

Kweekhuid voor onderzoek naar bacteriële infecties en ontsteking bij brandwonden

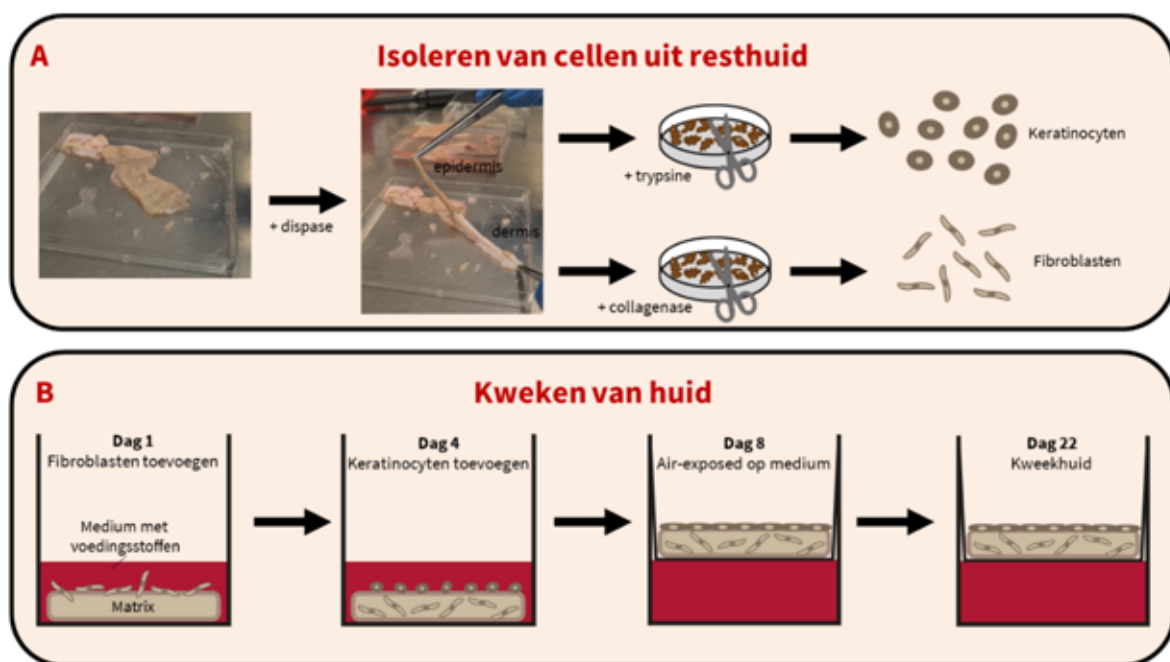
P.P.G. Mulder, T. Spreij, M. Vlig, A. Elgersma, B.K.H.L. Boekema*

Genezing van brandwonden verloopt vaak moeizaam door enorme schade aan de huid en een heftige reactie van het lichaam (1). Hevige ontsteking en bacteriële infecties behoren tot de veelvoorkomende complicaties bij brandwonden. Deze complicaties zijn regelmatig moeilijk te behandelen en kunnen de wondgenezing aanzienlijk verhinderen en vertragen. Om bijkomende ziekteverschijnselen zoveel mogelijk te beperken, is het noodzakelijk te weten hoe infecties kunnen worden voorkomen en hoe de afweerreactie van het lichaam onder controle kan worden gehouden. Om onderzoek naar wondgenezing, bacteriële infecties en ontsteking mogelijk te maken zonder daarvoor gebruik te maken van proefdieren, hebben wij modellen ontwikkeld op basis van kweekhuid.

Transitie naar proefdiervrij onderzoek

Onderzoek naar brandwonden wordt veelal gedaan met behulp van proefdieren, waaronder muizen, ratten en varkens (2,3). Een belangrijke reden hiervoor is dat onderzoek bij brandwondpatiënten wordt bemoeilijkt door strenge regelgeving voor het verzamelen van bloed- en weefselsamples. Daarnaast is er veel variatie tussen patiënten en tussen brandwonden. Bovendien is er meestal

gebrek aan een juiste controle, bijvoorbeeld een baseline-waarneming. Bij proefdieronderzoek is het wel mogelijk om brandwonden te bestuderen op een gestandaardiseerde en gecontroleerde manier met daarbij de juiste controlemetingen. Het gebruik van proefdieren voor onderzoek naar medicijnen wordt echter flink ter discussie gesteld. Naast bezwaar tegen het onethische dierenleed, is de situatie bij dieren geen goede weergave van die bij



Figuur 1. Kweken van huid voor onderzoek naar brandwonden. A) Flowschema met stappen om cellen te isoleren uit huid. B) Flowschema met de stappen om huid te kweken. Na ongeveer drie weken is de huid volledig ontwikkeld. Illustratie gebaseerd op: (8).

mensen. Zo is de samenstelling van ontstekingscellen in knaagdieren anders: de dieren hebben in verhouding meer cellen van het verworven immuunsysteem (T cellen en B cellen) dan van het aangeboren immuunsysteem (neutrofielen en monocyt/macrofagen) (4). Daarnaast genezen knaagdieren voornamelijk door contractie van de wondranden, terwijl bij mensen de wondgenezing tot stand komt door groei van huidcellen en fibrose (5). Deze dieren hebben daarom ook minder te maken met ernstige littekenvorming dan mensen. Dus, ondanks dat proefdieren belangrijke informatie kunnen geven over brandwonden, is het noodzakelijk om een betere manier te vinden om onderzoek naar brandwonden te doen.

Kweken van huid

Eén manier van onderzoek doen zonder gebruik te maken van patiënten of proefdieren, is het gebruik van humane kweekhuid. In het onderzoekslaboratorium van de Vereniging van Samenwerkende Brandwondencentra (VSBN) in Beverwijk wordt huid gekweekt voor onderzoek naar brandwonden (figuur 1). Om deze kweekhuid te maken, worden eerst keratinocyten en fibroblasten geïsoleerd uit huid die overblijft na bijvoorbeeld buikwand-reconstructies. Eerst wordt een hele dunne laag huid afgenomen met een dermatoom. Met behulp van het enzym dispase kan de epidermis van de dermis worden gescheiden. De fibroblasten worden uit de dermis gehaald door de dermis fijn te snijden en te behandelen met het enzym collagenase. Met het enzym trypsine worden keratinocyten geïsoleerd uit de epidermis. De geïsoleerde cellen worden vervolgens opgekweekt om ze te vermeerderen en kunnen dan bewaard worden in een vat met vloeibare stikstof. Om een kweekhuid te maken is een stevige structuur nodig waaraan cellen zich goed kunnen hechten. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een collageen-elastine matrix (6). Huid bestaat voor het grootste deel uit collageen en elastine en dat geeft de huid stevigheid en maakt deze elastisch. Op dag 1 worden fibroblasten in de matrix gezaaid, deze moeten de dermis vormen. Op dag 4 worden keratinocyten toegevoegd aan de matrix. Deze cellen zullen hechten aan de bovenkant en bouwen de epidermis op. Na acht dagen gaan de modellen air-exposed: de bovenkant of de epidermis staat droog aan de lucht net zoals bij echte huid en aan de onderkant kunnen voedingsstoffen opgenomen worden uit het medium. Op dag 22 is de kweekhuid volledig gegroeid en is deze vergelijkbaar met gezonde huid (7).

Onderzoek naar brandwonden

De gekweekte huid wordt gebruikt om onderzoek te doen naar brandwonden. Om brandwonden te maken, wordt veelal gebruikt gemaakt van een soldeerbout. Door een hete soldeerbout (doorgaans 80 - 90 °C) aan te brengen op de kweekhuid ontstaat er een gestandaardiseerde contact-

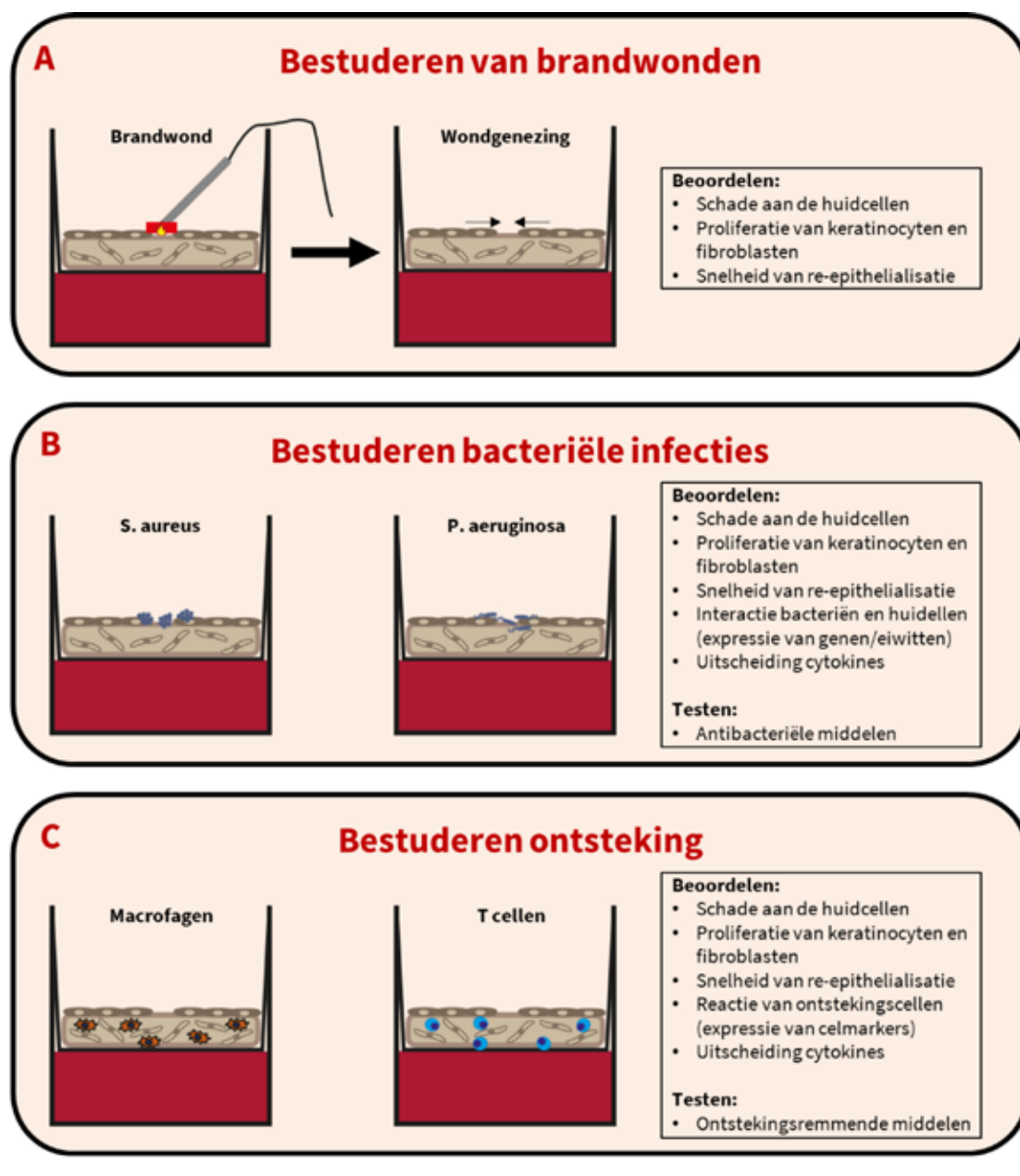
verbranding die goed zichtbaar is (7). Met behulp van microscopische technieken kunnen deze brandwonden worden beoordeeld (figuur 2A). Zo wordt de schade aan de huidcellen in kaart gebracht. Daarnaast wordt ook de groei van keratinocyten en fibroblasten en de snelheid van herstel van de epidermis onderzocht. Op deze manier kan ook het effect van geneesmiddelen of de reactie van cellen op bepaalde omstandigheden, zoals een infectie of ontsteking worden bekeken.

Onderzoek naar bacteriële infecties

Kolonisatie met micro-organismen, met name *Staphylococcus aureus* en *Pseudomonas aeruginosa*, is een veelvoorkomend probleem bij patiënten met brandwonden ondanks de hoge zorgstandaard (9). Aanwezigheid van bacteriën in brandwonden kan leiden tot zowel infectie, vertraagde wondgenezing, herhaaldelijke operaties, langere opname-duur en meer littekenvorming (10). Het voorkomen en bestrijden van bacteriën zal dan ook een positief effect hebben op de wondgenezing. Lokale behandelingen die beschikbaar zijn, zoals zilver sulfadiazine, moeten echter verbeterd worden omdat deze de wondgenezing negatief kunnen beïnvloeden (11). Hoewel er antibiotica beschikbaar zijn, is het gebruik hiervan bij brandwondenpatiënten maar beperkt mogelijk vanwege de ontwikkeling van antibioticaresistentie die wereldwijd gestaag blijft toeneemen. Bacteriën kunnen ook een biofilm vormen waardoor ze nog toleranter worden voor antibiotica. Uit voorgaand werk blijkt dat de interactie tussen *S. aureus* en de mens erg complex is en naast bacteriestam- ook huiddonorafhankelijk is. In ons onderzoek gaan we proberen te achterhalen welke bacteriële en menselijke factoren van belang zijn in gekoloniseerde brandwonden om zo nog betere brandwondmodellen te kunnen ontwikkelen (figuur 2B). Dit model gebruiken we vervolgens om nieuwe behandelstrategieën te ontwikkelen en te testen.

Onderzoek naar ontsteking

Voor onderzoek naar ontsteking is een complexer model nodig, omdat de ontstekingscellen niet aanwezig zijn. Uit voorgaand onderzoek is gebleken dat neutrofielen, macrofagen en T cellen betrokken zijn bij ontsteking na brandwonden (12,13). Om aspecten van de ontstekingsreactie na te bootsen kunnen ontstekingscellen, geïsoleerd uit gezond bloed, handmatig worden toegevoegd aan de gekweekte huid (figuur 2C) (8). Vervolgens wordt bestudeerd hoe de ontstekingscellen reageren op een brandwond, door verandering in activatie en cytokineproductie met behulp van microscopie en flow cytometrie. Vanwege de aanzienlijk korte levensduur van neutrofielen (1 - 2 dagen) en het onvermogen om deze cellen in te vriezen is het nog niet gelukt om de reactie van deze cellen na te bootsen in het huidmodel.



Figuur 2. Kweken van huid voor onderzoek naar brandwonden, bacteriële infecties en ontsteking. A) Nabootsen van brandwonden. B) Nabootsen van bacteriële infecties door *Staphylococcus aureus* of *Pseudomonas aeruginosa* toe te voegen. C) Nabootsen van ontsteking door macrofagen of T cellen toe te voegen. Illustratieve weergave van experimenten met kweekhuid. Illustratie gebaseerd op: (8).

Toekomst

Met deze huidmodellen krijgen we meer informatie over wondgenezing en kunnen we geneesmiddelen testen. Diverse antibacteriële middelen kunnen getest worden op het huidmodel met bacteriën en verschillende ontstekingsremmers kunnen getest worden op het huidmodel met ontstekingscellen. Op deze manier werken we aan de verbetering van de brandwondenzorg op een proefdiervrije manier.

Literatuur

1. Jeschke MG, van Baar ME, Choudhry MA, et al. **Burn injury.** Nat Rev Dis Prim [Internet], 2020; Dec 1 [cited 2020 Jun 23];6(1):1–25. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41572-020-0145-5>
2. Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke MG. **Animal models in burn research.** Cell Mol Life Sci, 2014; Sep 9;71(17):3241–55.
3. Masson-Meyers DS, Andrade TAM, Caetano GF, et al. **Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment.** Int J Exp Pathol, 2020; Feb;101(1-2):21–37.

4. Mestas J, Hughes CCW. **Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology.** J Immunol, 2004;172(5):2731-8.
5. Zomer HD, Trentin AG. **Skin wound healing in humans and mice: Challenges in translational research.** J Dermatol Sci, 2018;90(1):3-12.
6. Jordan SW, Turin SY, Zielinski ER, et al. **Matrices and dermal substitutes for wound treatment.** In: Interventional Treatment of Wounds: A Modern Approach for Better Outcomes, 2018; p.215-50.
7. Mulder PPG, Raktoe RS, Vlig M, et al. **Full Skin Equivalent Models for Simulation of Burn Wound Healing, Exploring Skin Regeneration and Cytokine Response.** J Funct Biomater, 2023;14(1):29.
8. Mulder PPG, Vlig M, Elgersma A, et al. **Monocytes and T cells incorporated in full skin equivalents to study innate or adaptive immune reactions after burn injury.** Front Immunol [Internet], 2023 Oct 13;14(October):1-13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1264716/full>
9. Diederens JFM, Wardle CLW, Krijnen P, et al. **Epidemiology of Clinically Relevant Bacterial Pathogens in a Burn Center in the Netherlands between 2005 and 2011.** J Burn Care Res, 2015;36(3):446-53.
10. Issler-Fisher AC, McKew G, Fisher OM, et al. **Risk factors for, and the effect of MRSA colonization on the clinical outcomes of severely burnt patients.** Burns [Internet], 2015;41(6):1212-20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2015.03.003>
11. van den Brand CS, van der Steen LPE, Boekema B, et al. **Silversulfadiazine cream treatment results in more wound contraction and more itch in a standardized porcine scald model.** J Burn care Res Off Publ Am Burn Assoc, 2021;Feb;
12. Bergquist M, Hästbacka J, Glaumann C, et al. **The time-course of the inflammatory response to major burn injury and its relation to organ failure and outcome.** Burns [Internet], 2019;45(2):354-63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2018.09.001>
13. Mulder PPG, Vlig M, Fasse E, et al. **Burn-injured skin is marked by a prolonged local acute inflammatory response of innate immune cells and pro-inflammatory cytokines.** Front Immunol [Internet], 2022; Nov 14;13:1-14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.1034420/abstract>

**Patrick P.G. Mulder, postdoctoraal onderzoeker, Pre-klinisch Onderzoek, Vereniging van Samenwerkende Brandwondencentra in Nederland (VSBN), Beverwijk.*

Tianne Spreij, promovenda/onderzoeker, Pre-klinisch Onderzoek, Vereniging van Samenwerkende Brandwondencentra in Nederland (VSBN), Beverwijk.

Marcel Vlig, senior technician, Pre-klinisch Onderzoek, Vereniging van Samenwerkende Brandwondencentra in Nederland (VSBN), Beverwijk.

Anouk Elgerma, technician, Pre-klinisch Onderzoek, Vereniging van Samenwerkende Brandwondencentra in Nederland (VSBN), Beverwijk.

Bouke K.H.L. Boekema, onderzoekshoofd, Pre-klinisch Onderzoek, Vereniging van Samenwerkende Brandwondencentra in Nederland (VSBN), Beverwijk.