFN- $\beta$ 1	Interferon $\beta$ 1
IFN-gamma	Interferon gamma
EGF	Epidermal growth factor
TNF- $\beta$	Tumor necrosis factor- $\beta$ (lymphotoxin)

gedefecten bij andere moeilijk te behan- delen huidafwijkingen, zoals M. Hailey-Hailey en M. Darier zal spoedig plaatsvinden. Door middel van ex vivo genterapie van gekweekte autologe keratinocyten is het in principe mogelijk deze huidafwijkingen te verbeteren danwel te genezen, nadat de getransfec- teerde cellen bij de patiënt zijn terugge- plaatst. Ook is er het vooruitzicht dat genetisch gemanipuleerde keratinocyten gebruikt kunnen worden voor de toedie- ning van bepaalde hormonen, zoals het menselijke groeihormoon. Hoewel autografts als "drug delivery system" nog niet zijn toegepast, liggen er revolutionai- re mogelijkheden voor genterapie in het verschiep, zoals reeds bij de behandeling van cystic fibrosis is aangetoond. Mede daarom is het van belang de op dit gebied in ons land aanwezige expertise op het gebied van celkweektechnologie in stand te houden.

#### Financiële aspecten

Het produceren van kweekhuid vereist een enorme investering aan specifieke deskundigheid, materiaal en kwaliteits- controle. Het ligt daarom voor de hand

dat het op grote schaal kweken van auto- en allografts uitsluitend plaats kan vinden in een goed geoutilleerd en gecontro- leerd productielaboratorium. Eén en ander impliceert een zeer hoge kostprijs voor kweekhuid, die ruwweg neerkomt op \$ 1000 per procent verbrand lichaamsoppervlak. Overleg met de zorgverzekeraars, het COTG en resultaat van kosten- en batenanalyse moet uitmaken of dit een zinvolle investering betreft.

#### Referenties

1. Teepe RGC. Cultured keratinocyte grafting. Implications for wound healing. Dissertatie, Leiden. 1993.
2. Billingham RE, Reynolds J. Transplantation studies on sheets of pure epidermal epithelium and on epidermal cell suspensions. *Br J Plast Surg* 1952; 5: 25-36.
3. Pickerill HP. On the possibility of establishing skin banks. *Br J Plast Surg* 1951; 3: 157-165.

4. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975; 6: 331-344.

5. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5665-5668.

## Legenda

### Figuur 1

Dwars aangesneden microscopische coupe van gekweekte epidermis van tweede passage, twee weken na initiëren van de celkweek.

De basale cellaag onderscheidt zich duidelijk van de daarboven gelegen gestratificeerde en deels verhoorde cellen. (Hematoxyline en eosine; x 200).

### Figuur 2 A-C

Diep tweedegraads en derdegraads brandwonden op de rug van een 12-jarige jongen (A): het gebied direct na toepassing van gekweekte autografs. (B): de autografs sloegen voor gemiddeld 80% aan en reëpithelialisatie van de opengebleven gebieden vond plaats binnen 6 weken. (C): bevredigend resultaat 4 jaar na transplantatie.

### Figuur 3

Microscopisch beeld van geregenereerde huid 15 dagen na toepassing van gekweekte autografs. Het grensvlak tussen dermis en epidermis is volkomen vlak (zgn. verstreken retellijsten). De epidermis toont een normale uitrijping van cellen, waarbij verschillende lagen zijn te onderscheiden. De dermis toont een celrijk granulatiweefsel. (Hematoxyline en eosine; x 400).

### Figuur 4 A-D

- A: Chronisch ulcus boven de linker laterale enkel.  
B: Afname van het ulcusoppervlak na behandeling met verse (fr) en vervolgens cryo-gepreserveerde gekweekte autografs (cp).  
C: Tien dagen na behandeling is een opvallende uitgroei van epitheel te zien vanuit de wondranden en huid-adnexusen.  
D: Uitstekend cosmetisch resultaat bij wondgenezing.

Dit artikel is ook verschenen in:

- Het Bulletin Nederlandse Transplantatievereniging. Jaargang 1994; 5: 10-13 (geen foto's).
- De Ley (Medisch Tijdschrift van Ziekenhuis Leyenburg) 1994; 1: 13-17.

## Voor u gelezen

### Burns and scalds associated with motorvehicles

J.C. Lawrence  
2nd European Conference on Advances in Woundmanagement,  
1992;106-108.

In dit onderzoek, waar men over een periode van 10 jaar terugkijkt op vlam- en heetwaterverbrandingen bij verkeersongevallen, tracht men een patroon te vinden in het optreden van deze verbrandingen. Om het onderzoek compleet te maken, onderzocht men ook het verband tussen brandwonden en het gebruik van motorvoertuigen. De bevindingen kwamen uit een groot brandwondencentrum in Engeland. Uit de cijfers bleek dat meer mannen dan vrouwen dit soort verbrandingen opliepen. Vooral mannen in de leeftijd van 16 tot 44 jaar en dit zowel bij verkeersongevallen als bij het onderhoud van motorvoertuigen.

De heetwaterverbrandingen kwamen niet zoveel voor bij ongevallen, maar meer bij het onderhoud van de voertuigen. Met name het verwijderen van de radiatorkap

bij een hete motor.

Het gemiddelde percentage daarbij was ongeveer 7% en de diepte niet meer dan tweedegraads. De wonden genazen spontaan.

De vlamverbrandingen kwamen in meer variëteiten voor en waren allen tweedegraads en dieper.

Bij iedereen was een operatie nodig om te genezen. Het percentage liep op tot een gemiddelde van 19%, waarbij bij sommigen het verbrande gebied zo uitgebreid was dat de dood intrad. De oorzaken lagen vaak bij het gebruik van benzine en LPG en varieerden van tanken en onderhoud tot poging tot zelfdoding.

Bij maar één van de gevallen was een inhalatietrauma opgetreden.

Geconcludeerd kon worden dat er meer mannen dan vrouwen op deze manier brandwonden opliepen (als er vrouwen bij betrokken waren, dan was het bij een verkeersongeval) en dat de vlamverbrandingen het ernstigst waren in oppervlakte en in diepte.

De mortaliteit was bij deze brandwonden het hoogst.