

Academiejaar 2015- 2016

**De rol van galzouten bij inflammatoire darmziekten:  
onderzoek naar de expressie van galzouttransporters  
en galzoutreceptoren in gezonde muizen**

Gert BEARELLE

Promotor: Prof Dr. D. Laukens  
Begeleidster: L. Van den Bossche

Masterproef voorgedragen in de 2de Master in het kader van de opleiding tot  
**MASTER OF MEDICINE IN DE GENEESKUNDE**



Academiejaar 2015- 2016

**De rol van galzouten bij inflammatoire darmziekten:  
onderzoek naar de expressie van galzouttransporters  
en galzoutreceptoren in gezonde muizen**

Gert BEARELLE

Promotor: Prof Dr. D. Laukens  
Begeleidster: L. Van den Bossche

Masterproef voorgedragen in de 2de Master in het kader van de opleiding tot  
**MASTER OF MEDICINE IN DE GENEESKUNDE**



Deze pagina is niet beschikbaar omdat ze persoonsgegevens bevat.  
Universiteitsbibliotheek Gent, 2021.

This page is not available because it contains personal information.  
Ghent University, Library, 2021.



## **Voorwoord**

Bij deze wil ik graag enkel mensen bedanken die mij geholpen hebben bij het schrijven van mijn thesis. Zonder hun hulp had ik deze scriptie nooit tot een goed einde gebracht.

Eerst en vooral wil ik mijn promotor Debby Laukens bedanken om mij de kans te bieden deze thesis te mogen schrijven. Er heerste steeds een aangename sfeer in het labo, wat het vele labowerk een stuk aangenamer maakte. Het was ook tof dat ik betrokken werd in de activiteiten die georganiseerd werden in het labo. Zo maakte ik een verjaardagsdrink mee en mocht ik de doctoraatverdediging van één van de doctoraatstudenten bijwonen, beide heel tof. Dankuwel.

Een grote dankuwel gaat uit naar mijn begeleidster Lien Van den Bossche. Gedurende twee jaar stond ze altijd voor mij paraat en kon ik rekenen op haar begrip, indien de bekomen resultaten wat tegen vielen. Met heel wat vragen kon ik ook bij haar terecht, vaak kreeg ik al binnen de 24 uur een antwoord op mijn vraag. Haar opmerkingen en aanwijzingen hebben mij op het goede pad gezet. Ze leerde me ook verschillende labotechnieken aan zoals qPCR, in vitro werk, een luminex, een massaspectrummeting,...

Daarnaast wil ik absoluut mijn medethesisstudent Daniel Borsboom en in het bijzonder Michiel Hanssens bedanken. Heel wat avondjes heb ik samen met Michiel literatuur doornomen om de complexe galzoutinteracties en mechanismen die IBD veroorzaken, te bestuderen. Gedurende twee jaar hebben we heel intens samengewerkt en hebben we meermaals een lach of een traan gedeeld. Ik kan gerust stellen dat door het schrijven van deze thesis, we elkaar nog beter kennen dan voorheen.

Het schrijven van deze thesis was voor mij een leerrijke ervaring. Het heeft me toegestaan een betere visie te ontwikkelen op hoe onderzoek verloopt in de dagelijkse praktijk. Het moeilijke van deze thesis was de bijzaken van de hoofdzaken te onderscheiden en om te gaan met onzekerheden, verbonden aan wetenschappelijk onderzoek.





## Inhoudstabel

<b>Abstract</b> .....	<b>1</b>
<b>Inleiding</b> .....	<b>3</b>
1.1 Inflammatoire darmziekten .....	3
1.1.1 Wat is IBD? .....	3
1.1.2 Epidemiologie van IBD .....	4
1.1.3 Pathogenese van IBD .....	4
1.1.4 De diagnose van IBD .....	8
1.1.5 De behandeling van IBD .....	9
1.2 Galzouten .....	13
1.2.1 Wat zijn galzouten? .....	13
1.2.2 Functies van galzouten .....	13
1.2.3 De synthese van galzouten .....	13
1.2.4 De enterohepatische cyclus .....	15
1.2.5 De verschillende spelers van de intestinale galzouthuishouding .....	17
1.3 Interactie tussen IBD, het microbioom en galzouten .....	22
1.3.1 IBD en zijn invloed op galzouten .....	22
1.3.2 Galzouten en hun invloed op IBD .....	22
1.3.3 Interactie tussen galzouten en het microbioom .....	23
1.4 Probleemstelling en doelstelling masterproef .....	24
<b>Materiaal en methoden</b> .....	<b>25</b>
2.1 Galzouten .....	25
2.2 Muizen .....	25
2.3 Behandelingen .....	25
2.4 Sacrificatie en staalname .....	26
2.5 RNA- isolatie .....	26
2.6 cDNA bereiding .....	27
2.7 qPCR .....	27
2.8 Dataverwerking .....	28
<b>Resultaten</b> .....	<b>29</b>
3.1 Het verloop in expressie van genen, betrokken in de galzouthomeostase van de darm .....	29
3.1.1 Nucleaire receptoren en membraanreceptor TGR5 .....	29
3.1.2 Transporters .....	30
3.1.3 Enzymen .....	33
3.2 Effect van de galzoutbehandeling op de expressie van genen, betrokken in de galzouthomeostase van de darm .....	33

3.2.1 Effect van TUDCA op de genexpressie .....	33
3.3.2 Effect van UDCA op de genexpressie.....	36
3.2.3 Effect van GUDCA op de genexpressie .....	38
<b>Discussie.....</b>	<b>41</b>
4.1 het verloop in expressie van genen, betrokken in de galzouthomeostase in de darm .....	41
4.2 Effect van galzoutbehandeling op de expressie van genen betrokken in de galzouthomeostase in de darm.....	43
<b>Conclusie.....</b>	<b>47</b>
<b>Algemene discussie.....</b>	<b>48</b>
<b>Referentielijst.....</b>	<b>50</b>

# Abstract

---

**ACHTERGROND** Colitis Ulcerosa (UC) en de ziekte van Crohn (CD) zijn chronische recidiverende inflammatoire darmziekten die veroorzaakt worden door een niet adequaat immunologisch antwoord op een verstoord microbioom in genetisch gevoelige individuen. Beide aandoeningen leiden tot veranderingen in de galzoutsamenstelling. Bij inflammatory bowel disease (IBD) patiënten wordt eveneens een gewijzigde expressie van genen betrokken bij de galzouthomeostase waargenomen. Uit recente studies blijkt dat de galzouten ursodeoxycholzuur (UDCA) en zijn taurine-conjugaat tauroursodeoxycholzuur (TUDCA) colitis in muizen verbeteren. In deze thesis wordt nagegaan of UDCA en zijn derivaten, TUDCA en glyoursodeoxycholzuur (GUDCA) in basale omstandigheden een effect hebben op de expressie van genen betrokken in de galzouthomeostase. Bovendien wordt het natuurlijk verloop in expressie van genen betrokken in de galzouthomeostase onderzocht.

**METHODEN** Gezonde mannelijke C57BL/6J muizen werden gedurende 7 dagen intragastrisch behandeld met TUDCA (250mg/kg/d), UDCA (250mg/kg/d), GUDCA (250mg/kg/d) of een placebo (PBS 8µl/g/d of labrafil 8µl/g/d). Op de laatste dag werd het ileum en colon geïsoleerd. De genexpressie van nucleaire receptoren, transporters en enzymen betrokken in de galzouthomeostase werd bepaald aan de hand van qPCR ter hoogte van het ileum, het proximale colon (PC), het midden colon (MC) en het distale colon (DC).

**RESULTATEN** Toediening van UDCA, TUDCA en GUDCA leidt niet tot significante verschillen in de expressie van de galzoutreceptoren farnesoid X receptor (FXR), pregnane X receptor (PXR), vitamine D receptor (VDR), small heterodimer partner (SHP) en de membraanreceptor G protein-coupled bile acid receptor (TGR5). Ter hoogte van het PC ziet men een echter wel een trend tot opregulatie van de nucleaire FXR, PXR en de membraanreceptor TGR5. Hoewel de mRNA expressie van FXR, PXR en TGR5 ter hoogte van het ileum constant blijft na UDCA, TUDCA of GUDCA behandeling, is de expressie van de targetgenen intestinal bile acid binding protein (IBABP) en fibroblast growth factor 15 (FGF15) echter gestegen, wat een verhoogde FXR activiteit suggereert. De expressie van de galzouttransporters verandert in het algemeen niet na TUDCA, UDCA of GUDCA behandeling, slechts enkele regionale verschillen worden opgemerkt. De expressie van apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT), multi drug resistance protein (MDR1) en solute carrier family 15 member 1 (SLC15a1) is ter hoogte van het PC namelijk gestegen.

De nucleaire receptoren FXR en PXR, de membraanreceptor TGR5, de apicale transporters ASBT, SLC15a1 en breast cancer resistance protein (BCRP), IBABP, de basolaterale transporter organic solute transporter subunit alpha ( $OST\alpha$ ) en de enzymen inducible nitric oxide synthase (iNOS) en cytochroom P450 family 3, subfamily a, member 11 (CYP3A11) komen ter hoogte van het ileum meer voor dan ter hoogte van colon.

**CONCLUSIE** De studie toont aan dat er geen noemenswaardige verschillen worden waargenomen in de basale expressie van genen betrokken in de galzouthomeostase bij gezonde muizen na de behandeling van TUDCA, UDCA en GUDCA. Eveneens werden geen verschillen waargenomen tussen de behandelingsgroepen TUDCA, UDCA en GUDCA onderling.

# Inleiding

---

## 1.1 Inflammatoire darmziekten

### 1.1.1 Wat is IBD?

Inflammatoire darmziekten (Eng: Inflammatory Bowel Disease (IBD)) is de verzamelterm voor chronische recidiverende ontstekingsziekten in de darm[1]. De precieze etiopathogenese van IBD is nog niet volledig opgehelderd. De chronische intestinale inflammatie zou veroorzaakt worden door een niet-adequaat immunologisch antwoord op een verstoord microbioom in genetische gevoelige individuen[2]. De piekleeftijd waarop de ziekte ontstaat, is meestal tussen 15 en 30 jaar[3].

De twee meest frequente vormen van IBD zijn Colitis Ulcerosa (Eng: ulcerative colitis (UC)) en de ziekte van Crohn (Eng: Crohn's Disease (CD)). Collagene, lymfocyttaire, eosinofiele en ongedetermineerde colitis zijn minder frequente ziektepatronen, behorend tot het ziekteconcept IBD[1].

Patiënten met inflammatoir darmlijden hebben vooral last van diarree, bloedverlies per anum, gewichtsverlies, abdominale pijn, krampen en een valse of toegenomen stoelgangsdwang[4]. Er kunnen echter ook extra-intestinale klachten optreden ter hoogte van de huid, gewrichten, ogen en lever. Omwille van de ernst van de ziekte en het ontstaan ervan op jonge leeftijd heeft IBD een grote impact op de levenskwaliteit van de patiënt. Daarnaast hebben IBD patiënten een hoger risico op het ontwikkelen van andere inflammatoire aandoeningen, zoals primaire scleroserende cholangitis, ankyloserende spondylitis en psoriasis[3].

UC bevindt zich voornamelijk in het colon en wordt opgesplitst in 3 entiteiten (10% van de UC patiënten heeft backwash ileitis). Zo maakt men een onderscheid tussen pancolitis (frequentie 20-30%), linker colon colitis (frequentie 20-30%) en rectosigmoiditis (frequentie 40-60%). Linker colon colitis komt vaker voor bij vrouwen dan bij mannen[1]. Bij UC is de inflammatie en ulceratie van de darmwand beperkt tot de mucosa en de submucosale laag[5]. UC uit zich voornamelijk door een toegenomen stoelgangsfrequentie vermengd met bloed en slijm. Andere symptomen van UC zijn diarree, gewichtsverlies, tenesmen, koorts en pijn ter hoogte van het linker colon[4, 5].

CD geeft voornamelijk pijn en krampen ter hoogte van het rechter abdomen. Nutriëntendeficiëntie en bijgevolg groeiachterstand kan optreden door de gestoorde absorptie ter hoogte van de inflammatoire zones in de darm[4, 6]. In tegenstelling tot UC kan CD zich manifesteren op elke plaats in de gastro-intestinale tractus, de inflammatie bevindt zich echter voornamelijk in het terminaal ileum[1, 3]. Een andere eigenschap van CD zijn de zogenaamde skip lesions, waarbij de geïntermittente darm afgewisseld wordt met gezonde darmsegmenten[1].

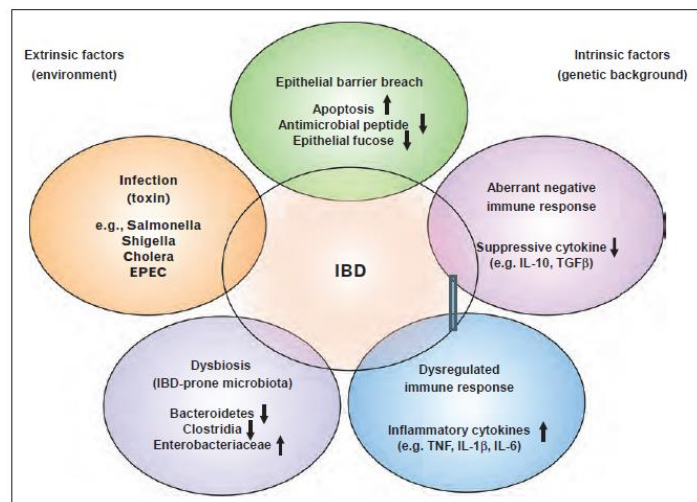
De diagnose van IBD wordt gesteld door middel van anamnese, klinisch onderzoek, bloedresultaten, coloscopie en histologie van het geïntermittente darmweefsel (zie infra)[5].

### 1.1.2 Epidemiologie van IBD

Ongeveer 0,4% van de Europeanen en de Noord-Amerikanen hebben IBD[7], met andere woorden lijden er in Europa 2,2 miljoen mensen aan deze ziekte[2]. De laagste prevalentie van IBD wordt teruggevonden in Azië en de Pacific, met uitzondering van Australië[8]. IBD komt vooral in geïndustrialiseerde landen voor en haast niet in ontwikkelingslanden[4]. De prevalentie van IBD is de laatste 50 jaar sterk gestegen door de toenemende Westerse levensstijl[2]. Op kinderleeftijd komt CD vaker voor dan UC, UC daarentegen heeft de hoogste prevalentie onder de algemene bevolking[5].

### 1.1.3 Pathogenese van IBD

De oorzaak van IBD is nog niet volledig opgehelderd[4]. De pathogenese wordt omschreven als een ongecontroleerde immuunrespons op een verstoorde commensale flora bij genetisch vatbare patiënten[2]. Zoals Figuur 1 weergeeft, worden de volgende risicofactoren: een gestoorde epitheliale barrière, een infectie, een bacteriële dysbiose of een gestoorde



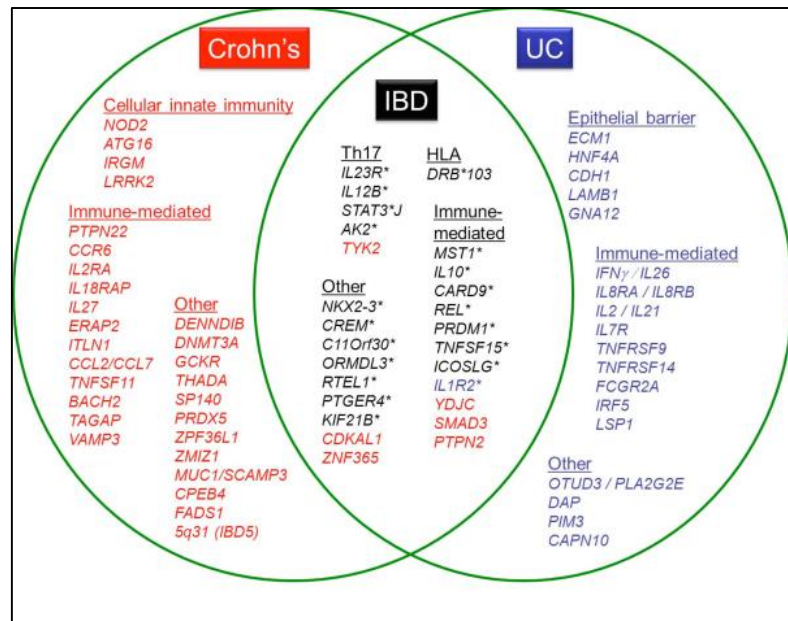
Figuur 1: extrinsieke en intrinsieke risicofactoren van IBD[9].

immuunrespons beschreven in het ontstaansmechanisme van IBD[9]. Tussen deze verschillende risicofactoren onderling bestaat een interactie. Zo wordt het microbiom beïnvloed door omgevingsfactoren, het immuunsysteem en het genoom en bepaalt het genoom deels de compositie van het microbiom en deels de aanmaak van verschillende proteïnen die

betrokken zijn in de intestinale barrière en het immuunsysteem[1]. In onderstaande paragrafen worden de verschillende componenten toegelicht die bij een dysfunctie geassocieerd worden met het ontstaan van IBD.

### 1.1.3.1 Genetisch

Momenteel worden er 163 genmutaties beschreven die geassocieerd zijn met een hogere kans op het krijgen van IBD. Figuur 22 geeft de voornaamste mutaties weer. Deze mutaties doen zich voornamelijk voor in genen die betrokken zijn met het immuunsysteem, de intestinale barrière, de endoplasmatische reticulum stress, de



Figuur 2. Mutaties in het genoom geassocieerd met CD en UC of beiden (IBD)[10].

oxidatieve stressrespons of de galzouthomeostase[2, 3, 9-11]. Deze polymorfismen hebben respectievelijk een aandeel van 13 en 7% in het ontstaan van CD en UC, waaruit blijkt dat mutaties in het genoom slechts gedeeltelijk de etiopathogenese van IBD verklaren[8]. De beschreven polymorfismen bij IBD patiënten worden bovendien bij gezonde individuen waargenomen[9].

Bij CD worden meer dan 30 mutaties beschreven in het NOD2 gen[1]. Het NOD2 eiwit is een intracellulaire sensor van de bacteriële peptidoglycanen. Mutaties van het NOD2 gen leiden tot een verhoogde productie van pro-inflammatoire cytokines en geven aldus een verhoogde kans op het ontwikkelen van IBD[4]. Een mutatie in het E-cadherine gen (CDH1) wordt gelinkt aan UC en zorgt voor een verhoogde intestinale permeabiliteit. De verhoogde intestinale permeabiliteit zorgt voor een verhoogde influx aan microbiële peptiden, wat het immuunsysteem triggert[1].

### 1.1.3.2 Immuunsysteem

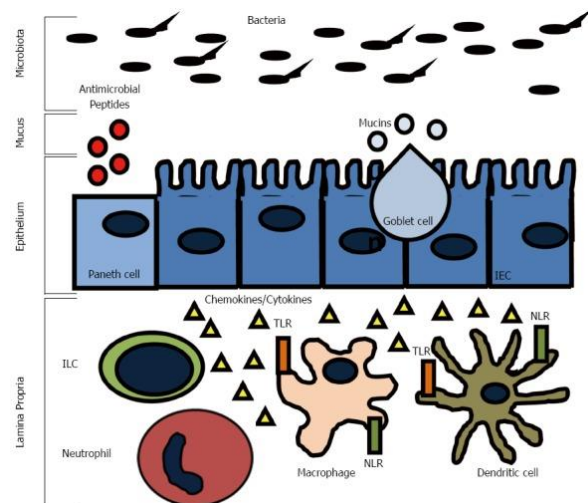
In normale omstandigheden bestaat er een evenwicht tussen T-helper 1 cellen (TH1-cellen) en T-Helper 2 cellen (TH2-cellen). TH2-cellen staan voornamelijk in voor de productie van anti-inflammatoire cytokines zoals interleukine-4 (IL-4), interleukine-6 (IL-6) en interleukine-10 (IL-10). Terwijl TH1-cellen voornamelijk de cellulaire immuniteit moduleren[4].

Bij CD ziet men een overexpressie aan TH1-cellen, wat leidt tot een overproductie van de pro-inflammatoire cytokines: tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interferon gamma (IFN $\gamma$ ), interleukine-2 (IL-2) en interleukine-1b (IL-1b)[4].

Daarentegen wordt UC gekenmerkt door een atypische TH2 respons en een overexpressie van de volgende cytokines: interleukine-5 (IL-5), IL-10 en interleukine-13 (IL-13)[12]. Deze cytokines leiden tot de migratie van niet-klassieke natural killer cellen in het colon. Natural killer cellen produceren op hun beurt overvloedig veel IL-13, wat epitheliale cytotoxiciteit, apoptose en bijgevolg een defecte intestinale barrière induceert. Deze gealtereerde intestinale barrière leidt tot de verhoogde influx van bacteriële peptiden, wat inflammatie veroorzaakt[5]. Auto-immuniteit speelt eveneens een rol bij UC. Deze ziekte wordt gekarakteriseerd door de aanwezigheid van immunoglobuline G1(IgG1) antilichamen gericht tegen antigenen van colonocyten. Deze antigenen vindt men ook terug op de huid, de ogen, de gewrichten en de galwegen, wat de aanwezigheid van extra-intestinale manifestaties bij IBD verklaart[5].

### 1.1.3.3 De intestinale barrière

Een normaal functionerende intestinale barrière wordt gekenmerkt door een intacte mucosa, antimicrobiële peptiden en de aanwezigheid van immuuncellen van het adaptief en gespecialiseerd immuunsysteem (zie Figuur 3). De mucosa van de darm wordt opgebouwd door ten eerste epitheelcellen, ten tweede een lamina propria en ten derde een muscularis mucosae. Het intestinaal epitheel bestaat uit enterocyten, slijmbekercellen, entero-endocriene cellen en Paneth cellen. Slijmbekercellen produceren mucus en bevorderen epitheliaal herstel[3]. Paneth cellen daarentegen produceren antimicrobiële peptiden, zoals alpha-defensine, en cytokines die instaan voor efficiënte autofagie[5]. Het intestinaal epitheel wordt continue hernieuwd door een gecontroleerd proces van cel proliferatie en cel apoptose.



Figuur 3. De verschillende bouwstenen van een normaal functionerende intestinale barrière[14].



Een verstoorde cel proliferatie kan leiden tot een verhoogde intestinale permeabiliteit en wordt gezien bij IBD patiënten[13]. De doorlaatbaarheid van de intestinale barrière kan eveneens gemoduleerd worden door het immuunsysteem, alcoholinname, NSAID gebruik en toxines en proteasen van enterische pathogenen[12, 14]. Door schade of erosie aan de intestinale barrière ontstaat er een gestegen influx van schadelijke stoffen in de circulatie, wat leidt tot inflammatie en tot het ontstaan van IBD[3, 4].

#### *1.1.3.4 Het microbioom*

Een defect in de tolerantie ten opzichte van bacteriën wordt geformuleerd als een centraal punt in de pathogenese van IBD[5]. Zo hebben CD patiënten meer antilichamen tegen bacteriële antigenen (anti Outer Membrane proteïne C (anti-OmpC), anti bacteriële flagelline (anti-CBir1)) en schimmel antigenen (anti-saccharomyces cerevisiae antilichamen (ASCA)).

Patiënten met CD en UC hebben een gedaalde bacteriële diversiteit en een gedaalde aanwezigheid van de mucosa-gebonden bacteriestammen Firmicutes en Bacteroidetes. Het is echter onduidelijk of deze daling een gevolg of een oorzaak is van IBD[2, 3, 14]. Bovendien zijn verschillende anti-inflammatoire bacteriën, waaronder *Faecalibacterium Prausnitzii*, verminderd aanwezig bij IBD patiënten. Intra-gastrische toediening van *F. Prausnitzii* bij dieren zorgt voor een verbetering van de ernst van experimentele colitis[2]. Uit dierenproeven is eveneens gebleken dat de aanwezigheid van microbiota noodzakelijk is om inflammatie te veroorzaken[3]. Bij IBD patiënten wordt een stijging bemerkt van Proteobacteria, inclusief de adherent invasieve *Escherichia coli*. Deze stam invadeert de epitheliale cellen en vermenigvuldigt zich in macrofagen, wat zorgt voor inflammatie[15].

Volgens Goto et al. kan het toedienen van microbiota of een stoelgangtransplantatie de intestinale barrière terug herstellen en IBD verbeteren[9].

#### *1.1.3.5 Omgevingsfactoren*

Bepaalde omgevingsfactoren zijn geassocieerd met een verhoogde kans op IBD. Omgevingsfactoren zijn immers in staat de samenstelling van het microbioom te moduleren[16]. Zoals hoger beschreven (zie epidemiologie), neemt de prevalentie van IBD globaal toe door de toenemende Westerse levensstijl. Omwille van de Westerse levensstijl ziet men de hoogste prevalentie van IBD in sterk ontwikkelde landen. In ontwikkelingslanden treft men de laagste prevalentie[8]. Bovendien ziet men dat de tweede of derde generatie allochtonen, waarvan de (groot)ouders afkomstig zijn van ontwikkelingslanden, dezelfde incidentie van IBD aannemen als de autochtone Westerse bevolking. Bovenstaande twee

voorbeelden tonen de invloed van omgevingsfactoren op het ontstaansmechanisme van IBD aan[2]. De belangrijkste omgevingsrisicofactoren die leiden tot IBD zijn roken, stress, depressie, roken, vitamine D depletie en inname van melkproducten, vlees en onverzadigde vetzuren[2, 4].

Roken heeft een dubbele rol in het ontstaan van IBD. Bij UC patiënten heeft het voornamelijk een protectieve rol[4]. Zo ziet men dat niet-rokers of ex-rokers een hoger risico hebben op het ontwikkelen van UC[3]. Rokende UC patiënten hebben ten opzichte van niet-rokende UC patiënten ook een milder ziekteverloop en behoeven minder hospitalisaties en geneesmiddelen[5]. Het stoppen met roken zorgt voor een hogere kans op het ontwikkelen van UC in vergelijking met niet-rokers. Deze verhoogde kans blijft aanhouden tot 10 jaar na de rookstop[2].

Roken heeft bij CD patiënten een aggraverende rol in het ziekteproces. Het verdubbelt namelijk het risico op het ontwikkelen van CD. Bovendien kennen rokende CD patiënten een agressiever ziekteverloop[2].

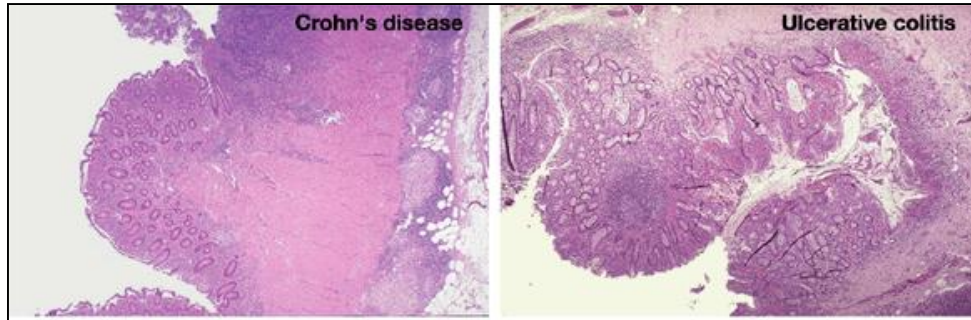
Een hoger risico op IBD ontwikkeling wordt eveneens gezien bij mensen met een dieet rijk aan vetten. Een dieet rijk aan vetten leidt immers tot de verhoogde aanwezigheid van bacteriële pro-inflammatoire subpopulaties in de darm en het mesenterisch vet[2]. Bij dieren stijgt de ernst van colitis na toediening van extra vetten in het dieet[8]. Bovendien wordt vastgesteld dat de dagelijks inname van vetten en dier- en melkproteïnen hoger is bij CD patiënten dan in de algemene bevolking[1].

#### 1.1.4 De diagnose van IBD

Door uitgebreide anamnese, endoscopie en histologisch onderzoek wordt de diagnose IBD gesteld. Andere manieren om de ziekte te identificeren zijn radiologie en capsule endoscopie[5]. De ernst en uitgebreidheid van IBD wordt voornamelijk bepaald door endoscopisch onderzoek. Het bepalen van de sedimentatiesnelheid, de fecale lactoferrine of calprotectine helpt de ernst van de inflammatie in te schatten en de ziekte op te volgen[5].

Endoscopisch onderscheidt men milde, matige en ernstige UC. Een milde UC heeft een granulaire, erythemateuze uitzicht met verlies van de vasculaire patronen, matige UC vertoont micro-ulceraties en erosies en ernstige UC vertoont spontane bloedingen[5].

CD wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van afteuze ulcera, een cobblestone patroon en skip lesions. De medische term skip lesions betekent dat gebieden van inflammatie afgewisseld worden met gezonde darmsegmenten [5].



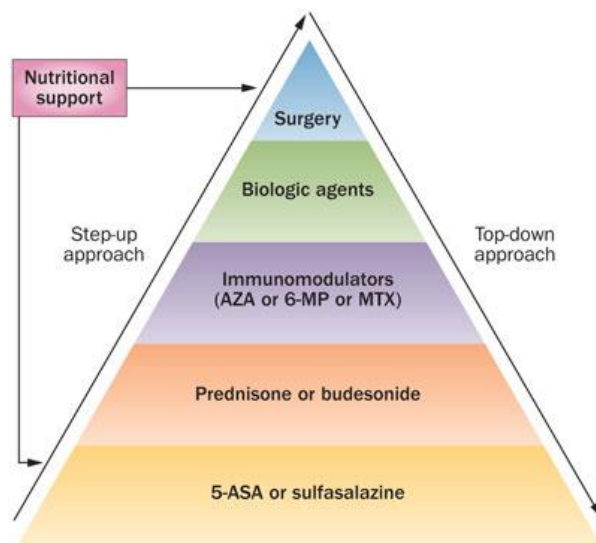
Figuur 4. Histologische verschillen tussen CD en UC.

Histologisch wordt UC gekenmerkt door een darmbiopt rijk aan lymfocyten, plasmacellen en granulocyten (zie figuur 4). Andere typische bevindingen zijn slijmbekercel depletie, de architecturale verstering van crypten en de aanwezigheid van ulceraties. Typisch voor CD is de aanwezigheid van epitheloïde granuloma's[5].

### 1.1.5 De behandeling van IBD

Verschillende niet-specifieke medicijnen worden gebruikt in de behandeling van IBD. De medicijnen hebben als doel de klachten van de patiënten te verminderen, de inflammatie te onderdrukken en mucosale genezing te bevorderen[1, 17]. IBD wordt stapsgewijs behandeld.

Er wordt overgeschakeld naar een andere therapie, indien de symptomen niet verdwijnen bij de initiële therapie. Figuur 5 geeft de verschillende therapieën van IBD weer[17]. Bij een acute aanval van inflammatoir darmlijden worden voornamelijk 5-aminosalicylaten en orale of rectale corticosteroïden gebruikt. Zelden is in de acute fase het gebruik van ciclosporine, TNF $\alpha$ -remmers of vedolizumab geïndiceerd. Chronische



Figuur 5. stapsgewijze behandeling van IBD[18].

onderhoudsbehandelingen van IBD zijn 5-aminosalicylaten, azathioprine, mercaptopurine, laaggedoseerd methotrexaat, TNF $\alpha$ -remmers en vedolizumab (richtlijnen BCFI).

#### 1.1.5.1 5-aminosalicylaten

5-aminosalicylaten of 5-ASA preparaten worden gebruikt in de behandeling van mild tot matige UC in zowel de acute – als de remissiefase. Dit medicijn induceert bij 50% van de patiënten remissie. De precieze werking van 5-ASA preparaten is onbekend en is in CD controversieel[17]. Een mogelijk werkingsmechanisme is de inhibitie van cytokine synthese door de opregulatie van peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) en zijn target

genen[17]. Andere mogelijke werkingsmechanismen zijn de inhibitie van de productie van prostaglandines en leukotriënen, de inhibitie van neutrofielen chemotaxis en de inhibitie van adenosine secretie als antwoord op bacteriële peptiden. Mogelijks verhinderen aminosalicylaten ook de activatie van nuclear factor kappa bèta (NF-κB)[6]. Omwille van nevenwerkingen stopt 20 tot 25% van de patiënten de therapie. Milde bijwerkingen zijn: hoofdpijn, epigastrische pijn, nausea, braken en rash. Gevaarlijke, maar zeldzame bijwerkingen zijn: hepatitis, auto-immune hemolyse, aplastische anemie, agranulocytose en pancreatitis[17].

#### *1.1.5.2 Corticosteroiden*

Patiënten met milde tot matige UC die refractair zijn aan de behandeling van orale 5-aminosalicylaten kan men orale glucocorticoïden of immunosuppressiva voorschrijven[5]. Omwille van negatieve effecten op lange termijn worden corticosteroiden enkel gebruikt in de acute behandeling van IBD. Corticosteroiden oefenen hun werking uit door de expressie van verschillende adhesiemoleculen te blokkeren en de migratie van inflammatoire cellen naar het darmslijmvlies te verhinderen. Daarnaast induceren corticosteroiden eveneens apoptose van geactiveerde lymfocyten en onderdrukken ze de productie van inflammatoire cytokines. In de behandeling van IBD is budesonide het voorkeurscorticosteroid. Budesonide heeft namelijk een hoge first-pass metabolisme en bijgevolg weinig systemische bijwerkingen. Acute bijwerkingen van corticosteroiden zijn immunosuppressie, glaucoom, vochtretentie, hypertensie, hyperglycemie, gewichtstoename en psychiatrische ziekten. Lange termijn bijwerkingen zijn osteoporose, cataract, bijnierinsufficiëntie, diabetes mellitus en een gestoorde wondheling[17].

#### *1.1.5.3 thiopurines*

Thiopurines, zoals azathioprine en 6-mercaptopurine, zijn immunomodulatoren die voornamelijk gebruikt worden in de onderhoudsbehandeling van IBD. Thiopurine is pas werkzaam na 3 maanden toediening. Het actief thiopurine metaboliet 6-thioguanine (6-TGN) is een purine antagonist en verhindert de proliferatie van T en B lymfocyten. Het induceert bij 50 tot 66 % van de patiënten remissie. Bij het opstarten van de therapie moet er echter gecontroleerd worden op hepatotoxiciteit en leukopenie als mogelijke bijwerkingen. Er bestaat namelijk genetische variatie in de enzymatische activiteit van thiopurine S-methyltransferase (TPMT), wat 6-TGN omzet tot 6-methylmercaptopurine (6-MMP). Te sterke activiteit van TPMT leidt tot de vorming van te hoge concentraties aan het hepatotoxische metaboliet 6-MMP. Wanneer de TPMT activiteit te laag is, kan leukopenie ontstaan. Andere mogelijke bijwerkingen zijn: pancreatitis (voornamelijk in de eerste maand van de therapie), huiduitslag,

artralgien en koorts. De meest gevreesde lange termijn bijwerking van thiopurines is de ontwikkeling van lymfomen en non-melanoma huidkanker[17].

#### *1.1.5.4 Methotrexaat*

Methotrexaat is net zoals thiopurine een immunomodulator. Het wordt gebruikt als onderhoudsbehandeling indien thiopurines, omwille van bijwerkingen of contra-indicaties (lage TPMT activiteit) niet aangewezen zijn. Methotrexaat inhibeert de productie van interleukine-1 (IL-1), interleukine-2 (IL-2), interleukine-6 (IL-6) en interleukine-8 (IL-8) en is werkzaam 8 weken na het opstarten. Mogelijke bijwerkingen van methotrexaat zijn nausea, stomatitis, diarree, haarverlies, leukopenie, interstitiële pneumonitis en hepatische fibrose. Omwille van zijn teratogene en abortus inducerende werking, mag het medicijn niet gebruikt worden tijdens de zwangerschap[17].

#### *1.1.5.5 Cyclosporine*

Cyclosporine kan ook gebruikt worden in de behandeling van IBD. Het gebruik is echter minder frequent en meestal voorbehouden voor de behandeling van ernstige of fulminante colitis bij UC patiënten. Cyclosporine werkt door calcineurine selectief te inhiberen, wat dus leidt tot een neerregulatie van verschillende inflammatoire cytokines[17].

#### *1.1.5.6 Biologicals*

Enkele voorbeelden van biologicals zijn infliximab, adalimumab en golimumab. Deze antilichamen oefenen hun werking uit door te binden met het pro-inflammatoire TNF $\alpha$  en ze bijgevolg TNF $\alpha$  neutraliseert. Ongeveer 60% van de patiënten reageert aanvankelijk goed op de biologicals met een klinische remissie na 2 tot 6 weken. Een daling in werkzaamheid van de biological wordt echter bij 30 tot 50% van de initiële responders opgemerkt. Deze daling wordt verklaard door immunogeniciteit (de vorming van antilichamen tegen biologicals), veranderde farmacokinetiek of verandering in de dominante pathofysiologische weg van IBD. Wanneer de klinische toestand echter verslechtert zonder zichtbare endoscopische afwijkingen, moet men denken aan een onderliggend proces zoals een enterische infectie of inflammatoire bowel syndrome(IBS). Vooraleer men biologicals toedient, wordt de patiënt gecontroleerd op de aanwezigheid van hepatitis B en tuberculose[17].

Natalizumab is een antilichaam gericht tegen  $\alpha 4\beta 1$  en  $\alpha 4\beta 7$  integrines. Inhibitie van deze integrines verhindert de migratie en adhesie van leukocyten naar geïntegreerde regio's in de gastrointestinale tractus en het centraal zenuwstelsel. Deze biologicals worden gebruikt indien de conventionele anti-TNF $\alpha$  therapie faalt. Het is effectief in zowel de actieve als chronische behandeling van IBD[17].

Vedolizumab is een antilichaam gericht tegen het  $\alpha 4 \beta 7$  integrine. Het  $\alpha 4 \beta 7$  integrine bevindt zich enkel in de gastro-intestinale en de nasopharyngeale mucosa. vedolizumab is effectief bij zowel CD en UC en wordt gebruikt indien basistherapieën falen. Het kan bij matige of ernstige UC als initiële therapie gebruikt worden[17].

#### *1.1.5.7 De chirurgische aanpak*

Indien medicamenteuze behandeling faalt, wordt er beslist om over te gaan tot chirurgie[4]. Omwille van complicaties komen ongeveer 25% van de UC patiënten in contact met chirurgie[18]. Bij de beslissing om tot chirurgie over te gaan, wordt er rekening gehouden met verschillende factoren, zoals de stoelgangfrequentie, het klinisch onderzoek, het C-reactieve proteïne(CRP)-gehalte, albuminegehalte, fecale calprotectine en radiologische en endoscopische bevindingen[5, 18]. Indicaties voor chirurgie bij UC zijn fulminante colitis, dysplasie, neoplasie en refractair colitis[17]. Een colectomie met herstel van de darm door middel van een ileale pouch anale anastomose (IPAA, Eng: Ileal pouch-anal anastomosis) is bij UC patiënten de procedure bij voorkeur. IPAA leidt tot een opmerkelijke verbetering van de levenskwaliteit, gelijkaardig aan de algemene bevolking[18].

Chirurgie is bij CD conservatief. Men tracht zo veel mogelijk de darm te sparen en te vermijden dat er een short bowel syndroom(SBS) ontstaat. Ongeveer 70 tot 90% van de CD patiënten komt vroeg of laat in contact met chirurgie[18]. Bij CD wordt er overgegaan tot chirurgie indien er sprake is van een strictuur, een perforatie, kanker, een fistel of refractaire inflammatie[17].

## 1.2 Galzouten

### 1.2.1 Wat zijn galzouten?

Galzouten zijn amfipatische moleculen met een hydrofobe kern en een hydrofiele staart. Ze worden opgeslagen in de galblaas en komen tijdens de maaltijd vrij in het duodenum onder invloed van het hormoon cholecystokinine (CCK), wat galblaascontractie veroorzaakt[19].

### 1.2.2 Functies van galzouten

Galzouten spelen een primaire rol bij de vertering van vetten en faciliteren de opname van lipiden, cholesterol en vetoplosbare vitaminen[10, 19, 20]. De rol van galzouten in de vertering van vetten is voornamelijk een detergentische rol, namelijk vetdruppels beter oplosbaar maken in de darm. Dit gebeurt als volgt: concentrische bewegingen van de darm splijten de vetdruppels in de darm. Daarna binden galzouten met hun hydrofobe kern aan het oppervlak van de gesplitste vetpartikels, waarbij de hydrofiele staart naar buiten wordt gericht. De hydrofiele staart van galzouten voorkomt dat vetdruppels terug samensmelten. Door de opsplitsing tot kleinere vetdruppels stijgt de som van de totale oppervlakte van de vetpartikels, waarop de enzymen lipase en colipase kunnen op inwerken. Wat leidt tot een betere en snellere vertering van vetten. De enzymen lipase en colipase zetten vetpartikels om tot monoglyceriden en vrije vetzuren[19].

Galzouten voorkomen eveneens de vorming van galstenen door de oplosbaarheid van cholesterol in gal te verhogen[19]. De productie van galzouten in hepatocyten (zie 1.2.3 De synthese van galzouten) is verantwoordelijk voor eveneens 50% van de cholesterol eliminatie in het lichaam. Galzouten spelen aldus een rol in de cholesterolhomeostase[21]. Ten vierde hebben galzouten antimicrobiële eigenschappen. Ze zijn immers toxisch voor bacteriën en stimuleren de productie van antimicrobiële peptiden[20].

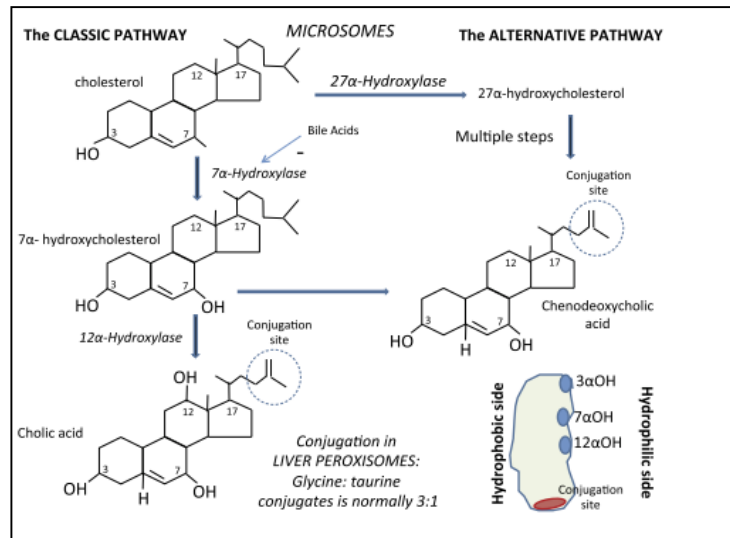
### 1.2.3 De synthese van galzouten

#### 1.2.3.1 Primaire galzouten

Ter hoogte van de lever worden galzouten gevormd door een reeks van sterol ring hydroxylaties en oxidaties van de zijtakken van cholesterol. De mens heeft twee primaire galzouten: Cholzuur (CA of cholic acid) en chenodeoxycholzuur (CDCA of chenodeoxycholic acid). Bij muizen wordt naast CDCA en CA, muricholzuur (MCA of muricholic acid) beschreven als primair galzout[20].

### Klassieke pathway

Primaire galzouten worden voornamelijk via de klassieke pathway gevormd, zie Figuur 6. De snelheidsbepalende stap van de klassieke pathway is de omvorming van cholesterol tot 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol door het enzym cholesterol 7 alpha- hydroxylase (CYP7A1), die gelegen is in het endoplasmatisch reticulum van de hepatocyt[22]. De klassieke pathway maakt gebruik van minstens 14 verschillende enzymen om cholesterol om te vormen tot CA of CDCA[15].



Figuur 6. De klassieke en alternatieve pathway voor de vorming van primaire galzouten[24].

### Alternatieve pathway

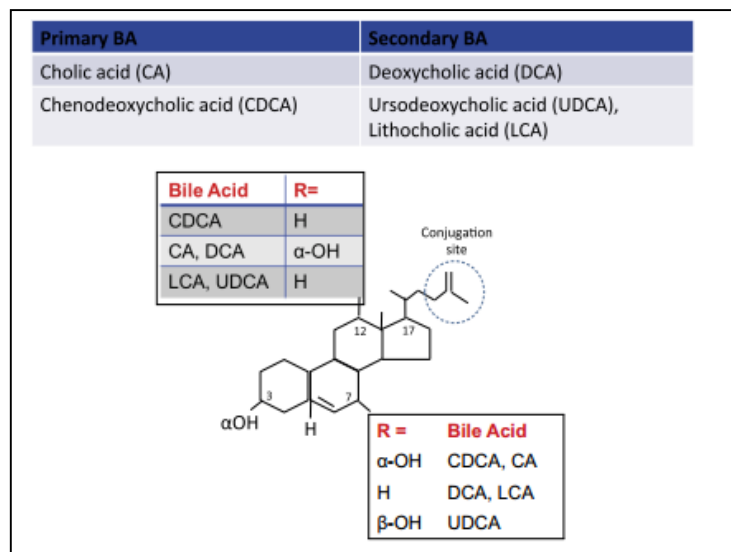
De alternatieve pathway is bij mensen verantwoordelijk voor de productie van 10% van de primaire galzouten. Bij knaagdieren kan dit aandeel oplopen tot 25%. De mitochondriale sterol 27-hydroxylase(CYP27A1) is het belangrijkste enzym in de alternatieve pathway. Het faciliteert immers de omvorming van cholesterol tot 27-hydroxycholesterol en 3 $\beta$ -hydroxy-5-cholestenoic acid. De alternatieve pathway leidt enkel tot de vorming van het primaire galzout CDCA, zie Figuur 6[22].

Vooraleer de primaire galzouten in de galwegen gesecreteerd worden, worden ze ter hoogte van de lever geconjugeerd met glycine en taurine. De ratio glycine/taurine is bij de mens 3 op 1. Bij muizen worden de primaire galzouten voornamelijk gekoppeld aan taurine (95%)[20]. De conjugatie van het galzout met glycine of taurine verhoogt de wateroplosbaarheid van galzouten, wat passieve reabsorptie van galzouten ter hoogte van de dunne darm verhindert (zie enterohepatische cyclus 1.2.4)[19].



### 1.2.3.2 Secundaire galzouten

De primaire galzouten worden omgezet tot secundaire galzouten over het ganse verloop van de darm door de inwerking van bacteriële enzymen. Deze omzetting naar secundaire galzouten gebeurt echter voornamelijk ter hoogte van het colon, aangezien de concentratie aan bacteriën hier het hoogst is[15]. Enzymatische 7-dehydroxytie van de primaire galzouten CA en CDCA is irreversibel en leidt tot



Figuur 7. Schematische voorstelling van de primaire galzouten CA en CDCA en de secundaire galzouten DCA, UDCA, LCA[24].

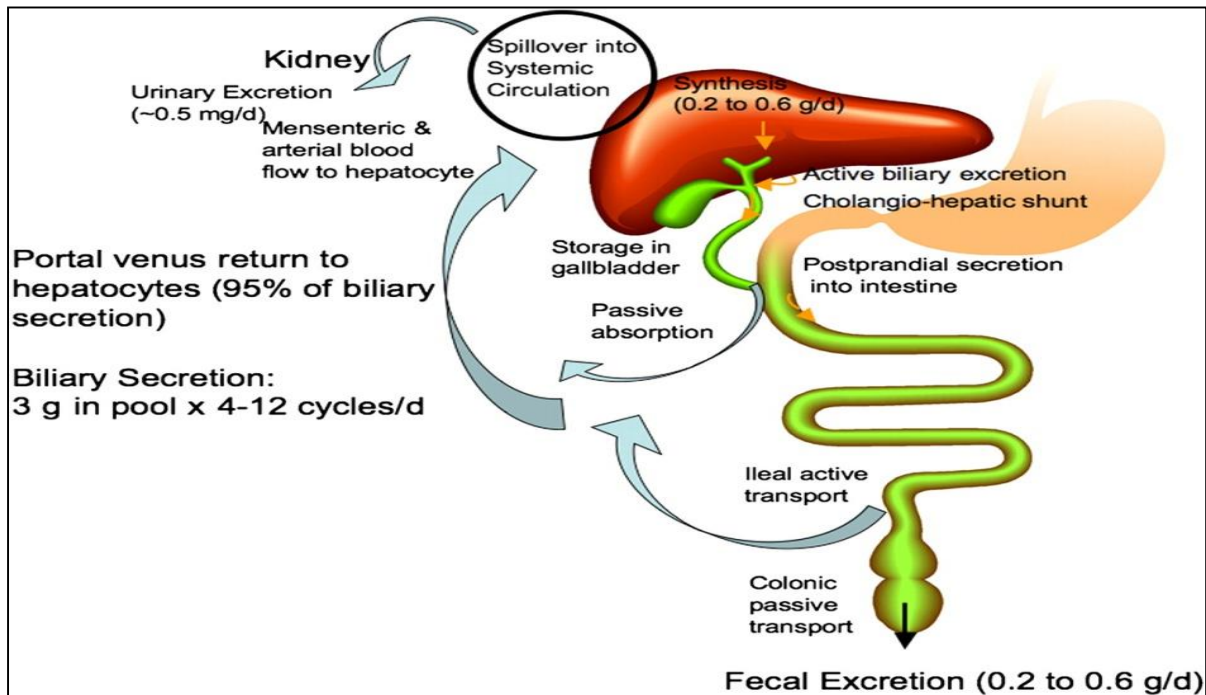
respectievelijk de vorming van het secundaire galzout deoxycholzuur (DCA of deoxycholic acid) en het secundaire galzout lithocholzuur (LCA of lithocholic acid) (zie Figuur 8). 7-dehydroxylatie verhoogt de graad van hydrofobiciteit bij beide secundaire galzouten. Ursodeoxycholzuur (UDCA of ursodeoxycholic acid) wordt gevormd door epimerisatie van de 7 $\alpha$ -hydroxylgroep van gedeconjugeerde CDCA door bacteriële epimerasen[15]. De beschreven secundaire galzouten worden ofwel gereabsorbeerd ter hoogte van het colon ofwel geëxcreteerd in de feces[19].

### 1.2.4 De enterohepatische cyclus

De galzouten circuleren onder normale fysiologische omstandigheden 6 tot 10 keer per dag tussen de darm en de lever, de enterohepatische cyclus genaamd (zie figuur 8). Slechts kleine hoeveelheden galzouten gaan tijdens de enterohepatische cyclus verloren en worden vervangen door de novo synthese (0,6g per dag)[10]. De totale hoeveelheid galzouten die gestockeerd wordt in de galblaas, bedraagt bij de mens 3 tot 4 gram. Tijdens het eten worden de galzouten gesecreteerd via de galwegen in het duodenum. Deze secretie wordt gestimuleerd door het hormoon cholecystokinine. De vrijstelling van cholecystokinine wordt afgeremd door de aanwezigheid van galzouten in het duodenum[19].

Slechts 5 % van de gesecreteerde galzouten worden ter hoogte van de dunne darm niet gereabsorbeerd en komen terecht in het colon. Tijdens de passage doorheen de darm worden onder invloed van bacteriële enzymen primaire galzouten omgevormd tot secundaire galzouten (zie supra). Deze omvorming gebeurt voornamelijk in het colon, aangezien hier het meest

bacteriën aanwezig zijn[15]. De gevormde secundaire galzouten worden dan ofwel ter hoogte van het colon gereabsorbeerd ofwel via de stoelgang geëxcreteerd[19].



Figuur 8. De enterohepatische cyclus van de galzouten[21].

De aanwezigheid van actieve of passieve transporters ter hoogte van de apicale membraan van de enterocyt is nodig om galzouten te absorberen, aangezien galzouten te groot zijn om paracellulair te diffunderen. Ter hoogte van het ileum worden de meeste galzouten via actief transport gereabsorbeerd. Een kleine fractie aan galzouten, galzouten die niet-geïoniseerd en niet-geconjugeerd zijn (tenzij met glycine), worden eveneens via passief transport gereabsorbeerd[20].

In het cytosol van de enterocyt binden de galzouten met de intracellulaire intestinal bile-acid binding protein (IBABP) (zie infra). IBABP transporteert vervolgens de galzouten van de apicale naar de basolaterale zijde van de enterocyt. Ter hoogte van de basolaterale membraan worden de galzouten gebonden aan albumine en getransporteerd als een galzout-albumine complex in de portale circulatie[21]. Ter hoogte van de lever kunnen de secundaire galzouten die de irreversibele 7-dehydroxylatie niet hebben ondergaan, terug omgevormd worden tot de primaire galzouten CA of CDCA. In de hepatocyt wordt het hepatotoxische LCA daarentegen geconjugeerd met sulfaat of glucuronide. Deze conjugatie verhindert de reabsorptie van LCA ter hoogte van de darm en bijgevolg wordt LCA via de stoelgang geëxcreteerd uit het lichaam [15].

Om bovenstaande redenen bestaan de galzouten in gal voornamelijk uit CA, CDCA en DCA, aangevuld met kleine hoeveelheden UDCA, LCA en andere restgalzouten. Bij fecesonderzoek vindt men vooral DCA, LCA en kleine hoeveelheden van CDCA, CA en UDCA terug[19]. De grootte en de diversiteit van galzouten in de galzoutenpool hangt af van verschillende factoren, zoals de efficiëntie van het enterohepatisch transport, het gastheer metabolisme, het microbiom en de homeostatische feedback mechanismes tussen hepatocyten, enterocyten en het microbiom[20].

### 1.2.5 De verschillende spelers van de intestinale galzouthuishouding

In onderstaande paragraaf bespreken we achtereenvolgens de nucleaire receptoren, de membraanreceptor G protein-coupled bile acid transporter (TGR5), de apicale transporters, de intracellulaire receptoren, de basolaterale transporters en de detoxificerende enzymen die betrokken zijn in de intestinale galzouthuishouding.

#### 1.2.5.1 De nucleaire receptoren

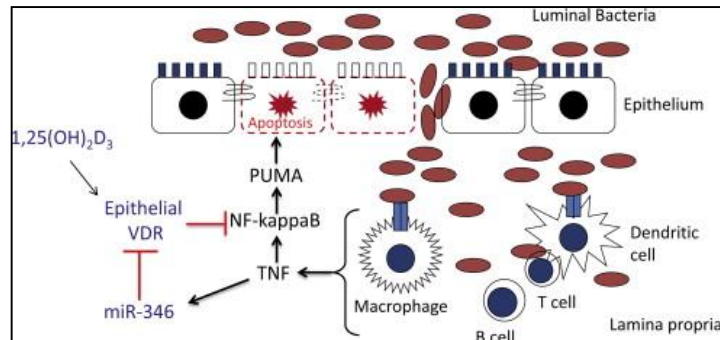
Farnesoid X receptor (**FXR**) is een nucleaire receptor met als natuurlijk ligand onder andere galzouten. Bij activatie moduleert FXR de expressie van transporters betrokken in de galzouthomeostase. Zo leidt FXR activatie tot de neerregulatie van de apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) (zie 1.2.5.3) en tot de opregulatie van verschillende galzout efflux transporters, detoxificerende enzymen en IBABP[19]. FXR activatie leidt eveneens tot een verhoogde aanmaak van de endocriene fibroblast growth factor 19 (FGF19) ter hoogte van de darm (**FGF15** is equivalent in muis). FGF19 komt vrij in de circulatie en bindt met de fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) op de basolaterale membraan van de hepatocyt. Stimulatie van de FGFR4 leidt op zijn beurt tot een verminderde expressie van het snelheidsbepalend enzym van de klassieke pathway, CYP7A[19].

Naast zijn centrale rol in de galzout homeostase, heeft FXR ook belangrijke anti-inflammatoire eigenschappen. Stimulatie van FXR leidt immers tot een verminderde productie van de pro-inflammatoire cytokines IL-1 $\beta$ , IL2, IL-6, TNF $\alpha$  en IFN $\gamma$ . FXR activatie reduceert eveneens het risico op kankerontwikkeling door enerzijds inflammatie te onderdrukken en anderzijds de Wnt/ $\beta$ -catenine pathway te onderdrukken. Activatie van de Wnt/ $\beta$ -catenine pathway wordt gezien bij tumorogenese[12].

FXR stimuleert ook de expressie van inducible nitric oxide synthase (**iNOS**). Nitric oxide (NO) is bactericid en moduleert tevens de intestinale barrière[12, 19]. NO heeft een dubbele rol in inflammatie. Lage concentraties aan NO zijn mogelijks cytoprotectief, aangezien het de mucosale bloedcirculatie verhoogt. Hoge concentraties aan NO leiden echter tot beschadiging

van het intestinaal epitheel, wat leidt tot een gedaalde intestinale barrière. Bij IBD patiënten ziet men een opregulatie van iNOS[12].

De Vitamine D receptor (**VDR**) is een nucleaire receptor en is zowel in enterocyten als in immuuncellen aanwezig. VDR stimulatie leidt tot een betere integriteit van de intestinale barrière door te interfereren met de TNF $\alpha$  geïnduceerde apoptose van de enterocyt. Vitamine D (1,25(OH) $_2$ D $_3$ ) toediening inhibeert immers de apoptotische NF- $\kappa$ B pathway die wordt geactiveerd bij verhoogde TNF $\alpha$  spiegels (zie Figuur 9). Een verlaagde VDR expressie wordt gezien bij inflammatoire omstandigheden door de verhoogde aanmaak van de RNA molecule miR-346[23].



Figuur 9. De werking van VDR op inflammatoire pathways[25].

Uit studies blijkt dat het toedienen van vitamine D de ernst van inflammatie bij een IBD episode vermindert en aldus een nuttige therapeutische behandeling kan zijn. Vitamine D depletie wordt gezien bij IBD patiënten[2, 23]. VDR zorgt eveneens voor de opregulatie van het detoxificerend enzym CYP3A4[24].

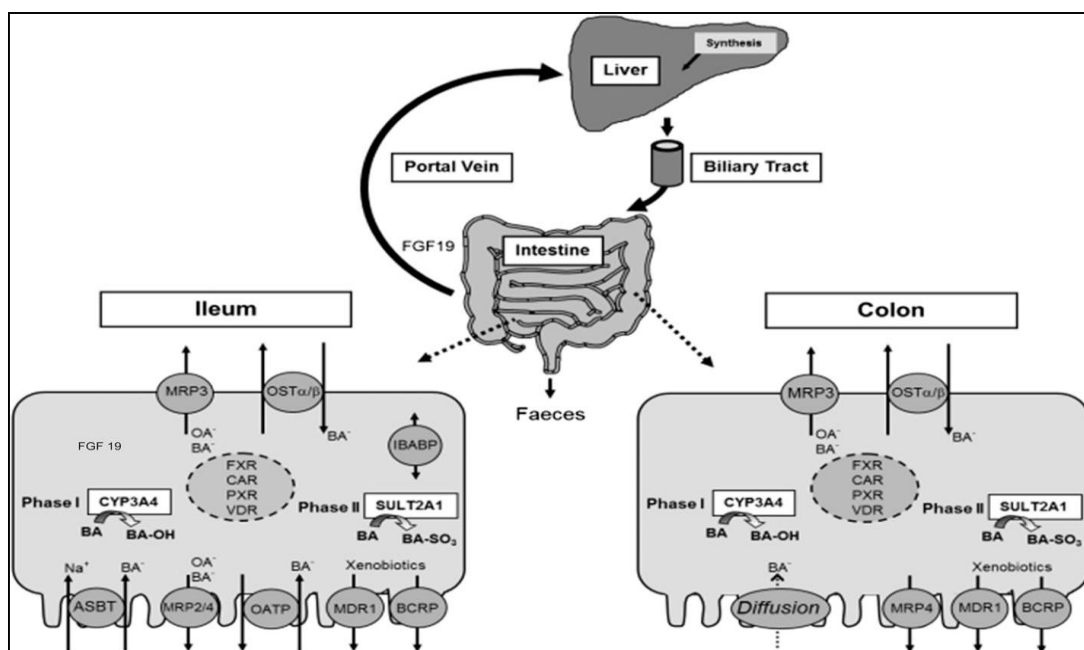
De nucleaire Pregnane- X Receptor (**PXR**) is belangrijk in het handhaven van de mucosale integriteit door te verhinderen dat schadelijke stoffen accumuleren in de cel[25]. Zo leidt activatie van PXR tot de opregulatie van de apicale efflux transporters: multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4), multidrug resistance protein 1 (MDR1) en de basolaterale multidrug resistance-associated protein 3 (MRP3) en het detoxificerend enzym cytochroom P450 3A4 (CYP3A4, equivalent bij muizen is CYP3A11) (zie Figuur 11). PXR wordt onder andere geactiveerd door galzouten, immunosuppressiva, chemo en antibiotica[19]. PXR verbetert eveneens de intestinale inflammatie door de pro-inflammatoire transcriptie factor nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) en het pro-inflammatoire cytokine TNF $\alpha$  te neutraliseren[25]. Mutaties die leiden tot een gedaalde PXR activiteit zijn geassocieerd met een verhoogd risico op IBD ontwikkeling[19].

### 1.2.5.2 De membraanreceptor TGR5

De membraanreceptor G-protein coupled bile acid receptor 1 (GPBAR-1) of **TGR5** bevindt zich voornamelijk op intestinale neuroendocriene cellen, de galblaas, de milt, macrofagen en cholangiocyten. TGR5 speelt een belangrijke rol in de energie huishouding. Zo stimuleert TGR5 de loslating van glucagon-like peptide 1, wat op zijn beurt de loslating stimuleert van insuline ter hoogte van de pancreas[8].

In de dunne darm vertragen galzouten de peristaltiek, wat een efficiënte absorptie ter hoogte van het ileum bevordert. Ter hoogte van het colon versnellen galzouten daarentegen de motiliteit van de darm. Dit gebeurt door binding met TGR5 op enterochromaffine en neuronen, wat zorgt voor de loslating van hydroxytryptamine en calcitonine en bijgevolg een toegenomen motiliteit[22].

TGR5 heeft net zoals VDR een anti-inflammatoire werking door de NF- $\kappa$ B activiteit te inhiberen[26]. TGR5 inhibeert eveneens de productie van pro-inflammatoire cytokines[27].



Figuur 10. Schematische voorstelling van de belangrijkste transporters, betrokken in de enterohepatische cyclus van galzouten ter hoogte van de darm[10].

### 1.2.5.3 De apicale transporters

Zoals hoger vermeld, worden galzouten via actief transport gereabsorbeerd ter hoogte van het terminale ileum door **ASBT**[10]. Deze transporter heeft de instroom van 2 Na<sup>+</sup>-ionen nodig om één galzout te transporteren over de apicale membraan (zie Figuur 110)[21]. ASBT heeft een hogere affiniteit voor hydrofiële galzouten dan voor hydrofobe galzouten en bindt sterker met dihydroxy galzouten (CDCA en DCA) in vergelijking met trihydroxy galzouten (CA, taurocholic acid (TCA) en glycocholic acid (GCA))[19].

Binding tussen de transcriptiefactor hepatocyt nuclear factor 1 homeobox A (HNF1 $\alpha$ ) en de ASBT promotor regio leidt tot transcriptie van ASBT. FXR inhibeert indirect de expressie van ASBT door de productie te stimuleren van de nucleaire receptor, small heterodimer partner (**SHP**), wat leidt tot een daling van de ASBT expressie. Bij HNF1 $\alpha$  knock-out muizen wordt er geen expressie van ASBT waargenomen. Bij FXR knock-out muizen daarentegen zijn er in basale omstandigheden geen alteraties in de ASBT expressie[21]. Tabel 1 somt de verschillende transcriptiefactoren op die de expressie van ASBT moduleren. Bij mensen met een mutatie in beide allelen van het ASBT gen, wordt er primaire galzoutmalabsorptie waargenomen met als belangrijkste symptomen diarree, steatorroe en hypocholesterolemie. Een gedaalde opname van galzouten leidt tot een verminderde FXR activatie en bijgevolg een gedaalde aanmaak van FGF19. FGFR4 wordt minder geactiveerd, wat zorgt voor een gestegen galzoutsynthese in de hepatocyten en bijgevolg een daling van het plasma cholesterol[10]. Mutaties in het ASBT gen leiden tot een verhoogde susceptibiliteit voor CD[28].

Tabel 1. Moleculaire regulatie van ASBT[22].

Transcriptiefactor	Ligand	Effect op ASBT	Fysiologische implicaties
Farnesoid X Receptor (FXR)	Galzout	ASBT(+)	Galzout efflux +
Small heterodimer Partner (SHP)		ASBT(-)	Gedaalde galzout absorptie in de cel
Peroxisome proliferator activated receptor-alpha (PPAR $\alpha$ )	Vetzuren	ASBT(+)	Gestegen galzout absorptie
Hepatic Nuclear Factor 1-alpha (HNF1 $\alpha$ )	-	ASBT	Basale promotor activiteit
Glucocorticoid receptor (GR)	Glucocorticoid	ASBT(+)	Verhoogt de galzout opname
Retinoic Acid Receptor (RAR)	retinoids	ASBT(+)	Verhoogt de galzout opname
Vitamine D receptor (VDR)	Vitamine D	ASBT(+)	Verhoogt de galzout opname

**MDR1** en **MRP4** bevinden zich aan de apicale zijde van de enterocyt en fungeren beiden als efflux-pomp van verscheidene xenobiotica[25]. Beide transporters worden gestimuleerd door PXR, FXR en VDR[10, 19, 25].

Breast cancer related protein (**BCRP**) bevindt zich eveneens aan de apicale zijde van de membraan. Het zorgt voor de efflux van verschillende toxines uit de cel. IBD patiënten vertonen een gedaalde BCRP expressie tijdens inflammatie[29].

#### *1.2.5.4 De intracellulaire transporter IBABP*

Ileal bile-acid binding protein (**IBABP**), aanwezig in het cytosol van de enterocyt, faciliteert het transport van galzouten en vetzuren en andere hydrofobe substanties van de apicale naar de basolaterale membraan[19, 20]. FXR activatie stimuleert de IBABP expressie[20]. Een verlaagde IBABP expressie wordt gezien bij necrotiserende enterocolitis[19]. IBABP heeft de hoogste affiniteit voor taurine- geconjugeerde galzouten en een mindere affiniteit voor glycine geconjugeerde en ongeconjugeerde galzouten[20]. Een biallelische mutatie van het IBABP gen leidt eveneens tot primaire bile-acid malabsorptie (BAM) met symptomen zoals diarree, steatorroe en hypocholesterolemie[10].

#### *1.2.5.5 De basolaterale transporters*

De heterodimere organic solute transporter alpha en bèta (**Osta en OSTβ**) faciliteren ter hoogte van het jejunum, het ileum, het colon en het cecum het passief transport van het merendeel van de galzouten over de basolaterale membraan. De expressie van Osta/β wordt gemoduleerd door FXR[20].

Een andere basolaterale transporter, betrokken bij de enterohepatische circulatie, is de multidrug resistance-associated protein 3 (**MRP3**). De functie van MRP3 lijkt eerder gering. In vitro onderzoek wees uit dat deze transporter voornamelijk glucuronide geconjugeerde galzouten transporteert[20].

#### *1.2.5.6 De detoxificerende enzymen*

Elke enterocyt bevat detoxificerende enzymen, zoals **CYP3A11** en sulphotransferase 2A1 (SULT2A1). Deze enzymen metaboliseren naast xenobiotica ook galzouten en verhinderen bijgevolg de accumulatie van galzouten tot cytotoxische concentraties in de enterocyt. CYP3A11 vormt hydrofobe galzouten (cytotoxisch) om tot hydrofiele galzouten[10]. De expressie van CYP3A11 wordt gestimuleerd door PXR[10] en FXR[30].

## 1.3 Interactie tussen IBD, het microbioom en galzouten

### 1.3.1 IBD en zijn invloed op galzouten

Zoals hoger vermeld is het ontstaansmechanisme van IBD nog niet volledig opgehelderd. Men ziet bij CD een daling van de galzoutenpool diversiteit en gedaalde serum concentraties van secundaire galzouten[15]. Bij IBD patiënten ziet men eveneens een stijging in de glycine/taurine ratio en een daling van het secundaire galzout DCA, UDCA daarentegen stijgt wel. In de stoelgang van IBD patiënten wordt in vergelijking met gezonde individuen een sterke toename gezien van geconjugeerde galzouten en een afname van secundaire galzouten[31]. Of deze waargenomen veranderingen de ziekte veroorzaken of het gevolg zijn van de ziekte, is tot op heden nog onduidelijk[15]. Een daling van de hoeveelheid galzouten wordt eveneens waargenomen in het serum en de stoelgang van IBD patiënten[31]. Dit wordt veroorzaakt door een verminderde galzoutabsorptie ter hoogte van het ileum (zie 1.2.5.3). Deze daling in de hoeveelheid galzouten zorgt voor een gedaalde bacteriële diversiteit en een stijging van pro-inflammatoire bacteriestammen. Het is echter moeilijk uit te maken of een gedaalde hoeveelheid galzouten leidt tot veranderingen in het microbioom of dat veranderingen in het microbioom leiden tot alteraties in de galzoutabsorptie[15].

De waargenomen veranderingen in galzoutsamenstelling bij IBD worden volgens Martinez-Augustin et al. veroorzaakt door wijzingen in de transitijd en veranderingen in de samenstelling van het microbioom bij IBD patiënten(zie 1.3.3). Veranderingen in het microbioom leiden immers tot veranderingen in bacteriële enzymen en bijgevolg veranderingen in de deconjugatie, desulfatie en transformatie van galzouten en aldus een gewijzigde galzout samenstelling[19].

### 1.3.2 Galzouten en hun invloed op IBD

Galzouten beschikken over anti-inflammatoire eigenschappen ter hoogte van de darm. Ze zijn immers in staat om de productie van pro-inflammatoire cytokines, zoals TNF $\alpha$ , in monocyt en macrofagen te inhiberen. Deze anti-inflammatoire werking wordt bewerkstelligd door te binden met de nucleaire receptoren FXR, VDR, PXR en TGR5[16]. Afhankelijk van hun chemische structuur hebben galzouten een andere werking op de nucleaire receptoren. Zo zorgt de simultane toediening van indomethacine en DCA voor een verslechtering van de ernst van ulceraties in een NSAID colitis model. In tegenstelling tot het simultaan toedienen van UDCA en indomethacine, wat leidt tot een afname van de ulceraties[15, 32, 33]. UDCA reduceert eveneens de intestinale permeabiliteit en oxidatieve stress bij experimentele indomethacine colitis[19, 22]. De uiteenlopende werking van deze galzouten wordt eveneens gezien bij in vitro onderzoek, waar DCA apoptose induceert van darmepitheelcellen en UDCA en TUDCA anti-



apoptotisch werkt[13, 33, 34]. Glucuronide geconjugeerde galzouten verergeren, net zoals DCA, colitis[19].

Een uiteenlopende werking hebben galzouten eveneens op de waterhuishouding van de cel. Zo ziet men dat CDCA en DCA de excretie van water uit de cel stimuleren. UDCA daarentegen verhindert de secretie van vloeistoffen uit de cel[22]. Patiënten met IBD klagen van diarree. Deze diarree wordt mogelijk veroorzaakt door een verhoogde aanwezigheid van DCA in het colon, wat de activiteit van cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) verhoogt. Een verhoogde activiteit van CFTR leidt tot een verhoogde excretie van elektrolyten en water, wat diarree veroorzaakt. Een veranderd galzout compositie kan leiden tot een verminderde aanwezigheid van bepaalde anti-inflammatoire secundaire galzouten. Wat een mogelijke trigger kan zijn in het ontstaansmechanisme van IBD[31].

### 1.3.3 Interactie tussen galzouten en het microbiom

#### *1.3.3.1 Effect galzouten op bacteriën*

Galzouten beschikken enerzijds over antimicrobiële eigenschappen door FXR te stimuleren, wat leidt tot de productie van de antibacteriële enzymen angiogenine, carbon anhydrase 12 en iNOS[19]. De antimicrobiële werking van galzouten wordt aangetoond bij cholestase, namelijk bij depletie aan galzouten ter hoogte van de dunne darm ontstaat er een bacteriële overgroei[19]. Galzouten kunnen anderzijds ook de groei van bacteriën bevorderen door te dienen als voedselbron, bacteriën metaboliseren namelijk glycine en taurine. Het overschot aan elektronen die ontstaat bij fermentatie door bacteriën wordt overgebracht naar galzouten[20].

#### *1.3.3.2 Effect van bacteriën op galzouten*

Bacteriën zijn in staat de galzoutensamenstelling te wijzigen en met uitbreiding verschillende functies, uitgeoefend door galzouten in het lichaam, te modifieren. Zo hebben microbiota indirect een effect op het lichaamsgewicht, leverziektes, de intestinale mucosale functie, colonkanker en cardiovasculaire functies[20]. Bacteriën zijn in staat om de galzoutsynthese in de lever te moduleren via de productie van FXR antagonisten, wat aanleiding geeft tot alteraties in de FXR-FGF19-FGFR4 feedback mechanisme[15].

Een dieet rijk aan melkvetzuren stimuleert de aanwezigheid van de sulfiet reducerende bacterie *Bilophila Wadsworthia*, wat leidt tot een stijging van taurocholzuur (TCA, Eng: Taurocholic acid). TCA veroorzaakt colitis in genetische gemodificeerde muismodellen[8]. Het apoptose-inducerend secundaire galzout LCA wordt gevormd door anaerobe intestinale bacteriën door modificatie van het primaire galzout CDCA[35].

## 1.4 Probleemstelling en doelstelling masterproef

Zoals hoger vermeld gaat IBD gepaard met veranderingen in het microbioom en met een gealtereerde galzouten compositie[15]. Eveneens worden er bij IBD patiënten ter hoogte van de darm alteraties opgemerkt in de expressie van verschillende receptoren, transporters en enzymen betrokken in de galzouthomeostase. Zo zien Jahnel et al. dat de expressie van verschillende transporters (MRP3, MRP4, OST $\alpha$ , OST $\beta$ , MDR1) en nucleaire receptoren (FXR en PXR) bij pancolitis (UC) sterk neergereguleerd is in vergelijking met de algemene bevolking. Bij CD patiënten werd een significante daling gezien van de apicale transporters ASBT en BCRP en van het detoxificerend enzym SULT2A1[10]. In de literatuur wordt beschreven dat zowel UDCA als TUDCA een anti-apoptotische en anti-inflammatoire werking hebben[13, 32, 33]. En de toediening van galzouten een effect heeft op de expressie van genen betrokken in de galzouthomeostase[36]. In deze studie willen we nagaan of het toedienen van TUDCA, UDCA en GUDCA aan gezonde muizen de basale expressie van verschillende receptoren, transporters en enzymen betrokken in de galzouthomeostase verandert en vergelijken we eveneens de UDCA, TUDCA en GUDCA behandelingsgroep onderling.

Deze studie is onderdeel van een grotere onderzoeksvraag die nagaat of de waargenomen alteraties in genexpressie bij IBD patiënten op de verschillende receptoren, transporters en enzymen betrokken in de galzouthomeostase kunnen tegengewerkt worden door de toediening van een van deze galzouten. Indien dit het geval is, kan het toedienen van UDCA, TUDCA en GUDCA een mogelijke add-on therapie zijn voor IBD patiënten. IBD is namelijk een ernstige ziekte die, zoals hoger vermeld, veel jonge mensen treft en gepaard gaat met een ernstige morbiditeit en een verhoogde mortaliteit bij CD. Bij UC patiënten is de verhoogde mortaliteit enkel het geval als de ziekte ontstaat op kinderleeftijd[4].

Uit academisch oogpunt onderzoeken we eveneens het verloop in expressie van de verschillende transporters, receptoren en enzymen betrokken in de galzouthomeostase. Een visuele weergave van hun verloop in de darm leek ons dan ook zinvol om aan te geven op welke plaatsen in de darm deze genen voornamelijk geëxprimeerd worden.

# Materiaal en methoden

---

## 2.1 Galzouten

De galzouten UDCA (Tokyo Chemical Industry Co. Ltd, Toshima-Ku, Tokyo, Japan) en TUDCA (Calbiochem, Duitsland) werden opgelost in PBS aan een concentratie van 31,25 g/l. TUDCA werd aangekocht als TUDCA-zout, UDCA werd aangekocht als UDCA-hydraat. Beide vormen zijn oplosbaar in water. GUDCA (Sigma-Aldrich, Diegem, België) werd aangekocht als GUDCA-zuur en opgelost in labrafil® M1944 (Gattefosse, Saint-Priest Cedex, Frankrijk) eveneens aan een concentratie van 31,25 g/l.

## 2.2 Muizen

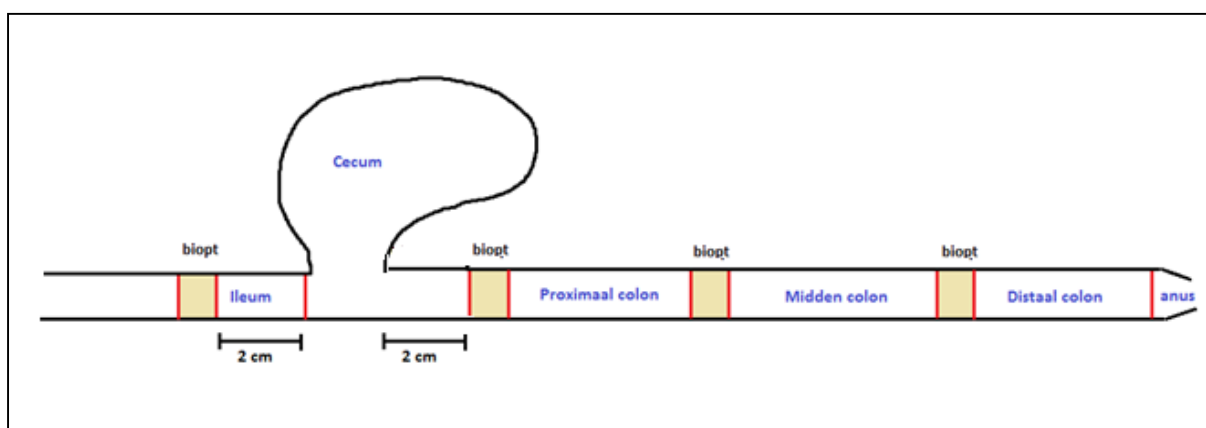
In deze studie werd gebruik gemaakt van 32 mannelijke C57BL6/J muizen (Harlan Laboratories, Horst, Nederland) met een leeftijd van 8 weken en een gemiddeld gewicht van 25g. De muizen werden ondergebracht in het animalarium van het UZ Gent en werden elk afzonderlijk gehuisvest in een kooi uit plexiglas. Vooraleer het experiment gestart werd, kregen de muizen een week acclimatisatie in het animalarium. Tijdens de periode van de acclimatisatie en het experiment hadden de muizen continue (ad libitum) toegang tot drinken en voedsel (mice maintenance chow, Carfil Labofood, Pavan Service, Belgium). Nestmateriaal werd aangeboden ter verstrooiing. In het animalarium heerste een constante temperatuur van 20 tot 25 °C en werd een 12/12 licht-donkercyclus (licht aan van 8u00 tot 20u00) gehanteerd. De relatieve vochtigheid bedroeg 40 – 60%.

## 2.3 Behandelingen

Voor de start van het experiment werden de muizen volgens gewicht gerandomiseerd over 5 studiegroepen: TUDCA (N=7), UDCA (N=7), GUDCA (N=7), PBS (N=6) en labrafil (N=5). De studiegroepen PBS en labrafil worden aanzien als controlegroep. Afhankelijk van de studiegroep waartoe ze behoorden, kregen de muizen gedurende 1 week per 5 g lichaamsgewicht dagelijks 40 µl TUDCA-, UDCA- of GUDCA- oplossing (zie hierboven) intragastrisch toegediend. De muizen die behoorden tot de controlegroep kregen respectievelijk 40 µl PBS of labrafil per 5 g lichaamsgewicht toegediend via een intragastrische sonde (Bio Services, Uden, Nederland). Tijdens het experiment werd het lichaamsgewicht van de muizen dagelijks opgevolgd. De studie werd goedgekeurd door het ethisch comité van de Universiteit Gent (ECD 14/25).

## 2.4 Sacrificatie en staalname

Op dag 7 van het experiment werden de muizen gesacrificeerd door cervicale dislocatie. Voorafgaand aan de cervicale dislocatie werden de muizen verdoofd door middel van een injectie intraperitoneaal met een mengsel van ketamine (Ketalar, Pfizer, Brussel, België) en xylazine (Rompun, Bayer, Brussel België) (resp. 80% en 20%, 100 µl per muis). Na de cervicale dislocatie werd de buikholte geopend via een longitudinale en dwarse insnede over de buikwand. Hierna werd de darm verwijderd en op de dissectietafel overgebracht. De resterende feces in de darm werd verwijderd door enerzijds manuele manipulatie en anderzijds de darm te spoelen met PBS. Het colon, gelegen tussen het cecum en de anus, werd opgesplitst in 3 gelijke delen (Figuur 2). Deze segmenten worden respectievelijk het proximaal colon (PC), het midden



Figuur 11. Visuele weergave van de gedissecteerde darm. Ter hoogte van de licht gekleurde gebieden van de darm werd een biopt genomen voor mRNA expressie bepaling.

colon (MC) en het distaal colon (DC) genoemd. Van deze 3 bekomen darmsegmenten werd steeds van het proximale uiteinde een biopt van 5 mm genomen (Figuur 11). Ter hoogte van het PC en het ileum werd het darmsegment gepreleveerd op een afstand van 2 cm van het cecum. Van iedere muis werden dus 4 darmbiopten bekomen en longitudinaal geopend. Vervolgens werd het weefselbiopt nogmaals gespoeld met PBS en ondergedompeld in RNAlater (Ambion, Cambridgeshire, VK) in RNase-vrije epjes. Deze epjes werden overgebracht in vloeibare stikstof (N<sub>2</sub>) (snap frozen). In het laboratorium werden de epjes bewaard aan een temperatuur van -80°C tot verdere analyse.

## 2.5 RNA- isolatie

Voor de RNA-isolatie werd het protocol van Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen Benelux, Venlo, Nederland) gevolgd. De concentratie en de zuiverheid van het bekomen RNA werd bepaald door een spectrofotometer (BioPhotometer Plus, Eppendorf, Rotselaar, België). Vervolgens

werd het totaal RNA verdund met RNase-vrij water tot 100 ng/ $\mu$ l, hiervoor werd de volgende formule gebruikt:

$$Toe\ te\ voegen\ volume\ (\mu l) = \frac{\text{concentratie}\left(\frac{ng}{\mu l}\right) \times \text{Resterend\ volume}\ (\mu l)}{\text{Gewenste\ concentratie}\left(\frac{ng}{\mu l}\right)} - \text{Resterend\ volume}\ (\mu l)$$

Enkel stalen met een OD260/OD280 ratio tussen 1,8 en 2,1 werden gebruikt voor verdere analyse.

## 2.6 cDNA bereiding

Eén microgram van het totaal RNA werd omgezet tot dubbelstrengig cDNA door gebruik te maken van de SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, Frankrijk), volgens het protocol van de verdeler.

## 2.7 qPCR

De expressie van de genen ASBT, MRP3, OST $\alpha$ , OST $\beta$ , IBABP, BCRP, MDR1, FXR, SHP, PXR, VDR, INOS, CYP3A11, FGF15, TGR5, SLC15a1, CFTR, MRP4 en de huishoudgenen GAPDH en HPRT werd gekwantificeerd door middel van qPCR (quantitative polymerase chain reaction).. Het cDNA werd eerst verdund tot een concentratie van 5 ng/ $\mu$ l en in duplicaat overgebracht op een 192-well plaat. In elke well werd 4  $\mu$ l Sensimix SYBR no-ROX mastermix (Bioline, VK), 1  $\mu$ l primermix (forward primer en reverse primer; 2  $\mu$ M; Biolegio, Nederland) en 3  $\mu$ l cDNA gepipetteerd. De reactie werd vervolgens uitgevoerd aan de hand van een LightCycler480 apparaat. Er werd gekozen voor een 2 stappen programma (Quantace SybrGreen Program). Gedurende 10 minuten heerste er een temperatuur van 95°C om het cDNA te denaturen. De hybridisatie en elongatie van het cDNA ontstond, na het doorlopen van 45cycli tussen een temperatuur van 60°C (gedurende 60 seconden) en 95°C (gedurende 10 seconden). Na afloop van het programma werden de smeltcurves van de verschillende genen geanalyseerd om de primer specificiteit na te gaan. Geen anomalieën (bv. een smeltcurve met twee pieken) werden aangetroffen. De PCR efficiëntie van de primers werd bepaald aan de hand van een standaardcurve van referentie cDNA. De amplificatie-efficiëntie werd berekend volgende de volgende formule:  $10^{(-1/\text{helling}) * 100}$ . De expressie van de target genen werd genormaliseerd naar de expressie van de huishoudgenen GAPDH en HPRT.

Tabel 2. Primers van de qRT-PCR analyse

Gen	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')	E(%)	correlatie
GAPDH	CATGGCCTTCCGTGTTCTA	GCGGCACGTCAGATCCA	87	0,99
HPRT	GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA	AGGGCATATCCAACAACAACTT	75	0,98
FXR	CGGCAGGCAGAATAAAAGGG	GTGAGCGCGTTGTAGTGGT	101	0,99
ASBT	CCCAAATGCAACTGTCTGCG	CACCCCATAGAAAACARCACCA	102	0,99
SHP	AGGGCACGATCCTCTTCAAC	CAGGGCTCCAAGACTTCACA	97	0,99
TGR5	CCTGGCAAGCCTCATCGTC	AGCAGCCCGGCTAGTAGTAG	106	0,94
FGF15	GGTCCCTATGTCTCCAAGTGC	CTTGATGGCAATCGTCTTCAGA	97	0,99
IBABP	CTTCCAGGAGACGTGATTGAAA	AACTTGTTGCTCATAATGTTGCC	101	0,99
OSTa	TCTGCACCCACGGTGGTAT	GGCCATTTCTACAAGTGTGAGG	98	0,99
MRP3	GTCCCTGCATCTACCTGTG	GCCGTCTTGAGCCTGGATAA	109	0,99
MRP4	TTCCAGAAGATCGCTCAAAGC	CCAGTACCGTTGAAGCTCCT	90	0,99
MDR1	AGCCGTAAGAGGCTGAGGCCG	TCACGTGCCACCTCCGGGTT	95	0,98
BCRP	GCCAGCACAGAAGGCCTTGGGA	TCCGCAGGGTTGTTGTAGGGCT	107	0,99
VDR	GTGCAGCGTAAGCGAGAGAT	GGATGGCGATAATGTGCTGTTG	100	0,99
PXR	GATGGAGGTCTTCAAATCTGCC	CAGCCGGACATTGCGTTTC	98	0,99
INOS	GGCAGCCTGTGAGACCTTTG	GCATTGGAAGTGAAGCGTTC	2	0,96
CFTR	CACAGTCATCAACGGAATCGT	CATACCATATCTGTACGGCAGTG	96	0,98
CYP3a11	GACAAACAAGCAGGGATGGAC	CCAAGCTGATTGCTAGGAGCA	90	0,99
SLC15a1	CTCGGGGTTGCTTCGGTTAC	GTGAGAGATTGTCGTCCCA	103	0,99

## 2.8 Dataverwerking

De ruwe data werd verwerkt door gebruik te maken van het rekenbladprogramma Microsoft Excel. De statistische analyse van de data werd verricht met het programma SPSS versie 22 (Chicago, USA). Aangezien het over een kleine studiepopulatie gaat, werd als normaliteitstest gekozen voor de Shapiro-Wilk test. Indien de P-waarde bij de Shapiro-Wilk test  $>0,05$  wordt de nulhypothese niet verworpen. Dit betekent dat de data normaal verdeeld zijn. Om significantie aan te tonen bij normaal verdeelde data werd gebruik gemaakt van de Unpaired Students T-Test. Om de ongelijkheid in varianties op te sporen werd een Levene's test uitgevoerd. Indien de P-waarde  $<0,05$  werd een Welch correctie uitgevoerd. Bij niet-normaal verdeelde data werd de niet-parametrische Mann-Whitney U test gebruikt. P-waarden  $<0,05$  werden als significant beschouwd. Grafieken werden opgesteld in GraphPad Prism (GraphPad Software, Californië, Verenigde Staten).

# Resultaten

---

## 3.1 Het verloop in expressie van genen, betrokken in de galzouthomeostase van de darm

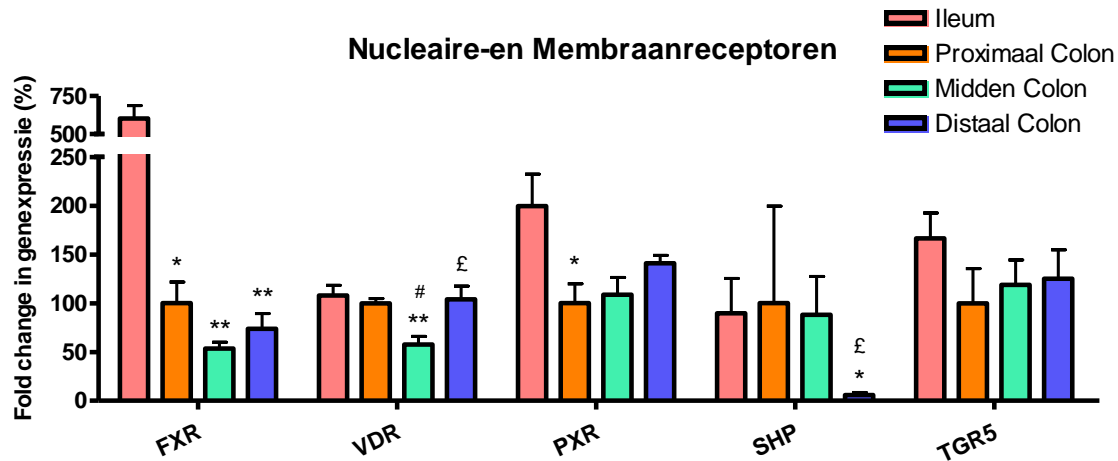
In het eerste luik van deze thesis wordt het verloop in mRNA expressie besproken van de belangrijkste genen die betrokken zijn in de galzouthomeostase, namelijk de nucleaire receptoren, de transporters en de detoxificerende enzymen. In onderstaande paragrafen wordt de mRNA expressie van deze genen ter hoogte van het ileum, het proximaal colon (PC), het midden colon (MC) en het distaal colon (DC) als een fold change grafiek weergegeven.

### 3.1.1 Nucleaire receptoren en membraanreceptor TGR5

De nucleaire receptoren FXR en PXR en de membraanreceptor TGR5 worden meer geëxprimeerd ter hoogte van het ileum dan ter hoogte van het colon (zie Figuur 12). De FXR expressie is ter hoogte van het PC, het MC en het DC respectievelijk 83%, 91% en 88% gedaald ten opzichte van de FXR expressie in het ileum. Deze daling is significant in het PC ( $p=0,02$ ) en is sterk significant in het MC ( $P=0,006$ ) en het DC ( $P=0,004$ ). Ten opzichte van het ileum is de PXR expressie ter hoogte van het PC gehalveerd ( $P=0,039$ ). De TGR5 expressie is niet-significant hoger in het ileum dan ter hoogte van het colon. Bij beide genen wordt een opwaartse trend in expressie bemerkt van het proximaal naar distaal colon toe.

De nucleaire receptoren VDR en SHP vertonen een min of meer stabiele expressie in de darm. De expressies van VDR ter hoogte van het MC en van SHP ter hoogte van het DC wijken echter af van deze stabiele expressie. VDR wordt immers ter hoogte van het MC lager geëxprimeerd ten opzichte van het ileum ( $P=0,05$ ), het proximaal colon ( $P=0,011$ ) en het distaal colon ( $P=0,022$ ). Bij SHP is de expressie in het DC sterk gedaald ten opzichte van het ileum ( $P=0,011$ ), het PC en het MC ( $P=0,027$ ). Het verschil in mRNA expressie tussen het PC en het DC is niet significant, dit wordt verklaard door de grote spreiding van SHP expressie ter hoogte van het PC.

Noot: de absolute expressie van TGR5 en SHP is laag ter hoogte van het ileum en het colon



Figuur 12. Verloop van de nucleaire receptoren FXR, VDR, PXR en SHP en de membraanreceptor TGR5 ter hoogte van het ileum en het colon (PC, MC, DC). De expressie wordt opgegeven als 'fold change' ten opzichte van het proximaal colon (100%). Het gemiddelde +/- SEM wordt weergegeven. Significante veranderingen ten opzichte van het ileum, het PC en het MC worden resp. aangegeven met het symbool \*, # en £. Eén symbool staat voor  $P \leq 0,05$ , twee symbolen staan voor een  $P \leq 0,01$ .

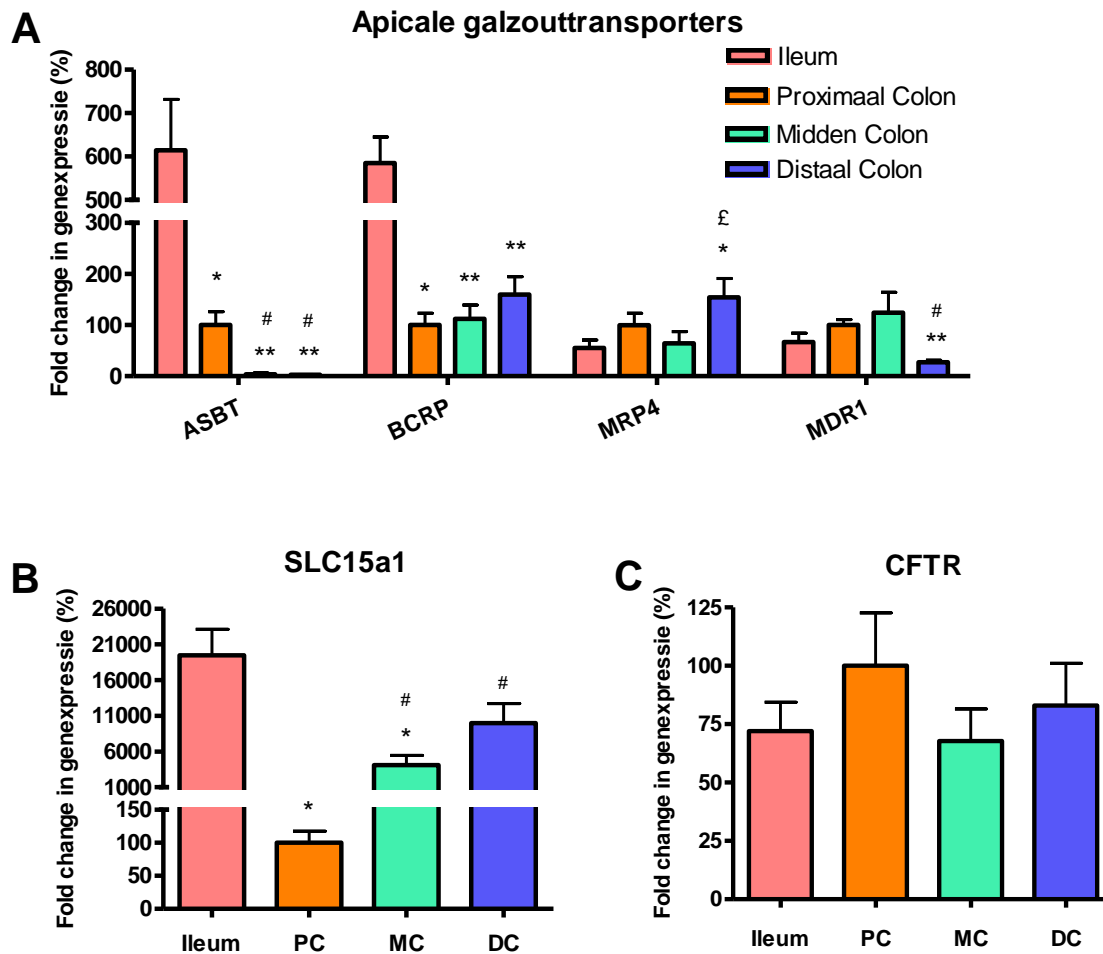
### 3.1.2 Transporters

In onderstaand paragraaf worden achtereenvolgens het verloop in expressie bepaald van de apicale transporters, de intracellulaire transporter IBABP en de basolaterale transporters.

De expressie van de apicale transporters ASBT, BCRP en SLC15a1 is hoger ter hoogte van het ileum dan in het colon (Figuur 13). Zo is de expressie van ASBT ter hoogte van het PC, het MC en het DC significant gedaald tot respectievelijk 16%, 0,6% en 0,4% van de oorspronkelijke genexpressie in het ileum. De BCRP expressie in het ileum verschilt eveneens significant met het colon. Ter hoogte van het PC, het MC en het DC daalt de BCRP expressie respectievelijk tot 17%, 19% en 27% van de BCRP genexpressie in het ileum. De expressie van SLC15a1 is eveneens ter hoogte van het PC en het MC significant gedaald tot relatief 0,5% ( $P=0,02$ ) en 21% ( $P=0,011$ ) van de SLC15a1 expressie in het ileum. Ter hoogte van het colon zien we een opwaartse trend in het voorkomen van de apicale transporters BCRP en SLC15a1. De expressie van CFTR is vrij stabiel over het ganse verloop van de darm. De apicale galzouttransporter MRP4 vertoont eveneens een vrij stabiel verloop in de darm. Ter hoogte van het DC wijkt de MRP4 expressie echter af van dit stabiele verloop. De expressie in het DC is significant hoger in vergelijking met het ileum ( $P=0,025$ ) en het MC ( $P=0,045$ ). Bij de apicale transporter MDR1 wordt een positieve trend in expressie gezien van het ileum naar het MC toe. Ter hoogte van het DC wordt MDR1 significant lager geëxprimeerd ten opzichte van het ileum ( $P=0,006$ ) en het PC ( $P=0,02$ ).

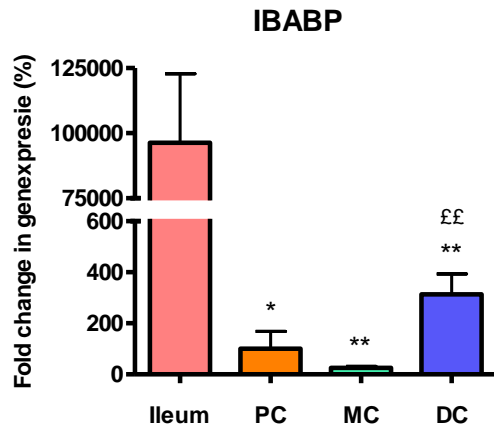
Noot: De absolute expressie van MRP4 en MDR1 is beperkt ter hoogte van het colon en het ileum in vergelijking met de gemiddelde expressie van de huishoudgenen HPRT en GAPDH.





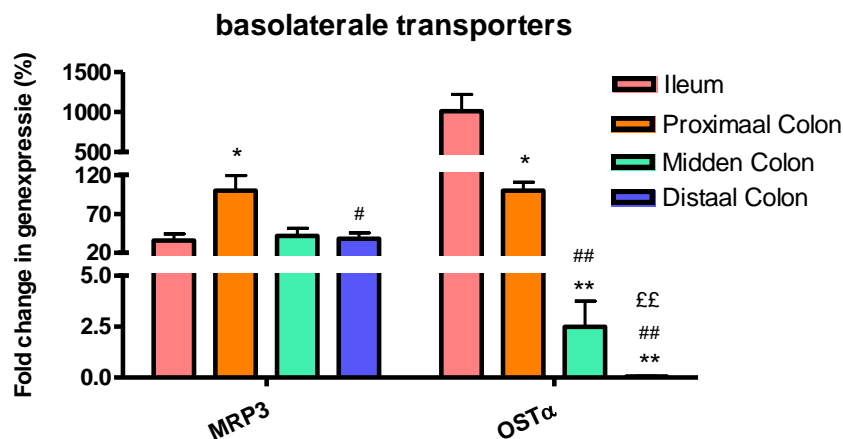
Figuur 13. Verloop van de apicale galzouttransporters ASBT, BCRP, MRP4 en MDR1 (A), CFTR (B) en SLC15a1 (C) ter hoogte van het ileum en het colon (PC, MC, DC). De expressie wordt opgegeven als 'fold change' ten opzichte van het proximaal colon (100%). Het gemiddelde +/- SEM wordt weergegeven. Significante veranderingen ten opzichte van het ileum, het PC en het MC worden resp. aangegeven met het symbool \*, # en £. Eén symbool staat voor  $P \leq 0,05$ , twee symbolen staan voor een  $P \leq 0,01$ .

Galzouten worden ter hoogte van de apicale membraan van de enterocyt opgenomen. Het intracellulaire transport wordt gemedieerd door de intracellulaire transporter IBABP. IBABP komt voornamelijk voor in het ileum. De expressie ter hoogte van het PC, MC en het DC bedraagt respectievelijk 0,1% ; 0,026% en 0,33% van de IBABP expressie in het ileum. Figuur 5 geeft weer dat er van het MC naar het DC een significante opregulatie van IBABP optreedt. Deze IBABP opregulatie lijkt echter niet relevant, aangezien IBABP 300 keer hoger geëxprimeerd wordt ter hoogte van het ileum.



Figuur 14. Verloop van de intracellulaire transporter IBABP ter hoogte van het ileum en het colon (PC, MC, DC). De expressie wordt opgegeven als 'fold change' ten opzichte van het proximale colon (100%). Het gemiddelde +/- SEM wordt weergegeven. Significante veranderingen ten opzichte van het ileum, het PC en het MC worden resp. aangegeven met het symbool \*, # en £. Eén symbool staat voor  $P \leq 0,05$ , twee symbolen staan voor een  $P \leq 0,01$ .

De intracellulaire transporter IBABP faciliteert het transport van galzouten van de apicale naar de basolaterale membraan. Ter hoogte van de basolaterale membraan faciliteert MRP3 en  $OST\alpha$  het transport van galzouten naar de portale circulatie. De expressie van de basolaterale galzout transporter MRP3 is net zoals de apicale galzout transporter MRP4 vrij stabiel over zijn verloop in de gastrointestinale tractus. Eén uitzondering hierop is de expressie ter hoogte van het PC, waarbij men een verhoging van de mRNA expressie ziet ten opzichte van de andere darmsegmenten. Het verloop van  $OST\alpha$  expressie vertoont een negatieve evolutie van het ileum naar het DC toe. Zo is de expressie van  $OST\alpha$  in het ileum 10 keer hoger in vergelijking met het PC, 400 keer hoger in vergelijking met het MC en 20.000 keer hoger in vergelijking met het DC. Men kan dus stellen dat  $OST\alpha$  voornamelijk voorkomt in het ileum, minder in het PC en slechts beperkt in het MC en DC.

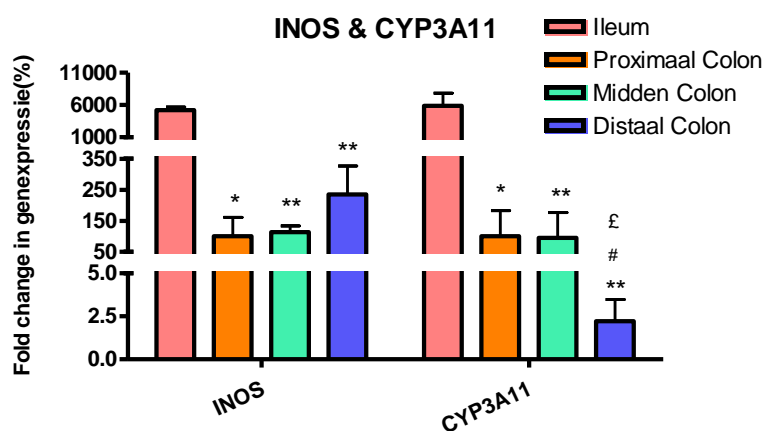


Figuur 15. Verloop van de basolaterale galzouttransporters MRP3 en  $OST\alpha$  ter hoogte van het ileum en het colon (PC, MC, DC). De expressie wordt opgegeven als 'fold change' ten opzichte van het proximale colon (100%). Het gemiddelde +/- SEM wordt weergegeven. Significante veranderingen ten opzichte van het Ileum, het PC en het MC worden resp. aangegeven met het symbool \*, # en £. Eén symbool staat voor  $P \leq 0,05$ , twee symbolen staan voor een  $P \leq 0,01$ .

### 3.1.3 Enzymen

iNOS en CYP3A11 worden significant hoger geëxprimeerd ter hoogte van het ileum in vergelijking met de expressie in het colon. De expressie in het ileum is 60x hoger in het ileum dan in het PC en het MC. Ter hoogte van het DC is de mRNA expressie van iNOS verhoogd ten opzichte van het MC en PC, deze verhoging is echter niet significant. Bij CYP3A11 is de expressie in het DC significant verlaagd ten opzichte van het PC en MC.

Noot: de expressie van CYP3A11 ten opzichte van het gemiddelde van de huishoudgenen HPRT en GAPDH is zeer laag in het colon en het ileum.



Figuur 16. Verloop van de enzymen iNOS en CYP3A11 ter hoogte van het ileum en het colon (PC, MC, DC). De expressie wordt opgegeven als 'fold change' ten opzichte van het proximaal colon (100%). Het gemiddelde +/- SEM wordt weergegeven. Significante veranderingen ten opzichte van het ileum, het PC en het MC worden resp. aangegeven met het symbool \*, # en £. Eén symbool staat voor  $P \leq 0,05$ , twee symbolen staan voor een  $P \leq 0,01$ .

## 3.2 Effect van de galzoutbehandeling op de expressie van genen, betrokken in de galzouthomeostase van de darm

Het effect van de toediening van TUDCA, UDCA en GUDCA bij gezonde muizen op de genexpressie van de belangrijkste nucleaire receptoren, transporters en enzymen die betrokken zijn in de galzouthomeostase wordt in onderstaande paragrafen besproken.

### 3.2.1 Effect van TUDCA op de genexpressie

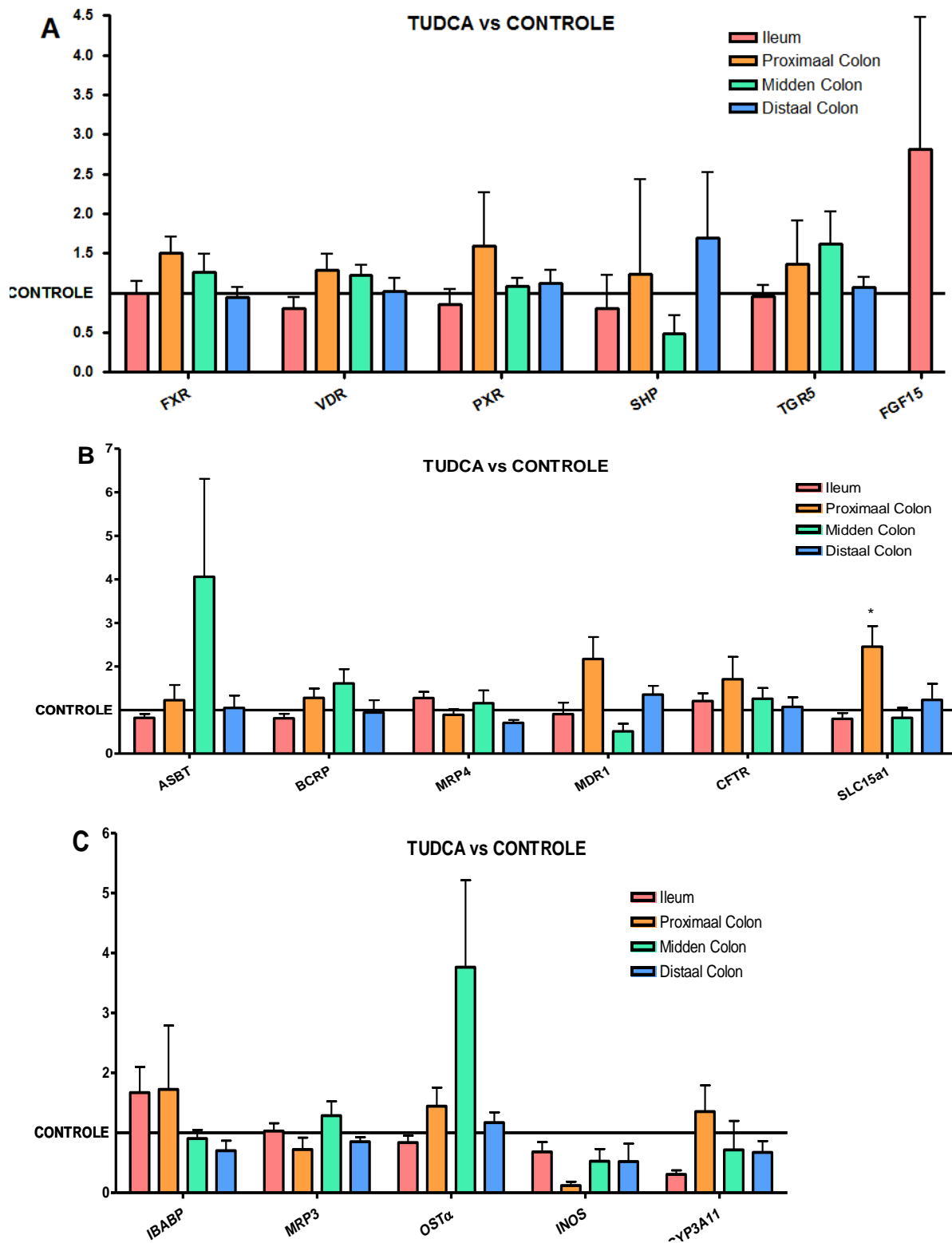
Na TUDCA toediening blijft de expressie van de nucleaire receptoren FXR, VDR, PXR en SHP en de membraanreceptor TGR5 vrij gelijkaardig aan hun expressie in de controlegroep (Figuur 17). Ter hoogte van het PC ziet men bij bovenstaande receptoren echter wel een lichte trend tot stijging in mRNA expressie na TUDCA behandeling. Ter hoogte van het ileum is de expressie van FGF15 2,8 keer verhoogd in TUDCA-behandelde muizen ten opzichte van de onbehandelde groep. Deze toename is echter niet significant ( $P=0,485$ ). Ter hoogte van het MC is de expressie van SHP verlaagd en bij TGR5 is de expressie verhoogd ten opzichte van de

controlegroep. Ter hoogte van het DC ziet men een opregulatie van SHP na TUDCA behandeling.

Orale toediening van TUDCA brengt eveneens weinig verschil teweeg in de expressie van de apicale galzouttransporters (Figuur B). Ter hoogte van het PC ziet men echter wel een lichte opregulatie van MDR1, CFTR en SLC15a1. Deze apicale transporters komen respectievelijk 2,15; 1,65 en 2,45 keer meer voor in het PC van TUDCA-behandelde muizen. Het verschil in expressie is slechts bij SLC15a1 significant ( $P=0,025$ ). De ASBT expressie is sterk toegenomen ter hoogte van het MC. Dit verschil is echter, omwille van de grote variatie in expressiewaarden binnen het MC, niet significant. Aangezien ASBT hoofdzakelijk voorkomt in het ileum en het PC (zie 3.1.2), is het klinisch belang van deze opregulatie te betwisten. De MDR1 expressie wordt ter hoogte van het MC gehalveerd na TUDCA toediening. Dit verschil is echter niet-significant door de eveneens grote spreiding in expressiewaarden van de controlegroep (PBS). Het intracellulair transport van galzouten wordt verzorgd door IBABP. De expressie van IBABP is niet-significant verhoogd ter hoogte van het ileum en het PC (respectievelijk 1,65x en 1,70x) en niet-significant verlaagd ter hoogte van het DC. Het klinisch nut van deze verlaagde expressie ter hoogte van het DC is mogelijks irrelevant, aangezien IBABP hoofdzakelijk tot expressie komt ter hoogte van ileum (zie 3.1.2).

De expressie van de basolaterale transporter MRP3 is na TUDCA toediening vrij gelijklopend aan de expressie van MRP3 in basale omstandigheden (Figuur C). Anderzijds zorgt deze behandeling wel voor een verhoogde expressie van de basolaterale transporter OST $\alpha$  ter hoogte van het MC. Net zoals ASBT en IBABP komt OST $\alpha$  weinig voor in het MC en het DC, waardoor de relevantie van deze expressiestijging beperkt lijkt.

Over het ganse verloop in de darm wordt de expressie van iNOS neergereguleerd na TUDCA behandeling. Deze neerregulatie is echter niet significant aangezien de iNOS expressiewaarden bij de controlegroep sterk variëren. Het toedienen van TUDCA heeft een wisselend effect op de expressie van CYP3A11. Zo wordt de mRNA expressie ter hoogte van het ileum, het MC en het DC neergereguleerd in vergelijking met de controlegroep. De expressie ter hoogte van het PC wordt licht verhoogd na TUDCA toediening (niet significant).



Figuur 17. Visuele weergave van de genexpressie van nucleaire en membraangebonden galzoutreceptoren (A), apicale transporters (B) en overige genen betrokken in het galzoutmetabolisme (C) ter hoogte van het ileum en het colon (PC, MC, DC). De expressie van de TUDCA-behandelde muizen wordt per regio (ileum, PC, MC, DC) weergegeven als 'fold change' ten opzichte van de genexpressie in de desbetreffende regio in de PBS-behandelde controlegroep (volle lijn, met als waarde 1.0). Het gemiddelde +/- SEM wordt weergegeven. Significante veranderingen in genexpressie ten opzichte van de controlegroep worden aangegeven met het symbool \*, waarbij  $P \leq 0,05$ .

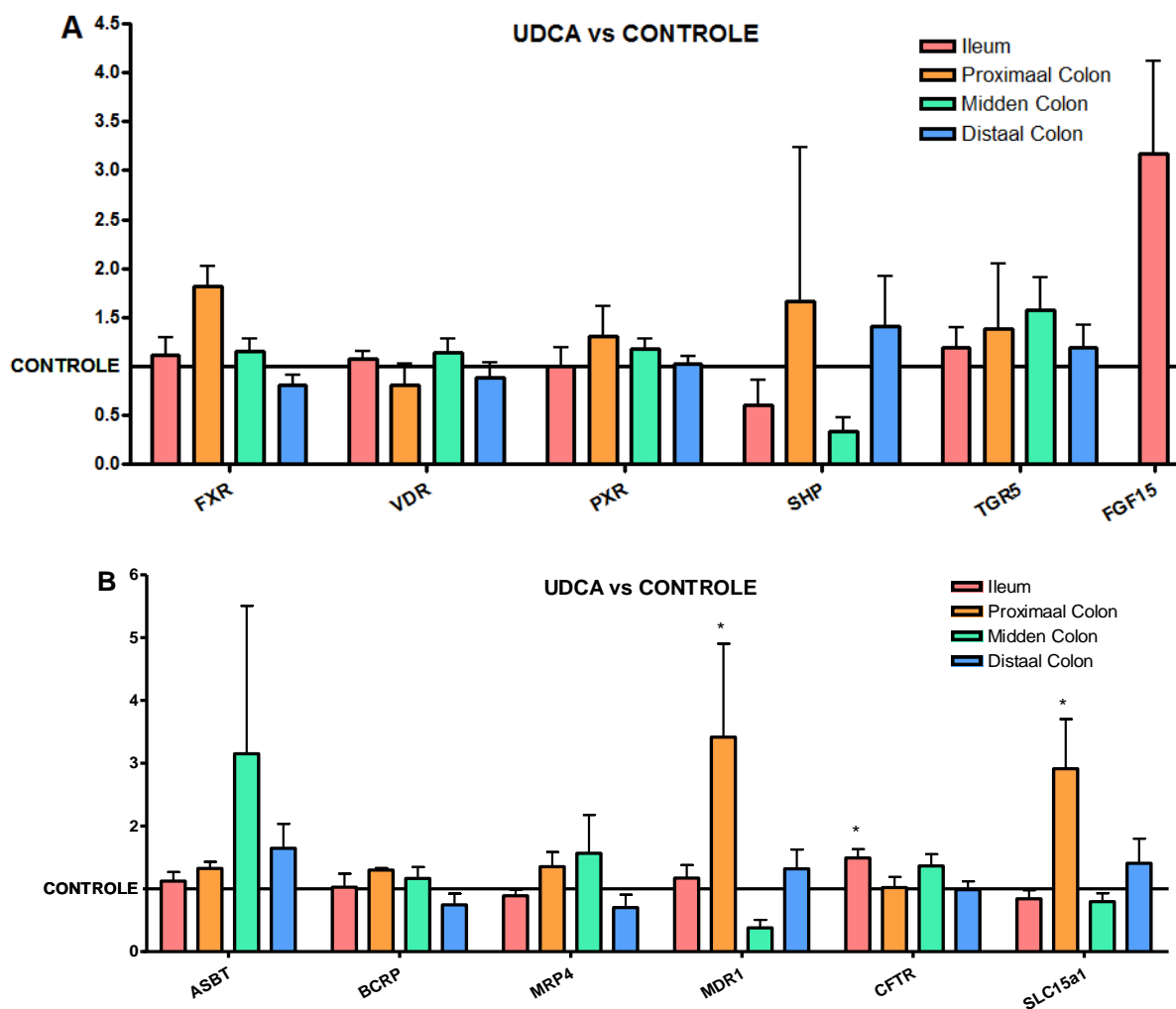
### 3.3.2 Effect van UDCA op de genexpressie

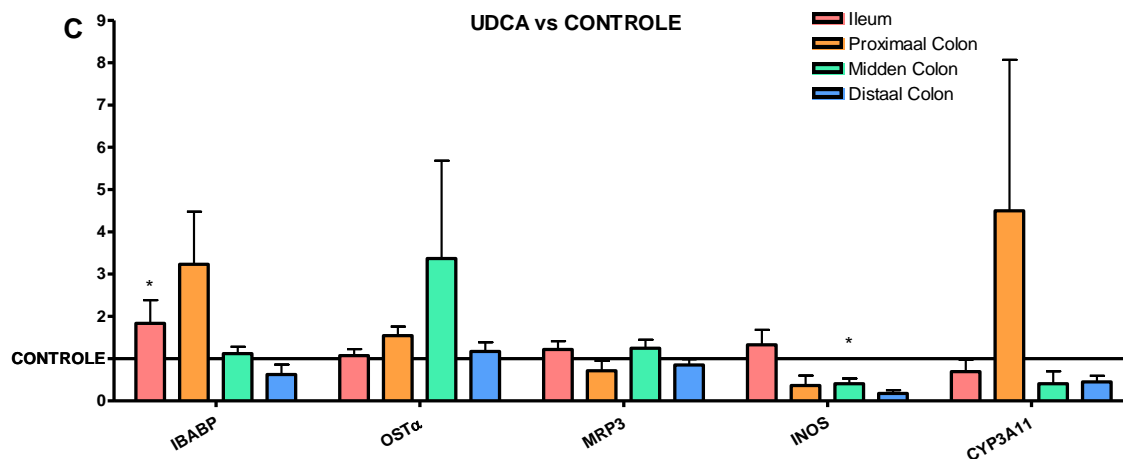
In deze thesis werd eveneens het effect van UDCA op de expressie van genen die betrokken zijn in de galzouthomeostase, besproken. Het verloop van de nucleaire receptoren FXR, PXR, VDR en SHP en de membraanreceptor TGR5 kent na het toedienen van UDCA, een gelijkaardig verloop als het verloop van de PBS controlegroep (Figuur 12A). Toch zijn er enkele niet-significante trends waar te nemen. Zo wordt bij UDCA-behandelde muizen, net zoals bij TUDCA-behandelde muizen, ter hoogte van het PC een verhoogde expressie van de nucleaire receptoren FXR, PXR, SHP en membraanreceptor TGR5 waargenomen. Het verschil in FXR expressie is ter hoogte van het PC randsignificant ( $P=0,051$ ). Toediening van UDCA heeft ook op de expressie van SHP gelijkaardige effecten als de TUDCA behandeling. Zo wordt SHP minder geëxprimeerd ter hoogte van het ileum en het MC en wordt de expressie ter hoogte van het DC verhoogd na UDCA behandeling. UDCA zorgt ter hoogte van het ileum tevens voor een verhoogde expressie (3,15x) van FGF15 ten opzichte van de controlegroep. Door de grote spreiding in expressiewaarden van FGF15 is het verschil in expressie slechts randsignificant ( $P= 0,063$ ).

UDCA toediening wijzigt de expressie van de apicale galzouttransporters weinig in vergelijking met de PBS controlegroep. Ter hoogte van het PC ziet men echter wel een (rand)significante opregulatie van de apicale transporters, MDR1 (3,35x) en SLC15a1 (2,85x). Behandeling met UDCA heeft, net zoals TUDCA behandeling, een gelijkaardig effect op de expressie van MDR1. Ter hoogte van het MC halveert UDCA immers ook de expressie van MDR1. Bij de apicale transporter CFTR wordt ter hoogte van het ileum een significante verhoging in de expressie waargenomen ( $P=0,015$ ) in UDCA-behandelde muizen. De expressie van ASBT is eveneens verhoogd na UDCA behandeling ter hoogte van het MC. Omwille van de grote spreiding in expressiewaarden is het verschil in expressie echter niet significant.

Figuur 129C geeft weer dat de expressie van de intracellulaire transporter IBABP verhoogt na UDCA toediening ter hoogte van het ileum (1,8x verhoogd) en het PC (3,2x verhoogd). Zijn expressie is bijna gehalveerd in het DC. Het verschil in IBABP expressie is ter hoogte van het ileum randsignificant in vergelijking met de controlegroep ( $P=0,04$ ). IBABP wordt hoofdzakelijk geëxprimeerd in het ileum, waardoor de verschillen in expressie ter hoogte van het PC en DC irrelevant lijken. Verder wijzigt UDCA de expressie van MRP3 niet over het verloop van de darm. De expressie van de basolaterale transporter OST $\alpha$  komt ter hoogte van het PC en het MC, respectievelijk 1,5x en 3,4 x meer tot expressie. De expressiewaarden van OST $\alpha$  ter hoogte van het MC zijn echter sterk verspreid, waardoor het verschil in expressie niet significant is. Net zoals ASBT en IBABP komt OST $\alpha$  voornamelijk voor in het ileum.

Ter hoogte van het colon is de iNOS expressie sterk neergereguleerd. Zo is de expressie van het PC, het MC en het DC respectievelijk 66%, 62% en 88% gedaald ten opzichte van de expressiewaarden van de controlegroep PBS. Enkel ter hoogte van het MC is deze neerregulatie significant ( $P=0,019$ ). Ter hoogte van het PC is de mRNA expressie van het detoxificerend enzym CYP3A11 verhoogd na behandeling met UDCA. Deze verhoging is opnieuw niet significant omwille van de grote spreiding in expressiewaarden. Ter hoogte van het MC en het DC is de expressie van CYP3A11 gehalveerd.





Figuur 12. Visuele weergave van de genexpressie van nucleaire en membraangebonden galzoutreceptoren (A), apicale transporters (B) en overige genen betrokken in het galzoutmetabolisme (C) ter hoogte van het ileum en het colon (PC, MC, DC). De expressie van de UDCA-behandelde muizen wordt per regio (ileum, PC, MC, DC) weergegeven als 'fold change' ten opzichte van de genexpressie in de desbetreffende regio in de PBS-behandelde controlegroep (volle lijn, met als waarde 1.0). Het gemiddelde +/- SEM wordt weergegeven. Significante veranderingen in genexpressie ten opzichte van de controlegroep worden aangegeven met het symbool \*, waarbij  $P \leq 0,05$ .

### 3.2.3 Effect van GUDCA op de genexpressie

Ten slotte werd het effect van GUDCA nagegaan op de expressie van de belangrijkste nucleaire receptoren, transporters en enzymen die betrokken zijn in de galzouthomeostase.

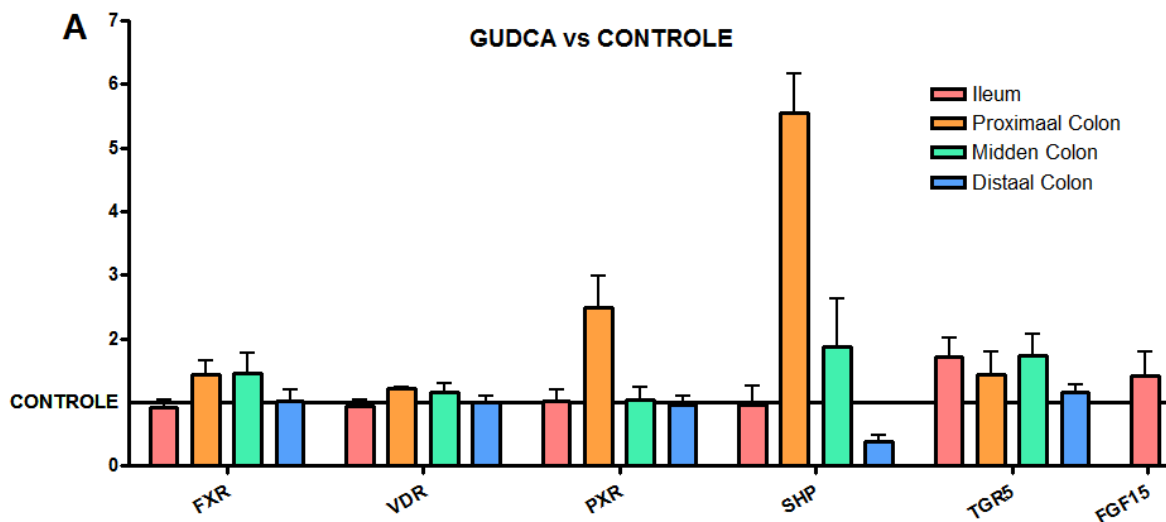
De expressie van nucleaire receptoren FXR, VDR, PXR, SHP en de a TGR5 wijkt na behandeling met GUDCA niet significant af van de expressie in de controlegroep labrafil (Figuur 139A). Toch worden er enkel evoluties bemerkt. Net zoals bij de TUDCA- en UDCA-behandeling zorgt de toediening van GUDCA voor een opregulatie van de nucleaire receptoren en de membraanreceptor TGR5 ter hoogte van het PC. Zo wordt de expressie van FXR ( $P=0,432$ ), VDR ( $P=0,06$ ), PXR ( $P=0,285$ ), SHP ( $P=0,157$ ) en TGR5 ( $P=0,480$ ) respectievelijk 1,35; 1,15; 2,45; 5,50 en 1,40 keer verhoogd ten opzichte van de labrafil-controlegroep. De expressie van FGF15 wordt minder sterk opgeregeerd (1,40x) ter hoogte van het ileum in vergelijking met de TUDCA- en UDCA behandeling. Over het ganse verloop van de darm ziet men een niet-significante opregulatie van de membraanreceptor TGR5. In vergelijking met de TUDCA en UDCA behandeling zorgt GUDCA voor een omgekeerd effect op de expressie van de nucleaire receptor SHP ter hoogte van het MC en het DC. Zo verhoogt GUDCA de expressie van SHP ter hoogte van het MC en verlaagt het de expressie ter hoogte van het DC.

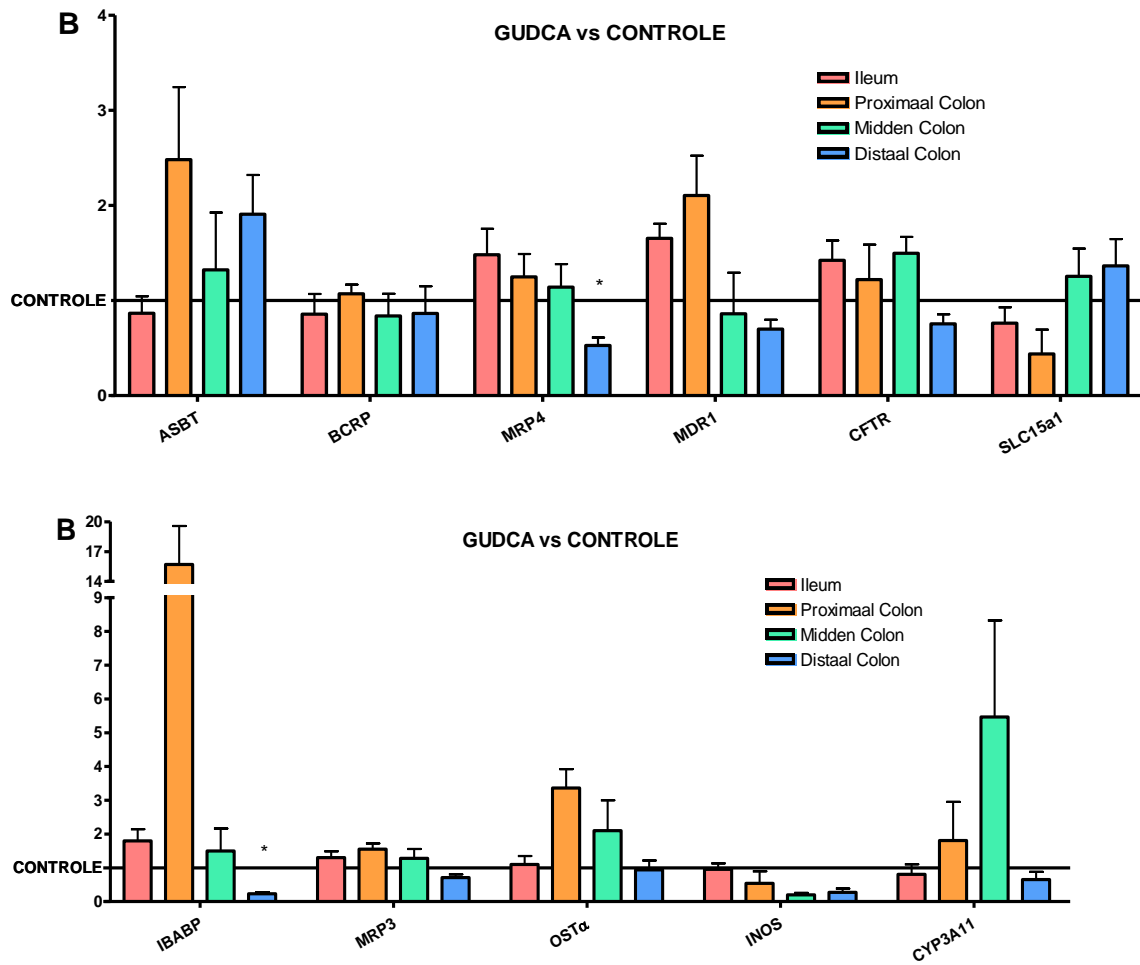
Toediening van GUDCA heeft zowel een positieve als een negatieve invloed op de expressie van de apicale galzouttransporters. Ter hoogte van het PC zorgt toediening van dit galzout voor opregulatie van de apicale transporters ASBT, MRP4, MDR1, CFTR. Deze opregulatie wordt eveneens gezien na de toediening van UDCA en TUDCA. ASBT wordt 2,50 keer meer



geëxprimeerd na het toedienen van GUDCA in vergelijking met de labrafil controlegroep. Dit verschil in expressie is echter niet significant, omwille van de grote spreiding in expressiewaarden. Anderzijds zorgt GUDCA behandeling voor een neerregulatie van SLC15a1 ter hoogte van het PC (P=0,018) en van MRP4 ter hoogte van het DC (P=0,018). Meer specifiek wordt hun expressie op hun respectievelijk plaats in de darm gehalveerd. Een positieve invloed op de mRNA expressie heeft GUDCA eveneens op de apicale transporters MRP4, MDR1 en CFTR ter hoogte van het ileum. Deze genen komen respectievelijk 1,45; 1,55 en 1,35 meer tot expressie.

De intracellulaire transportmolecule IBABP wordt ter hoogte van het ileum en het PC opgereguleerd na het toedienen van GUDCA en ter hoogte van het DC ziet men een (rand)significante neerregulatie van IBABP (P=0,042). De expressie van de basolaterale receptor MRP3 verschilt weinig met de labrafil-controlegroep. OST $\alpha$  daarentegen wordt sterk opgereguleerd ter hoogte van het PC (3,30x) en het MC (2,00x). Op beide plaatsen is de opregulatie echter niet significant. Ter hoogte van het colon is de expressie van iNOS sterk neergereguleerd. Omwille van de grote spreiding in de expressiewaarden in de labrafil-controlegroep is het verschil in expressie niet significant. De expressie van CYP3A11 is ter hoogte van het MC opgereguleerd na GUDCA behandeling ten opzichte van de controlegroep.





Figuur 13. Visuele weergave van de genexpressie van nucleaire en membraangebonden galzoutreceptoren (A), apicale transporters (B) en overige genen betrokken in het galzoutmetabolisme (C) ter hoogte van het ileum en het colon (PC, MC, DC). De expressie van de GUDCA-behandelde muizen wordt per regio (ileum, PC, MC, DC) weergegeven als 'fold change' ten opzichte van de genexpressie in de desbetreffende regio in de labrafil-behandelde controlegroep (volle lijn, met als waarde 1.0). Het gemiddelde +/- SEM wordt weergegeven. Significante veranderingen in genexpressie ten opzichte van de controlegroep worden aangegeven met het symbool \*, waarbij  $P \leq 0,05$ .

# Discussie

---

## 4.1 het verloop in expressie van genen, betrokken in de galzouthomeostase in de darm

Het eerste luik van deze thesis bespreekt de genexpressie van de belangrijkste receptoren, transporters en enzymen, betrokken bij de galzout homeostase over het verloop van de darm. Tot op heden is er in de literatuur weinig beschreven over het voorkomen van deze receptoren, transporters en enzymen in de darm. De expressie ter hoogte van het DC wordt in de literatuur vaak geëxtrapoleerd naar de expressie over het ganse colon. Uit de resultaten van deze thesis blijkt echter dat de expressie van ASBT, MRP4, MDR1, SLC15a1, MRP3, OST $\alpha$  en CYP3A11 niet stabiel is over het verloop in het colon. De aangehaalde extrapolatie is met andere woorden niet volledig correct. Zo correleren Wojtal et al. [37] de daling in ASBT expressie, die typisch gezien wordt bij CD patiënten in het ileum, met de ernst van CD. Zoals aangehaald is de ASBT expressie in de darm niet stabiel, waardoor de plaatsafname van het biopt in belangrijke mate de ASBT expressie bepaalt. Indien men aan de hand van de expressie van ASBT de ziekteactiviteit van IBD wil quoteren, moet men dus rekening houden met de verschillen in genexpressie over het verloop van het colon. Dit voorbeeld onderstreept het belang van extra onderzoek naar de expressie in normale omstandigheden.

In de literatuur wordt beschreven dat de absorptie van galzouten voornamelijk gebeurt ter hoogte van het ileum[15]. Dit wordt bevestigd in onze studie. In basale omstandigheden bij gezonde muizen wordt vastgesteld dat de expressie van ASBT, IBABP en OST $\alpha$ , transporters die essentieel zijn in de intestinale galzouttransport, ter hoogte van het ileum het grootst is en significant minder voorkomen ter hoogte van het PC met een verdere daling in mRNA expressie naar distaal toe. Een uitzondering op het aflopend verloop is de significant verhoogde expressie van IBABP ter hoogte van het DC ten opzichte van het MC. Indien we ons baseren op de mRNA expressie van ASBT, IBABP en OST $\alpha$  gebeurt er echter nog steeds actieve absorptie ter hoogte van het colon. Dit blijkt uit de relatief hoge Cp-waarden ter hoogte van het DC van ASBT(Cp=28) en IBABP(Cp=22). In de literatuur wordt beschreven dat galzouten ter hoogte van het colon passief binnentreden[21], onze resultaten suggereren echter ook actief transport van galzouten in het colon. In deze thesis werd echter de expressie van ASBT bepaald op mRNA niveau. Om echter met zekerheid te stellen dat er nog actief transport van galzouten plaatsvindt ter hoogte van het colon, is verder onderzoek nodig die de eiwitexpressie van ASBT

bepaalt en het transport van galzouten door ASBT meet in basale omstandigheden. Sommigen beweren dat de ASBT expressie ter hoogte van het colon niet detecteerbaar is, dit wordt in deze studie ontkracht[37]. In de literatuur [38] wordt beschreven dat de expressie van OST $\alpha$  de expressie van IBABP en ASBT mimeert. Dit werd bevestigd in bovenstaande resultaten.

FXR, PXR en TGR5 worden het hoogst geëxprimeerd ter hoogte van het ileum. De VDR expressie daarentegen is stabiel over het verloop in de darm. De expressie ter hoogte van het MC is echter een uitzondering op het stabiele verloop. De transcriptie van VDR wordt voornamelijk gestimuleerd door calcitriol, de inactieve finale metaboliet van vit D, en in minder mate door LCA en zijn derivaten[24]. Aangezien de expressie van VDR minder afhangt van galzouten, verklaart dit mogelijk het stabiele verloop van VDR in de darm. De nucleaire receptoren FXR, PXR en TGR5 daarentegen worden voornamelijk gestimuleerd door galzouten. De hoogste concentratie aan galzouten wordt gevonden in het ileum, wat de hogere expressie van FXR, PXR en TGR5 in het ileum verklaart. Opmerkelijk is dat SHP het verloop van FXR expressie niet volgt, aangezien de expressie van SHP bepaald wordt door FXR [36]. PXR stimuleert de expressie van MDR1, MRP3 en MRP4 en het detoxificerend enzym CYP3A11. De expressie van deze effluxtransporters volgt echter niet het verloop van de nucleaire receptor PXR. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat deze effluxtransporters niet exclusief gestimuleerd worden door de nucleaire receptor PXR, maar ook deels door de nucleaire receptor VDR. Het verloop van CYP3A11 is eveneens niet conform het verloop van PXR. De absolute expressie van dit enzym was echter zeer laag, wat de nauwkeurigheid van de meting mogelijk in het gedrang brengt (Cp-waarde DC bedraagt 39).

Verder onderzoek is nodig om te bepalen in welke mate de expressie van de belangrijkste transporters, receptoren en enzymen van de enterohepatische cyclus stabiel blijft in de darm bij verschillende omstandigheden. Eenmaal men de normale expressie van de galzoutreceptoren in kaart gebracht heeft, kan men onderzoeken of IBD gepaard gaat met regionale alteraties van de nucleaire receptoren en transporters van de galzoutencascade. Genen die een gewijzigde genexpressie vertonen, kunnen interessante targets zijn, waarop medicijnen kunnen op inwerken. Verschillende mutaties van genen betrokken bij het galzout metabolisme zijn immers geassocieerd met IBD.

## 4.2 Effect van galzoutbehandeling op de expressie van genen betrokken in de galzouthomeostase in de darm

In het tweede luik van deze thesis werd het effect van TUDCA, UDCA of GUDCA op de expressie van genen, betrokken in de galzouthomeostase van de darm nagegaan. Na toediening van deze galzouten worden slechts enkele (rand)significante verschillen in genexpressie bekomen ten opzichte van de controlegroep. Bij IBD of bij een veranderd microbioom ziet men veranderingen in de galzoutensamenstelling en veranderingen in genexpressie van genen betrokken in de galzouthomeostase[10, 15]. Deze studie toont aan dat het toedienen van bovenstaande drie galzouten aan gezonde muizen niet leidt tot nadelige neerregulaties van deze genen.

Ondanks de beperkte veranderingen in expressie, ziet men na een UDCA, TUDCA of GUDCA toediening wel een lichte opregulatie van FXR ter hoogte van het PC. Bovendien mag men stellen dat na het toedienen van één van deze galzouten de activiteit van FXR toeneemt. We baseren ons hiervoor op de stijging van de targetgenen van FXR. De expressie van SHP, IBABP en OST $\alpha$  is namelijk verhoogd ter hoogte van het PC. We zien echter dat de ASBT expressie ter hoogte van het PC ook gestegen is. Deze verhoogde expressie druist in met wat in de literatuur vermeld wordt, namelijk dat FXR activatie een daling in ASBT expressie veroorzaakt. Een verklaring voor de stijging van ASBT expressie in de darm wordt hieronder gegeven. Een ander targetgen van FXR is FGF15. We kunnen echter de expressie van FGF15 in het colon niet bespreken, aangezien de expressie van FGF15 onder de detectielimiet viel.

Ter hoogte van het ileum blijft de expressie van FXR stabiel en stijgt de expressie van FGF15 na toediening van één van de drie galzouten. Dit suggereert dat de FXR activiteit ook ter hoogte van het ileum toegenomen is. Gelijkaardige resultaten worden bekomen door het onderzoeksteam van Song et al. waarin werd aangetoond dat de expressie van FXR ter hoogte van het ileum stabiel blijft en de expressie van FGF15 stijgt na toevoeging van UDCA aan het dieet van muizen (0,1%; 0,3%; 1,0% en 3,0%)[36]. Onze data laten echter niet toe om met zekerheid te stellen dat de FXR activiteit is toegenomen, aangezien de stijging in FGF15 expressie niet significant is. Een grotere studiepopulatie is nodig om een grotere power te bekomen. Bovendien is na TUDCA, UDCA of GUDCA toediening, naast FGF15, enkel de expressie van IBABP ter hoogte van het ileum opgereguleerd ten opzichte van de controlegroep en vertonen SHP, ASBT en OST $\alpha$  geen gewijzigde expressie. In de studie van Song et al. werd de expressie van IBABP eveneens verhoogd na de toediening van UDCA aan de bovenstaande concentraties[36]. In onze studie worden dus de resultaten van Song et al. bevestigd.

De expressie van VDR blijft constant na toediening van TUDCA, UDCA en GUDCA. Dit is enerzijds een positief resultaat. In de literatuur wordt immers beschreven dat VDR geactiveerd wordt door LCA om accumulatie van deze toxische secundaire galzouten in de cel te voorkomen[35, 39]. VDR activatie leidt immers tot de activatie van de effluxtransporters MDR1, MRP3 en MRP4 en het detoxificerend enzym CYP3A11. Aangezien de expressie van VDR en zijn targetgenen ongewijzigd blijft, kunnen we veronderstellen dat toediening van TUDCA, UDCA of GUDCA niet resulteert tot een verhoogde aanwezigheid van toxische galzouten ter hoogte van het ileum en het colon . Bij UC patiënten met pancolitis ziet men een significante daling in VDR expressie[10]. Pro-inflammatoire cytokines leiden immers tot een neerregulatie van de VDR expressie door een opregulatie van miRNA-346 (zie figuur 9)[24]. Mogelijks kan het toedienen van TUDCA, UDCA of GUDCA deze neerregulatie van VDR tegen gaan door de productie te inhiberen van pro-inflammatoire cytokines en bijgevolg de aanmaak van miRNA-346 te vermijden[40].

Na toediening van TUDCA, UDCA of GUDCA wordt een trend tot opregulatie gezien in de ASBT expressie ter hoogte van het colon. Ter hoogte van het ileum wordt echter een ongewijzigde ASBT expressie gezien na galzout toediening. Een mogelijke verklaring voor deze ongewijzigde expressie is dat het lichaam in basale omstandigheden geen nood heeft om extra galzouten op te nemen ter hoogte van het ileum. Bijgevolg komen er meer (hydrofiele) galzouten in het colon terecht, wat op zijn beurt een effect heeft op samenstelling van de darmflora. Annaba et al. zien een link tussen het voorkomen van verschillende bacteriestammen en de regulatie van ASBT[41]. Onder fysiologische omstandigheden stimuleren bacteriën immers de GATA4 expressie. GATA4 inhibeert vervolgens de expressie van ASBT[42]. Een shift in de samenstelling van de bacteriële flora ter hoogte van de darm, veroorzaakt door de toegenomen hoeveelheid galzouten in de darm, zou dus kunnen zorgen voor een stijging in ASBT expressie door alteraties in GATA4 expressie[42]. Jahnel et al. zien een significante neerregulatie in ASBT expressie bij IBD patiënten[10]. Zoals in de inleiding vermeld is IBD geassocieerd met microbiom dysbiose in de darm. Dit alles suggereert dat er bij IBD patiënten een shift in het microbiom ontstaat die zorgt voor een hogere GATA4 expressie , wat leidt tot een neerregulatie van de ASBT expressie. De opregulatie van ASBT ter hoogte van het colon na behandeling met TUDCA, UDCA of GUDCA is dus mogelijk protectief tegen de ontwikkeling van IBD. Zo kunnen meer galzouten via ASBT de enterocyt binnen treden die binden met de anti-inflammatoire receptor FXR.

De expressie van SLC15a1 zorgt naast het transport van di- en tripeptiden voor het transport van muramyldipeptide (MDP). MDP is een afbraakproduct van de bacteriële cellaag en activeert de intracellulaire NOD1 receptor, wat leidt tot apoptose van de cel en verstoring van de intestinale barrière. De transcriptie van SLC15a1 is verhoogd bij IBD patiënten als respons op de pro-inflammatoire cytokines IFN- $\gamma$  en TNF- $\alpha$ [37]. Zo ziet men bij CD patiënten dat de SLC15a1 expressie significant gestegen is ten opzichte van de controlegroep. Dit was echter niet het geval bij UC patiënten, al zag men een stijgende trend[37]. Bij de TUDCA en UDCA behandelingsgroep werd een significante stijging van SLC15a1 waargenomen ter hoogte van het PC. Een verklaring voor deze significante stijging werd niet gevonden in de literatuur.

We vergeleken in deze thesis eveneens de galzoutenbehandeling onderling en stelden vast dat toediening van UDCA, TUDCA of GUDCA aan gezonde muizen dezelfde effecten heeft op de genexpressie van receptoren, transporters en enzymen betrokken bij de galzout homeostase. Slechts randsignificante verschillen werden gezien tussen de toediening van UDCA en GUDCA op de VDR genexpressie ter hoogte van het DC ( $P=0,015$ ; data niet weergegeven) en de CFTR expressie ter hoogte van het ileum ( $P= 0,032$ ). Tussen de toediening van TUDCA en UDCA werden eveneens twee randsignificante verschillen opgemerkt in de expressie van de apicale transporters MRP4 ( $P= 0,049$ ; data niet weergegeven) en ASBT ( $P= 0,042$ ; data niet weergegeven) ter hoogte van het ileum . Men kan dus stellen dat het effect van TUDCA, UDCA en GUDCA op de genexpressie van de verschillende proteïnen, betrokken bij de galzout homeostase in basale omstandigheden weinig tot niet verschilt. Een gelijkaardig besluit wordt waargenomen door Duane et al. na stimulatie van hepatoma cellen van kippen met TUDCA, UDCA en GUDCA. Er worden namelijk geen verschillen gezien in ASBT promotor activiteit tussen de TUDCA, UDCA en GUDCA behandelingsgroep[43]. Toediening van een hogere dosis van TUDCA, UDCA of GUDCA veroorzaakt echter wel een verschillend effect, wat mogelijks verklaard wordt door verschillende in cytotoxische eigenschappen tussen deze drie galzouten.

De klachten van aandrang en diarree worden bij IBD mogelijks deels veroorzaakt door de galzoutmalabsorptie ter hoogte van het ileum. Door de verminderde reabsorptie van galzouten bij IBD ter hoogte van het ileum bereiken meer galzouten het colon. Stimulatie van TGR5 door galzouten ter hoogte van het colon door galzouten leidt tot een verhoogde peristaltiek in de darm[44, 45], wat mogelijks de klachten van aandrang bij IBD patiënten verklaart. Diarree wordt veroorzaakt door een verhoogde activiteit van CFTR, een verhoogde mucus secretie door slijmbekercellen en een gestegen motiliteit[46]. Pro-inflammatoire cytokines zijn namelijk in

staat om adenylaat cyclase (AC) te stimuleren, wat bijgevolg leidt tot CFTR activatie. Uit onze resultaten blijkt dat de expressie van CFTR licht verhoogd is na toediening van TUDCA, UDCA en GUDCA ter hoogte van het ileum, het PC en het MC. Deze lichte niet-significante verhoging wordt mogelijks verklaard door een toename aan galzouten die het colon bereiken na toediening van TUDCA, UDCA en GUDCA. In Chinese hamster ovarium cellen blijken taurine gekoppelde galzouten een potentere activator te zijn voor TGR5 dan glycine gekoppelde galzouten. Onze resultaten tonen echter geen verschil tussen de TUDCA en GUDCA behandelingsgroep op de TGR5 expressie[47]. Om met zekerheid te kunnen stellen of de toegenomen expressie van TGR5 en CFTR leiden tot een toegenomen prosecretair effect, moet in de toekomst de stoelgangconsistentie en defaecatiefrequentie van muizen bijgehouden worden, wat niet werd gedaan in deze studie.

Tot slot is het belangrijk te vermelden dat er nog verder onderzoek moet verricht worden naar de rol van galzouten in ons lichaam. In de literatuur worden namelijk tegenstrijdige effecten van galzouten beschreven op de expressie van receptoren, transporters en enzymen in de galzouthomeostase. Dit wordt mede verklaard door dat onderzoekers gebruik maken van verschillende galzouten en verschillende –soms suprafysiologische- galzoutconcentraties, verschillende muismodellen en verschillende proefopstellingen. Er is met andere woorden nood aan standaardisatie bij het onderzoek rond IBD. Het blijkt dan ook moeilijk om in deze thesis een duidelijk antwoord te geven op de rol van TUDCA, UDCA en GUDCA op de expressie van de hierboven benoemde transporters, receptoren en enzymen bij gezonde muizen. Ten eerste wordt de expressie van bovenstaande transporters, receptoren en enzymen niet gestimuleerd door één, maar meerdere pathways (zie tabel 1) en worden deze pathways gemoduleerd door het microbiom, het genoom en galzouten, wat zorgt voor complexiteit en minder eenduidige antwoorden. Bovendien maken we in deze studie gebruik van mRNA expressie die bij opregulatie of neerregulatie een indicatie is voor een gestegen of gedaalde aanwezigheid en/of activiteit. Een activiteitsbepaling is echter nodig om meer zekerheid te bekomen. TUDCA, UDCA en GUDCA worden eveneens gemetaboliseerd over het verloop in de darm. We beschikken echter niet over de exacte concentraties van hun voorkomen in het ileum en het colon. De beschreven effecten kunnen dus mogelijk de oorzaak zijn van de metaboliëten van TUDCA, UDCA en GUDCA.



# Conclusie

---

Deze studie toont aan dat de toediening van TUDCA, UDCA en GUDCA aan gezonde muizen niet leidt tot algemene veranderingen in de basale expressie van genen die betrokken zijn in de galzouthomeostase. Ter hoogte van het PC lijkt de FXR activiteit verhoogd te zijn. De expressie van de apicale SLC15a1 transporter is na TUDCA en UDCA behandeling significant gestegen. Indien we de behandelingsgroepen TUDCA, UDCA en GUDCA onderling vergelijken, worden slechts enkele regionale significante verschillen in expressie opgemerkt bij de nucleaire VDR en de apicale transporters CFTR, ASBT en MRP4. Het voorkomen van de belangrijkste nucleaire receptoren, transporters en enzymen van de enterohepatische cyclus van galzouten in de darm is hoger ter hoogte van het ileum in vergelijking met de expressie in het colon.

# Algemene discussie

---

Het onderzoek beschreven in deze thesis vormt een onderdeel van een bredere studie rond de rol van galzouten bij IBD. Patiënten met IBD hebben namelijk een gewijzigde galzouthomeostase[31] en toediening van specifieke galzouten aan muizen met experimentele colitis heeft gunstige effecten[13, 48, 49]. De vraag hierbij is of een gewijzigde genexpressie van galzouttransporters en –receptoren bijdraagt tot de reeds beschreven wisselwerking tussen IBD en galzouten. Om deze vraag te beantwoorden werden verschillende experimenten parallel uitgevoerd. Een eerste onderzoek beschreef het toedienen van TUDCA en UDCA aan muizen met DSS-geïnduceerde, chronische colitis. Hierbij werden echter geen significant gunstige effecten gevonden, in tegenstelling tot wat er in de literatuur beschreven is bij vergelijkbare experimenten[13, 31, 48, 49]. Een tweede studie onderzocht bij gezonde muizen de effecten van TUDCA, UDCA en GUDCA op de expressie van genen betrokken bij het galzoutmetabolisme. In het derde onderdeel van de experimenten werden dezelfde genen getest in biopten van CD- en UC-patiënten enerzijds en in Caco2- en HT29-cellen na incubatie met de drie galzouten anderzijds. Bij beide studies werden enkele belangrijke wijzigingen in genexpressie vastgesteld.

Tegelijkertijd met deze experimenten liep er in dezelfde onderzoeksgroep een studie over wijzigingen in de galzouthomeostase in  $TNF^{\Delta ARE}$  muizen.  $TNF^{\Delta ARE}$  muizen staan model voor CD ileïtis en vertoonden een verstoorde genexpressie van galzouttransporters en –receptoren ter hoogte van het ileum. Toediening van TUDCA aan deze muizen ging deze wijzigingen gedeeltelijk tegen en had bovendien een gunstig effect op de graad van inflammatie.

Een eerste belangrijke observatie binnen deze groep van experimenten was dat de veranderingen in genexpressie tijdens chronische DSS-geïnduceerde colitis niet overeenkomen met de veranderingen die geobserveerd werden in de UC-biopten. De algemene trend tot neerregulatie van genen betrokken in het galzoutmetabolisme die werd gezien bij UC-biopten wordt wel bevestigd in de literatuur[10, 50-52]. Het chronische DSS-colitismodel is dus mogelijk niet geschikt als representatie van de galzouthomeostase bij UC. De gegevens van het  $TNF^{\Delta ARE}$  experiment waren wel grotendeels vergelijkbaar met wat in de ileumbiopten werd vastgesteld. Deze muizen lijken dus een waardevol model om de humane situatie van CD na te bootsen.

Toediening van TUDCA aan  $TNF^{\Delta ARE}$ -muizen had uitgesproken effecten op de ileale expressie van factoren in het galzoutmetabolisme, in tegenstelling tot wat gezien werd in Caco2-cellen en in het ileum van de gezonde muizen en van de wild-type muizen uit het  $TNF^{\Delta ARE}$ -experiment. De gunstige effecten van TUDCA tijdens  $TNF^{\Delta ARE}$  ileïtis betekenen mogelijks dat dit galzout

vooral een invloed uitoefent tijdens inflammatie. Een dergelijke vergelijking voor het colon levert andere resultaten op. Daar hebben galzouten namelijk weinig effect op DSS-colitis, maar brengen ze wel enkele veranderingen teweeg in het proximaal colon van gezonde muizen en in HT29-cellen. De waarde van het DSS-colitismodel in deze onderzoeken kan in vraag gesteld worden zoals hierboven wordt beschreven.

Omwille van hun belang als anti-inflammatoire receptoren, werden de resultaten van de expressie van FXR en PXR in de verschillende experimenten met elkaar vergeleken. Ten eerste wordt de situatie in het colon besproken. Beide receptoren waren sterk neergereguleerd in biopten van UC-patiënten. Bij het *in vivo* experiment met gezonde muizen werd na toediening van de drie galzouten een trend tot opregulatie van deze genen waargenomen in het proximaal colon (PC). Zowel bij experimentele colitis als in gezonde muizen waren bovendien enkele targetgenen van FXR opgereguleerd in het PC na toediening van TUDCA. Ook in HT29 cellen (model voor colonocyten) werden de gunstige effecten van UDCA en zijn twee derivaten op de expressie van FXR en PXR bevestigd.

In het ileum zijn de resultaten minder eenduidig. Bij CD-patiënten was PXR neergereguleerd, terwijl de expressie van FXR op hetzelfde niveau bleef. Caco2-cellen (model voor ileale enterocyten) vertoonden geen verhoogde expressie van FXR en PXR na toediening van TUDCA, UDCA of GUDCA en ook in beide proeven met gezonde muizen had toediening van galzouten geen effect op hun expressie in het distaal ileum. Enkel in het TNF<sup>ΔARE</sup> model werd na toediening van TUDCA een minder grote daling in expressie van deze twee receptoren waargenomen in vergelijking met placebo-behandelde TNF<sup>ΔARE</sup>-muizen. Dit kan een element zijn in de mildering van symptomen van ileïtis bij de zieke muizen na behandeling met TUDCA. Bij het analyseren van de resultaten voor andere genen over de verschillende experimenten heen, was het moeilijk om duidelijke trends te zien in veranderingen van genexpressie na toediening van galzouten.

De bovenstaande gegevens laten toe enkele besluiten te formuleren. Ten eerste lijken TNF<sup>ΔARE</sup>-muizen een beter model voor CD dan muizen met chronische DSS-colitis voor UC. Ten tweede heeft het toedienen van TUDCA, UDCA en GUDCA in de verschillende gebruikte modellen geen eenduidige effecten op de expressie van factoren in het galzoutmetabolisme. Daarbij werden tussen deze galzouten onderling weinig verschillen gezien. Ten slotte zijn er in een aantal van deze modellen wel aanwijzingen dat de galzouten mogelijk gunstige effecten hebben bij colitis en/of ileïtis door in te werken op de verstoorde expressie van genen betrokken in de galzouthomeostase.

# Referentielijst

---

1. Sobczak, M., et al., *Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases*. Pharmacol Rep, 2014. **66**(5): p. 766-75.
2. Ananthakrishnan, A.N., *Environmental risk factors for inflammatory bowel disease*. Gastroenterol Hepatol (N Y), 2013. **9**(6): p. 367-74.
3. Abraham, C. and J.H. Cho, *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2009. **361**(21): p. 2066-78.
4. Fakhoury, M., et al., *Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments*. J Inflamm Res, 2014. **7**: p. 113-20.
5. Danese, S. and C. Fiocchi, *Ulcerative colitis*. N Engl J Med, 2011. **365**(18): p. 1713-25.
6. Podolsky, D.K., *Inflammatory bowel disease*. N Engl J Med, 2002. **347**(6): p. 417-29.
7. Beaugerie, L. and S.H. Itzkowitz, *Cancers Complicating Inflammatory Bowel Disease*. N Engl J Med, 2015. **373**(2): p. 195.
8. Lee, D., et al., *Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2015. **148**(6): p. 1087-106.
9. Goto, Y., Y. Kurashima, and H. Kiyono, *The gut microbiota and inflammatory bowel disease*. Curr Opin Rheumatol, 2015. **27**(4): p. 388-96.
10. Jahnel, J., et al., *Inflammatory bowel disease alters intestinal bile acid transporter expression*. Drug Metab Dispos, 2014. **42**(9): p. 1423-31.
11. Lees, C.W., et al., *New IBD genetics: common pathways with other diseases*. Gut, 2011. **60**(12): p. 1739-53.
12. Stojancevic, M., K. Stankov, and M. Mikov, *The impact of farnesoid X receptor activation on intestinal permeability in inflammatory bowel disease*. Can J Gastroenterol, 2012. **26**(9): p. 631-7.
13. Laukens, D., et al., *Tauroursodeoxycholic acid inhibits experimental colitis by preventing early intestinal epithelial cell death*. Lab Invest, 2014. **94**(12): p. 1419-30.
14. Yu, L.C., et al., *Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2012. **3**(1): p. 27-43.
15. Pavlidis, P., et al., *Systematic review: bile acids and intestinal inflammation-luminal aggressors or regulators of mucosal defence?* Aliment Pharmacol Ther, 2015. **42**(7): p. 802-17.
16. Trauner, M., P. Fickert, and H. Tilg, *Bile acids as modulators of gut microbiota linking dietary habits and inflammatory bowel disease: a potentially dangerous liaison*. Gastroenterology, 2013. **144**(4): p. 844-6.
17. Grevenitis, P., A. Thomas, and N. Lodhia, *Medical Therapy for Inflammatory Bowel Disease*. Surg Clin North Am, 2015. **95**(6): p. 1159-82, vi.
18. Hwang, J.M. and M.G. Varma, *Surgery for inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(17): p. 2678-90.
19. Martinez-Augustin, O. and F. Sanchez de Medina, *Intestinal bile acid physiology and pathophysiology*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(37): p. 5630-40.
20. Dawson, P.A. and S.J. Karpen, *Intestinal transport and metabolism of bile acids*. J Lipid Res, 2015. **56**(6): p. 1085-99.
21. Alrefai, W.A. and R.K. Gill, *Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications*. Pharm Res, 2007. **24**(10): p. 1803-23.
22. Camilleri, M. and G.J. Gores, *Therapeutic targeting of bile acids*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015. **309**(4): p. G209-15.

23. Li, Y.C., Y. Chen, and J. Du, *Critical roles of intestinal epithelial vitamin D receptor signaling in controlling gut mucosal inflammation*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2015. **148**: p. 179-83.
24. Teske, K.A., et al., *Synthesis and evaluation of vitamin D receptor-mediated activities of cholesterol and vitamin D metabolites*. Eur J Med Chem, 2016. **109**: p. 238-46.
25. Iwamoto, J., et al., *Bile acid malabsorption deactivates pregnane X receptor in patients with Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(6): p. 1278-84.
26. Guo, C., et al., *The G-Protein-Coupled Bile Acid Receptor Gpbar1 (TGR5) Inhibits Gastric Inflammation Through Antagonizing NF-kappaB Signaling Pathway*. Front Pharmacol, 2015. **6**: p. 287.
27. Yoneno, K., et al., *TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease*. Immunology, 2013. **139**(1): p. 19-29.
28. Wong, M.H., P. Oelkers, and P.A. Dawson, *Identification of a mutation in the ileal sodium-dependent bile acid transporter gene that abolishes transport activity*. J Biol Chem, 1995. **270**(45): p. 27228-34.
29. Deuring, J.J., et al., *Absence of ABCG2-mediated mucosal detoxification in patients with active inflammatory bowel disease is due to impeded protein folding*. Biochem J, 2012. **441**(1): p. 87-93.
30. Vitek, L., *Bile acid malabsorption in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2015. **21**(2): p. 476-83.
31. Duboc, H., et al., *Connecting dysbiosis, bile-acid dysmetabolism and gut inflammation in inflammatory bowel diseases*. Gut, 2013. **62**(4): p. 531-9.
32. Kullmann, F., et al., *Effect of ursodeoxycholic acid on the inflammatory activity of indomethacin-induced intestinal inflammation in rats*. Z Gastroenterol, 1997. **35**(3): p. 171-8.
33. Kullmann, F., et al., *Beneficial effect of ursodeoxycholic acid on mucosal damage in trinitrobenzene sulphonic acid-induced colitis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 1997. **9**(12): p. 1205-11.
34. Rodriguez, V.A., et al., *Ursodeoxycholic and deoxycholic acids: Differential effects on intestinal Ca(2+) uptake, apoptosis and autophagy of rat intestine*. Arch Biochem Biophys, 2016. **591**: p. 28-34.
35. Krasowski, M.D., et al., *Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR*. Mol Cell Endocrinol, 2011. **334**(1-2): p. 39-48.
36. Song, P., et al., *Individual bile acids have differential effects on bile acid signaling in mice*. Toxicol Appl Pharmacol, 2015. **283**(1): p. 57-64.
37. Wojtal, K.A., et al., *Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients*. Drug Metab Dispos, 2009. **37**(9): p. 1871-7.
38. Khan, A.A., et al., *Expression and regulation of the bile acid transporter, OSTalpha-OSTbeta in rat and human intestine and liver*. Biopharm Drug Dispos, 2009. **30**(5): p. 241-58.
39. Khan, A.A., et al., *Regulation of VDR expression in rat and human intestine and liver--consequences for CYP3A expression*. Toxicol In Vitro, 2010. **24**(3): p. 822-9.
40. Amaral, J.D., et al., *Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid*. J Lipid Res, 2009. **50**(9): p. 1721-34.
41. Annaba, F., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli inhibits ileal sodium-dependent bile acid transporter ASBT*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012. **302**(10): p. G1216-22.
42. Out, C., et al., *Gut microbiota inhibit Asbt-dependent intestinal bile acid reabsorption via Gata4*. J Hepatol, 2015. **63**(3): p. 697-704.
43. Duane, W.C., W. Xiong, and J. Wolvers, *Effects of bile acids on expression of the human apical sodium dependent bile acid transporter gene*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1771**(11): p. 1380-8.
44. Jiang, C., et al., *Current developments in pharmacological therapeutics for chronic constipation*. Acta Pharm Sin B, 2015. **5**(4): p. 300-9.

45. Alemi, F., et al., *The receptor TGR5 mediates the prokinetic actions of intestinal bile acids and is required for normal defecation in mice*. *Gastroenterology*, 2013. **144**(1): p. 145-54.
46. Camilleri, M., *Bile Acid diarrhea: prevalence, pathogenesis, and therapy*. *Gut Liver*, 2015. **9**(3): p. 332-9.
47. Copple, B.L. and T. Li, *Pharmacology of bile acid receptors: Evolution of bile acids from simple detergents to complex signaling molecules*. *Pharmacol Res*, 2016. **104**: p. 9-21.
48. Martinez-Moya, P., et al., *Dose-dependent antiinflammatory effect of ursodeoxycholic acid in experimental colitis*. *Int Immunopharmacol*, 2013. **15**(2): p. 372-80.
49. Bernardes-Silva, C.F., et al., *Ursodeoxycholic acid ameliorates experimental ileitis counteracting intestinal barrier dysfunction and oxidative stress*. *Dig Dis Sci*, 2004. **49**(10): p. 1569-74.
50. Langmann, T., et al., *Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(1): p. 26-40.
51. Gutmann, H., et al., *Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein expression in patients with newly diagnosed and therapy-refractory ulcerative colitis compared with healthy controls*. *Digestion*, 2008. **78**(2-3): p. 154-62.
52. Liu, W., et al., *Intestinal epithelial vitamin D receptor signaling inhibits experimental colitis*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(9): p. 3983-96.



