

DE EFFECTEN VAN GLYCEROL-PRESERVEREN EN CRYOPRESERVEREN VAN DONORHUID OP DE INACTIVATIE VAN HIV-1

Jeroen van Baare*, Paul Cameron**, Nick Vardaxis***, Joanne Pagnon**, Janette Reece**, Esther Middelkoop**** en Suzanne Crowe**.

Cryopreserveren en glycerol-preserveren van donorhuid zijn twee succesvolle methoden om humane donorhuid voor lange termijn te bewaren. Voordat donorhuid echter klinisch kan worden gebruikt, worden zowel de donor als de donorhuid onderworpen aan een aantal strenge selectiecriteria. Dit is van belang om potentiële overdracht van micro-organismen van donorhuid naar de ontvanger te minimaliseren. Van hoge concentraties glycerol is het bekend dat het anti-bacteriële en antivirale eigenschappen bezit. De effecten van glycerol op HIV-1 zijn echter niet bekend. In samenwerking met Prof. Suzanne Crowe van het Macfarlane Burnet Center for Medical Research, AIDS Pathogenesis Research Unit, Melbourne, Australië, is daarom een onderzoek gestart naar de effecten van cryopreserveren en glycerol-preserveren van donorhuid op infectueus HIV-1. De American Burn Association heeft in maart 1998 in Chicago de Lindbergh Award toegekend aan dit onderzoek (1).

Humane donorhuid wordt al lange tijd met succes gebruikt bij de behandeling van brandwonden. Belegging van de wond met donorhuid als een tijdelijk wondverband levert een belangrijke bijdrage aan het voorkomen van infectie en reduceert het verlies van lichaamsvloeistoffen door deze wonden. Verschillende methoden zijn ontwikkeld om donorhuid te preserveren en te bewaren om op die manier altijd direct voldoende donorhuid ter beschikking te hebben. Cryopreserveren en glycerol preserveren zijn twee succesvolle methoden om donorhuid voor lange termijn te bewaren. Om veiligheid en kwaliteit van donorhuid optimaal te garanderen, wordt de donor en de donorhuid onderworpen aan een aantal strenge selectiecriteria, zoals screening van de medische en sociale achtergrond en een aantal specifieke criteria zoals huidafwijkingen. Ook wordt de donor op een aantal overdraagbare ziekten gescreend door bloed te testen op HIV-1 en 2, Hepatitis B en C, HTLV-1 en Syfilis. Daarnaast wordt de donorhuid ook gekweekt om vast te stellen of de donorhuid vrij is van bacteriën, schimmels en gisten. Ondanks deze strenge voorzorgsmaatregelen zijn gevallen bekend van overdracht van ziekteverwekkers na transplantatie van bot, cornea, hartkleppen, dura mater en huid. Overdracht geschiedde voornamelijk doordat weefsel niet was

gescreend voor bepaalde micro-organismen of omdat het weefsel al getransplanteerd was alvorens de serologie uitslag bekend was. Overdracht van HIV na transplantatie is zeldzaam. Simonds et al meldde een HIV-1 transmissie door weefsel en organen afkomstig van een seronegatieve, maar HIV-geïnfecteerde multi-orgaan donor. Organen en onbewerkte bottransplantaten resulteerden bij de ontvangers in een HIV infectie. Ontvangers van gevriesdroogd weefsel werden niet geïnfecteerd. HIV overdracht na huidtransplantatie is één keer in de literatuur beschreven. De verse en onbewerkte donorhuid werd echter gebruikt alvorens de serologische testen van de donor bekend waren, welke positief bleken voor HIV-1. Recente verbeteringen in donor screening en de introductie van nieuwe serologie tests hebben een grote bijdrage geleverd om potentiële overdracht van ziekteverwekkers te minimaliseren. Desondanks blijft er met de huidige serologie tests sprake van het "window-fase" probleem. De meeste internationaal geaccepteerde serologie tests screenen op de aanwezigheid van antilichamen gericht tegen bepaalde virussen. Indien een persoon echter recent is besmet met een virus, zijn er nog geen of onvoldoende antilichamen aangemaakt welke door de test kunnen worden gedetecteerd. Zo is van een HIV-1 besmetting bekend dat soms pas na 6 maanden voldoende

antilichamen zijn aangemaakt en dan pas door de test kunnen worden aangetoond. Nieuwe technieken, zoals het direct aantonen van de aanwezigheid van een virus, zoals met de Polymerase Chain Reaction (PCR), zijn al enige tijd geleden ontwikkeld en kunnen de window-fase verkleinen. Echter, deze test heeft nog niet de betrouwbaarheid die nodig is voor postmortaal bloed. In de laatste 10 jaar zijn miljoenen vierkante centimeters donorhuid getransplanteerd op brandwonden en andere wonden. Noch HIV, noch enige andere virale besmetting is ooit gerapporteerd. Een methode om donorhuid te verkrijgen die gegarandeerd vrij is van elke ziekteverwekker is op dit moment nog niet mogelijk zonder daarmee essentiële structuren in de huid te vernietigen of zonder het introduceren van toxische substanties. De huidige internationaal geaccepteerde sterilisatiemethoden met ethyleen oxide of gamma bestraling veroorzaken veranderingen in de structurele integriteit van donorhuid en mogelijk vorming van schadelijke radicalen. Het is al geruime tijd bekend dat een hoge concentratie glycerol de structuur van donorhuid nagenoeg onaangetast laat, de antigeniciteit van donorhuid verlaagt en anti-bacteriële eigenschappen bezit. In een recent gepubliceerd artikel door de Euro Skin Bank werden 2000 huid-donoren met hun bacteriologische

data nader bekeken (2). Uit de resultaten bleek dat bacteriologisch gecontamineerde glycerol-gepreserveerde donorhuid die langere tijd was opgeslagen in de koelkast bij 4°C uiteindelijk bacterievrij was. Hoge concentraties glycerol blijken naast hun bactericide werking ook antivirale eigenschappen te bezitten (3,4). Herpes simplex type I en poliovirus type I zijn beiden onderzocht. Blootstelling aan 85% glycerol was voldoende om beide virussen te inactiveren in een studie waarbij gebruik werd gemaakt van extracellulair virus. Intracellulair virus was moeilijker te inactiveren bij blootstelling aan 85% glycerol. Poliovirus werd geïnactiveerd na incubatie gedurende 3 weken bij 20°C. Geen van de studies heeft gekeken naar het effect van glycerol op virusrepliatie of levensvatbaarheid wanneer huid werd onderworpen aan de totale glycerol conserveringstechniek zoals uitgevoerd door de Euro Skin Bank. Bovendien is HIV replicatie in beide studies niet onderzocht.

Recente studies hebben aangegeven dat huid HIV-geïnfecteerde cellen kan bevatten, inclusief Langerhans cellen en keratinocyten, welke beiden lymfoïde cellen kunnen infecteren. Om de vraag te beantwoorden over mogelijke HIV transmissie na allogene huidtransplantatie, is de huidige studie opgezet om te bepalen of HIV-1 geïnactiveerd wordt na glycerol-preservering of cryopreservering van donorhuid.

MATERIAAL EN METHODE GLYCEROL PRESERVERINGSMETHODE

De glycerol preserveringstechniek is afgeleid van de Euro Skin Bank methode. 98% glycerol werd verdund tot 50%, 70% en 85% glycerolconcentraties. De eerste fase was incubatie in 50% glycerol bij kamertemperatuur. De tweede fase 3 uur incubatie in 70% glycerol bij 37°C en de laatste stap in de preservering was incubatie in 85% glycerol bij 37°C gedurende 3 uur.

CRYOPRESERVERINGSMETHODE

De cryopreserveringstechniek is afgeleid van de procedure gebruikt door de Victorian Institute of

Forensic Medicine, Donor Tissue Bank of Victoria, Melbourne, Australië. Als cryoprotector werd 10% DMSO gebruikt. De eerste fase bestond uit 8 uur incubatie in een celweekmedium met antibiotica. Dit werd gevolgd door incubatie bij 4°C in 10% DMSO gedurende 0 tot 120 minuten. Tot slot werd cryopreserveerd met 1°C/min en vond opslag plaats in vloeibare stikstof.

EXPERIMENTEN

Gebruik werd gemaakt van HIV-1_{BA-L} als modelvirus dat monocyten en dendritische cellen in huid efficiënt kan infecteren. Het onderzoek werd in 3 groepen uitgevoerd. In groep 1 werd extracellulair HIV-1 gebruikt. Groep 2 bevatte kunstmatig HIV-geïnfecteerde cellen. In groep 3 werd kunstmatig HIV-geïnfecteerde donorhuid onderzocht.

REVERSE TRANSCRIPTASE ASSAY (RTASE)

Nadat het geïnfecteerde materiaal was blootgesteld aan een van beide preserveringstechnieken werd de mate van infectueus HIV bepaald door aan het behandelde materiaal niet-geïnfecteerde cellen toe te voegen en de reverse transcriptase activiteit te bepalen.

RESULTATEN

EFFECT VAN GLYCEROL/CRYOPRESERVEREN OP CEL-VRIJ HIV-1_{BA-L}

De effecten van verschillende concentraties glycerol en verschillende incubatietijden en temperatuur zijn weergegeven in Figuur 1a. HIV was nog infectueus na 3 uur incubatie in PBS of 50% glycerol bij 4°C, kamertemperatuur en 37°C. Indien HIV-1 blootgesteld werd aan 70% of 85% glycerol werd HIV binnen 40 minuten compleet geïnactiveerd bij 4°C, kamertemperatuur en 37°C. In tegenstelling tot glycerol, blijkt cryopreserveren met verschillende blootstellingstijd aan 10% DMSO geen enkel effect te hebben op infectueus HIV (figuur 1b).

INACTIVEREN VAN KUNSTMATIG HIV-GEÏNFECTEERDE CELLEN

De effecten van glycerolpreservering op HIV-1 zijn weergegeven in figuur 2a. Na de eerste preserveringsfase

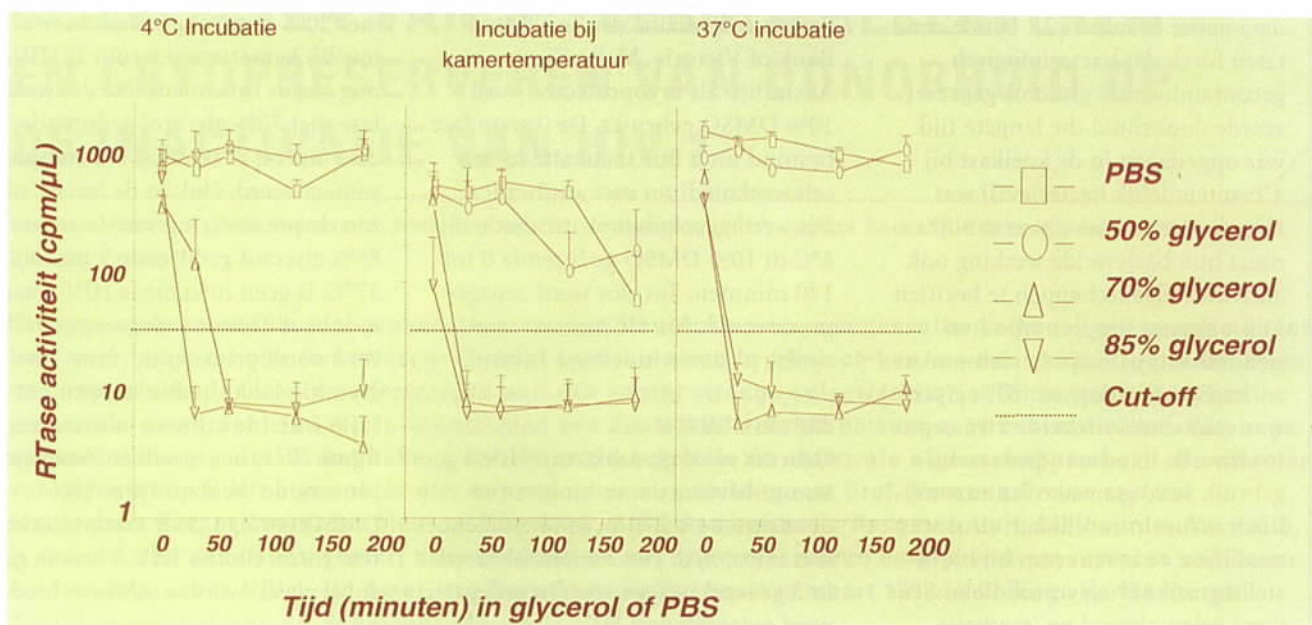
met 50% glycerol gedurende twee uur bij kamertemperatuur is HIV-1 nog steeds infectueus. Na de tweede fase met 70% glycerol gedurende drie uur bij 37°C is HIV-1 compleet geïnactiveerd. Ook in de laatste stap van de preservering van donorhuid, 85% glycerol gedurende 3 uur bij 37°C, is geen infectueus HIV-1 aantoonbaar. De controlegroep, waarbij PBS wordt gebruikt in plaats van glycerol, blijkt in alle stappen het HIV-1 niet te kunnen inactiveren. In figuur 2b is het resultaat weergegeven van de incubatie met 10% DMSO gevolgd door cryopreserveren. Intracellulair HIV-1 kon in geen enkel geval worden geïnactiveerd.

INACTIVERING VAN KUNSTMATIG HIV-BESMETTE SPLIT-THICKNESS HUID

Kunstmatig HIV-besmette donorhuid werd onderworpen aan de gehele glycerol preserveringstechniek. Resultaten zijn weergegeven in figuur 3a. Na incubatie van de donorhuid in 50% glycerol gedurende twee uur bij kamertemperatuur was infectueus HIV-1 detecteerbaar. Aansluitende incubatie in 70% glycerol gedurende drie uur bij 37°C resulteerde in volledige inactivatie van HIV-1. De laatste stap tenslotte in de glycerolpreservering van donorhuid was eveneens vrij van infectueus HIV. Blootstelling van HIV-besmette donorhuid aan verschillende tijdsduren met 10% DMSO gevolgd door cryopreservering resulteerde niet in inactivatie van HIV-1 (figuur 3b).

DISCUSSIE

Indien voldoende autologe huid ontbreekt om brandwonden te bedekken, wordt allogene huid, afkomstig van huiddonoren, met veel succes gebruikt als tijdelijk biologisch wondverband en is derhalve vaak de eerste keus bij veel brandwonden centra in de wereld. Donorhuid voorkomt niet alleen verlies van vloeistof, eiwitten en warmte en minimaliseert kolonisatie door bacteriën, maar levert ook een acceptabel cosmetisch resultaat op. Om het risico op besmetting van bacteriën en virussen te minimaliseren na transplantatie van donorhuid op de patiënt, worden de huiddonor en de



Figuur 1a. Effecten van glycerol en temperatuur op cel-vrij HIV-1Ba-L. HIV-1Ba-L werd blootgesteld aan verschillende concentraties glycerol bij verschillende temperaturen. Niet-geïnfecteerde PBMC's werden toegevoegd en besmettelijkheid werd bepaald door meten van de RTase productie. Cut-off is gemiddelde niet-geïnfecteerde cellen + 3 SDs.

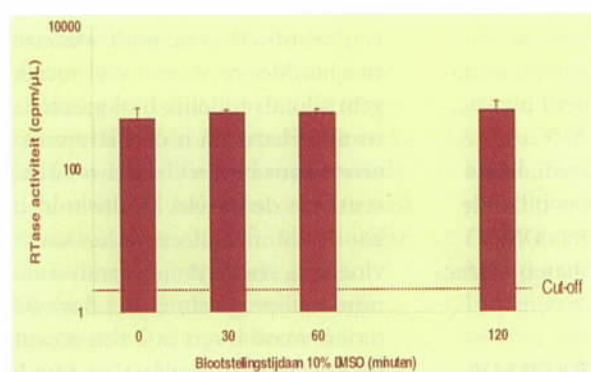
donorhuid aan strenge selectiecriteria onderworpen. Echter, ondanks deze strenge criteria is overdracht van virussen niet geheel uit te sluiten en wordt donorhuid derhalve vaak alleen gebruikt in levensbedreigende situaties. In niet-levensbedreigende situaties, zoals heet-water verbrandingen bij kinderen, wordt vaak de voorkeur gegeven aan synthetische behandelingsmaterialen, ondanks de positieve resultaten die met donorhuid worden bereikt, zoals onmiddellijke pijnstilling na applicatie van donorhuid en relatief goede cosmetische resultaten.

Er zijn twee succesvolle technieken om donorhuid gedurende langere termijn te bewaren: Cryopreserveren

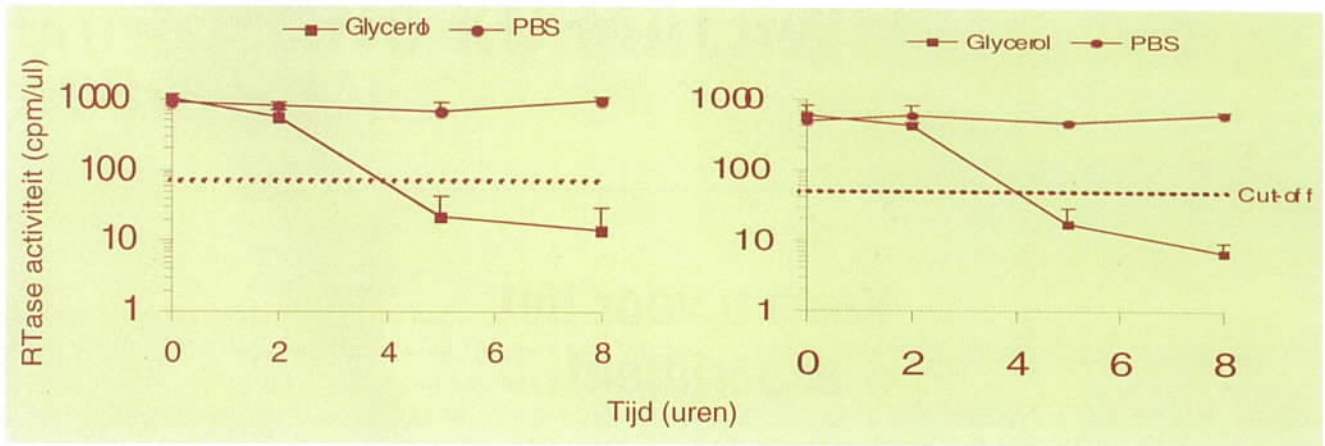
en glycerol-preserveren. Donorhuid blijft vitaal na cryopreservering, terwijl glycerolpreservering resulteert in niet-vitale huid. Vitale donorhuid zou cytokinen produceren welke de wondgenezing stimuleren, maar induceren ook een immuunreactie. Het blijft de vraag of vitale donorhuid noodzakelijk is, mede gezien de klinische resultaten die met glycerol-gepreserveerde donorhuid worden bereikt. Omdat in eerdere experimenten was aangetoond dat hoge concentraties glycerol virussen kunnen inactiveren, is dit onderzoek gestart naar de effecten van glycerol preservering en cryopreservering op HIV-1.

Met betrekking tot de effecten van glycerol blijkt uit de resultaten dat inactivatie van HIV-1 afhankelijk is van een combinatie van glycerolconcentratie, temperatuur en blootstellingstijd. Cel-vrije HIV suspensies die aan 70% of 85% glycerol werden blootgesteld

werden binnen 40 minuten bij alle onderzochte temperaturen geïnactiveerd. Deze resultaten lijken een aanwijzing te zijn dat extracellulair HIV-1 efficiënt wordt geïnactiveerd door de glycerol preserveringstechniek van de Euro Skin Bank. Omdat aangetoond is dat HIV-1 aanwezig kan zijn in epidermale cellen, zijn kunstmatig HIV-besmette cellen en kunstmatig HIV-besmette donorhuid blootgesteld aan glycerol. Na de tweede stap in de preserveringsprocedure met 70% glycerol blijkt dat HIV-1 compleet geïnactiveerd is. De laatste stap met 85% glycerol toont ook in geen enkel geval infectueus HIV-1 aan. Deze data geven een sterke aanwijzing dat de huidige preserveringsprocedure van de Euro Skin Bank voldoende zou zijn om HIV-1 compleet te inactiveren. Met betrekking tot het effect van cryopreserveren op infectueus HIV-1 is in geen enkele situatie, zowel extra- als intracellulair HIV, inactivatie van het virus waargenomen. Potentiële huiddonoren worden in eerste instantie onderworpen aan strenge screeningsprotocollen. Bloed van de donor wordt onder andere getest op aanwezigheid van HIV-1. De kans dat de donor HIV-geïnfecteerd is, maar seronegatief is, is derhalve uitermate klein, evenals

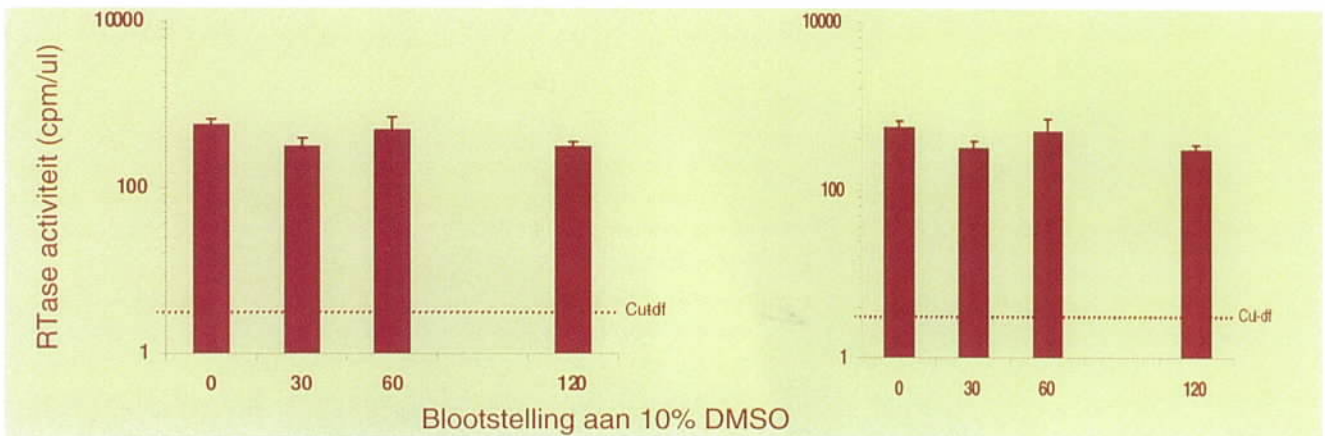


Figuur 1b. Effect van cryopreservering op cel-vrij HIV-1Ba-L. Verschillende blootstellingstijd aan 10% DMSO gevolgd door cryopreserveren. Besmettelijkheid werd bepaald door RTase productie. Cut-off is gemiddelde niet-geïnfecteerde cellen + 3 SDs.



Figuur 2a. Effect van glycerol-preserveering op intracellulair HIV-1_{Ba-L}. Kunstmatig besmette PBMC's werden blootgesteld aan oplopende concentratie glycerol. Na iedere stap in het proces werden niet geïnfecteerde PBMC's toegevoegd en de hoeveelheid infectueus HIV-1 bepaald door RTase productie. Cut-off is gemiddelde niet-geïnfecteerde cellen + 3 SD's.

Figuur 3a. Effect van glycerol-preserveering op kunstmatig HIV-1_{Ba-L} geïnfecteerde donorhuid. Kunstmatig HIV-1_{Ba-L} geïnfecteerde donorhuid werd blootgesteld aan oplopende concentraties glycerol. Na iedere stap in het proces werden niet-geïnfecteerde PBMC's toegevoegd en de hoeveelheid infectueus HIV-1 bepaald door RTase productie. Cut-off is gemiddelde niet-geïnfecteerde cellen + 3 SD's.



Figuur 2b. Effect van cryopreserveering op intracellulair HIV-1_{Ba-L}. Verschillende blootstellingstijd aan 10% DMSO gevolgd door cryopreserveering. Daarna toevoeging van niet-geïnfecteerde PBMC's en bepaling infectiviteit HIV-1 door RTase productie. Cut-off is gemiddelde niet-geïnfecteerde cellen + 3 SD's.

Figuur 3b. Effect van cryopreserveering op kunstmatig HIV-1_{Ba-L} geïnfecteerde donorhuid. Verschillende blootstellingstijd aan 10% DMSO gevolgd door cryopreserveering. Daarna toevoeging van niet-geïnfecteerde PBMC's en bepaling infectiviteit HIV-1 door RTase productie. Cut-off is gemiddelde niet-geïnfecteerde cellen + 3 SD's.

het potentiële risico op virale besmetting. De resultaten van dit onderzoek zijn klinisch relevant voor de behandeling van brandwonden en chronische wonden met donorhuid. Complete inactivatie van zowel extra- als intracellulair virus werd bereikt door een simpele en eenvoudige procedure. Zowel cryogepreserveerde als glycerol-gepreserveerde donorhuid zijn veilig in gebruik op basis van de verschillende screeningsprocedures, hoewel de resultaten er op lijken te wijzen dat de glycerol preserveeringsprocedure een additionele reductie geeft van het al minimale besmettingsrisico na huidtransplantatie. Mede door deze resultaten kan worden afgewogen

glycerol-gepreserveerde donorhuid niet alleen in levensbedreigende situaties te gebruiken, maar ook in minder ernstige wonden, indien klinisch wenselijk.

LITERATUURVERWIJZINGEN

1. Van Baare et al. Comparison of glycerol preservation with cryopreservation methods on HIV-1 inactivation. *J Burn Care Rehabil* 1998; 19:494-500.
2. Van Baare et al. Microbiologic evaluation of glycerolised cadaveric donor skin. *Transplantation* 1998; 20:77-80.
3. Van Baare et al. Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns* 1994; 20:S77-S80.
4. Marshall et al. Effect of glycerol on in-

tracellular virus survival: implications for the use of glycerol-preserved cadaver skin. *Burns* 1995; 5; 356-361.

- * Euro Skin Bank, Beverwijk
- ** Macfarlane Burnet Centre for Medical Research, AIDS Pathogenesis Unit, Melbourne, Australië
- *** Royal Melbourne Institute of Technology, Melbourne, Australië
- **** Nederlandse Brandwonden Stichting, Brandwondencentrum Rode Kruis Ziekenhuis, Beverwijk

Correspondentieadres:
Drs. Jeroen van Baare, Euro Skin Bank, Postbus 1015, 1940 EA Beverwijk; e-mail: vanbaare@wxs.nl