

University of Groningen

## Precision-cut tissue slices: a novel ex vivo model for fibrosis research

Pham, Bao Tung

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Pham, B. T. (2016). *Precision-cut tissue slices: a novel ex vivo model for fibrosis research*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# *Appendix 1*

Nederlandse samenvatting

---

Overtollige littekenvorming (fibrose) in organen wordt gekenmerkt door een excessieve productie en depositie van extracellulaire matrix (ECM) eiwitten in het orgaan, resulterend in het verlies van functioneel weefsel. Fibrose ontstaat vaak door chronische schade en komt voor in nagenoeg alle organen waaronder de lever, nier, darm en longen. Darmfibrose is een complicatie van chronische darmziekte, zoals bijvoorbeeld de ziekte van Crohn. In 30% van alle Crohnpatiënten is de mate van fibrose zo ernstig dat er een vernauwing van de darm optreedt, die alleen door een chirurgische ingreep kan worden verholpen. Het moleculaire mechanisme dat leidt tot fibrose is nog steeds niet volledig opgehelderd en het ziekteproces verloopt anders in de verschillende organen. Om het mechanisme van fibrose in de mens te ontrafelen is het essentieel dat onderzoekers beschikken over goede humane (*in vitro*)-modellen. Helaas zijn deze modellen niet voorhanden, wat het bestuderen van fibrose belemmert. Doordat het ontstaan en de progressie van fibrose niet goed kunnen worden onderzocht, is het ook moeilijk om anti-fibrotische geneesmiddelen te ontwikkelen. Experimentele diermodellen voor de verschillende typen van fibrose (bijvoorbeeld lever- of nierfibrose) bestaan wel, maar deze modellen kunnen niet, of alleen gedeeltelijk, het ziekteproces in mensen simuleren. Daarom is het van groot belang om humane *in vitro*-modellen te ontwikkelen om zowel het pathologisch mechanisme van fibrose te bestuderen als om geneesmiddelen te vinden tegen fibrose. In dit proefschrift wordt gebruikt gemaakt van “precies gesneden weefselslices” (precision-cut tissue slices; PCTS). In dit model blijft de originele structuur van het orgaan behouden, wat het mogelijk maakt om, onder andere, de interactie tussen cellen in hun normale omgeving te bestuderen.

Het doel van dit onderzoek was om te bestuderen of PCTS van darm en nier gebruikt kunnen worden als fibrosemodel. Daarnaast is er onderzocht of dit model toepasbaar is om de anti-fibrotische effectiviteit van verschillende stoffen te bepalen (**hoofdstuk 2**).

Dit proefschrift behelst twee delen:

De eerste sectie beschrijft de ontwikkeling van een nieuw *ex vivo*-model, precision-cut darmslices, om de beginfase van darmfibrose te bestuderen. In de tweede sectie zijn

PCTS gebruikt om de anti-fibrotische effectiviteit van stoffen te meten, onder andere in darmfibrose.

---

**Hoofdstuk 1** beschrijft de huidige stand van zaken betreffende het gebruik van PCTS in het onderzoek naar fibrose in de lever, long, darm en nier.

In **hoofdstuk 3** beschrijven we hoe precision-cut darmslices (PCIS) werden gebruikt om de beginfase van darmfibrose in ratten, muizen en mensen te bestuderen. PCIS werden gemaakt van het jejunum (middelste deel van de dunne darm). De PCIS werden tot 72 uur gekweekt in aan- of afwezigheid van de pro-fibrotische factor transforming growth factor beta 1 (TGF $\beta$ 1). Uit onze experimenten bleek dat PCIS van ratten maar 24 uur levensvatbaar waren, wat we baseerden op het ATP- gehalte in de slices en de morfologie van de slices. Daarentegen bleven PCIS van muizen en mensen tijdens kweek tot 72 uur vitaal. In alle PCIS nam gedurende de kweekperiode de expressie toe van genen gerelateerd aan fibrose, te weten heat shock protein 47 (HSP47) en plasminogen activator 1 (PAI-1). Genexpressie van synaptofysine, een marker voor stellaatcellen, nam alleen toe gedurende de kweek van humane PCIS, terwijl de expressie van fibronectine (Fn2) en TGF $\beta$ 1 alleen in PCIS van ratten steeg. In PCIS van muizen nam de genexpressie van Fn2 en connective tissue growth factor (Ctgf) toe gedurende de kweek. Toevoeging van TGF $\beta$ 1 aan het kweekmedium leidde alleen in PCIS van rat en muis tot een verhoging van de genexpressie van de fibrosemarkers (pro)collageen 1a1 (Colla1), Fn2 en Ctgf.

In dit hoofdstuk hebben we aangetoond dat we de beginfase van fibrose in de darm kunnen nabootsen in PCIS en dat de pro-fibrotische groeifactor TGF $\beta$ 1 alleen in knaagdier-PCIS een verdere toename in de genexpressie van verscheidene fibrosemarkers veroorzaakt.

In **hoofdstuk 4** hebben we gebruik gemaakt van de muizen-PCIS om het effect van potentiële anti-fibrotische stoffen op de beginfase van darmfibrose te meten. Hiervoor werden PCIS van muizen blootgesteld aan pro-fibrotische en/of anti-fibrotische stoffen. Het resulterende fibrotische proces werd bestudeerd op gen- en eiwitniveau, gebruikmakend van verschillende markers zoals Colla1, Hsp47, Fn2 en Pai-1. Het effect van potentiële anti-fibrotische stoffen die vooral de TGF $\beta$ -signaalroute remmen, te weten valproïnezuur, tetrandrine, pirfenidone, SB203580 en LY2109761 en stoffen die vooral de PDGF-signaalroute beïnvloeden, namelijk imatinib, sorafenib and sunitinib, werden in niet-toxische concentraties getest. PCIS van muizen bleven gedurende 48 uur vitaal en in deze periode werd een toename van de expressie van verschillende fibrosemarkers, waaronder Hsp47, Fn2 en Pai-1, waargenomen. Toevoeging van TGF $\beta$ 1 aan het kweekmedium leidde tot een verdere

toename van de expressie van de fibrosemarkers. PDGF had dit effect echter niet. Van de geteste anti-fibrotische middelen hadden pirfenidone, LY2109761 en sunitinib het meeste effect op het ontstaan van darmfibrose. Vooral de genexpressie van de fibrose markers Colla1, Hsp47, Fn2 en Pai-1 werd verlaagd door deze stoffen. Daarnaast reduceerde LY2109761 ook nog de eiwitexpressie van Fn2. Concluderend kunnen we vaststellen dat PCIS gebruikt kunnen worden om de anti-fibrotische effectiviteit van geneesmiddelen aan te tonen. Door gebruik te maken van het muizen-PCIS model hebben we aangetoond dat tetrandrine, pirfenidone, LY2109761 en sunitinib op genniveau een anti-fibrotisch effect hebben en dit rechtvaardigt verdere studies naar de effectiviteit van deze stoffen voor de behandeling van darmfibrose.

Uit eerder onderzoek in (humane) leverslices bleek dat rozemarijnzuur (RA) een potentieel anti-fibrotisch geneesmiddel zou kunnen zijn. In **hoofdstuk 5** hebben we de anti-fibrotische effectiviteit en eventuele toxiciteit van RA bestudeerd in een ander orgaan, namelijk de darm. RA is een organische verbinding die gevonden wordt in verschillende plantensoorten, waaronder de ruwbladigenfamilie en lipbloemenfamilie, en waaraan gunstige eigenschappen worden toegeschreven, waaronder ontstekingsremmende en antibacteriële effecten. In dit hoofdstuk onderzochten we de toxiciteit, ontstekingsremmende en anti-fibrotische effecten van RA in precision-cut leverslices (PCLS) en PCIS van humaan, muizen- en rattenweefsel. PCLS en PCIS werden gedurende 48 uur gekweekt in aan- of afwezigheid van RA. Genexpressie van de ontstekingsfactoren: IL-6, IL-8, CXCL1 / KC en IL-1 $\beta$ , evenals de fibrosemarkers Colla1, Hsp47,  $\alpha$ -SMA, Fn2 en Pai-1 werd gemeten. Onze resultaten lieten zien dat RA alleen toxisch was in PCIS van muizen. Daarnaast zorgde RA niet voor een vermindering van de ontstekingsreactie in de meeste modellen, hoewel een duidelijk afname van IL-6 en CXCL1 / KC genexpressie in PCIS van muizen werd waargenomen bij niet-toxische concentraties. Verder leidde blootstelling aan RA tot een daling van de genexpressie van Fn2 en Pai-1 in muizen-PCLS en van Fn2 in muizen-PCIS. Er werd echter geen effect waargenomen op de genexpressie van fibrosemarkers in de humane en ratten-PCIS. Uit onze studie bleek dus duidelijk dat RA orgaan- en species-specifieke effecten bewerkstelligt. Concluderend kunnen we stellen dat RA weinig invloed had op de ontstekingsreactie in PCTS. Verder blijkt dat RA wel een potentiële kandidaat is voor de behandeling van leverfibrose.

In **hoofdstuk 6** gebruiken we precision-cut nierslices (PCKS) om de

---

ontwikkeling van nierfibrose te bestuderen en om de anti-fibrotische werking van een nieuw medicijnpreparaat te testen. Nierfibrose wordt beschouwd als het schadelijkste proces in patiënten met chronische nierschade. Desondanks zijn er geen preventieve en curatieve therapieën beschikbaar om nierfibrose te behandelen. De zoektocht naar nieuwe en doeltreffende behandelingsstrategieën is daarom van levensbelang. Uit onze studie bleek dat PCKS van muizen gedurende 72 uur vitaal blijven, ook in aanwezigheid van TGF $\beta$ . Behandeling met TGF $\beta$  verhoogde duidelijk de gen- en eiwitexpressie van  $\alpha$ -SMA, Fn2 en Col1a1. Dit pro-fibrotische effect van TGF $\beta$  kon worden tegengegaan door middel van interferon gamma (IFN $\gamma$ ) en het preparaat PPB-PEG-IFN $\gamma$ . Dit preparaat bindt specifiek aan de PDGF-receptor  $\beta$ , welke sterk tot expressie wordt gebracht door geactiveerde fibroblasten. Deze resultaten tonen aan dat PKCS gebruikt kunnen worden om de beginfase van fibrose te bestuderen en dat het model geschikt is om de effectiviteit van potentiële anti-fibrotische geneesmiddelen te testen.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek laat zien dat er een grote vooruitgang is geboekt in het optimaliseren van het PCTS-model voor de studie van darm- en nierfibrose. Daarnaast bleken PCIS en PCKS een ideaal experimenteel model te zijn bij de zoektocht naar effectieve anti-fibrotische verbindingen. Verder dragen PCTS er toe bij dat het aantal proefdieren dat wordt gebruikt in fibrose-onderzoek gereduceerd kan worden. Ten slotte kan het humaan PCTS-model een brug vormen tussen basaal pre-klinisch en klinisch onderzoek.

