



PDF Complete

Your complimentary use period has ended. Thank you for using PDF Complete.

Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features



¹ Universitätsklinikum des Saarlandes, Klinik für Augenheilkunde, Homburg/Saar, Deutschland

² Universität Wuhan, Klinik für Augenheilkunde, Wuhan, China

³ Universität des Saarlandes, Experimentelle Ophthalmologie, Homburg/Saar, Deutschland

⁴ Universität des Saarlandes, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Homburg/Saar, Deutschland

⁵ Technische Universität Kaiserslautern, Fachbereich Physik, Kaiserslautern, Deutschland



Klinik für Augenheilkunde
Universitätsklinikum des Saarlandes UKS, Homburg/Saar
 Direktor: Prof. Dr. Berthold Seitz, ML, FEBO

Einleitung: Die Photodynamische Inaktivierung (PDI) stellt eine potentielle Alternative zur Behandlung einer therapieresistenten infektiösen Keratitis dar ^{1, 2}. Die Wirkung der PDI basiert auf der Kombination eines von einer bestimmten Wellenlänge angeregten Photosensibilisators und des dadurch resultierenden Zelltodes durch freie Sauerstoffradikale.

In früheren Studien haben wir bereits die Wirkung des Photosensibilisators Chlorine e6 (Ce6) auf humane Keratozyten in der Zellkultur getestet ^{3, 4}. Dabei konnten wir 24 Stunden nach der Bestrahlung eine erniedrigte Vitalität ab einer Konzentration von 100 nM Ce6, eine gesteigerte Expression von CD34 ab 150 nM Ce6, sowie einen Anstieg der Apoptoserate und eine Absenkung der Bildung von α -smooth-muscle-actin ab 250 nM Ce6 nachweisen.

FGFb ist ebenso wie KGF und VEGF ein Angiogenesemarker ⁵. KGF wird als wichtiger Mediator von stromalen und epithelialen Interaktionen charakterisiert ⁶⁻⁸. Darüber hinaus gelten FGFb, HGF, KGF und insbesondere TGF 1 als wichtige Faktoren in der Wundheilung der Hornhaut und der Differenzierung von Keratozyten in Myofibroblasten ⁹. In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Wirkung der PDI unter Verwendung des Photosensibilisators Ce6 auf die Sekretion von FGFb, HGF, KGF, TGF 1 und VEGF bezüglich der Zellaktivierung und inflammatorischer Immunantwort humaner Keratozyten *in vitro*.

Methode: Humane primäre Keratozyten (HPK) wurden aus Hornhäuten der LIONS Hornhautbank Saar-Lor-Lux Trier/Westpfalz wie beschrieben isoliert ¹⁰. Die Keratozyten wurden in DMEM/Ham's F12 (angereichert mit 10% FCS) kultiviert. Die Charakterisierung erfolgte anhand der Morphologie ¹¹ und des Nachweises von Fibronectin (Durchflusszytometrie) ¹². Die HPK wurden mit Ce6 in den Konzentrationen von 0 nM und 100 nM für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit einer Wellenlänge von 670 nm für 13 Minuten bestrahlt. 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde die Sekretion von FGFb, HGF, KGF, TGF 1 und VEGF mit einem Enzyme linked immuno absorbent assay (ELISA) photometrisch analysiert, basierend auf dem Nachweis entsprechender Proteine durch spezifische Antikörper welche mit einem Substrat gekoppelt sind. In Abhängigkeit ihrer Bindung wird das Substrat umgesetzt und ein Farbumschlag hervorgerufen. Die Konzentration der Wachstumsfaktoren wurde zur Standardisierung auf den Proteingehalt der Zellen bezogen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bradford-Assay.

Ergebnisse: Die Sekretion von FGFb sank 24 Stunden nach der Behandlung von 3,55 pg/μg Protein auf 1,58 pg/μg Protein ($p=0,01$) (Abbildung). Bei HGF, TGF 1 und VEGF konnten keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrolle ohne Ce6 und ohne Bestrahlung nachgewiesen werden. Signifikante Veränderungen ergaben sich bei den bestrahlten Proben ohne Ce6 bei FGFb (2,7 pg/μg Protein), TGF 1 (1,98 pg/μg Protein), und VEGF (5,95 pg/μg Protein) und mit 100 nM Ce6 bei FGFb (1,58 pg/μg Protein), TGF 1 (2,83 pg/μg Protein) und VEGF (9,01 pg/μg Protein). Eine Sekretion von KGF konnte aus dem Zellkulturüberstand nicht nachgewiesen werden.

Potentielle Interessenkonflikte:

1. nein, 2. nein, 3. nein, 4. J. Wang: China Scholarship Council, N. Szentmáry: Stipendium der Alexander von Humboldt Stiftung, Zentrales Innovationsprogramm Mittelstand (ZIM) Nr. KF215004MD0 5. nein

Bestrahlung (PDI) auf die Sekretion von FGFb, HGF, KGF, TGF 1 und VEGF durch humane Keratozyten in der Zellkultur

Eppig ³, A. Langenbacher ³, M. Bischoff ⁴, H.-J. Foth ⁵
 Berthold Seitz ¹, Nóra Szentmáry ¹

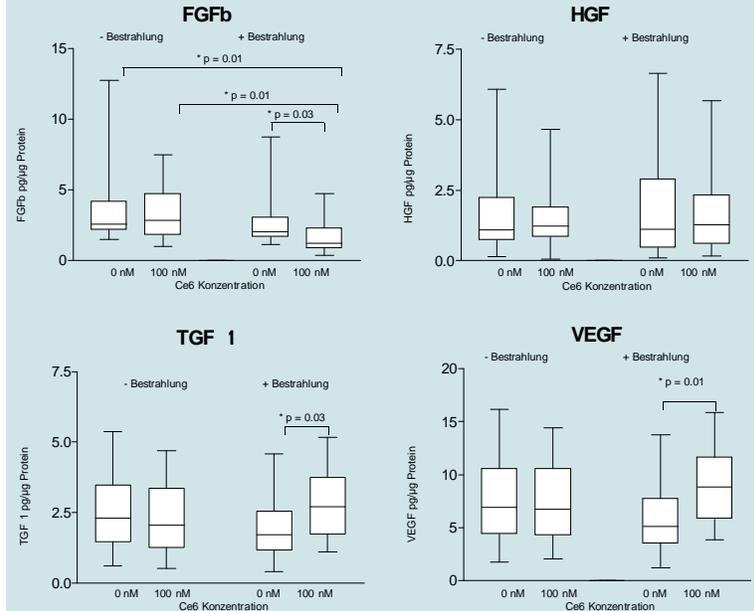


Abbildung: Sekretion von FGFb, HGF, TGF 1, und VEGF durch humane Keratozyten in der Zellkultur, 24 Stunden nach PDI mit Ce6 (ohne / mit Bestrahlung, n=5).

Schlussfolgerung: 24 Stunden nach PDI geht die Abnahme der FGFb Sekretion mit einer erniedrigten Vitalität einher, aber eine Veränderung der Sekretion von HGF, TGF 1 und VEGF ist bei einer Ce6 Konzentration von 100 nM nicht nachweisbar. Um die Wirkung der PDI auf die korneale Wundheilung und der Angiogenese insbesondere bei einer infektiösen Keratitis besser zu verstehen, müssen weitere Experimente *in vitro* durchgeführt werden.

Literatur

- Makdoui K, Mortensen J, Craford S. Infectious keratitis treated with corneal crosslinking. *Cornea* 2010; 29: 1353-8.
- Szentmáry N, Goebels S, Bischoff M, Seitz B. Photodynamic therapy of infectious keratitis. *Ophthalmologie* 2012; 109: 165-170.
- Szentmáry N, Stachon T, Wang J, Eppig T, Langenbacher A, Seitz B. Photodynamic inactivation (PDI) triggers expression of haemopoietic stem cell marker CD34 of keratocytes. ARVO 2012, Poster No: 1078/A114.
- Wang J, Stachon T, Eppig T, Langenbacher A, Seitz B, Szentmáry N. Impact of photodynamic inactivation (PDI) on viability, apoptosis and proliferation of human keratocytes *in vitro*. ARVO 2012, Poster No:140/A128.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: Basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25: 581-611.
- Wilson SE, Wenig J, Chwang EL, Leitch AM, Shay JW. Hepatocyte growth factor (HGF), keratinocyte growth factor (KGF), and their receptors in human breast cancer cells and tissues: Alternative receptors. *Cell Mol Biol Res* 1994; 40: 337-350.
- Wilson SE, He YG, Wenig J, Zieske JD, Jester JV, Schultz GS. Effect of epidermal growth factor, hepatocyte growth factor and keratinocyte growth factor on proliferation, motility and differentiation of human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 1994; 59: 665-678.
- Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1989; 86: 802-806.
- Jester JV, Petroll WM, Barry PA, Cavanagh HD. Expression of alpha-smooth muscle (alpha-SM) actin during corneal stromal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 809-819.
- Cubott CL, Tanq Q, Monteiro CA, Lausch RN, Oakes JE. IL-8 Gene expression in cultures of human corneal epithelial cells and keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 3199-3206.
- Seitz B, Hayashi S, Wee WR, LaBree L, McDonnell PJ. In vitro effects of aminoglycosides and fluoroquinolones on keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 656-665.
- Cook SD, Aitken DA, Brown SM. Growth and characterization of rabbit corneal cells *in vitro*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987; 225: 351-6.