

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2008-2009

**NIEUW INTESTINAAL MUCOSAMODEL
VOOR DE STUDIE VAN ENTERISCHE VIRUSSEN**

door

Sebastiaan THEUNS

Promotor: Prof. Dr. Hans Nauwynck
Medepromotor: Ir. Evelien Van Hamme

Studieproject in het kader
van de Masterproef

AUTEURSRECHT

De auteur geeft de toelating deze studie voor consultatie beschikbaar te stellen voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van deze studie. Het auteursrecht betreffende de gegevens vermeld in deze literatuurstudie berust bij de promotor(en). Het oorspronkelijke auteursrecht van de individueel geciteerde studies en eventueel bijhorende documentatie, zoals tabellen en figuren, blijft daarbij gevrijwaard. De auteur en de promotor(en) zijn niet verantwoordelijk voor de behandelingen en eventuele doseringen die in deze studie geciteerd en beschreven zijn.

INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING

I.	INLEIDING	2
A.	ANATOMIE EN HISTOLOGIE VAN DE DUNNE DARM.....	2
B.	FYSIOLOGIE VAN DE DUNNE DARM EN SPIJSVERTERINGSKLIEREN.....	4
C.	EPITHEELPROLIFERATIE EN -HERSTEL IN DE DUNNE DARM	6
II.	NIEUW INTESTINAAL MUCOSAMODEL	7
A.	EXPERIMENT 1	7
1.	Materiaal en Methoden.....	7
2.	Resultaten	8
i.	Stereomicroscopie	8
ii.	Fluorescentie microscopie	9
3.	Discussie	9
B.	EXPERIMENT 2	10
1.	Materiaal en Methoden.....	10
2.	Resultaten	10
3.	Discussie	13
C.	EXPERIMENT 3	14
1.	Materiaal en Methoden.....	14
2.	Resultaten	14
3.	Discussie	17
D.	CONCLUSIE	17
III.	LITERATUURLIJST	18

SAMENVATTING

Diarree is een veelvoorkomend probleem waarbij virussen vaak een grote rol spelen, zowel bij mens als dier. Er is nood aan een betrouwbaar model waarin de replicatie van enterische virussen kan bestudeerd worden. Het doel van dit onderzoek is het in leven houden van een stuk dunne darm gedurende ten minste 12 tot 24 uur. Deze stukken darm, die verwijderd werden uit een varken, kunnen dan in een volgend stadium van het onderzoek geïnfecteerd worden met porcine enterische virussen. Darmweefsel is echter zeer gevoelig, waardoor het geen evidente taak is om een mucosa-explant model op te stellen. Op basis van literatuurgegevens werden verschillende stoffen getest op hun effect op de vitaliteit van de explanten. De vitaliteit van de explanten werd beoordeeld aan de hand van stereomicroscopie, waarbij aan elk explant op geregelde tijdstippen een score werd gegeven. Daarnaast werd ook gebruik gemaakt van fluorescentie microscopie waarbij gekleurd werd tegen cytokeratine en actine. Additie van gal, insuline, keratinocyte medium supplement en foetaal kalf serum had een positief effect op explanten. Met deze producten konden de explanten gemiddeld 6 uur in cultuur gehouden worden. Gezien de beperkte resultaten is er nog aanvullend onderzoek nodig om dit model verder te verfijnen en de levensduur van de explanten te verlengen.

SUMMARY

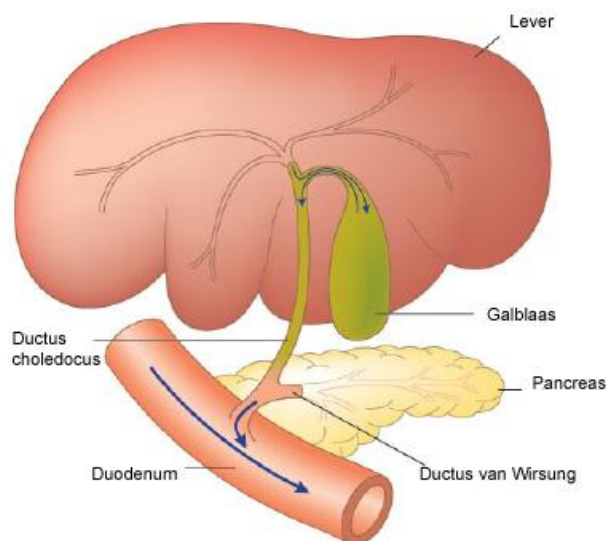
Diarrhoea is a widespread problem in humans and animals in which viruses play an important role. It is necessary to design a model for studying the replication of these viruses. The aim of this thesis is to keep a piece of intestine alive (for 12-24 hours) that was isolated from a pig. In a later stadium this piece of intestine can then be infected with porcine enteric viruses. Intestinal tissue is very fragile, which hampers the development of a model. Based on information found in literature, several products were selected to evaluate their effects on the vitality of the explants. Vitality of the explants was controlled by stereomicroscopy. The explants were regularly given a score based on their morphological appearance. Fluorescence microscopy was also used to visualize cytokeratin and actin. More research will be necessary to refine this model. Adding bile, insulin, keratinocyte medium supplement and foetal calf serum positively influenced the vitality of the explants. An average lifespan of 6 hours in culture was achieved. More research is needed to refine this model and to extend the vitality in time.

I. INLEIDING

Diarree is een veelvoorkomend probleem bij zowel mens als dier. Hierbij spelen virussen vaak een grote rol. Dit onderzoek had tot doel een intestinaal mucosamodel te ontwikkelen dat bruikbaar is om de vermeerdering van enterische virussen te bestuderen. Deze thesis start met een beperkte literatuurstudie, waarin de normale anatomie, histologie en fysiologie van de darm wordt besproken. Aan de hand hiervan werden potentieel interessante stoffen geïdentificeerd, die nadien uitgetest werden op intestinale mucosa-explanten.

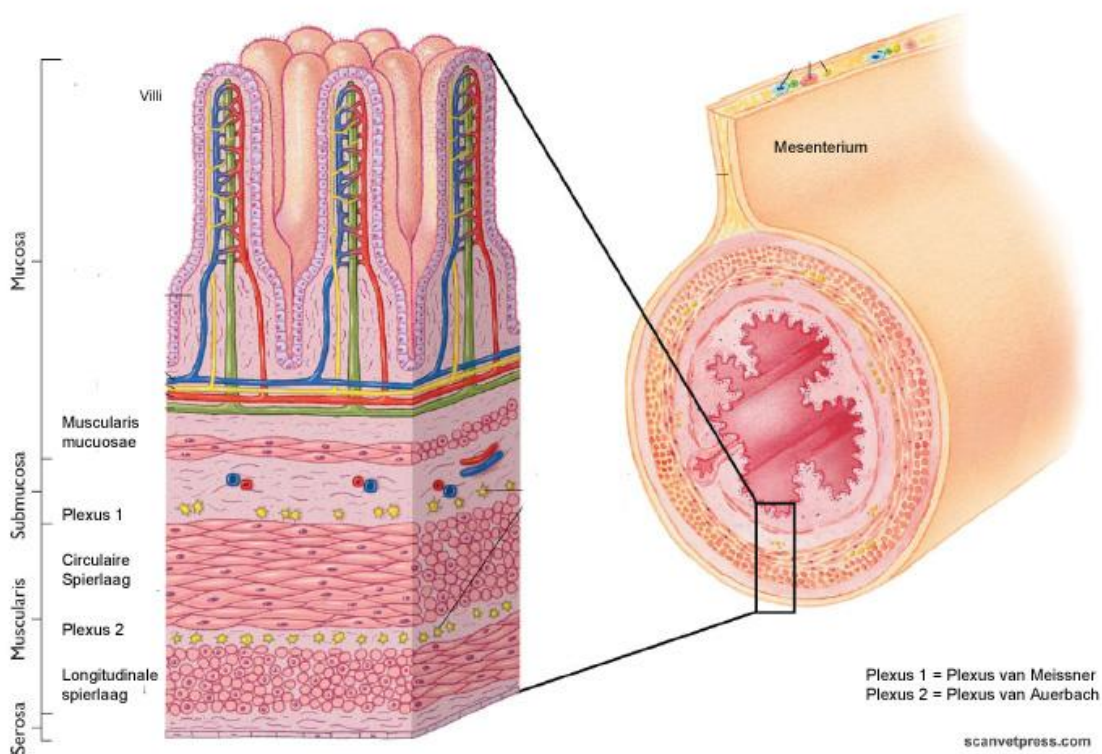
A. ANATOMIE EN HISTOLOGIE VAN DE DUNNE DARM

Het spijsverteringsstelsel is opgebouwd uit verschillende compartimenten. Van craniaal naar caudaal zijn dit de mondholte met speekselklieren, de farynx, de oesofagus of slokdarm, de maag, de dunne darm, de dikke darm, het rectum en de anus. De dunne darm kan onderverdeeld worden in het duodenum, het jejunum en het ileum. Een aantal structuren staan in verbinding met het duodenum om er hun inhoud in te ledigen, wat nodig is voor de vertering van voedsel. Dit wordt weergegeven in Figuur 1. De galblaas scheidt haar inhoud, die geproduceerd wordt door de lever, in het duodenum uit via de ductus choledocus. De exocriene pancreas geeft haar excreties af via de ductus pancreaticus, welke ook wel de ductus van Wirsung genoemd wordt. Daarnaast bestaat er ook een ductus pancreaticus accessorius, die ook de ductus van Santorini genoemd wordt. De situatie bij het varken komt niet overeen met Figuur 1, daar bij deze diersoort enkel de ductus van Santorini aanwezig is (Koenig en Liebich, 2004).



Figuur 1. Schematische weergave van de afvoergangen van galblaas en pancreas, welke in verbinding staan met het duodenum (naar Sjaastad *et al.*, 2003).

De wand van de dunne darm bestaat histologisch uit verschillende lagen. Deze worden schematisch weergegeven in Figuur 2. Vanuit het darmlumen naar de buikholte toe worden de volgende lagen onderscheiden: de tunica mucosa, tunica submucosa, tunica muscularis en tunica serosa. Het oppervlakte-epitheel van de mucosa bestaat uit verschillende celtypes zoals enterocyten, slijmbekercellen, enteroendocriene cellen, M cellen en progenitor cellen. In de submucosa ligt de zenuwplexus van Meissner. Tussen de binnenste circulaire en de buitenste longitudinale spierlaag van de darm ligt de zenuwplexus van Auerbach. Beide plexi zijn verantwoordelijk voor de innervatie van de darmwand. De serosa is een dunne laag epitheel aan de peritoneale zijde van de darm. Het oppervlak van de darm wordt vergroot door middel van plooien in de darmwand en door middel van vingervormige uitstulpingen van de mucosa, de villi. Daarnaast bezitten de enterocyten aan hun apicaal oppervlak microvilli, die een brush border of borstelzoom vormen (Samuelson, 2007).



Figuur 2. Schematische weergave van de doorsnede van de dunne darmwand (naar Sjaastad *et al.*, 2003).

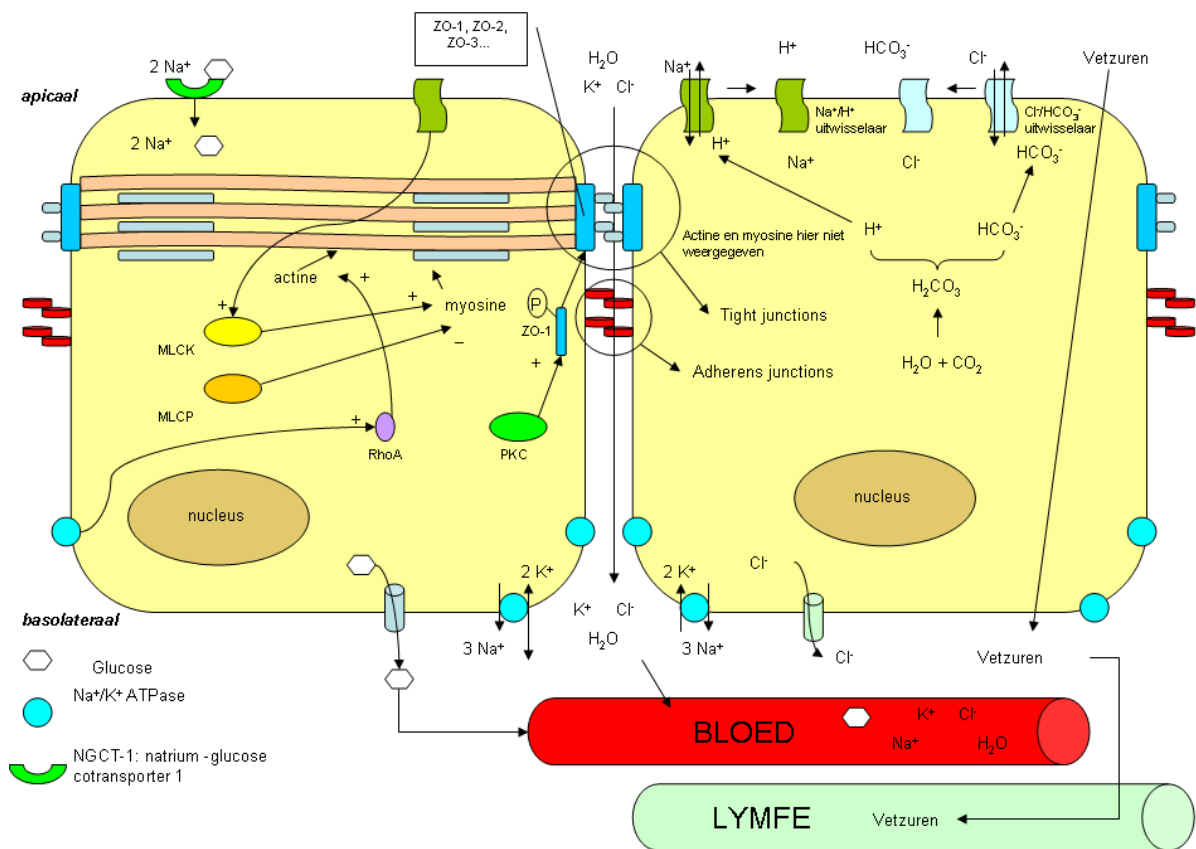
De intestinale cellen zijn zoals bij alle andere epithelia onderling sterk verbonden. Deze intercellulaire verbindingen (ter hoogte van de laterale celmembranen) worden gevormd door tight junctions (*zonulae occludentes*), intermediate junctions (*zonulae adherentes*) en desmosomen (*maculae adherentes*) (Farquhar en Palade, 1963). De tight junctions bestaan uit verscheidene transmembraanproteïnen van één cel die interacties aangaan met de transmembraanproteïnen van een naburige cel. Het occludine, claudine en de junctional adhesion molecules (JAMs) zijn reeds

gekende transmembraanproteïnen. Andere proteïnen die deel uitmaken van de tight junctions zijn de zonula occludens-proteïnen ZO-1, ZO-2 en ZO-3 (Mitic en Anderson, 1998). De zonulae adherentes zijn anders opgebouwd. Extracellulair Ca^{2+} zorgt voor interacties tussen E-cadherines van naburige cellen (Zheng *et al.*, 2006). Door het contact tussen de cadherines worden Cdc42 en Rac geactiveerd. Dit zijn beiden Rho GTPases, welke deel uitmaken van de Ras superfamilie van de GTPases (Etienne-Manneville en Hall, 2002).

Het proteïne kinase C (PKC) speelt vermoedelijk een rol bij de vorming van tight junctions door fosforylatie van ZO-1 proteïnen, waardoor deze ZO-1 proteïnen naar de laterale membraan van de cel migreren (Stuart en Nigam, 1995). Dit PKC kan gestimuleerd worden door het toedienen van de stof dioctanoylglycerol, zoals werd aangetoond in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cellen (Balda *et al.*, 1993). Het actine-cytoskelet is verbonden met de tight junctions en adherens junctions onder de vorm van een actine-myosine gordel die dwars doorheen de cel loopt (Nusrat *et al.*, 2000). Deze gordel speelt een rol bij het openen en sluiten van de intercellulaire verbindingen, een proces dat afhankelijk is van myosine. Het myosin light-chain kinase (MLCK) en myosin light-chain phosphatase (MLCP) spelen een rol bij de activatie van het myosine (Matter *et al.*, 2003). Wordt het myosine gefosforyleerd door het MLCK, dan zullen de tight junctions geopend worden (Turner *et al.*, 1997). De stof 1-(5-iodonafthaleen-1-sulfonyl)-1H-hexahydro-1,4-diazepine hydrochloride of kortweg ML-7 is een specifieke MLCK inhibitor (Turner *et al.*, 1997; Bain *et al.*, 2003). Door toediening van dioctanoylglycerol treedt reorganisatie op van de actinefilamenten (Balda *et al.*, 1993). In Figuur 3 wordt de interactie van PKC met de tight junctions, alsook de interactie van MLCK en MLCP met het actine-cytoskelet schematisch weergegeven. De rol van de verschillende elektrolytenpompen die ook weergegeven zijn in Figuur 3, worden besproken onder het hoofdstuk I. B. Fysiologie van de dunne darm en spijsverteringsklieren.

B. FYSIOLOGIE VAN DE DUNNE DARM EN SPIJSVERTERINGSKLIEREN

In het darmlumen worden enzymen uitgescheiden die afkomstig zijn van de exocriene pancreas. Deze zijn nodig om eiwitten, suikers, vetten, desoxyribonucleïnezuur (DNA) en ribonucleïnezuur (RNA) af te breken tot eenvoudige basismoleculen die daarna geresorbeerd worden. Trypsine, chymotrypsine, elastase en carboxypeptidase zijn pancreasenzymen die verantwoordelijk zijn voor de afbraak van peptiden en proteïnen. Terwijl lipase triglyceriden afbreekt, splitst het fosfolipase de fosfolipiden op in hun verschillende basismoleculen. DNA en RNA worden afgebroken tot nucleotiden door respectievelijk desoxyribonuclease en ribonuclease (Sjaastad *et al.*, 2003a). Naast al deze enzymen bevat het secreet van de pancreas ook het enzyme amylase, dat een synergetische werking heeft met onder andere maltase, sucrase en lactase in de afbraak van polysacchariden tot glucose, fructose en galactose. Het maltase, sucrase en lactase bevinden zich echter ter hoogte van de borstelzooam van het epitheel en niet vrij in het lumen, zoals bij amylase wel het geval is (Sjaastad *et al.*, 2003b). Naast pancreassecreten worden er in het lumen ook galzouten uitgescheiden die samenwerken met het enzyme lipase bij de vertering van vetten.



Figuur 3. Histologie en fysiologie van de enterocyt.

Het celoppervlak van de enterocyten bevat verschillende proteïnen die de elektrolytenbalans en absorptie van nutriënten regelen. Deze worden weergegeven in Figuur 3 (zie boven). Aan het basolaterale oppervlak van de enterocyt zijn Na⁺/K⁺ ATPase pompen gelokaliseerd welke 3 Na⁺ uitwisselen voor 2 K⁺ door het verbruiken van 1 molecule adenosine-trifosfaat (ATP). De Na⁺-concentratie zal dus hoger zijn buiten de cel dan binnen in de cel. Voor K⁺ is dit net omgekeerd (Nelson en Cox, 2005). Het Na⁺/K⁺ ATPase blijkt polymerisatie van het actine te induceren. Dit effect blijkt tot stand te worden gebracht via de activatie van RhoA (Rajaskeran *et al.*, 2008). Door dit mechanisme wordt het mogelijk dat Na⁺ en glucose aan het apicale oppervlak van de enterocyt kunnen worden geïnternaliseerd door middel van het natrium-glucose cotransport 1 proteïne (NGCT-1). Na⁺ migreert hierdoor immers van een hoge naar lage concentratie, welke gecreëerd werd door het Na⁺/K⁺ ATPase. Dit mechanisme wordt secundair actief transport genoemd. In het apicale oppervlak bevinden zich ook Na⁺/H⁺ en HCO₃⁻/Cl⁻ uitwisselaars. Deze zorgen voor het externaliseren van H⁺ en HCO₃⁻, terwijl Na⁺ en Cl⁻ worden geïnternaliseerd (Cunningham, 2002).

C. EPITHEELPROLIFERATIE EN -HERSTEL IN DE DUNNE DARM

Galzouten blijken een belangrijke rol te spelen in het herstelmechanisme van de darmwand na trauma. Het galzout taurodeoxycholaat blijkt bij fysiologische concentraties het herstel van het intestinale epitheel te stimuleren. Dit effect blijkt grotendeels gemedieerd te worden door transformering growth factor β (Strauch *et al.*, 2001). Daarnaast is gebleken dat apoptose van epitheelcellen, geïnduceerd door tumor necrosis factor α , geïnhibeerd kan worden door taurodeoxycholaat via de activatie van NF- κ B (Toledo *et al.*, 2004). Een andere stof die een invloed blijkt te hebben op de proliferatie en differentiatie van de darmwand is keratinocyt groei factor (KGF). KGF werd eerst geïsoleerd uit longfibroblasten en had een stimulerend effect op de keratinocyten van de epidermis. KGF blijkt echter ook de diepte van de intestinale crypten en het aantal slijmbekercellen te doen toenemen bij ratten (Housley *et al.*, 1994). Orale toediening van insuline aan ratten induceerde hyperplasie in het ileum. Dit werd aangetoond door een toename van DNA en proteïnen in de ileale mucosa. Deze hyperplasie werd veel minder gezien in het jejunum, waar insuline wel zorgde voor een verminderde apoptose van enterocyten (Sukhotnik *et al.*, 2005).

Andere factoren zoals insuline-like growth factor 1, glucocorticosteroiden en glucagon-like peptide 2 blijken ook een stimulerende invloed te hebben op het intestinaal epitheel (Drozdowski *et Thomson*, 2009).

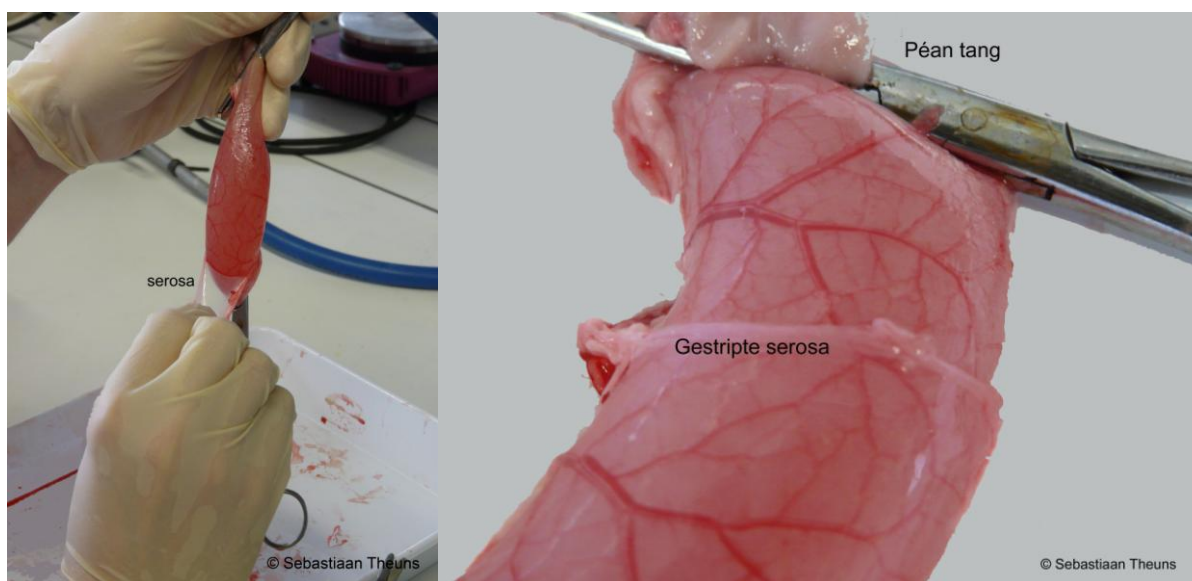
II. NIEUW INTESTINAAL MUCOSAMODEL

Er werden 3 experimenten uitgevoerd. Op basis van de resultaten van ieder experiment werd telkens een tussentijdse evaluatie gemaakt om zo het proefopzet te optimaliseren.

A. EXPERIMENT 1

1. Materiaal en Methodes

Een varken, 16 weken oud, werd vóór het experiment 24 uur uitgevast. Euthanasie gebeurde met natriumpentobarbital (Natrium Pentobarbital 20%, Kela Laboratoria). Er werd een incisie gemaakt in de buikholte om een stuk van het jejunum te verwijderen. De darm werd gespoeld met spoelmedium (fosfaat gebufferde zoutoplossing (FGZ, pH= 7,3) aangevuld met 0,1 mg/ml gentamycine (Gibco), 100 U/ml penicilline (Continental Pharma), 0,1 mg/ml streptomycine (Certa) en 5µg/ml Fungizone (Bristol-Myers Squibb)). Na het spoelen werd aan één einde van het verwijderde stuk darm een péan tang geplaatst. De darm werd gevuld met het spoelmedium en aan het andere einde werd een tweede tang geplaatst. Vervolgens werd de tunica serosa verwijderd, zoals weergegeven in Figuur 4.



Figuur 4. Strippen van de serosa van de darmwand.

Eens de serosa verwijderd was, konden stukjes explant uitgeknipt en overgebracht worden in een standaard cultuurmedium (50% RPMI (Gibco)/50% DMEM (Gibco), aangevuld met 0,6 mg/ml glutamine (BDH Biochemical), 0,1 mg/ml gentamycine, 100 U/ml penicilline en 0,1 mg/ml streptomycine. Aan dit standaardmedium werden stoffen toegevoegd om hun effect op de explanten te testen. Zo werd gal, verkregen na punctie van de galblaas, alsook CaCl_2 en insuline getest.

Voor dit experiment werd een scoresysteem ontwikkeld op basis van de morfologie van de explanten die beoordeeld werden met de stereomicroscop. Score 3 is een explant waarvan de villi nog mooi los van elkaar staan, niet verdikt zijn en waarbij er geen cellen loskomen. Score 2 staat voor het beginnen

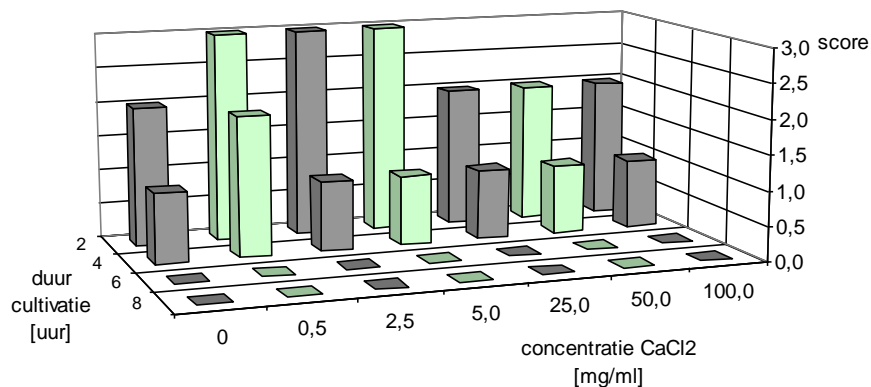
zwellen van de villi, waarbij praktisch geen of slechts een klein aantal cellen loslaten. Score 1 wordt gegeven aan explanten waarbij de villi sterk verkort zijn en waarbij veel cellen losgelaten zijn. Score 0 wordt gegeven wanneer alle cellen loslaten en dus praktisch geen villi meer zichtbaar zijn.

Daarnaast werden er ook beelden van de explanten onder de fluorescentie microscoop gemaakt (Leica DM RBE microscoop, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Duitsland). De preparaten, die verzameld werden op verschillende tijdstippen, werden gekleurd voor cytokeratines (PAN Cytokeratine, Dako Cytomation; Goat Anti Mouse FITC, Molecular probes) en F-actine (Texas Red-X phalloidin, Invitrogen).

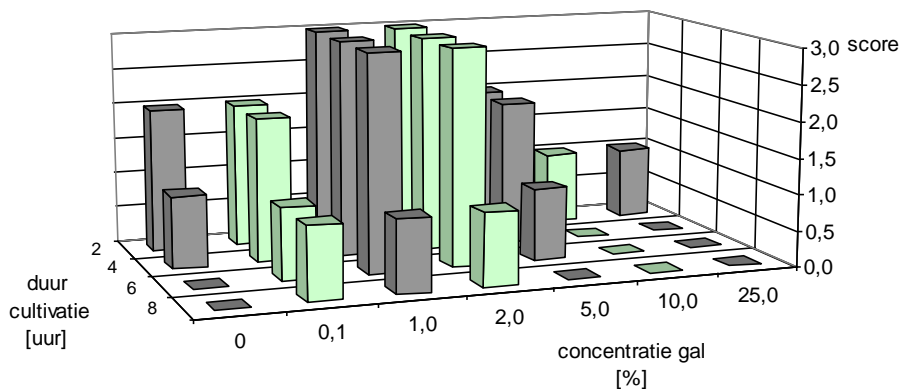
2. Resultaten

i. Stereomicroscopie

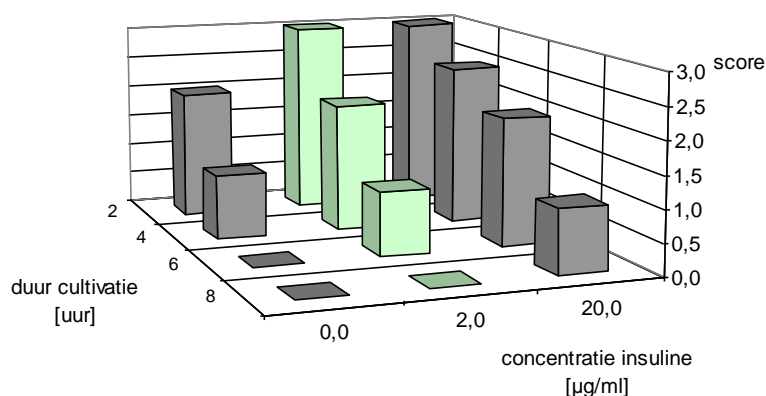
De resultaten die bekomen zijn op basis van stereomicroscopie zijn weergegeven in de Grafieken 1 tot en met 3.



Grafiek 1. Score na toevoegen van verschillende concentraties CaCl₂ aan het cultuurmedium.



Grafiek 2. Score na toevoegen van verschillende concentraties gal aan het cultuurmedium.



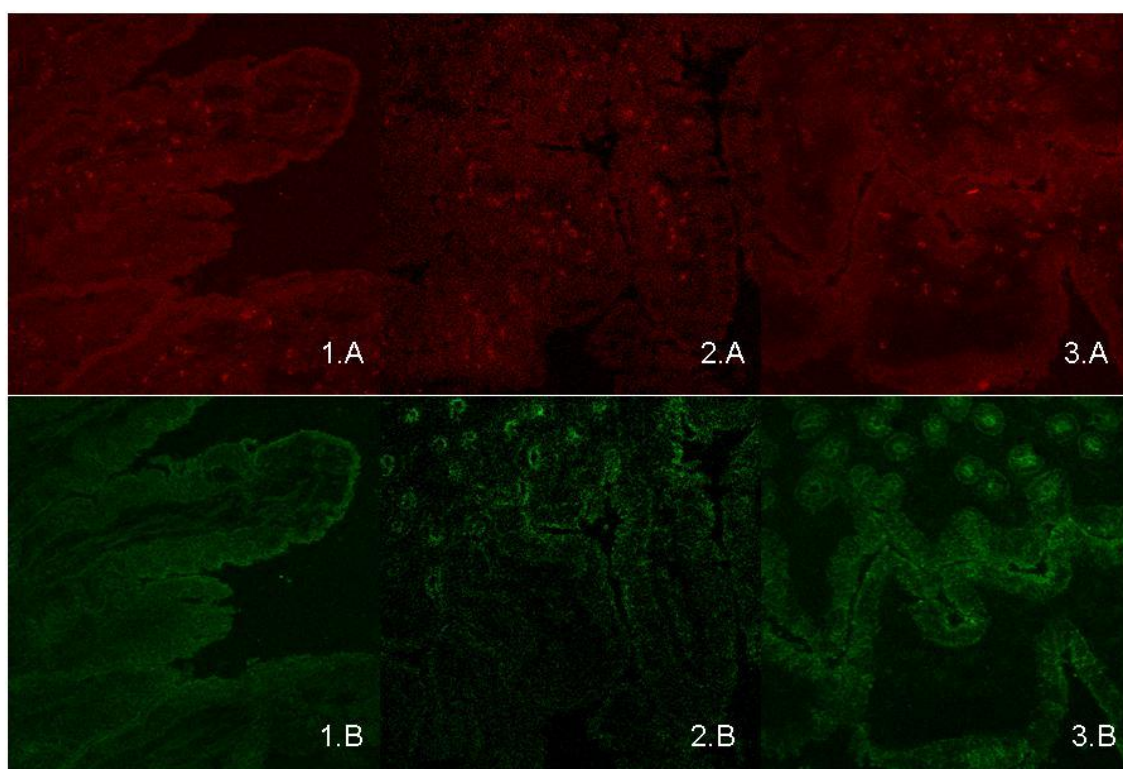
Grafiek 3. Score na toevoegen van verschillende concentraties insuline aan het cultuurmedium.

ii. *Fluorescentie microscopie*

De resultaten van de cytokeratine- en actinekleuring, na verschillende cultuurperioden, worden weergegeven in Figuur 5. Terwijl het cytokeratine aankleurt, geeft de actinekleuring geen resultaat. Enkele klompen actine zijn zichtbaar in de kern van de villi. Deel 1 van de Figuur toont de nog intacte villi, terwijl deze van deel 3 ten onder gaan.

3. Discussie

Op basis van deze resultaten kan geconcludeerd worden dat het CaCl_2 geen positief effect heeft op het darmepitheel. De gal daarentegen bleek een stabiliserend effect te hebben op het epitheel bij een concentratie van 1 à 2%. Hoge concentraties galzouten bleken toxisch te zijn. Insuline heeft bij een concentratie van 20 µg/ml een positief effect op het epitheel. In het volgende experiment werden de concentraties gal en insuline verder verfijnd. Met behulp van de actinekleuring werd aangetoond dat er een zekere dissociatie van het actine optrad, en dit direct na de euthanasie. Op basis hiervan werd vermoed dat de tight junctions, die nauw met het actine verbonden zijn, gedisintegreerd werden. Hierdoor worden gaten gevormd tussen de epitheelcellen, waardoor vocht naar de kern van de villus kan stromen en deze doet opzwellen. Finaal komen de cellen los. In de volgende experimenten zullen stoffen getest worden die het actine en de tight junctions stabiliseren.



Figuur 5. Actine (A) - en cytokeratinekleuring (B): direct na slachten (1), na strippen van de serosa (2) en na 2 uur cultivatie in cultuurmedium(3).

B. EXPERIMENT 2

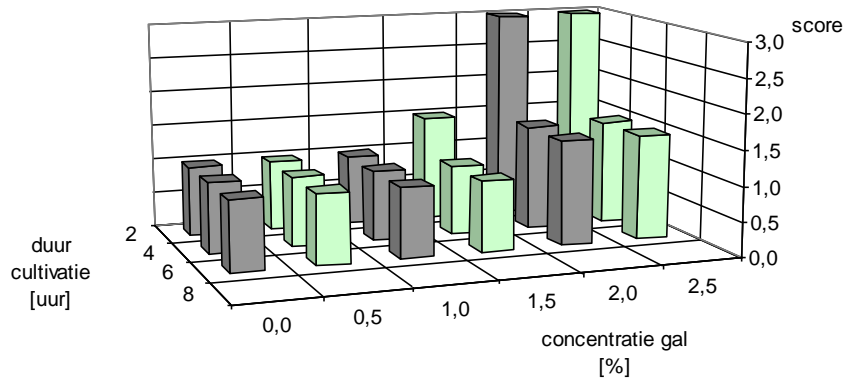
1. Materiaal en Methoden

Het experiment verliep gelijkaardig als experiment 1 met uitzondering van een aantal zaken. Het varken werd niet uitgevast op voorhand en aan de FGZ werd 0,1 g/l CaCl_2 en 0,2 g/l MgCl_2 toegevoegd.

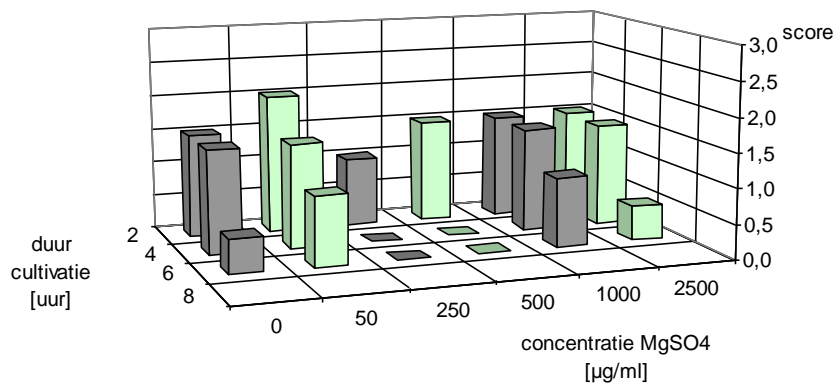
Tevens werden er een aantal nieuwe componenten getest zoals MgSO_4 (Sigma), keratinocyte medium supplement (Sigma), dexamethasone (Sigma), ML-7 (Sigma), 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycerol (Sigma) en glucagon-like peptide 2 (Sigma). Het keratinocyte medium supplement bevat recombinante groeifactoren, hydrocortisone, bovien serum albumine en bovien transferrine.

2. Resultaten

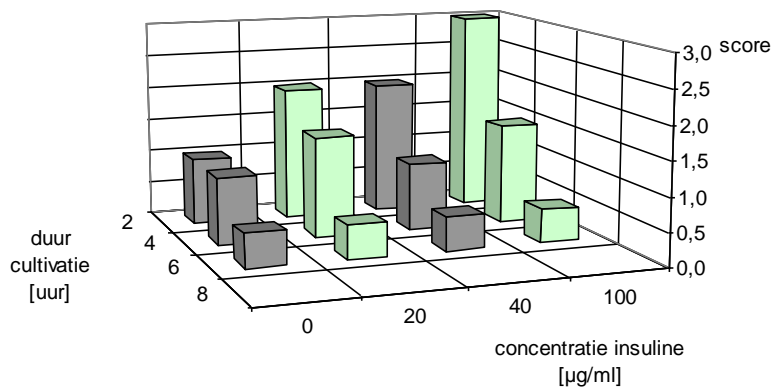
De resultaten van de stereomicroscopische beoordeling worden hieronder weergegeven in de Grafieken 4 tot en met 11.



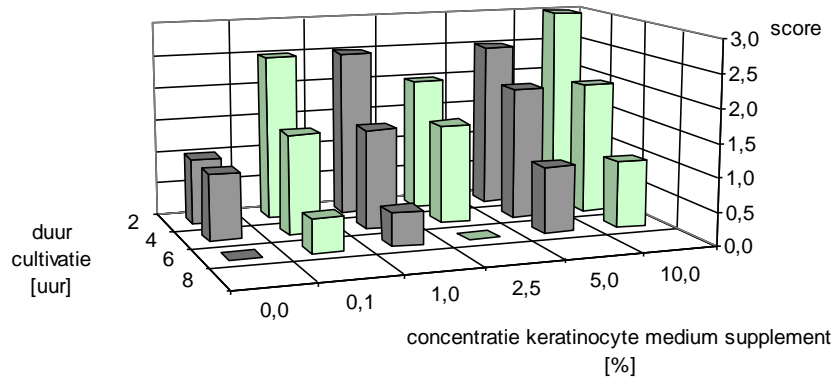
Grafiek 4. Score na toevoegen van verschillende concentraties gal aan het cultuurmedium.



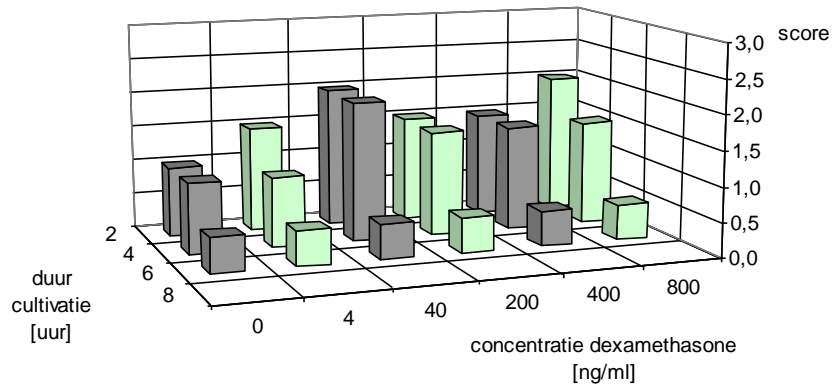
Grafiek 5. Score na toevoegen van verschillende concentraties MgSO₄ aan het cultuurmedium.



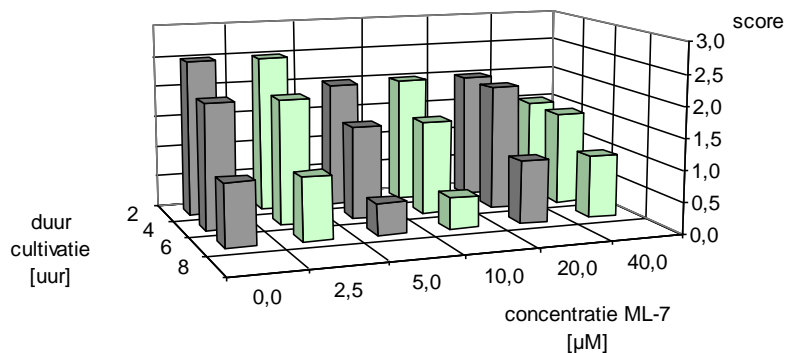
Grafiek 6. Score na toevoegen van verschillende concentraties insuline aan het cultuurmedium.



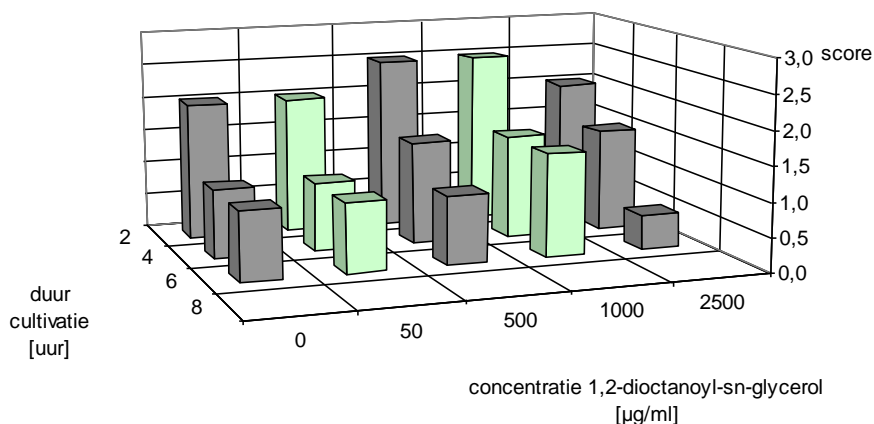
Grafiek 7. Score na toevoegen van verschillende concentraties keratinocyte medium supplement aan het cultuurmedium.



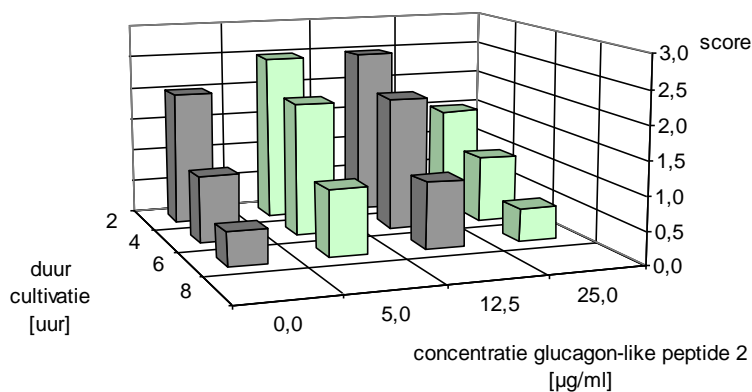
Grafiek 8. Score na toevoegen van verschillende concentraties dexamethasone aan het cultuurmedium.



Grafiek 9. Score na toevoegen van verschillende concentraties ML-7 aan het cultuurmedium.



Grafiek 10. Score na toevoegen van verschillende concentraties 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycerol aan het cultuurmedium.



Grafiek 11. Score na toevoegen van verschillende concentraties glucagon-like peptide 2 aan het cultuurmedium.

3. Discussie

Globaal gezien blijken de resultaten van dit tweede experiment veel slechter te zijn dan het eerste experiment. Een vermoedelijke verklaring hiervoor is het feit dat het varken voor dit experiment niet uitgevast werd, waardoor er extra manipulaties nodig waren bij het spoelen van darm die extra schade veroorzaakten aan de integriteit van de darmwand. Wat de gal betreft blijven de resultaten in de trend van het eerste experiment. De concentratie 2% scoort hier weer het beste. Magnesium blijkt weinig effect te hebben op de darmexplanten. Insuline bevestigt net zoals gal ook de resultaten van het eerste experiment. De hogere concentraties (100 µg/ml) die nu getest werden blijken echter nog betere resultaten te geven dan de 20 µg/ml van experiment 1. Het toevoegen van keratinocyte medium supplement had een positief effect op de darmexplanten. De grafiek laat moeilijk toe om te concluderen bij welke concentraties dit effect optimaal is. Vermoedelijk is het toevoegen van hogere concentraties gunstig. Dexamethasone heeft daarentegen weinig effect op de explanten. De

negatieve controle (0 μ M) van ML-7 geeft initieel een hoge score, waardoor de resultaten voor ML-7 moeilijk te interpreteren worden. Er werd geconcludeerd dat ML-7 weinig effect had op de explanten. Hetzelfde kan geconcludeerd worden over 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycerol en het glucagon-like peptide 2. Het tweede experiment bevestigt de positieve resultaten van gal en insuline uit het eerste experiment en brengt tevens een nieuwe stof naar voren met een positief effect op de explanten, namelijk het keratinocyte medium supplement. In een 3^{de} experiment zal getracht worden om na te gaan of dezelfde stoffen, aangevuld met een aantal nieuwe, hetzelfde effect hebben op de darmexplanten bij een uitgevast dier.

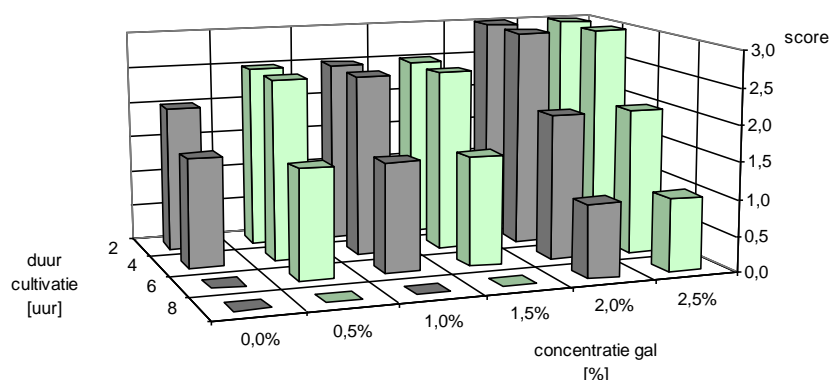
C. EXPERIMENT 3

1. Materiaal en Methoden

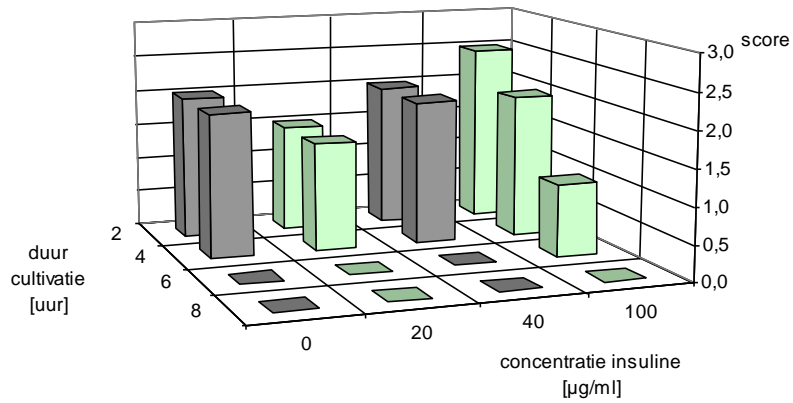
Het experiment verliep op een gelijkaardige manier als experiment 1 met uitzondering van een aantal zaken. Het varken werd dit maal 24 uur voor het experiment uitgevast. Als spoelmedium werd het cultuurmedium gebruikt (50% RPMI / 50% DMEM, aangevuld met 0,6 mg/ml glutamine, 0,1 mg/ml gentamycine, 100 U/ml penicilline en 0,1 mg/ml streptomycine). Het spoelen werd tot een minimum beperkt. De stukken darm werden getransporteerd zonder péan tangen op de uiteinden. Naast het strippen zoals beschreven in materiaal en methoden van experiment 1, werden er in één stuk darm enkel incisies doorheen de serosa gemaakt ter vergelijking. Een ander stuk darm werd intact in cultuurmedium gebracht. De nieuw geteste componenten waren de volgende: insuline-like growth factor-1 (IGF-1) (Sigma) en foetaal kalf serum (Gibco).

2. Resultaten

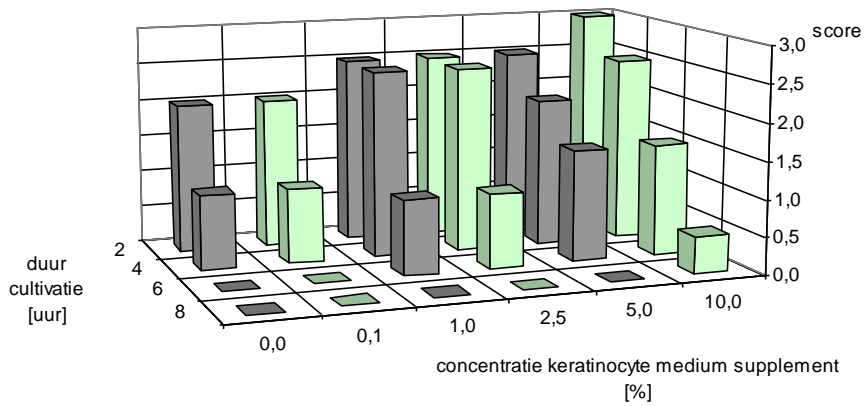
Op basis van de stereomicroscopie werden de volgende resultaten bekomen, die weergegeven zijn in de Grafieken 12 tot en met 18.



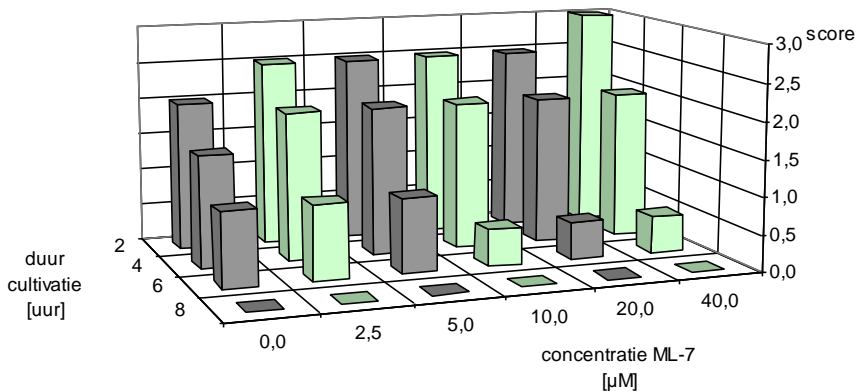
Grafiek 12. Score na toevoegen van verschillende concentraties gal aan het cultuurmedium.



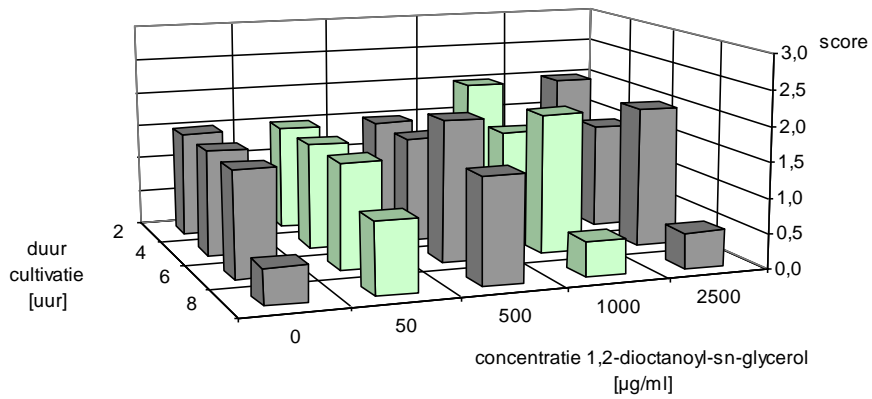
Grafiek 13. Score na toevoegen van verschillende concentraties insuline aan het cultuurmedium.



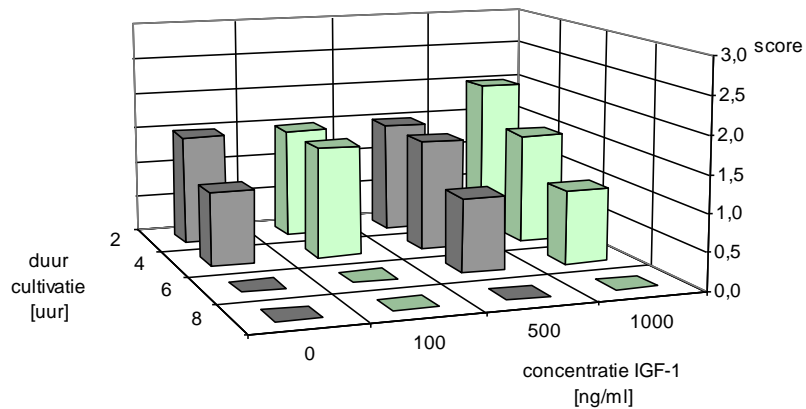
Grafiek 14. Score na toevoegen van verschillende concentraties keratinocyte medium supplement aan het cultuurmedium.



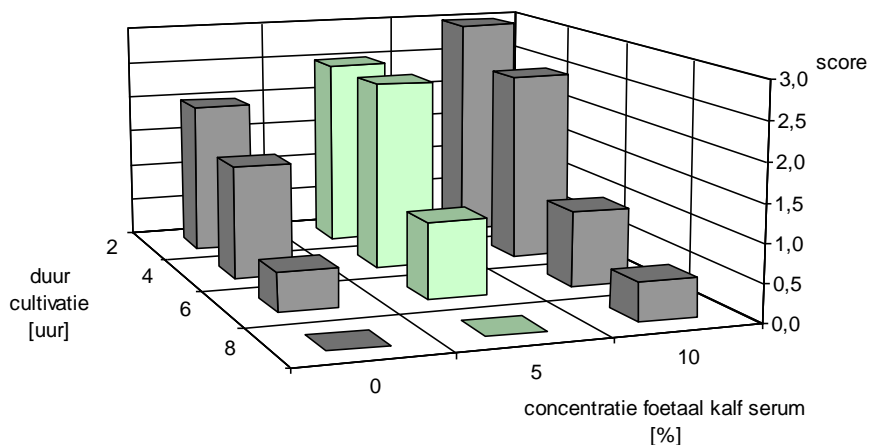
Grafiek 15. Score na toevoegen van verschillende concentraties ML-7 aan het cultuurmedium.



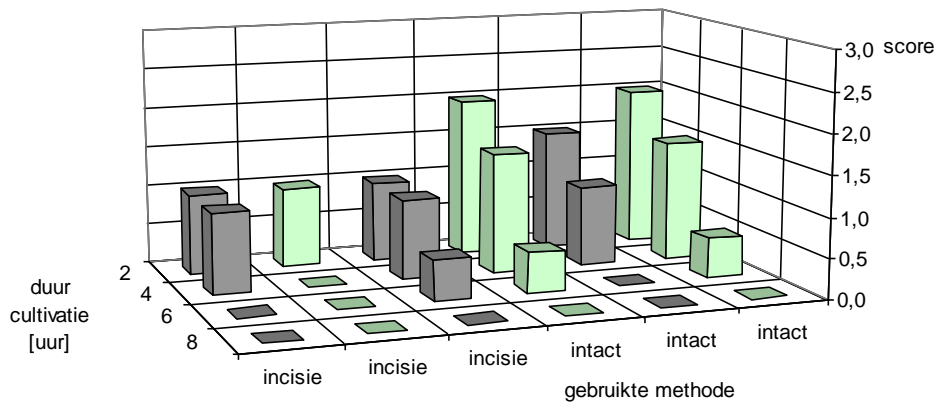
Grafiek 16. Score na toevoegen van verschillende concentraties 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol aan het cultuurmedium.



Grafiek 17. Score na toevoegen van verschillende concentraties IGF-1 aan het cultuurmedium.



Grafiek 18. Score na toevoegen van verschillende concentraties foetaal kalf serum aan het cultuurmedium.



Grafiek 19. Score na het maken van incisies in de serosa (links). Intacte explanten worden weergegeven in het rechter deel van de grafiek.

3. Discussie

De resultaten van gal en insuline bevestigen de conclusies welke getrokken werden uit de resultaten van experiment 2. De gal aan een concentratie van 2% en 2,5% scoort het best. Insuline blijkt opnieuw bij hogere concentraties (100 µg/ml) een beter effect te hebben op de explanten. De hogere concentraties van het keratinocyte medium supplement blijken het beste effect te hebben op de explanten. De resultaten van dit experiment bevestigen dat ML-7 en 1,2-dioctanoyl-*sn*-glycerol geen gunstig effect hebben op de explanten. De resultaten van IGF-1 benaderen vrij dicht deze van de negatieve controle (0 µg/ml). Hieruit kan geconcludeerd worden dat het effect van IGF-1 op de explanten gering is. De andere nieuw geteste stof, namelijk het foetal kalf serum, blijkt daarentegen wel een gunstig effect te hebben op de explanten: de 10% oplossing blijkt iets beter te scoren dan de 5% oplossing. Het maken van incisies blijkt geen goed resultaat te geven. Gezien de redelijke resultaten van het intact laten, zal deze methode ook opgenomen worden in verder onderzoek om te kijken of in de toekomst dezelfde resultaten bekomen worden.

D. CONCLUSIE

Uit deze 3 experimenten zijn een aantal stoffen naar voren gekomen die een effect blijken te hebben op de vitaliteit van darmexplanten, namelijk gal, insuline, keratinocyte medium supplement en foetaal kalf serum. In de toekomst zal ook 3,3',5-triiodo-L-thyronine sodium salt (Sigma) en glucagon (Sigma) getest worden op hun effect op de explanten. Om het model verder op punt te stellen en de tijd in cultuur te verlengen, zal extra onderzoek nodig zijn. De explanten moeten immers 12 uur in leven blijven om virale replicatie te kunnen bestuderen.

III. LITERATUURLIJST

1. Bain J., McLauchlan H., Elliott M. en Cohen P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *The Biochemical Journal* 371, 199-204.
2. Balda M.S., Gonzalez-Mariscal L., Matter K., Cereijido M., Anderson J.M. (1993). Assembly of tight junction: the role of diacylglycerol. *The Journal of Cell Biology*, 123, 293-302.
3. Cunningham J.G. (2002). *Textbook of Veterinary Physiology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, p. 263-268.
4. Drozdowski L. en Thomson A.B.R. (2009). Intestinal hormones and growth factors: Effects on the small intestine. *World Journal of Gastroenterology* 15, 385-406.
5. Etienne-Manneville S. en Hall A. (2002). RhoGTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
6. Farquhar M.G. en Palade G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *The Journal of Cell Biology* 17, 375-412.
7. Housley R.M., Morris F.C., Boyle W., Ring B., Biltz R., Tarpley J.E., Aukerman S.L., Devine P.L., Whitehead R.H. en Pierce G.F. (1994). Keratinocyte Growth Factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Investigation* 94, 1764-1777.
8. Koenig H.E. en Liebich H.G. (2004). *Veterinary anatomy of domestic mammals*. Schattauer, Stuttgart, Germany, p. 277-342.
9. Matter K. en Balda M.S. (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nature Reviews* 4, 225-236.
10. Mitic L.L. en Anderson J.M. (1998). Molecular architecture of tight junctions. *Annual Review of Physiology* 60, 121-142.
11. Nelson D.L. en Cox M.M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H. Freeman and Company, New York, p. 398-399.
12. Nusrat A., Turner J.R., Madara J.L. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 279, 851-857.
13. Rajaskaran S.A., Beyenbach K.W., Rajaskaran A.K. (2008). Interactions of tight junctions with membrane channels and transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1778, 757-769.
14. Samuelson D. (2007). *Textbook of Veterinary Histology*. Saunders Elsevier, Missouri, St. Louis, p. 335-342.
15. Sjaastad Ø.V., Hove K. en Sand O. (2003a). *Physiology of Domestic Animals*. Scandinavian Veterinary Press, Oslo, p. 538.
16. Sjaastad Ø.V., Hove K. en Sand O. (2003b). *Physiology of Domestic Animals*. Scandinavian Veterinary Press, Oslo, p. 549-550.
17. Strauch E.D., Wang J.-Y. en Bass B.L. (2001). Bile salt stimulates intestinal epithelial cell migration through TGF β after wounding. *Journal of Surgical Research* 97, 49-53.

18. Stuart R.O. en Nigam S.K. (1995). Regulated assembly of tight junctions by Protein-Kinase-C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 6072-6076.
19. Sukhotnik I., Shehadeh N., Shamir R, Bejar J., Bernshteyn A. en Mogilner J. (2005). Oral insulin enhances intestinal regrowth following massal small bowel resection in rat. *Digestive Diseases and Sciences* 50, 2379-2385.
20. Toledo A., Yamaguchi J., Wang J.-Y., Bass B.L., Douglas J.T. en Strauch E.D. (2004). Taurodeoxycholate stimulates intestinal cell proliferation and protects against apoptotic cell death through activation of NF- κ B. *Digestive Diseases and Sciences* 49, 1664-1671.
21. Turner J.R., Rill B.K., Carlson S.L., Carnes D., Kerner R., Mrsny R.J. en Madara J.L. (1997). Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation. *Cell physiology* 273, 1378-1385.
22. Zheng K., Trivedi M. en Siahaan T.J. (2006). Structure and function of the intercellular junctions: barrier of paracellular drug delivery. *Current Pharmaceutical Design* 12, 2813-2824.

DANKWOORD

Ik wil dit dankwoord gebruiken om een aantal mensen te bedanken. In de eerste plaats mijn promotor, Prof. dr. Hans Nauwynck. Dankzij hem heb ik de kans gekregen om van het onderzoek te proeven. Hiervoor, en ook voor de goede begeleiding van mijn Masterproef, wens ik U zeer hard te bedanken! Dan wil ik ook zeker en vast mijn medepromotor Evelien Van Hamme bedanken. Zonder haar hulp waren deze resultaten nooit tot stand gekomen! Merci voor de toffe momenten! Ik zou haar bij deze ook succes willen wensen bij het verder afwerken van haar doctoraat en in haar verdere carrière. Een woord van dank gaat ook uit naar Debby en Marc, zij hielpen me elke keer bij het verzamelen van stukken darm en verdienen dus zeker een dikke merci;) Sarah wil ook graag bedanken voor haar hulp bij het maken van de histologische preparaten en haar kennis over de fluorescentiemicroscopie, Lennert voor de initiatiecursus “hoe-snij-ik-voor-de-eerste-keer-mijn-eigen-coupes-en-hoe-kleur-ik-ze?”. Alle anderen die mij op welke manier dan ook geholpen hebben bij mijn Masterproef wens ik bij deze van harte te bedanken! Mijn vriendin, Nancy Roef, wens ik hierbij zeker te bedanken voor haar onvoorwaardelijke steun in de moeilijker momenten!