



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A multidirectional approach to optimize morphogenesis and barrier characteristics of human skin equivalents

Mieremet, A.

Citation

Mieremet, A. (2019, November 14). *A multidirectional approach to optimize morphogenesis and barrier characteristics of human skin equivalents*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/80612>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/80612>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/80612> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Mieremet, A.

Title: A multidirectional approach to optimize morphogenesis and barrier characteristics of human skin equivalents

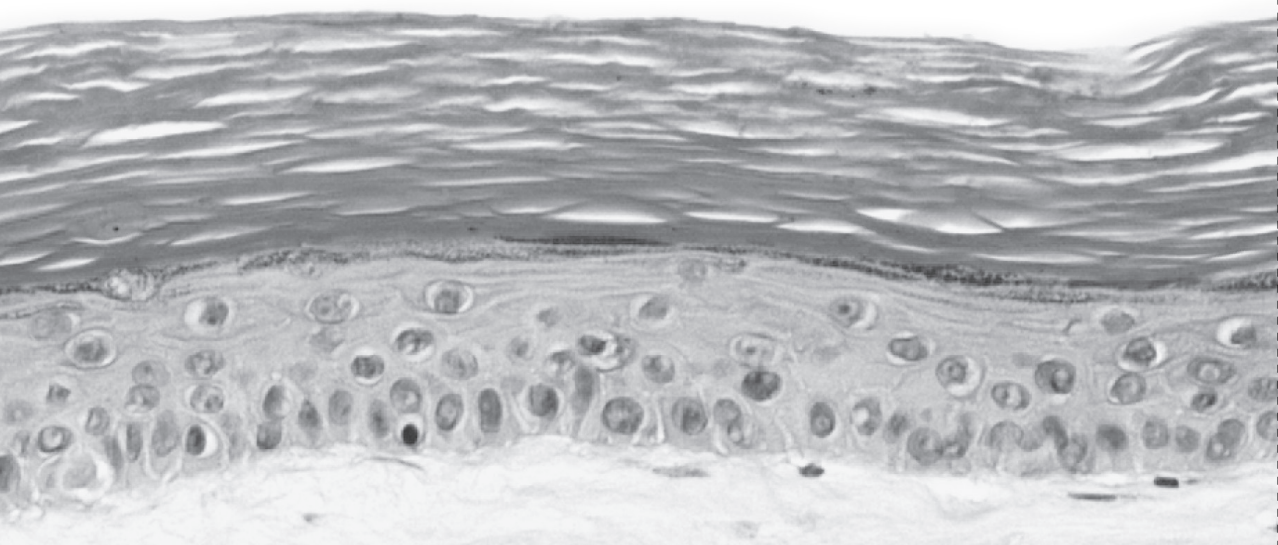
Issue Date: 2019-11-14

11

**Nederlandstalige samenvatting
(Dutch Summary)**

Curriculum Vitte

List of Publications



NEDERLANDSTALIGE SAMENVATTING

De huid

De huid is het grootste orgaan van het lichaam. Ondanks dat het een relatief dunne beschermlaag is, heeft het vele belangrijke functies. Dit zijn onder andere het beschermen van het lichaam tegen micro-organismen of allergenen, en het voorkomen van warmteverlies en uitdroging [1].

Barrière van de humane huid

De huid is opgebouwd uit drie verschillende lagen. Van binnen naar buiten zijn dit: het onderhuids vetweefsel, de lederhuid (dermis), en de opperhuid (epidermis) (**figuur 1 a**). Het onderhuids vetweefsel en de dermis zijn belangrijk voor de vitaliteit van de opperhuid. Deze zorgen namelijk voor het transport van voldoende voedingsstoffen naar de epidermis, het afvoeren van afvalstoffen uit de epidermis, en de communicatie met andere organen in het lichaam. In de dermis zijn de fibroblasten de belangrijkste en meest voorkomende cellen. De eiwitten van het extracellulaire matrix (ECM) vormen een groot en belangrijk component van deze laag [2]. Tussen de dermis en epidermis bevindt zich het basaalmembraan. De epidermis, die voornamelijk uit keratinocyten bestaat, vormt de belangrijkste barrière van de huid en is opgebouwd uit vier epidermale lagen zoals weergegeven in **figuur 1 b**. De onderste epidermale laag is het *STRATUM BASALE* (de basale cellaag), waar de celdeling oftewel de proliferatie plaatsvindt. De proliferatie van de huid is sterk gereguleerd, omdat de huid zich continue moet vernieuwen om de afschilfering van dode huidcellen aan het oppervlakte te compenseren [3]. De tweede laag is het *STRATUM SPINOSUM*, waarin de keratinocyten beginnen met het differentiatieproces [4]. Deze differentiatie zet zich voort in het *STRATUM GRANULOSUM*. Karakteristiek voor deze epidermale laag is de aanwezigheid van granulen en lamellaire bodies [5]. Deze bevatten verschillende lipiden die belangrijk zijn voor de vorming van de buitenste, verhoorde laag van de huid, het *STRATUM CORNEUM*. Deze epidermale laag is het eindproduct van het differentiatieproces. Aan het huidoppervlakte schilferen de verhoorden huidcellen af, wat gecompenseerd wordt met de vorming van een nieuwe cellaag in het *STRATUM CORNEUM*. Daarnaast bevat de huid ook haarvaten, zweetklieren en talgklieren, maar deze dragen minder bij aan de huidbarrière.

Het *STRATUM CORNEUM* (afgekort tot SC) vormt veruit de sterkste barrière van de huid. De structuur van het SC kan vergeleken worden met een bakstenen muur, waar de corneocyten de bakstenen, en de lipiden het cement voorstellen [6, 7]. Dit betekent dat de corneocyten worden omsloten door een matrix van lipiden (**figuur 1 c**). De lipiden matrix vormt een unieke en aaneengesloten structuur in het SC [8]. Dit is van belang voor het transport van geneesmiddelen door het SC die in een pleister, crème of zalf op de huid worden aangebracht.

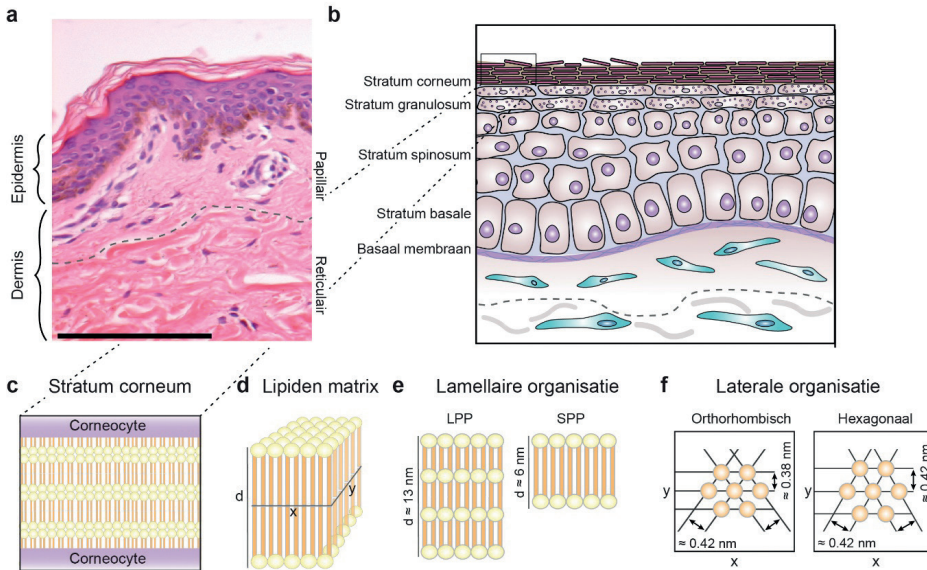
De lipiden in het SC zijn zeer regelmatig gerangschikt (**figuur 1 d**) [9]. Ten eerste vormen de lipiden op elkaar gestapelde lagen. Deze structuur herhaalt zich over een bepaalde lengte, wat de repetitie afstand wordt genoemd. De stapeling van de lipiden wordt de lamellaire fase genoemd (**figuur 1 e**). In het SC zijn er twee verschillende lamellaire fasen, namelijk de lange periodiciteit fase (LPP) en de korte periodiciteit fase (SPP). Ten tweede vormen de lipiden een organisatie met een bepaalde dichtheid, wat de laterale organisatie wordt genoemd (**figuur 1 f**). Er zijn drie soorten structuren, welke variëren van een zeer dichte structuur naar een minder dichte structuur. Dit zijn de orthorhombische, hexagonale en de vloeibare laterale organisatie. Wetenschappelijke studies hebben aangetoond dat de functionaliteit van de huidbarrière afhankelijk is van de laterale en de lamellaire organisatie, die op hun beurt worden beïnvloed door de samenstelling van de lipiden [10].

De samenstelling van lipiden is onderverdeeld in hoofd- en subklassen [11]. De drie hoofdklassen zijn de ceramiden, de vrije vetzuren en het cholesterol. Deze hoofdklassen zijn aanwezig in ongeveer een gelijke molaire verhouding (**figuur 1 g**). De molecuulstructuur van ceramiden bestaat uit een sphingoïde base gekoppeld aan een vetzuurketen. Omdat er verschillende typen sphingoïde basen en vetzuurketens zijn, bestaan er ook meerdere ceramide subklassen [12]. De vijftien meest voorkomende ceramide subklassen staan weergegeven in **figuur 1 g**. Daarnaast kan ook het aantal koolstofatomen variëren in zowel de sphingoïde base als in de vetzuurketen. Ook kunnen de koolstofketens dubbele bindingen bevatten, wat de mate van (on)verzadigdheid in de ceramiden bepaald. Dit resulteert in een groot aantal structuren binnen een ceramide subklasse. In de tweede belangrijke klasse, de vrije vetzuren, kunnen zowel het aantal koolstofatomen en de hoeveelheid aan dubbele bindingen variëren, wat resulteert in ruwweg drie verschillende vrije vetzuur subklassen (**figuur 1 g**).

Humane huidequivalenten

Humane huidequivalenten zijn de meest geavanceerde modellen van de humane huid (**figuur 1 h**). Ze lijken in veel aspecten op de humane huid en worden daarom voor een groot aantal toepassingen ingezet [14-19]. Voor fundamenteel onderzoek worden humane huidequivalenten gebruikt om de fysiologie en pathofysiologie van de huid (bijv. wondgenezing, huidveroudering, atopisch eczeem, psoriasis, huidkanker) beter te begrijpen [20, 21]. Ook kunnen ze ingezet worden voor preklinische studies om bijvoorbeeld nieuwe medicijnen te ontwikkelen en te testen. Daarnaast worden humane huidequivalenten ook gebruikt voor het testen van nieuwe cosmetica ingrediënten en het bepalen van het bijtend of irriterend vermogen van bepaalde chemicaliën. Tevens worden humane huidequivalenten gebruikt voor het vaststellen van de huidgevoeligheid voor sommige industriële materialen [22, 23].

Humane huid



Figuur 1 Aspecten van de morfologie en de lipiden barrière in de normale humane huid en in het humane huidequivalent. (a) Doorsnede van de humane huid. (b) Illustratie van de humane huid. De epidermale lagen, het basaalmembraan en de dermis zijn weergegeven. (c) Afbeelding van de lipiden matrix in het STRATUM CORNEUM (SC). (d) Driedimensionale structuur van de lipiden matrix. De gele cirkels geven de hydrofiële regionen weer en de oranje cilinders geven de hydrofobe regionen weer. (e) Schematische voorstelling van de lamellaire organisatie. De lange periodiciteit fase (LPP) en de korte periodiciteit fase (SPP) zijn weergegeven. (f) Laterale organisatie van de lipiden in het SC. De lipiden kunnen de meest compacte orthorhombische of de compacte hexagonale organisatie vormen.

Er zijn een aantal soorten humane huidequivalenten ontwikkeld, waaronder de humane huidequivalenten van de Universiteit Leiden. Daarnaast worden ook verschillende humane huidequivalenten commercieel aangeboden. De verschillende soorten humane huidequivalenten zijn het epidermale model, het “full-thickness model” (FTM) bestaande uit een dermis en epidermis, en de geavanceerde humane huidequivalenten welke nog een extra celtype bevatten. Humane huidequivalenten bootsen veel eigenschappen van de humane huid nauwkeurig na, zoals de aanwezigheid van de vier epidermale lagen, de vorming van het basaalmembraan, en de aanwezigheid van fibroblasten met bijbehorend ECM-eiwitten in de dermis (**figuur 1 i**). De SC lipiden in de humane huidequivalenten bestaan ook uit ceramiden, vrije vetzuren en cholesterol, wat leidt tot de vorming van lamellaire structuren [24]. Echter, er zijn ook verschillen tussen de humane huid en de humane huidequivalenten. Morfologisch gezien bevatten de humane huidequivalenten geen golvende structuren tussen de epidermis en dermis, is de celdeling verhoogd, bevinden de keratinocyten zich

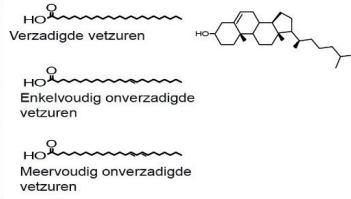
g Lipiden samenstelling

Ceramiden

	CER(non-EO)		CER[EO]	CER[O]
	Non-hydroxy vetzuur [N]	α -hydroxy vetzuur [A]	Esterificeerd ω -hydroxy vetzuur [EO]	ω -hydroxy vetzuur [O]
Dihydrosphingosine [dS]	[NdS]	[AdS]	[EOdS]	
Sphingosine [S]	[NS]	[AS]	[EOS]	[OS]
Phytosphingosine [P]	[NP]	[AP]	[EOP]	[OP]
6-hydroxy sphingosine [H]	[NH]	[AH]	[EOH]	[OH]

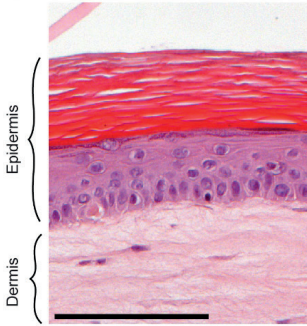
Vrije vetzuren

Cholesterol

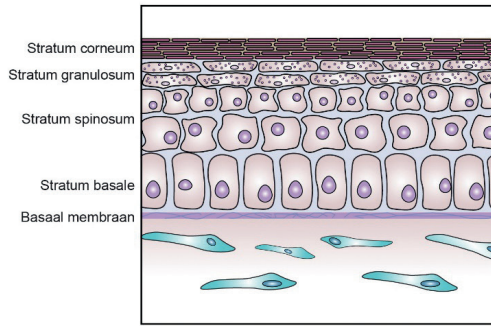


Humane huidequivalent

h



i



Figuur 1 Vervolg. (g) Samenstelling van de lipiden matrix met de hoofdklassen bestaande uit ceramiden, vrije vetzuren en het cholesterol. De ceramiden bestaan uit verschillende subklassen, weergegeven in een tabel op basis van de naamgeving volgens Motta *et al.* [13]. Structuurformules van de vrije vetzuren en het cholesterol zijn weergegeven. (h) Doorsnede van het humane huidequivalent. (i) Illustratie van het humane huidequivalent. Epidermale lagen, het basaalmembraan en de dermis zijn geïllustreerd. Schaal: 100 μ m.

in een geactiveerde staat en zijn de cellen van het *STRATUM GRANULOSUM* groter. Daarnaast functioneert de barrière van het humane huidequivalent niet zoals die van de humane huid. Uit recent onderzoek blijkt dat er verschillen zijn in de lipiden samenstelling en organisatie tussen de humane huidequivalenten en de humane huid [25, 26]. Dit betreft het profiel van de ceramide subklassen, een verhoogde aanwezigheid van ceramiden met korte koolstofketens, de verlaagde aanwezigheid van ceramiden met lange koolstofketens, en een verhoogde hoeveelheid ceramiden en vrije vetzuren met een enkelvoudig onverzadigde binding. Dit resulteert in een afwijkende lipidenorganisatie in het SC van humane huidequivalenten. De lipiden vormen een LPP met een kortere repetitie afstand, vormen geen SPP, en vormen voornamelijk de hexagonale laterale organisatie, in tegenstelling tot een orthorhombische laterale organisatie in het SC van de natieve humane huid. Deze veranderingen dragen bij aan een verminderde barrièrefunctie en dus een verhoogde diffusie van therapeutische moleculen door het SC en een verhoogd waterverlies. Dit kan mogelijk leiden tot misinterpretatie

van data tussen de humane huidequivalenten en de humane huid, wat kan leiden tot onder- of overschatting van therapeutische doseringen of toxiciteit van chemicaliën.

Doelstellingen

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is om de epidermale morfogenese en barrière vorming van de humane huidequivalenten te verbeteren, waardoor de barrière van de humane huid beter wordt nagebootst. In de beschreven studies worden geavanceerde technieken gebruikt om zowel de dermale als de epidermale morfogenese, SC lipiden samenstelling en organisatie, en functionaliteit van de barrière te onderzoeken. De doelstellingen van dit proefschrift zijn:

- a) Onderzoeken of de dermale ECM de epidermale lipiden barrière kan beïnvloeden.
- b) De celkweekcondities aanpassen met als doel de vorming van de lipiden huidbarrière tijdens het produceren van de humane huidequivalenten te verbeteren.
- c) Gebaseerd op de uitkomsten van de voorgaande studies, de ontwikkeling van humane huidequivalenten waarin de verbeterde kweekcondities en optimale ECM leiden tot een verbeterde huid barrièrefunctie.

Deel I Optimalisatie van de dermale extracellulaire matrix in humane huidequivalenten

In deel I van het proefschrift zijn studies beschreven die geassocieerd zijn met de eerste doelstelling: “onderzoeken of de dermale ECM de epidermale lipiden barrière kan beïnvloeden”. Het dermale compartiment van het FTM bestaat uit een collageen type I/III matrix waarin zich fibroblasten bevinden. Dit type ECM wordt vaak toegepast tijdens het kweken van orgaanmodellen, maar heeft een aantal nadelen waaronder de afkomst vanuit dierlijk materiaal en het ongecontroleerd krimpen van het collageen.

In **hoofdstuk 2** wordt het FTM (met collageen geïsoleerd uit rattenstaarten) vergeleken met een nieuw FTM, welke ontwikkeld is met humaan collageen in de dermis. Om dit te bewerkstelligen is een methode ontwikkeld om het humane collageen te isoleren. Vervolgens is dit collageen succesvol gebruikt voor de ontwikkeling van het humaan collageen full-thickness model (hC-FTM). Het nieuwe hC-FTM bevat een dermale matrix welke grote gelijkenissen vertoonde met die van het FTM. De morfologie, lipiden samenstelling, en lipiden organisatie waren vergelijkbaar met het FTM. Het ontwikkelde hC-FTM is daardoor een beter alternatief voor dierproeven dan het FTM, aangezien er geen dierlijk materiaal gebruikt wordt.

In **hoofdstuk 3** is een studie beschreven waarin het collageen (geïsoleerd uit rattenstaarten) gemengd wordt met het biopolymeer chitosan. Hierdoor is een nieuw type FTM ontwikkeld, welke het collageen-chitosan full thickness model (CC-FTM) is genoemd. In het CC-FTM was de verdeling van de fibroblasten en het genereren van het basaalmembraan niet verstoord door de aanwezigheid van chitosan. De epidermale morfogenese van het CC-FTM vertoonde grote gelijkenissen met die van de humane huid. Dit manifesteerde zich in een dunnere epidermis, normalisatie in celdeling en afwezigheid van een geactiveerde epidermis. De samenstelling van de ceramiden in het SC werd ook onderzocht. Zowel de ceramide koolstofketenlengte verdeling als de ceramide subklasse samenstelling leken meer op die van de humane huid in het CC-FTM dan in het FTM. Als gevolg van de verbetering in de lipiden samenstelling was ook de lipiden organisatie verbeterd en was het waterverlies door de huid verminderd, een aanwijzing dat de barrière functionaliteit in het CC-FTM is verbeterd.

Samenvattend, de studies beschreven in deel I laten zien dat de samenstelling van de dermis een belangrijke rol speelt in de epidermale morfogenese en barrière vorming van FTMs.

Deel II Optimalisatie van de celkweekcondities in humane huidequivalenten

In deel II staan studies beschreven die betrekking hebben op de tweede doelstelling: “de celkweekcondities aanpassen met als doel de vorming van de lipiden huidbarrière tijdens het produceren van de humane huidequivalenten te verbeteren”. In deze studies is er steeds één factor van de celkweekconditie gevarieerd tijdens het kweken van FTMs, om zo inzicht te verkrijgen in de bijdrage van elke specifieke parameter.

In **hoofdstuk 4** staan experimenten beschreven waarin de temperatuur tijdens de celkweek wordt onderzocht. De FTMs werden gekweekt bij lichaamstemperatuur (37°C) en bij lagere temperaturen, die beter de temperatuur van het huidoppervlak benaderden (35°C en 33°C). De FTMs werden geanalyseerd op morfologische eigenschappen en op lipiden en de daarmee samenhangende barrière karakteristieken tijdens een periode van vier weken. Een verlaging van temperatuur van 37°C naar 35°C leidde niet tot substantiële veranderingen. Echter, een verlaging van 37°C naar 33°C leidde tot een verandering in de epidermale morfogenese, wat zich manifesteerde in een dikkere epidermis, slechtere organisatie in de lagere epidermale lagen, en een verdikking van de granulaire cellen. Tevens werden kleine veranderingen in de samenstelling van de SC lipiden gevonden. De effecten van een verlaagde temperatuur waren vergelijkbaar na twee en na vier weken kweken, alhoewel het SC aanzienlijk dikker was na een langere celkweekperiode. Uit de resultaten van deze studie blijkt dat de temperatuur, een

invloed heeft op de morfogenetische eigenschappen en op de SC lipiden barrière vorming van het FTM.

Een andere belangrijke celkweekconditie is het zuurstofgehalte, wat beschreven staat in **hoofdstuk 5**. Om de invloed van het zuurstofgehalte op de morfogenese en SC lipiden van het FTM te onderzoeken, zijn 2D (monokweken van keratinocyten) en 3D (FTM) modellen geproduceerd met een zuurstofgehalte van 20% (normoxie, normale kweekconditie) of met een zuurstofgehalte van 3% (hypoxie). In de 2D en 3D modellen die gekweekt werden bij 3% zuurstof was het “hypoxia-inducible factor” (HIF) signaaltransductie mechanisme sterk geactiveerd. Dit werd aangetoond door een verhoogde expressie van een aantal genen die een belangrijke rol spelen in het metabolisme, waaronder pyruvaat dehydrogenase kinase (PDK-1), glucose transporter 1 (GLUT1), en vasculair endotheel groeifactor A (VEGFA). In het FTM geproduceerd met 3% zuurstof zijn er verbeteringen in de morfologie aangetoond, waardoor dit beter de humane huid nabootst. Deze veranderingen zijn de afname in dikte van de epidermis, reductie in celdeling, en een verbeterde structuur van de granulaire cellen. De samenstelling van SC lipiden was ook verbeterd en benaderde de ceramide samenstelling in humane huid beter. De studie die beschreven staat in **hoofdstuk 5** laat zien dat een lager zuurstofgehalte een positieve invloed heeft op de ontwikkeling van het FTM.

De invloed van relatieve luchtvochtigheid op de morfogenetische eigenschappen en lipidenbarrière karakteristieken van FTMs staat beschreven in **hoofdstuk 6**. Om dit te onderzoeken werden FTMs en CC-FTMs gekweekt bij een relatief luchtvochtigheidsgehalte van 90% en 60%. De morfologische eigenschappen werden het meest beïnvloed door een verlaging in relatieve luchtvochtigheid. De cellen van het *STRATUM GRANULOSUM* zijn vergroot, en de epidermis is meer geactiveerd. Een verandering van het relatieve luchtvochtigheidsgehalte leidde niet tot substantiële veranderingen in de lipidenbarrière karakteristieken van FTMs noch van CC-FTMs.

In **hoofdstuk 7** is een studie beschreven wat zich richtte op het effect van de afwezigheid van zonlicht tijdens het kweken van FTMs. Een van de belangrijkste effecten van zonlicht op de huid is de activatie van vitamine D. Om dit effect te imiteren werden FTMs geproduceerd met celkweekmedium wat verrijkt werd met een actieve vorm van vitamine D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). Deze toevoeging leidde tot activatie van het vitamine D signaaltransductie mechanisme in 2D en 3D modellen, waaronder een verhoogde expressie van een antibacterieel peptide (LL37). De toevoeging van $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ had geen invloed op de morfogenese, de ceramide subklassen samenstelling en de ceramide koolstofketenlengte verdeling. Directe blootstelling van FTMs aan ultraviolet licht (UV) veranderde de morfologie en ceramiden samenstelling niet, alhoewel blootstelling aan een

hoge dosering UV-licht apoptose van de keratinocyten veroorzaakte. Hieruit blijkt dat een gebrek in blootstelling aan UV-licht in FTMs niet leidt tot een verandering in de barrière vorming van de huid.

Samenvattend, uit de studies in deel II blijkt dat een verandering in celkweekcondities direct de morfogenetische eigenschappen en lipiden barrière karakteristieken van FTMs kan beïnvloeden. De meest optimale omstandigheden voor de productie van FTMs de humane huid het best nabootsen zijn een temperatuur van 37°C, een zuurstofgehalte van 3%, en een luchtvochtigheidsgehalte van 90%. Optioneel kan er ook voor specifieke vraagstukken $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ toegevoegd worden aan het celkweekmedium.

Deel III Meervoudige combinaties om humane huidequivalenten te verbeteren

In deel III staan studies beschreven die geassocieerd zijn met de derde doelstelling: “Gebaseerd op de uitkomsten van de voorgaande studies, de ontwikkeling van humane huidequivalenten waarin de verbeterde kweekcondities en optimale ECM leiden tot een verbeterde huid barrièrefunctie”. Om dit te realiseren is in hoofdstuk 8 de toevoeging van vrije vetzuren aan het celkweekmedium onderzocht. Vervolgens zijn in hoofdstuk 9 meervoudige veranderingen in kweekcondities gekozen om de optimale combinatie van het dermale ECM, de celkweekcondities, en het celkweekmedium te identificeren.

De studie beschreven in **hoofdstuk 8** richtte zich op de optimalisatie van de concentratie van het verzadigde vrije vetzuur palmitinezuur. In het onderzoek werd de concentratie van palmitinezuur (25 μM) verlaagd tot 10% en 1% van de originele hoeveelheid. In het FTM dat werd ontwikkeld met 1% palmitinezuur werden veranderingen in morfologie gevonden, waaronder een slechtere organisatie van de lagere epidermale lagen en een verhoging van de epidermale activatie. De samenstelling van de ceramiden en vrije vetzuren werd onderzocht. Deze werd niet beïnvloed door de hoeveelheid palmitinezuur in het medium. Tevens werd de absolute hoeveelheid ceramiden en vetzuren in de natieve humane huid en het FTM bepaald. Er werd een lagere absolute hoeveelheid vrije vetzuren in het SC van het FTM gevonden dan in het SC van de humane huid. Concluderend, deze studie toont aan dat de huidige toevoeging van vrije vetzuren aan het celkweekmedium adequaat de morfogenese en lipiden barrière vorming in het FTM ondersteunt.

Uit de voorgaande studies wordt een combinatie van veranderde kweekcondities gekozen, met als doel een FTM te ontwikkelen met een verbeterde morfologie en barrièrefunctie. Deze studie is beschreven in **hoofdstuk 9**. De veranderde kweekcondities zijn i) het modifieren van het dermale ECM met chitosan (hoofdstuk 3), ii) kweken met 3% zuurstof (hoofdstuk 5), en iii) het inhiberen

van de nucleaire receptor “liver X-receptor” (LXR) zoals beschreven door Helder *et al.* (nog niet gepubliceerd). Enkele combinaties van veranderde kweekcondities leiden tot een verdere verbetering van de morfogenese en lipidsamenstelling in het FTM waardoor de FTMs beter de eigenschappen van de humane huid nabootst. In meer detail zijn dit een vermindering in epidermale activatie, een lagere hoeveelheid van enkelvoudig onverzadigde ceramiden in het SC en een grotere fractie lipiden die een orthorhombische laterale organisatie vormen in het SC. Dit resulteerde in een verbetering in de barrière functionaliteit. Het CC-FTM gekweekt met inhibitie van de LXR imiteert de humane huid het beste. Dit type humane huidequivalent heeft daarom ook de grootste potentie voor toepassingen in studies naar nieuwe medicijnen die worden toegediend via de huid.

Kortom, de studies beschreven in deel III bevestigen het belang van een gebalanceerd celkweekmedium met een juiste hoeveelheid toegevoegde vrije vetzuren. Daarnaast is een combinatie van verbeterde celkweekcondities met een geoptimaliseerd celkweekmedium van cruciaal belang voor het creëren van humane huidequivalenten welke de humane huid het beste nabootsen. De nieuwe inzichten die in deel III zijn verkregen tonen ook de complexiteit aan van de optimalisatie van een *in vitro* gevormde kweekhuid. Een optimalisatie strategie waarbij verschillende factoren gecombineerd worden is een veelbelovende onderzoeksmethode, wat heeft geleid tot de ontwikkeling van humane huidequivalenten met verbeterde morfologie en lipide barrière eigenschappen.

Conclusies

In dit proefschrift worden studies beschreven met als doel een humane huidequivalent te ontwikkelen die beter de natieve humane huid nabootst. Dit resulteerde in humane huidequivalenten met een: veranderde dermale ECM, beter afgestemde celkweekcondities, en optimale combinatie van dermale ECM en kweekcondities. Uit deze studies blijkt dat verbeterde kweekcondities de morfologie en lipide barrière vorming in het humane huidequivalent verder kunnen verbeteren. Uit de studies blijkt ook de enorme complexiteit in de ontwikkeling van het humane huidequivalent en dat de verschillende cellulaire processen die hierbij betrokken zijn elkaar beïnvloeden. Belangrijke stappen zijn gezet in het begrijpen van deze processen en welke factoren een belangrijk rol spelen in de barrière vorming van lipiden. Het humane huidequivalent die het beste de humane huid nabootst betreffende de morfologie en lipide barrière vorming is het CC-FTM waarin de LXR werd geremd.

Referenties

1. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.M. Jensen, The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 2008. 17(12): p. 1063-1072.
2. Eckes, B., T. Krieg, and C.M. Niessen, *Biology of the Skin, in Therapy of Skin Diseases: A Worldwide Perspective on Therapeutic Approaches and Their Molecular Basis*. 2010, Springer: Berlin, Heidelberg, Germany. p. 3-14.
3. Blanpain, C. and E. Fuchs, Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009. 10: p. 207-217.
4. Simpson, C.L., D.M. Patel, and K.J. Green, Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2011. 12: p. 565.
5. Menon, G.K., S.E. Lee, and S.-H. Lee, An overview of epidermal lamellar bodies: Novel roles in biological adaptations and secondary barriers. *Journal of Dermatological Science*, 2018. 92(1): p. 10-17.
6. Michaels, A., S. Chandrasekaran, and J. Shaw, Drug permeation through human skin: theory and in vitro experimental measurement. *AICHE Journal*, 1975. 21(5): p. 985-996.
7. Elias, P.M., Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *Journal of Investigative Dermatology*, 1983. 80: p. S44-S49.
8. Bouwstra, J.A. and M. Ponec, The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2006. 1758(12): p. 2080-2095.
9. Boncheva, M., The physical chemistry of the stratum corneum lipids. *International Journal of Cosmetic Science*, 2014. 36(6): p. 505-515.
10. Bouwstra, J.A. and G.S. Gooris, The lipid organisation in human stratum corneum and model systems. *The Open Dermatology Journal*, 2010. 4(1): p. 10-13.
11. van Smeden, J., et al., The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014. 1841(3): p. 295-313.
12. Kihara, A., Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Progress in lipid research*, 2016. 63: p. 50-69.
13. Motta, S., et al., Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1993. 1182(2): p. 147-151.
14. Planz, V., C.-M. Lehr, and M. Windbergs, In vitro models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2016. 242: p. 89-104.
15. Mathes, S.H., H. Ruffner, and U. Graf-Hausner, The use of skin models in drug development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2014. 69-70: p. 81-102.
16. Yun, Y.E., et al., Artificial skin models for animal-free testing. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 2018: p. 1-9.
17. Groeber, F., et al., Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2011. 63(4): p. 352-366.
18. Niehues, H., et al., 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Experimental Dermatology*, 2018: p. 501-511.
19. Rademacher, F., et al., Skin microbiota and human 3D skin models. *Experimental Dermatology*, 2018. 27(5): p. 489-494.
20. MacNeil, S., Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 2007. 445: p. 874.
21. van Drongelen, V., et al., Reduced flaggrin expression is accompanied by increased *Staphylococcus aureus* colonization of epidermal skin models. 2014. 44(12): p. 1515-1524.
22. Gordon, S., et al., Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology. *Alternatives to Animal Experimentation: ALTEX* 2015. 32(4): p. 327-378.
23. Bergers, L., et al., Immune-competent human skin disease models. *Drug Discov Today*, 2016. 21(9): p. 1479-1488.
24. Ponec, M., et al., Barrier function in reconstructed epidermis and its resemblance to native human skin. *Skin Pharmacology Physiology*, 2001. 14(Suppl. 1): p. 63-71.
25. Thakoersing, V.S., et al., Increased presence of monounsaturated fatty acids in the stratum corneum of human skin equivalents. *Journal of Investigative Dermatology*, 2013. 133(1): p. 59-67.
26. Thakoersing, V.S., et al., Unraveling barrier properties of three different in-house human skin equivalents. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 2011. 18(1): p. 1-11.