

In vitro functionaliteitstest van serum oogdruppels

**Jos Lorinser¹, Stéphanie Groot¹,
Anne-Marieke D. van Stalborch², Jaap D. van Buul²,
Pieter F. van der Meer¹, Dirk de Korte¹**

- 1. Sanquin Bloedbank, Product- en Procesontwikkeling, Amsterdam**
- 2. Sanquin Research, Moleculaire Celbiologie Lab, Amsterdam**

Disclosure

Geen 'disclosures'.

Achtergrond

Voor een groep patiënten met een aantal indicaties, die samengevat kunnen worden als “extreem droge ogen”, worden humane serum oogdruppels (SEDs) voorgeschreven wanneer de gewone oogdruppels onvoldoende of geen effect hebben.

Achtergrond

De hypothese is dat actieve ingrediënten van serum, zoals groeifactoren een helende werking hebben op “extreem droge ogen”. Doordat de onderlinge adhesie van de cellagen van het oog verstevigen, wordt de barrière functie van het oog verbeterd. Ook zullen beschadigingen aan de cellagen, zoals het hoornvlies, hersteld worden door het serum. Tot nu toe is er nog geen *in vitro* model om de effectiviteit van SEDs te testen.

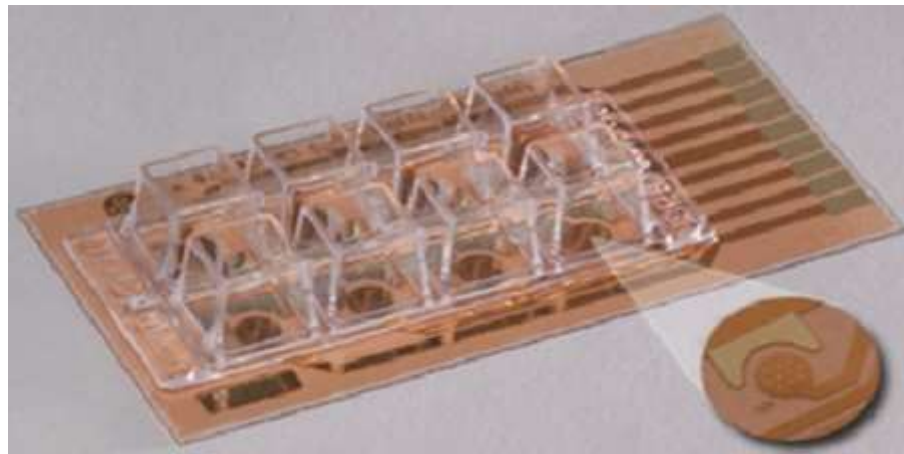
Doel

Het ontwikkelen van een gestandaardiseerd *in vitro* model om:

- de helende werking van SEDs op humane endotheel / epitheel cellen, die de cellagen van het oog representeren, te testen.
- te onderzoeken bij welke concentratie serum het helende effect van SEDs optimaal is.

Methode

- ECIS[®], Electric Cell-substrate Impedance Sensing, is een real-time, label-vrije op stroomgeleiding (impedantie) gebaseerde methode om in gekweekte cellen onderzoek te doen.
- De morfologie van de cellen verandert en in celweek kunnen deze veranderingen gemeten worden.



Methode

Cellen hechten zich aan de bodem en de electrode en vormen een isolerende laag.

Wanneer over de electrode spanning wordt gebracht, wordt de stroom belemmerd.

Door het meten van de weerstand over de cellagen heen kan de onderlinge adhesie van de cellen gemeten worden.

De mate van stroomgeleiding is dan een maat voor de kwaliteit van de cellaag.

Hierdoor kunnen kleine veranderingen van de barrière van de cellaag worden geregistreerd.

Methode

Twee hitte-geïnactiveerde serumpools werden getest op:

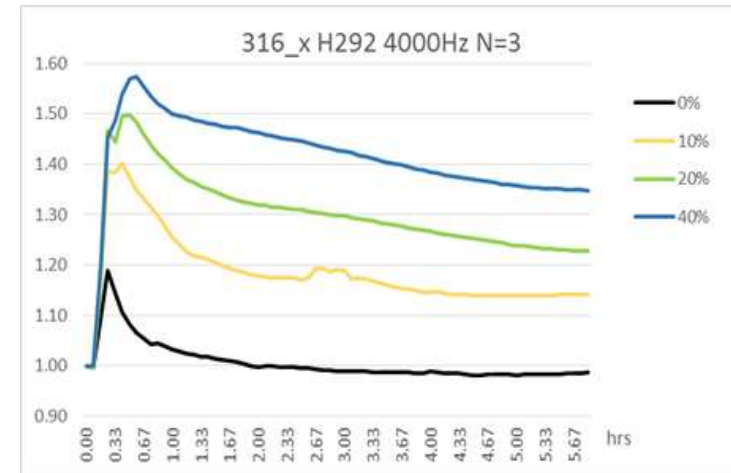
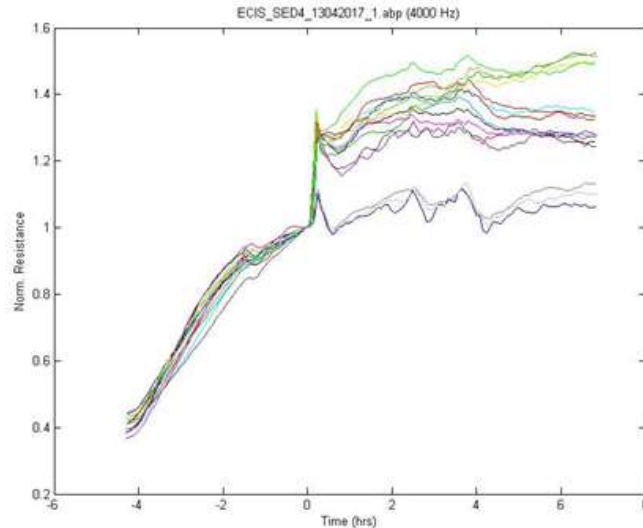
- Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)
- Humane longepitheel cellen A549
- Humane longepitheel cellen H292

Van elke serumpool werden de metingen in triplo uitgevoerd in 8-wells ECIS[®] (8W1E) arrays met 1.0×10^6 cellen per well.

Per well werd serumpool gepipetteerd met als eindconcentratie 10, 20 en 40% serum.

Als 0% serumpool werd EGM-2 kweekmedium gebruikt.

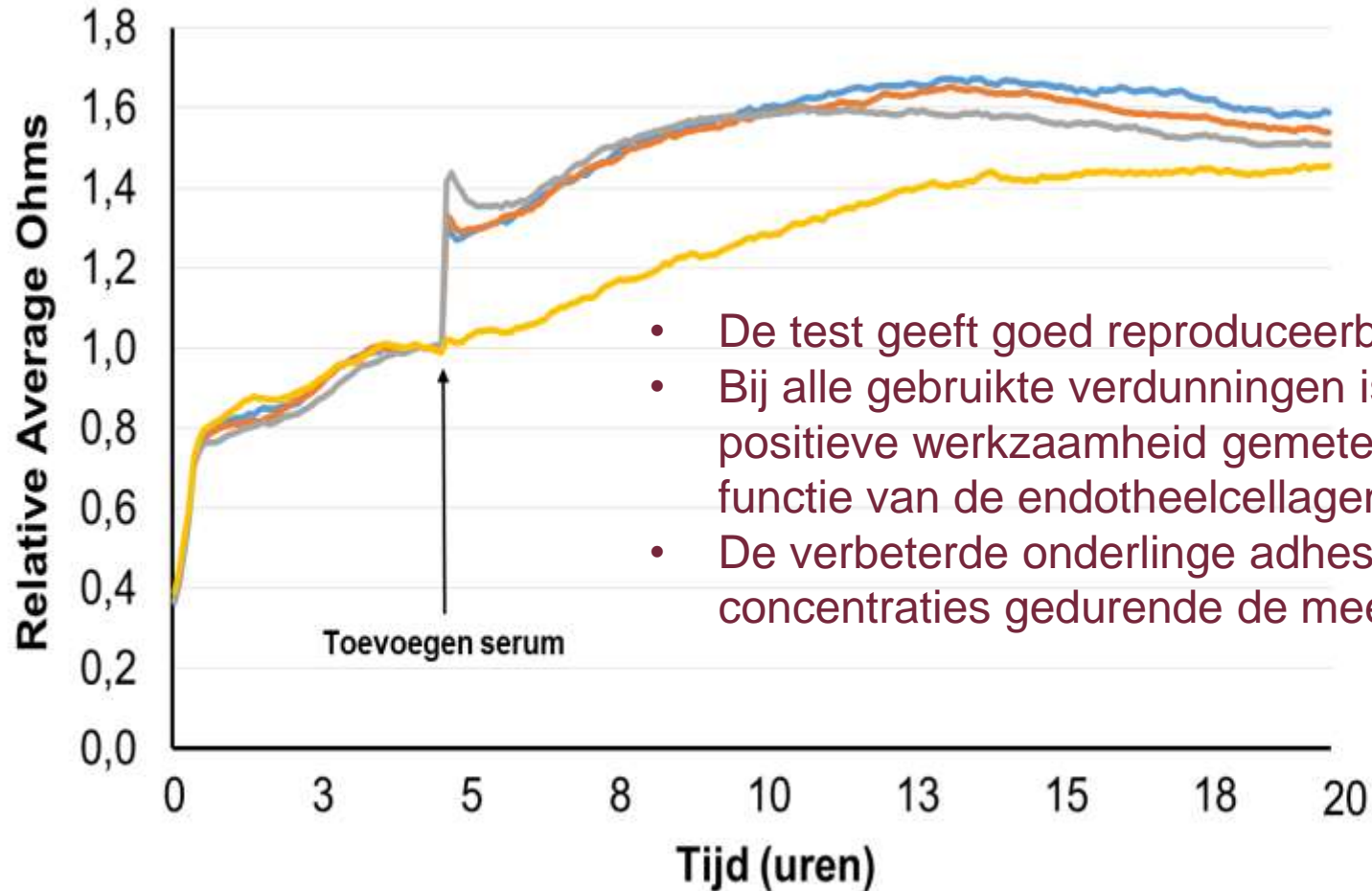
Resultaten



- Metingen werden overnacht uitgevoerd bij 37°C met 5% CO₂ en met een meetinterval van 300 seconden.
- De resultaten van de metingen werden na berekenen genormaliseerd vanaf het tijdstip van serum toevoegen tot een meetpunt van 16 uur.

Resultaten endotheelcellen

HUVEC endotheelcellen, meting n=3, genormaliseerd

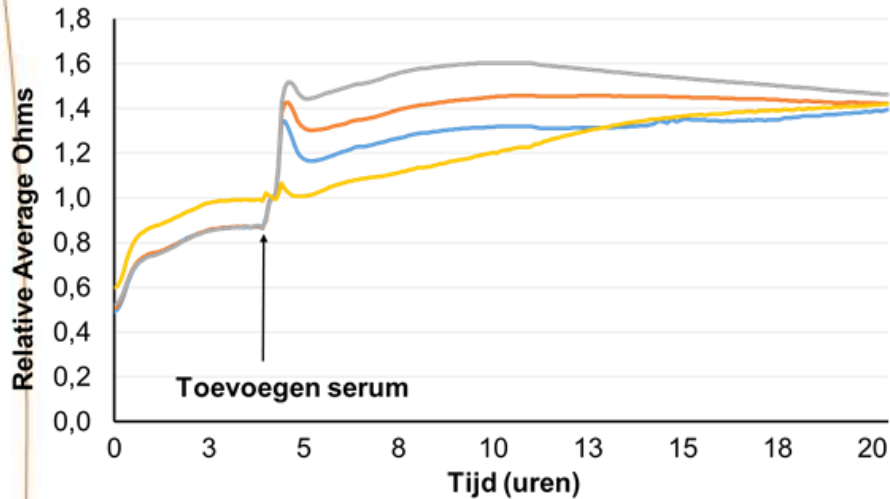


- De test geeft goed reproduceerbare resultaten.
- Bij alle gebruikte verdunningen is een directe en positieve werkzaamheid gemeten op de barrière functie van de endotheelcellagen.
- De verbeterde onderlinge adhesie is voor alle concentraties gedurende de meettijd aanwezig.

serum eindconcentratie —10% —20% —40% —0%

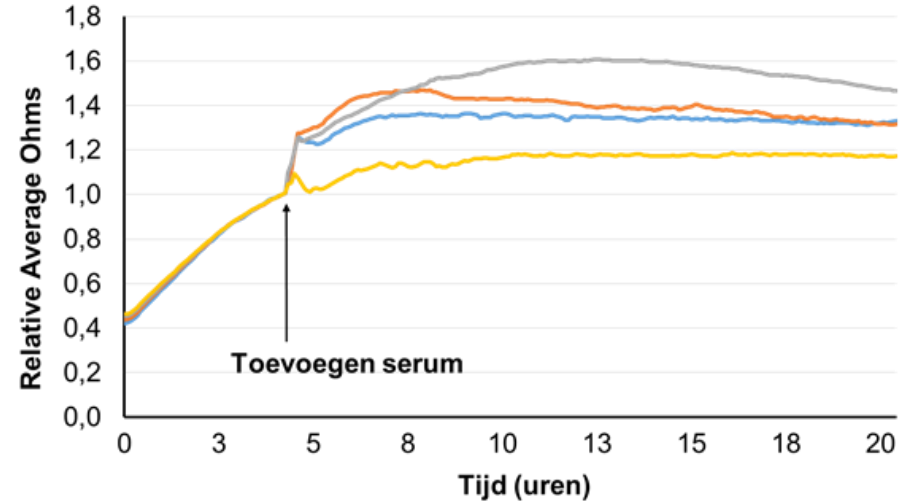
Resultaten epitheelcellen

H292 epitheelcellen, meting n=3, genormaliseerd



serum eindconcentratie — 10% — 20% — 40% — 0%

A549 epitheelcellen, meting n=3, genormaliseerd



serum eindconcentratie — 10% — 20% — 40% — 0%

- De hoogste respons en de langst durende werkzaamheid werd gemeten met 40% serum.
- Bij de overige verdunningen liep het effect eerder terug.

Conclusies

- ECIS[®] is gevalideerd als een betrouwbaar *in vitro* model om reproduceerbare metingen te verrichten om de effectiviteit van serumpools te testen.
- Bij alle gebruikte verdunningen van de serumpools is een directe positieve werkzaamheid gemeten op de barrière functie van de cellagen.

Conclusies

- Voor vervolgonderzoek is ECIS[®] een goede basis om:
- Verschillen tussen serum batches te onderzoeken.
- De vraag te beantwoorden of bewaard serum nog effectief is.
- Na het aanbrengen van schade aan de cellagen, serum toe te voegen om het maximaal helende effect van SEDs vast te kunnen stellen.