

STAGEGEGEVENS

Stageperiode: 8 februari 2016 tot 10 juni 2016

Stageplaats: Universiteit Gent – Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen
Centrum voor Microbiële Ecologie en Technologie
Coupure Links 653, 9000 Gent
Tel. +32 9/264 59 76
Fax +32 9/264 62 48

Stagementor: Eline Vanlancker
(prof. dr Tom Van de Wiele, dr Barbara Vanhoecke)

Stagebegeleider: Rudy Vanoverschelde

SAMENVATTING

Titel: 5-FU effect op de interactie tussen het orale microbioom en de humane epitheelcellen bij orale mucositis.

Trefwoorden: mucositis, 5-fluorouracil, oraal microbioom, wondheling

Orale mucositis is een vaak voorkomend neveneffect bij een chemo- of radiotherapeutische behandeling van kanker. Tijdens de ulceratie fase worden zweren ter hoogte van de mondholte gevormd waardoor eten en spreken moeilijker wordt, hierna zal spontane wondheling optreden. Door de pijnlijke bijwerkingen zal de levenskwaliteit van de patiënt achteruit gaan en wordt verdere kankertherapie uitgesteld waardoor de overlevingskansen voor de patiënt dalen. Een doeltreffende therapie om de spontane wondheling vroeger te laten plaats vinden is tot op heden nog niet bekend. Momenteel worden enkel pijnstillende behandelingen toegepast.

In deze bachelorproef werd gekeken naar de interactie tussen het orale microbioom van een donor en de humane epitheelcellen. Via een *in vitro* model werd deze interactie vergeleken tussen gezonde personen en mucositis patiënten in aanwezigheid van het chemotherapeuticum 5-fluorouracil. De aanwezigheid van bacteriën oefenen algemeen een nefast effect uit op de wondheling. Het tong- en wangstaal bevatten een lager aantal bacteriën waardoor in combinatie met 5-FU een stimulatie in wondheling waarneembaar was, maar in echte afwezigheid van bacteriën bleef 5-FU nog steeds zorgen voor een tragere genezing. Het grote aantal bacteriën in het speekselstaal bracht steeds een stressfactor met zich mee, waardoor de wondheling vertraagde. Er werden gelijkaardige resultaten bekomen voor zowel gezonde personen als mucositis patiënten, met het enige verschil dat de wondheling sneller plaats vond in het geval van mucositis stalen waarschijnlijk door het lagere aantal bacteriën in de afgenomen stalen.

Om het effect van 5-FU op het orale microbioom te onderzoeken, in afwezigheid van cellen, werd een dosis-respons curve opgesteld, en werd de viabiliteit van de biofilm gemeten na 24 uur incubatie in aanwezigheid van 5-FU. Voor de biofilm bestaande uit wangbacteriën, werd een stimulatie in viabiliteit geconstateerd bij een 5-FU behandeling met concentraties tussen 25 en 50 μM . Voor het tong en speekselstaal kon enkel een licht nadelig effect in aanwezigheid van 5-FU worden waargenomen.

In het tweede deel van de bachelorproef werd gekeken naar de combinatie van een pure cultuur (*Streptococcus mitis* en *S. oralis*) met een oraal staal, met de intentie de wondhelingsfase te versnellen zodat de ulceratie verkort kan worden en de behandeling van de patiënt iets draaglijker wordt. Uit de resultaten bleek *S. oralis* een betere wondstimulatie te weeg te brengen dan *S. mitis*. Daarom werd het beschermend effect van *S. oralis* op het speeksel staal onderzocht in verschillende concentratieverhoudingen. Speeksel (1/10 verdund) in combinatie met *S. oralis* (1/10 verdund) stimulerende de wondheling het best ten opzichte van het speekselstaal alleen.

Als besluit kan gesteld worden dat hoewel 5-FU aanleiding kan geven tot orale mucositis, dit chemotherapeuticum wondheling op wang- en tongoppervlakken niet negatief zal beïnvloeden (in tegendeel). Uit de resultaten blijkt dat dit kan toegeschreven worden aan het licht antibiotisch effect van 5-FU. Verder bleek dat een behandeling van speeksel en een monocultuur *S. oralis* een gunstig effect uitoefent op wondheling van epitheelcellen.

WOORD VOORAF

De laatste fase binnen mijn opleiding Chemie afstudeerrichting Biochemie, bestond uit een vier maanden lange stage en het schrijven van een aangrenzende bachelorproef. In deze periode heb ik de kans gekregen om te proeven van het onderzoek. Deze ervaring is mij erg goed bevallen. Niet alleen op professioneel vlak heb ik heel veel bijgeleerd maar ik heb mezelf ook beter leren kennen.

Graag zou ik nog een aantal mensen willen bedanken, die mij de mogelijkheid hebben gegeven om zoveel bij te leren.

De belangrijkste persoon tijdens mijn stage was Eline Vanlancker, zij heeft de taak van stagementor zeer zorgvuldig uitgeoefend, waarvoor een dikke merci. Het is namelijk ook door Eline dat ik zoveel heb bijgeleerd, zij leerde me de nieuwe technieken aan maar gaf ook gestructureerde opmerkingen over mijn bachelorproef. Bedankt om al mijn vragen steeds openlijk te ontvangen.

Hiernaast wil ik graag nog twee mensen bedanken, prof. dr Tom Van de Wiele en dr Barbara Vanhoecke, voor hun ondersteuning en het nalezen van mijn bachelorproef.

Ook meneer Vanoverschelde zou ik graag bedanken voor zijn ondersteuning vanuit Hogeschool "Odisee".

Tevens wil ik graag de vakgroep CMET bedanken, omdat ik hun infrastructuur heb mogen gebruiken, maar ook voor de aangename sfeer tijdens de werkuren.

Graag nog een algemeen dankwoord voor mijn medestudenten, die de middagpauzes iets kleurrijker maakten, en de medecollega's in de labo's om hun advies en praktische bijstand.

Als laatste wil ik graag ook nog even mijn familie bedanken om er steeds voor mij te zijn en mij te steunen, niet enkel tijdens mijn stageperiode maar gedurende de jaren van mijn opleiding. Bedankt ook voor jullie betrokkenheid, het was aangenaam om op vrijdag thuis te komen en te mogen vertellen hoe het in het labo geweest was.

INHOUD

LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN, ACRONIEMEN EN SYMBOLEN

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | VOORSTELLING STAGEPLAATS | 7 |
| 2 | PROBLEEMSTELLING EN OPDRACHT | 8 |
| 3 | THEORETISCH DEEL | 9 |
| 3.1 | ORALE MUCOSITIS..... | 9 |
| 3.1.1 | Biologie van de normale orale mucosa | 9 |
| 3.1.2 | Pathobiologie van mucositis | 10 |
| 3.1.3 | Kanker therapieën | 11 |
| 3.1.4 | De behandeling van orale mucositis | 12 |
| 3.2 | ROL VAN MICROBIOOM BIJ ORALE MUCOSITIS | 13 |
| 3.2.1 | Algemene kenmerken van de orale microbiota..... | 13 |
| 3.2.2 | De invloed van kankertherapieën op het oraal microbioom | 14 |
| 3.3 | HET <i>IN VITRO</i> MODEL | 14 |
| 3.4 | WONDHELING..... | 15 |
| 3.4.1 | Microbiota als nieuwe therapie | 15 |
| 4 | EXPERIMENTEEL DEEL | 16 |
| 4.1 | MATERIAAL..... | 16 |
| 4.1.1 | Celcultuur | 16 |
| 4.1.2 | Orale stalen | 16 |
| 4.1.3 | Chemotherapeuticum | 16 |
| 4.1.4 | Agarmucine | 16 |
| 4.1.5 | Analyse oplossingen | 17 |
| 4.1.5.1 | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)..... | 17 |
| 4.1.5.2 | Dimethylsulfoxide (DMSO) | 17 |
| 4.1.6 | Medium..... | 17 |
| 4.2 | METHODES | 17 |
| 4.2.1 | Celcultuur | 17 |
| 4.2.1.1 | Cellen splitsen | 17 |
| 4.2.1.2 | Medium verversen | 18 |
| 4.2.1.3 | Cellen in cultuur brengen | 18 |
| 4.2.1.4 | Cellen invriezen | 18 |
| 4.2.1.5 | Mycoplasma test..... | 18 |
| 4.2.2 | <i>In vitro</i> model..... | 19 |
| 4.2.2.1 | Uitzaaien cellen | 19 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.2.2.2 | Wondhelingsstest..... | 19 |
| 4.2.2.3 | Co-cultuur model..... | 20 |
| 4.2.2.4 | Analyse van de orale stalen..... | 21 |
| 4.2.2.5 | Cellulaire analyses..... | 21 |
| 4.2.2.6 | Filteranalyse..... | 22 |
| 4.2.2.7 | Mediuanalyses..... | 22 |
| 4.2.3 | Mono-cultuur..... | 22 |
| 4.2.3.1 | Bacteriën in cultuur brengen..... | 22 |
| 4.2.3.2 | Bacteriën onderhouden..... | 23 |
| 4.2.3.3 | Controle van de specificiteit via Sanger sequencer..... | 23 |
| 4.2.3.4 | Aantal bacteriën bepalen..... | 24 |
| 4.2.3.5 | <i>In vitro</i> model..... | 25 |
| 4.2.4 | 5-FU effect op orale stalen..... | 25 |
| 4.2.4.1 | MTT analyse..... | 25 |
| 5 | RESULTATEN..... | 27 |
| 5.1 | <i>IN VITRO</i> MODEL..... | 27 |
| 5.1.1 | Planktonische microbiota versus biofilmcellen..... | 27 |
| 5.1.2 | Gezonde stalen..... | 28 |
| 5.1.3 | Mucositisstalen..... | 32 |
| 5.1.4 | Monocultuur..... | 33 |
| 5.1.4.1 | Sanger sequencer..... | 33 |
| 5.1.4.2 | <i>Streptococcus mitis</i> en <i>S. oralis</i> monoculturen..... | 34 |
| 5.1.4.3 | <i>S. oralis</i> in combinatie met speeksel..... | 37 |
| 5.2 | 5-FU EFFECT OP ORALE STALEN..... | 40 |
| 5.2.1 | MTT analyse..... | 40 |
| 5.2.1.1 | Gezonde donors..... | 40 |
| 6 | DISCUSSIE..... | 44 |
| 7 | ALGEMEEN BESLUIT..... | 47 |

LITERATUURLIJST

LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN, ACRONIEMEN EN SYMBOLEN

| | |
|---------------------------------|---|
| 5-FU | 5-fluorouracil |
| BHI | Brain heart infusion |
| BSL | Biosafety level |
| CMET | Centrum voor Microbiële Ecologie en Technologie |
| CO ₂ | Koolstofdioxide |
| COX-2 | Cyclooxygenase-2 |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxide |
| DNA | Desoxyribonucleïnezuur |
| EDTA | Ethyleendiaminetetra-azijnzuur |
| FBS | Foetaal kalfsserum (Fetal Bovine Serum) |
| g | Gravitatiekracht |
| GC | Gaschromatografie |
| GEM | Gemiddelde waarde |
| H ₂ SO ₄ | Zwavelzuur |
| K ₂ HPO ₄ | Kaliumwaterstoffosfaat |
| KGF | Keratinocyt groeifactor |
| KH ₂ PO ₄ | Kaliumfosfaat |
| KVE | Kolonievormende eenheden |
| LPS | Lipopolysacchariden |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide |
| NaCl | Natriumchloride |
| NF-κB | Nuclear factor-kappa B |
| PBS ^{D-} | Dulbecco's phosphate buffered saline, calcium- en magnesium chloride negatief |
| PCR | Polymerasekettingreactie (Polymerase chain reaction) |
| PVP | Polyvinylpyrrolidone |
| ROS | Reactieve zuurstofradicalen |
| Rpm | Omwentelingen per minuut |
| SDS | Natriumdodecylsulfaat (Sodiumdodecyl sulphate) |
| SGPI | SYBR green propidium jodide |
| SM | <i>Streptococcus mitis</i> |
| SO | <i>Streptococcus oralis</i> |
| STDEV | Standaardafwijking |
| Tris | Tromethamine |
| WHO | Wereld Gezondheidszorg Organisatie |

1 VOORSTELLING STAGEPLAATS

CMET, Centrum voor Microbiële Ecologie en Technologie is een afdeling van de faculteit Bio-ingenieurswetenschappen aan de Universiteit van Gent, Coupure Links 653 - 9000 Gent. CMET situeert zich voornamelijk in het A-gebouw, andere CMET labo's bevinden zich in de kelder van het B-gebouw en in de technische hal. [1]

CMET specialiseert zich hoofdzakelijk in het onderzoek naar interacties tussen en de toepassing van gemengde microbiële culturen. Een microbiële gemeenschap bestaat namelijk uit verschillende populaties elk met hun eigen functionele biologie en metabolisch systeem. De focus van CMET ligt op het optimaal beheren van het microbiële bestand om via deze weg nieuwe duurzame producten en processen te ontwikkelen die het milieu of de menselijke gezondheid ten goede komen. CMET past deze aanpak toe op verschillende gebieden zoals (medische) microbiële ecologie, functionele levensmiddelen en dierenvoeding, biomaterialen en nanotechnologie, waterbehandeling, aquacultuur, bio-energie, bodems en sedimenten. [2] [3]

Aan het hoofd van CMET staan drie UGent professoren; professor Boon, professor Van de Wiele en professor Rabaey. De onderzoeksgroep bestaat uit ongeveer 65 werknemers onderverdeeld in postdoctorandi en doctorandi, master en bachelor studenten, en administratief, technisch en wetenschappelijk personeel.

CMET werkt samen met diverse binnen- en buitenlandse instituten, o.a. Shanghai JiaoTong University, University of Milan, Technical University of Crete en University of Bologna. CMET neemt ook deel aan verschillende Europese en nationale onderzoeksprojecten. [3] [4]

Het onderzoek naar de interacties tussen de micro-organismen en hun gastheer valt onder de coördinatie van prof. Van de Wiele. Via verschillende projecten wordt de combinatie van *in vitro* en *in vivo* mechanistisch onderzoek bestudeerd. Het pronkstuk in dit onderzoek is de SHIME (Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem), waarin de complexe microbiota in de darm van de mens wordt nagebootst. De verschillende studies worden ook gelinkt met een aantal ziekten zoals darmontsteking, obesitas of infecties veroorzaakt door pathogenen. [5]

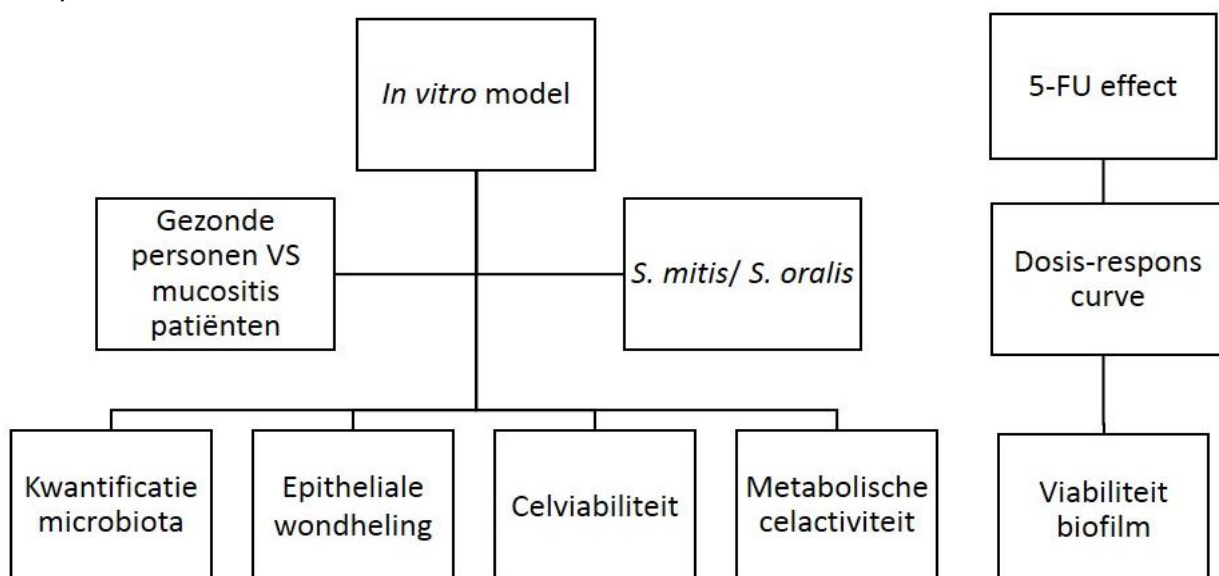
2 PROBLEEMSTELLING EN OPDRACHT

Orale mucositis wordt veroorzaakt door chemo- en radiotherapie bij de behandeling van kanker. Tijdens de behandeling wordt de epitheel laag ter hoogte van de mondholte beschadigd en treedt verzwering (ulcers) op. Dit zorgt voor een pijnverhoging bij de patiënt en vergroot het risico op infecties.

Om de nadelige gevolgen van mucositis te beperken is het belangrijk om de wondgenezing te stimuleren. Uit voorgaande onderzoeken zijn reeds een aantal factoren bekend die een rol spelen tijdens de helingsfase, namelijk componenten in de microbiële celwand, microbiële metabolieten en andere uitgescheiden factoren. Ook de rol van de microbiota wordt belangrijker. Enkel wanneer de functie van de orale bacteriën gekend is, kan gekeken worden naar het chemotherapeutisch effect op het microbiom. Later kan dan via combinatie van bepaalde species een stimulatie van de wondheling onderzocht worden.

Het doel van deze bachelorproef is om via een *in vitro* model de interacties tussen het orale microbiom, de humane epitheelcellen en het chemotherapeuticum 5-fluorouracil na te gaan. Tijdens de stageperiode werden verschillende donoren, zowel gezonde personen als mucositis patiënten, via het *in vitro* model onderzocht. Telkens werden de verschillende types stalen (speeksel, tong- en wangswab) met 5-FU behandeld zodat een vergelijking kon gemaakt worden tussen behandelde en onbehandelde monsters. In het tweede deel van het onderzoek werden *Streptococcus mitis* en *S. oralis* als pure cultuur in combinatie met speeksel bestudeerd aan de hand van het *in vitro* model. Verschillende eindpunten werden geanalyseerd. Als eerste werd gekeken naar de grootte van de bacteriële populatie, bij start en na 24 uur, aan de hand van uitplating en flow cytometrie. Ook werd de wondheling bestudeerd. De epitheelcellen werden gevisualiseerd aan de hand van een specifieke kleurstof (DiI) en verder via fluorescentie microscopie werden foto's van de wonden op tijdstip 0 en na 24 uur genomen. De bekomen wondoppervlakten werden hierna met elkaar vergeleken om zo de mate van wondheling te kunnen bepalen. Als laatste werden de viabiliteit en activiteit van de epitheelcellen nagegaan via MTT analyse en vetzuurextractie.

Naast het hoofdonderzoek werd ook een tweede type experiment uitgevoerd dat toeliet het directe effect van 5-FU op de orale microbiota te onderzoeken. Een dosisresponscurve werd opgesteld om het effect van 5-FU (0,1-100 μM) op de viabiliteit van speeksel-, wang- en tongstalen na te gaan via MTT analyse.



Figuur 1 Schematische doelopstelling

3 THEORETISCH DEEL

3.1 ORALE MUCOSITIS

Mucositis is een klinische term die de schade beschrijft ter hoogte van het orale en gastro-intestinale epitheel veroorzaakt door chemo- en radiotherapie. De beschadiging kan zich voordoen ter hoogte van het mond-, maag-, en darmepitheel. Deze bachelorproef zal zich voornamelijk richten op orale mucositis.

Orale mucositis is een nevenwerking bij de behandeling van kanker. Wanneer bij de behandeling van hoofd- en halskanker enkel gebruik gemaakt wordt van radiotherapie krijgen bijna alle patiënten te maken met mucositis. Wanneer een combinatie van radiotherapie en chemotherapie wordt toegepast krijgt bijna 90 % van de patiënten deze bijwerking. [6] Bij een uitsluitende chemokuur behandeling wordt orale mucositis bij 40% van de patiënten waargenomen. [7]

De voornaamste symptomen van orale mucositis zijn roodheid en zwelling van het mondslijmvlies (erytheem en oedeem), ontwikkeling van zweren in de mond, pijn, droge mond, bloedingen en hoge viscositeit van het speeksel. [8] [9] De gevolgen voor de patiënt zijn substantieel, problemen met eten, drinken en spreken zijn algemeen voorkomend. Door de pijn bij het eten en bijgevolg minder voedselinname, zal gewichtsverlies optreden. Een ander nadelig gevolg van mucositis is dat de kans op infecties verhoogt, waardoor de vooropgestelde behandeling uitgesteld of volledig stopgezet moet worden. Dit alles zal de levenskwaliteit van de patiënt doen dalen. [6] Aan de hand van de ernst van de symptomen wordt orale mucositis volgens de Wereld Gezondheidszorg Organisatie (WHO) onderverdeeld in vijf graden (Tabel 1). [6]

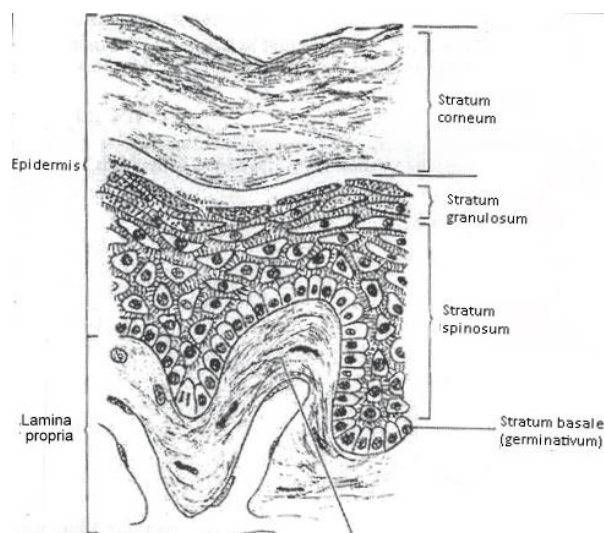
Tabel 1 De vijf graden van orale mucositis volgens WHO [6]

| Graad | Kenmerken |
|-------|---|
| 0 | Geen veranderingen |
| 1 | Pijn, erytheem |
| 2 | Erytheem, verzweringsen (ulcers), patiënt kan vast voedsel eten |
| 3 | Confluente ulcers, patiënt kan enkel vloeibaar voedsel eten |
| 4 | Bloedingen, geen orale inname van voedsel mogelijk |

3.1.1 Biologie van de normale orale mucosa

Het normale mondslijmvlies is samengesteld uit de mucosa en de submucosa. De orale mucosa bestaat uit een bovenste, gelaagd epitheel (epidermis) en de lamina propria (Figuur 2). [10]

De epitheellaag wordt nog eens onderverdeeld in vier sublagen: het stratum basale, het stratum spinosum, het stratum granulosum en het stratum corneum (Figuur 2). [11] Bovenop het epitheel bevindt zich een speeksellaag van ongeveer 70-100 µm dik. Deze laag bestaat hoofdzakelijk uit water, mucines, zouten, lipiden en proteïnen. Mucines hebben als nutriëntenbron een belangrijke rol in de groei van de microbiota. Ook hebben ze een beschermende functie, ze verdedigen namelijk het epitheel tegen koloniserende pathogenen. [11] Naargelang de ligging in de mond kan de orale mucosa onderverdeeld worden in drie soorten slijmvliesen. De meest voorkomende vorm is het slijmvlies dat waargenomen wordt op de wangen, de lippen, de ventrale tong en het zacht verhemelte. Deze mucosa bevat geen keratine waardoor het weefsel traumagevoelig is. Een tweede mucosa type bevindt zich op het harde verhemelte en het tandvlees. Dit slijmvlies wordt gekenmerkt door een stevig gekeratiniseerd oppervlak en is stressbestendiger dan de niet-gekeratiniseerde mucosa. Ten derde is er de mucosa op de dorsale tongzijde waarbij de aanwezigheid van het grote aantal papillen, met sensorische zenuwuiteinden, zal zorgen voor smaakherkenning. [12] [10]



Figuur 2 Schematische voorstelling van de orale mucosa [13]

De lamina propria bestaat uit los bindweefsel en vult de ruimten onder en tussen het epitheel op. Deze laag bevat een collageennetwerk met fibroblasten, macrofagen, kleine bloedvezels, een groot aantal zenuwuitlopers en een extracellulaire matrix. De capillaire bloedvaten zorgen voor de voeding van de epitheelcellen en de lymfevaten zorgen voor de afvoer van het vocht. [14] [10]

De mucosa heeft een beschermende functie en zorgt voor het transport van afvalstoffen. Het metabolisch proces zorgt voor de vervanging van de dode epitheelcellen aan het oppervlak. De nieuw gevormde epitheelcellen worden gegenereerd door de delende stamcellen aanwezig in de onderste epitheelcellaag van de mucosa. Algemeen kan gesteld worden dat de cellen om de 2 weken worden vernieuwd, afhankelijk van de locatie kan dit sneller of trager gebeuren. [12]

Onder het slijmvlies bevindt zich de submucosa, bestaande uit bindweefsel, bloed- en lymfevaten, alsook zenuw- en immuuncellen. De submucosa vervult een ondersteunende functie van de mucosa. [12]

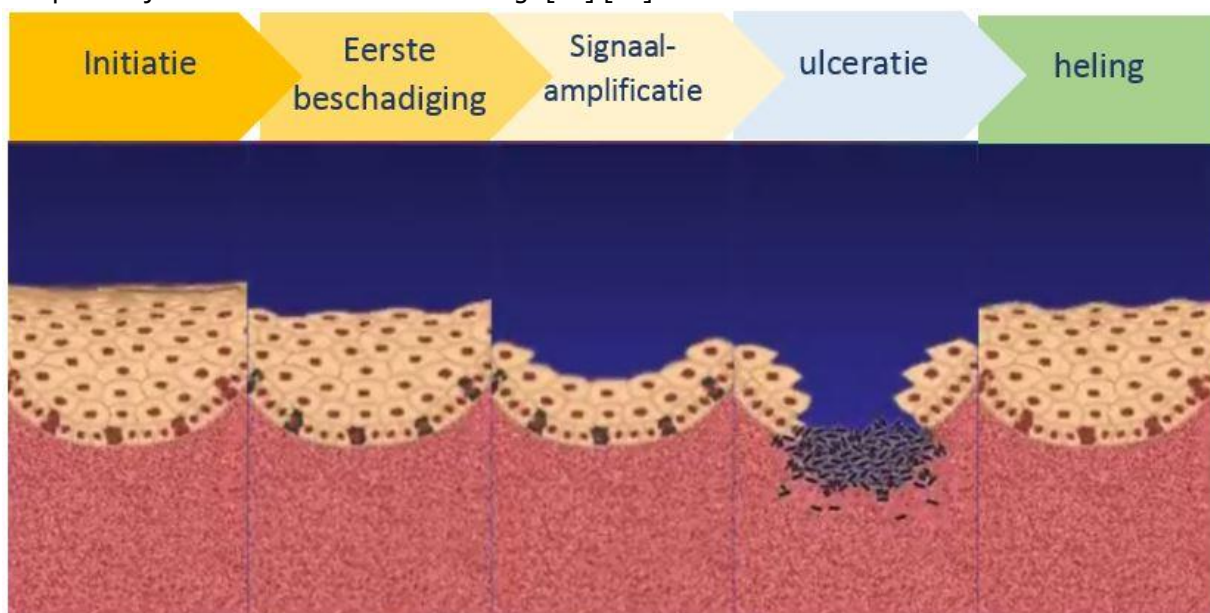
3.1.2 Pathobiologie van mucositis

In het verleden dacht men dat orale mucositis enkel het gevolg was van het toxisch effect van chemo- en radiotherapie op snel delende cellen, met klonogene celdood tot gevolg. Tegenwoordig erkent men dat mucositis eerder het gevolg is van een complexe opeenvolging van biologische gebeurtenissen die leiden tot weefselschade. Stephen Sonis heeft dit complex proces vastgelegd in het vijfphasen model. [15] [16]

Het pathobiologisch proces van orale mucositis wordt ingedeeld in de volgende vijf fasen: initiatie, eerste beschadigingsfase, signaalversterking, ulceratie en heling (Figuur 3). [17]

Radio- en chemotherapie zijn de stimulators voor de initiatiefase. De behandeling beschadigt in de eerste plaats het DNA en zorgt voor letsels aan de basale epitheelcellen met klonogene celdood tot gevolg. Ten tweede worden er reactieve zuurstofradicalen (ROS) gevormd waardoor er bijkomende schade optreedt aan het DNA van de cellen in het epitheel en de submucosa. [16] Tijdens de volgende fase, de eerste beschadigingsfase, vinden verschillende biologische interacties plaats. Deze zullen uiteindelijk resulteren in mucosale letsels of ulcers. De ROS zorgen voor de activatie van transcriptiefactoren, waarvan NF- κ B (nuclear factor-kappa B) de belangrijkste is. Deze reguleert de expressie van ongeveer 200 genen, waarvan vele een belangrijke rol spelen bij de pathogenese van mucositis. Ook sphingomyelinases zal als transcriptiefactor geactiveerd worden. Dergelijke activatie mechanismen beïnvloeden de eiwitsynthese en de productie van cytokine, dat zorgt voor de celsignalisatie, en creëren aldus beschadiging in de submucosa laag. [15] De signaalversterking fase treedt hierna snel op. De reactie op de primaire schade zal namelijk een verder nadelig effect stimuleren

via positieve terugkoppeling met een versnelde weefselbeschadiging tot gevolg. Dit alles resulteert in de vierde fase, de ulceratie, deze fase wordt gekenmerkt door de vorming van brede en diepe zweren, wat pijnversterkend werkt voor de patiënt. Momenteel kan enkel pijnstillende medicatie hulp bieden. De zweren zijn meestal bedekt door een pseudomembraan bestaande uit dode cellen en fibrine. Deze laag zal een bron zijn voor bacteriële groei en zal het risico op infecties doen stijgen met langere hospitalisatie tot gevolg. Als laatste fase is er de genezingsfase. Hierbij zal de wonde zich terug herstellen door spontane vernieuwing van de epitheelcellen twee tot zes weken na het beëindigen van de behandeling. Cyclooxygenase-2 (COX-2) ondersteunt de fibroblasten en het vasculair endotheel in de wederopbouw van de submucosa. De interactie tussen de epitheelcellen en de endotheelcellen tijdens de wondheling gebeurt via de keratinocyt groeifactor (KGF). Deze moleculen verzorgt de communicatie tussen de twee celtypen. De endotheelcellen produceren KGF, die de epitheelcellen triggeren tot groei en differentiatie zodat er nieuw weefsel wordt gevormd. Wel moet opgemerkt worden dat na de volledige genezingsfase de nieuw gevormde submucosa niet identiek zal zijn aan het oorspronkelijke weefsel door littekenvorming. [16] [15]



Figuur 3 Vijffasen model mucositis [18]

Verder onderzoek heeft aangetoond dat het Sonis model moest worden bijgesteld. Microscopische schade wordt immers het eerst waargenomen in de **submucosa**, die zowel zorgt voor de fysische als de biochemische ondersteuning van het epitheel. [15] Klinische tekenen van erytheem of ulceratie ter hoogte van de **mucosa** worden pas later zichtbaar. Subepitheliale weefselbeschadiging, apoptose van fibroblasten en microvasculaire endotheelcellen is groter dan de beschadiging van epitheel cellen. [15]

3.1.3 Kanker therapieën

De voornaamste therapieën die gebruikt worden bij kanker zijn radio- en chemotherapie. Bij radiotherapie wordt gebruik gemaakt van hoogenergetische straling. De straling zorgt in eerste instantie voor de beschadiging en uiteindelijk de vernietiging van de cellen rond het bestraalde lichaamsoppervlak. Als neveneffect worden niet enkel de kankercellen maar ook de gezonde weefsels aangetast. Kankercellen hebben een trager herstelmecanisme waardoor de gezonde cellen zich sneller kunnen hernieuwen. De reactie van de mucosale laag hierop is keratinisatie, een witte verkleuring die optreedt bij een stralingsdosis vanaf 10-20 Gy. Erytheem ontstaat vanaf een stralingsdosis van 20 Gy, verzwering treedt op na een langere 30 Gy behandeling. Drie weken na de aanvang van de radiotherapie zullen de eerste symptomen van mucositis worden waargenomen. [15] Radiotherapie-geïnduceerde mucositis heeft een chronisch effect waardoor de nevenwerkingen nog drie tot vier weken kunnen

aanhouden na het einde van de behandeling. Pas vanaf twee tot zes weken na voltooiing van de radiotherapie zal de wondheling starten. [19] [20] [16]

De behandeling van kanker met chemotherapie gebeurt via toediening van één of meerdere celremmende geneesmiddelen of cytostatica, deze zullen de groei van abnormale cellen verhinderen of stopzetten. Net als bij radiotherapie zullen ook gezonde cellen worden aangetast. In tegenstelling tot de radiotherapie zal een chemotherapie-geïnduceerde mucositis eerder acuut en systemisch zijn. Vijf tot acht dagen na de aanvang van de behandeling worden de eerste symptomen van mucositis waarneembaar. [17] [16]. Wanneer de chemotherapie wordt beëindigd zullen de symptomen van mucositis verdwijnen maar kunnen er nog steeds complicaties optreden door het grote infectie gevaar. De genezingsfase treedt spontaan op twee tot drie weken na het voltooien van de therapie. [21]

5-Fluorouracil (5-FU) is een chemotherapeuticum waarbij mucositis vaak optreedt. 5-FU is een cytostatisch geneesmiddel dat de celgroei en celdeling zal remmen. Het is immers structureel gerelateerd aan uracil (RNA bouwsteen) en thymine (DNA bouwsteen). Bij de aanmaak van RNA en DNA kan dus een foute base – 5-FU – ingebouwd worden, waardoor de cellen waarbinnen dit gebeurt, niet verder in staat zijn te functioneren en te delen, het groeiproces wordt dus geblokkeerd. Bovendien werkt 5-FU inhiberend op het enzym thymidylate synthase zodat de aanmaak van thymidine (DNA-bouwsteen) wordt belemmerd, met ook hier een cytostatische werking tot gevolg. [22] Tijdens de behandeling kunnen er ook bijwerkingen ontstaan. De werking van 5-FU richt zich niet enkel op kankercellen maar zal ook gezonde lichaamcellen gaan aantasten. De klachten komen het vaakst voor op plaatsen waar de cellen zich van nature sneller gaan delen zoals mond, maag en darmen, de huid, de haren en het bloed. De belangrijkste bijwerkingen zijn: verminderde aanmaak van bloedcellen, maagdarmklachten, ontsteking van de mond en keel, haaruitval, huiduitslag, verkleuring van de huid, pijnlijke, rode, gevoelloze handen en voeten, oogklachten, hoofdpijn en zenuwstoornissen. Deze bijwerkingen verdwijnen spontaan na het beëindigen van de chemokuur. [23]

Het optreden en de ernst van mucositis hangen af van verscheidene factoren. Vooreerst is het behandelingstype erg belangrijk, maar ook de toe te dienen dosis en het tijdschema zullen de graad van mucositis beïnvloeden. Er kunnen ook een aantal patiënt-gerelateerde factoren meespelen, zoals leeftijd, geslacht, body mass index, speekselproductie, mondhygiëne enz. [24]

3.1.4 De behandeling van orale mucositis

Een echte behandeling bestaat er vandaag de dag nog niet voor mucositis. De voorgestelde therapie is voornamelijk pijnstillend. [15] [25] Het komt er vooral op neer de levenskwaliteit van de patiënt te optimaliseren. Wel zijn er reeds een aantal behandelingen bekend die vaak positieve resultaten opleveren. Cryotherapie is een doelgerichte therapie die de graad van orale mucositis zal verminderen. Door middel van orale koeling ontstaat vaatvernauwing, waarbij de hoeveelheid toe te dienen chemotherapeuticum aan het mondslijmvlies, zal afnemen. Hierdoor zal de wondheling sneller plaats vinden. Een ander reeds gebruikte therapie is low-level laser therapie (LLLT), waarbij de wondgenezing wordt gestimuleerd door het ontstekingswerend effect van de behandeling. Ten slotte hebben ook de fibroblasten een aandeel in de wondheling. Een radiotherapeutische behandeling zorgt namelijk voor een vermindering van de proliferatie en de migratie van de fibroblasten, wat zorgt voor een reductie in aantal, met als gevolg dat de wondheling trager zal verlopen. Een oplossing is het toedienen van groeifactoren die ervoor zorgen dat de fibroblasten een extracellulaire matrix gaan produceren. Na de toediening van de recombinante groeifactoren zal er een verhoogde proliferatie van fibroblasten plaatsvinden, hiermee wordt de wondheling gestimuleerd. [26] Palifermin wordt het meest toegepast en is een menselijke recombinant van de keratinocyt groeifactor factor-1 (KGF-1). [27] Tijdens de behandeling wordt ook aangedrongen op een goede mondzorg zodat infecties vermeden kunnen worden. De mond regelmatig spoelen, twee tot vier keer per dag de tanden poetsen, kruidig voedsel vermijden, enz.... zijn de belangrijkste voorzorgsmaatregelen. [25]

3.2 ROL VAN MICROBIOOM BIJ ORALE MUCOSITIS

3.2.1 Algemene kenmerken van de orale microbiota

In en op de mucinelaag bevindt zich een uniek microbioom. De diversiteit van de microbiota in de mondholte kan gaan tot ongeveer 500 phylotypes. De tanden, het tandvlees, de tong, de wangen, de lippen, het verhard- en zacht verhemelte vormen op zich een uniek microbiëel habitat dat gekoloniseerd wordt door verscheidene bacteriële gemeenschappen. De orale microbiota kunnen onderverdeeld worden in twee groepen, naargelang de locatie in de mond (Tabel 2). [10]

Tabel 2 Microbiota in de mond [10]

| Categorie | Plaats | Microbiota | | |
|------------------|---|-------------------|---|----------------|
| 1 | Mondslimvlies, tandvlees, hard verhemelte | Phylum | <i>Firmicutes</i> | > 55 % |
| | | | <i>Proteobacteria</i> | 15-25 % |
| | | | <i>Bacteroidetes</i> | 10-15 % |
| | | | <i>Actinobacteria</i> | < 10 % |
| | | | <i>Fusobacteria</i> | < 5 % |
| | | Genus | <i>Streptococcus</i> | |
| 2 | Speeksel, tong, amandelen, keel | Phylum | <i>Firmicutes</i> | 40-45 % |
| | | | <i>Bacteroidetes</i> | 20-25 % |
| | | | <i>Proteobacteria</i> | 20 % |
| | | | <i>Fusobacteria</i> | 5-10 % |
| | | | <i>Actinobacteria</i> | 5-10 % |
| | | Genus | <i>Streptococcus, Veillonella, Prevotella, Neisseria, Fusobacteria, Actinomyces, Leptotrichia</i> | Gemiddeld >2 % |

In de mucinelaag vormt zich een biofilm bestaande uit een laagje micro-organismen dat omgeven is door een zelfgeproduceerde extracellulaire matrix die vastgehecht is aan een oppervlak. Deze complexe biofilm zal de gastheer beschermen tegen pathogenen door tussenkomst van verschillende verdedigingsmechanismen. De gebruikte verdedigingsmechanismen zijn: concurrentie op basis van de beschikbaarheid van voedsel, de productie van remmende metaboliëten of antimicrobiële stoffen, wijziging in de productie of werking van de toxinen of ontstekingsreacties, een verandering in de receptoren die zorgen voor een wijziging bij de aanhechting van verschillende componenten. [10]

De orale microbiota bevinden zich als planktonische cellen of in complexe biofilms op en in de epitheel laag, in het harde en zachte gedeelte van de mucosa, in het tandplak of in het speeksel. De meeste kennis omtrent de orale microbiële samenstelling en de vorming van biofilms komt uit tandheelkundige studies. Helaas is er nog geen enkele studie uitgevoerd die zich richt op de vroege kolonisatie van de nieuw gevormde mucosa tijdens de herstelfase van mucositis. Dergelijke studie is belangrijk omdat enkel via kennis van de initiële kolonisatie, de finale compositie en functie van de natuurlijke biofilm te achterhalen is. [10]

De biofilmvorming start met de afzetting van het speeksel op het tandoppervlak. Speeksel-eiwitten hechten zich vast aan het tandoppervlak en vormen een zogenaamd 'pellicle'. Zo kunnen de planktonische cellen via adhesie, zich vasthechten aan het microbiële oppervlak. De eiwitten, met mucinen en agglutinenen, van het tandmembraan dienen als receptoren voor de microbiota. Na de aanhechting veranderen de planktonische cellen in slijmproducerende bacteriën. *Fusobacteria* speelt

een cruciale rol in de vorming van de biofilm, want dit micro-organisme zorgt namelijk voor de communicatie tussen de cel-cel en cel-substraat interacties en de bevordering van een anaërobe omgeving. [10] Cel-cel en cel-substraat interacties katalyseren de groei van de biofilmgemeenschap. Een onrijpe biofilm bestaat voornamelijk uit *Streptococcus spp.* (80 %) en vormt een basis voor de opeenvolgende kolonisaties door andere soorten, zo ontstaat een multispecies biofilm. [28] Rijping van de biofilm verloopt via coaggregatie van de planktonische microbiota waarbij extracellulaire matrixcomponenten zoals polypeptiden, koolhydraten en nucleïnezuren worden gevormd. De uiteindelijke biofilm matrix zal de bacteriën beschermen tegen verschillende stress stimulerende factoren zoals antibiotica. [10]

Het orale microbioom van de mucosa bestaat bij gezonde personen voornamelijk uit *Streptococcus* en *Actinomyces*. Het tandplak bevat *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* en *Lactobacillus spp* en kunnen tandbederf veroorzaken. [29] [21] De meeste orale infecties worden veroorzaakt door de interactie tussen de microbiota en de biofilm en niet enkel door pathogenen soorten. [10]

Onderzoek is belangrijk om specifieke microbiota of gemeenschappen die een potentieel risico vormen voor het ontstaan van mucositis te kunnen identificeren. [10]

3.2.2 De invloed van kankertherapieën op het oraal microbioom

Chemo- en radiotherapie kunnen beiden zorgen voor een verschuiving in het orale microbioom. Recente studies hebben bij chemopatiënten een verschuiving naar een meer complexe orale bacteriële samenstelling opgemerkt [30], terwijl het tegenovergestelde werd vastgesteld bij een radiotherapeutische behandeling. [31] De aanwezigheid van gramnegatieve species en *Lactobacillus spp.* zal toenemen na de behandeling met radiotherapie. Radiotherapie zal dus invloed hebben op de microbiële samenstelling van de orale biofilm. [17] Algemeen wordt er bij een chemotherapeutische behandeling een toename van het totale aantal micro-organismen geconstateerd waardoor het microbioom complexer zal worden. Meer specifiek blijkt er een toename te zijn van; *Enterobacteriaceae spp.*, *Pseudomonas spp.* en *E. Coli* als gramnegatieve soorten en *Staphylococcus spp.* en *Streptococcus spp.* als de meest voorkomende grampositieve micro-organismen. Belangrijk bij de interpretatie van deze waarnemingen is echter dat er rekening gehouden wordt met een grote variabiliteit in de patiëntenpopulatie, de bacteriële monsternamen en de verscheidenheid aan gebruikte methodieken tijdens het onderzoek. [17]

Tijdens een 5-FU behandeling worden ook veranderingen in het darmmicrobiom geconstateerd met een daling in het aantal grampositieven en een stijging in het aantal gramnegatieve species. Op species niveau wordt er een duidelijke daling geconstateerd; voor *Lactobacillus spp.* 24 uur na de behandeling en voor *Enterococcus spp.* na 2 tot 48 uur. [32]

3.3 HET *IN VITRO* MODEL

In 2014 werd op LabMET (nu CMET) een *in vitro* model ontwikkeld om de effecten van de orale microbiota bij mucositis beter te kunnen bestuderen. Nog tot op de dag van vandaag wordt mucositis onderzoek voornamelijk uitgevoerd aan de hand van rat- en muismodellen. [33] Echter de grote kost en ethische belemmeringen, zette de onderzoeksgroep van LabMET ertoe aan een *in vitro* model te ontwikkelen dat in staat is het effect van chemotherapie op zowel het epitheel als de orale biofilm in detail te bestuderen. Ook wondheling kan aan de hand van dit model geëvalueerd worden. [21] Het *in vitro* model bootst het orale slijmvlies na en laat toe de interactie tussen de microbiële biofilm en de epitheelcellen van de gastheer te onderzoeken. Aangezien cellen en micro-organismen gecombineerd worden zal het *in vitro* model bestaan uit een co-cultuur. Er wordt gewerkt in niet-infectieuze omstandigheden zodat ook lange termijn interacties kunnen bestudeerd worden. [34]

Het *in vitro* model bestaat uit een apicaal en basaal gedeelte die via een semipermeabele membraan met elkaar in contact staan. Het apicaal deel bestaat een bacteriële biofilm afkomstig van het orale microbiom uit speeksel, wang of tong staal van de donor op een agarmucine laag. Het basaal deel is een monolaag bestaande uit TR146 epitheelcellen. (zie materiaal en methodes)

3.4 WONDHELING

De epitheelcellen zorgen voor de interactie en communicatie tussen de gastheer en zijn microbiom. Deze interactie wordt verstoord wanneer het contact via het epitheel beschadigd is. [34] Migratie en proliferatie zijn de twee mechanismen die het epitheliale wondhelingsproces zullen bevorderen. [33] Migratie zal zorgen voor de homogenisatie van de genetisch variatie tussen de populaties, en is het belangrijkste proces ter hoogte van de rand van de wonde met uitbreiding naar buiten toe. Radiotherapie zorgt voor een verzwakking van de proliferatie, de vermenigvuldigingssnelheid zal dalen wat leidt tot een verzwakt epitheliale barrière en verzwering. [26] [33]

Via het *in vitro* model werd reeds het effect van orale wangswabs op wondheling onderzocht. In niet-bestraalde omstandigheden en in aanwezigheid van microbiota werd epitheliale herstelling significant verminderd. Na bestraling echter konden de resultaten in twee afzonderlijke groepen worden ingedeeld. In groep 1 werd het remmend effect van de microbiota op de wondgenezing uitgesproken na bestraling in vergelijking met een niet-bestraalde toestand. In groep 2 werd geen effect van de microbiota na bestraling opgemerkt. Algemeen kan dus gesteld worden dat de microbiële groei als een belangrijke beperkende factor voor wondgenezing na bestraling kan worden gezien. De straling beïnvloedt namelijk de interactie tussen gastheer en micro-organisme tijdens de wondheling, de omvang zal afhankelijk zijn van de samenstelling, het aantal en de functionaliteit van de microbiota. [21]

Onderzoek aan CMET heeft al enkele factoren geïdentificeerd die een impact kunnen hebben op de wondheling, namelijk componenten in de microbiële celwand zoals lipopolysacchariden (LPS), korte vetzuur ketens als microbiële metaboliëten en andere uitgescheiden factoren zoals het toxine C3-transferase van *Clostridium botulinum*. [35]

3.4.1 Microbiota als nieuwe therapie

Het menselijk epitheel is de belangrijkste barrière voor fysische, chemische en biologische aanvallen op het menselijk lichaam. Bij acute beschadiging is wondgenezing één van de belangrijkste processen om de binnenste weefsels te beschermen. De microbiële dichtheid in de wonde is een van de cruciale parameters in het genezingsproces. Hoe lager de concentratie aan microbiota, hoe beperkter de ontstekingsreactie, met een versnelde wondgenezing tot gevolg. [36]

Via toediening van antibiotica werd het ontwikkelingsproces van orale mucositis bestudeerd. Hieruit bleek dat antibiotica geen effect hebben op de genezing van orale mucositis. [37] Een andere optie om een sneller genezingsproces te kunnen verkrijgen, is het toedienen van probiotica. [38]

4 EXPERIMENTEEL DEEL

4.1 MATERIAAL

4.1.1 Celcultuur

TR146 cellen zijn cellen uit de orale plaveiselcarcinoomcellijn, ze werden geïsoleerd uit een lymfekliermetastase. [39] De cellijn werd verkregen via het Laboratory Experimental Cancer Research (Ghent University Hospital). Al in de eerste fase van het onderzoek werden de cellen opgekweekt door ze tijdig te splitsen en te voorzien van een goede voedingsbodem. De TR146 cellen werden gekweekt in het Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (4,5 g/l D-glucose, L-glutamine) (Gibco® by life technologies™), aangevuld met 10 % gefiltreerd, hitte-geïnactiveerd foetaal kalfsserum en antibiotica (100 IU/ml penicilline, 100 µf/ml streptomycine, 2,5 µg/ml fungi). De incubator wordt ingesteld op 37 °C en 10 % CO₂, terwijl een relatieve vochtigheidsgraad van 90 % zorgt voor een verzadigde atmosfeer.

4.1.2 Orale stalen

Er kwamen twee types donoren aan bod, gezonde personen en mucositis patiënten, beide in dezelfde leeftijdscategorie (tussen 6 en 14 jaar). Als orale stalen werd gebruik gemaakt van tong-, wangswab en speeksel. De staalname vond 's ochtends plaats, voor het tanden poetsen, of overdag minimum 2 uur na het eten of tanden poetsen. Vooraleer een staal genomen kon worden diende de mond voldoende gereinigd te zijn door meerdere malen krachtig te spoelen met water. De swabstalen werden afgenomen met een steriele spatel door 10 keer over het weefsel, tong of wang, te wrijven. Hierna werden de swabs opgelost in 1 ml Dulbecco's Phosphate buffered saline, calcium- en magnesium chloride negatief (PBS^{D-}) (Gibco® by life technologies™). Het speekselstaal werd rechtstreeks gebruikt of bij een te hoge concentratie kon een verdunning in PBS^{D-} worden toegepast.

Voor het *in vitro* model werd een swabstaal onverdund gebruikt terwijl het speekselstaal tienmaal werd verdund in PBS^{D-}.

Voor het onderzoek naar het 5-FU effect op de orale stalen werden de speekseloplossing 1/100 of 1/1000 verdund en de swabsuspensie 1/10 of 1/100 verdund in BHI-DMEM medium (1:1).

Het is belangrijk dat ieder staal voor gebruik voldoende werd gehomogeniseerd.

4.1.3 Chemotherapeuticum

5-Fluorouracil werd als cytostatisch chemotherapeutische oplossing toegepast in het *in vitro* experiment. 0,013 g 5-FU (SIGMA® life science) werd opgelost in 1 ml DMSO, dit komt overeen met een concentratie van 100 mM. Hieruit konden nog verdere verdunningen (10 mM) in DMSO gemaakt worden. Om de gewenste concentratie van 10 µM in het *in vitro* model te bekomen, werd een 10 mM-oplossing nog 1000 maal verdund in DMEM-medium, zonder serum en zonder antibiotica. In vorig onderzoek werd tijdens een behandeling 5-FU, in een concentratie van 10 µM, in de mond aangetroffen, deze concentratie bleek ook niet toxisch te zijn voor de cellen. [40]

4.1.4 Agarmucine

De bacteriën gaan *in vivo* adheren op de mucinelaag. In het *in vitro* experiment werd op de filter een agarmucine laag aangebracht om zo de mucuslaag van de mond na te bootsen. Samen met het DMEM medium zorgde de agarmucine voor voldoende voeding voor de bacteriën, tijdens de incubatie. De agarmucine werd bereid door 0,16 g agar (ROTH®) toe te voegen aan 1 g mucine Type II from porcine stomach (SIGMA® life science), en samen op te lossen in 20 ml demi water. De oplossing werd hierna driemaal opgekookt om te steriliseren. De agar zorgde voor stolling, en om deze reden werd de agarmucine (75 µl) warm en omgekeerd gepipetteerd op de filter gebracht.

4.1.5 Analyse oplossingen

4.1.5.1 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)

Thiazolyl blue (ROTH®) wordt gereduceerd door metabolisch actieve cellen. Dehydrogenase enzymen genereren reducerende equivalenten zoals formazan, wat zorgt voor een paarse kleurvorming. Deze reactie werd toegepast bij de MTT-analyse voor de viabiliteitsbepaling van de cellen. 5 mg van het gele, poederige MTT werd opgelost in 1 ml PBS^{D-} hierna volgde een filtersterilisatie met een 0.22 µm membraan. Onopgeloste MTT werd bij kamertemperatuur op een donkere plaats gehouden, opgeloste MTT diende in het donker bij 4 °C bewaard te worden.

4.1.5.2 Dimethylsulfoxide (DMSO)

Dimethylsulfoxide (EMSURE® ACS) is een krachtig organisch oplosmiddel dat onsteriel gebruikt werd bij de MTT-analyse. Na incubatie en vooraleer de optische densiteit te meten, werden de formazan gekleurde epitheelcellen of de bacteriële biofilm opgelost in DMSO. Om een steriele DMSO oplossing te verkrijgen dient deze door een 0.20 µm RC membraan gefilterd te worden, want bij gebruik van andere filters zal DMSO de membraan oplossen, waardoor geen steriel eindproduct bekomen wordt. Steriel DMSO werd toegepast bij de bereiding van het behandeld medium tijdens het *in vitro* experiment. Om nevenreacties tegen te gaan dient DMSO afgeschermd te worden van het licht.

4.1.6 Medium

Brain heart infusion agar (Fluka® analytical for microbiology) werd als basisproduct gebruikt bij het uitplaten van voedingsbodems, waarop na enting en incubatie de telling van het aantal kolonievormende eenheden gebeurde.

Brain heart infusion (OXOID®) en DMEM (Gibco® by life technologies™) in een 1:1 verhouding werd als medium toegepast bij de analyse van het 5-FU effect op de bacteriële biofilm.

Ieder medium werd gesteriliseerd door te autoclaveren bij 121 °C, gedurende 21 minuten.

4.2 METHODES

4.2.1 Celcultuur

Omdat het gevaar voor besmetting van cellen zeer hoog is, werd gewerkt in een apart labo waar enkel "celwerk" werd uitgevoerd. Als extra voorzorgsmaatregel werd altijd gewerkt in de laminaire flow.

4.2.1.1 Cellen splitsen

Wanneer de cellen voldoende gegroeid zijn, de falcon is voor 80 % vol, is het belangrijk dat deze cellen gesplitst worden. Als eerste werd het medium verwijderd. Daarna werd 4 ml PBS^{D-} op de cellen gebracht, dit is een wasbeurt, PBS^{D-} werd nadien terug verwijderd. Er werd 2 ml trypsine toegevoegd, en na contact met de cellen werd terug een volume trypsine afgepipetteerd, zodat enkel nog een bodem overbleef. De falcon werd vervolgens geïncubeerd bij 37 °C en 10 % CO₂ gedurende 5 minuten. Wanneer er voldoende cellen van de bodem los waren gekomen, werd er 5 ml DMEM medium, met serum en antibiotica, aan de falcon toegevoegd. Zo werd het trypsine geneutraliseerd en bevonden alle cellen zich in het vloeibare medium. Om voldoende cellen over te kunnen brengen werd het medium meerdere malen over de bodem - waar de cellen zich bevonden - bevloed. En voor een goede vermenging te verkrijgen werd nog herhaaldelijk gesuspenderd. Naargelang de gewenste verdunning werd het juiste volume cellen overgebracht in een nieuwe falcon, gevuld met vers DMEM medium, met serum en antibiotica. Een T25 falcon bevat een totaal volume van 5 ml, terwijl een T75 falcon een totaal volume van 15 ml heeft.

Als voorbeeld werd voor een 1/5 verdunning, in een T25 falcon, 1 ml cellen overgebracht in 4 ml medium. Als extra controle konden de cellen nog eens bekeken worden onder de microscoop (ZEISS), bij 10x vergroting. De cellen werden terug in de incubator gebracht bij 37 °C, 10 % CO₂ en een relatief vochtgehalte van 90 %.

4.2.1.2 Medium verversen

De cellen gebruiken de nutriënten uit het medium waardoor deze voedselbron na enkele dagen uitgeput is. Wanneer de cellen na 3 dagen nog niet voldoende in aantal zijn toegenomen om te splitsen dient het DMEM medium, met serum en antibiotica, vervangen te worden.

4.2.1.3 Cellen in cultuur brengen

De cellen worden bewaard in vloeibare stikstof bij een temperatuur van -196 °C. Het transport van de cellen naar het labo gebeurde op ijs. Als voorbereiding werd 10 ml DMEM medium, met serum en antibiotica, klaargezet in een tube. Na het ontdooien van de cellen werd er 1 ml DMEM aan de cellen (1,5 ml) toegevoegd. Ongeveer 1 ml van de celoplossing werd dan terug overgebracht naar de 10 ml tube. Opnieuw werd 1 ml uit de 10 ml tube afgenomen en bij de resterende cellen toegevoegd, finaal werd nu de volledige celsuspensie terug overgebracht in de 10 ml tube. Om de cellen te kunnen isoleren werd de tube gecentrifugeerd bij 1000 rpm gedurende 3 minuten. Hierna werd het supernatans, dat door het DMSO toxisch is voor de cellen, verwijderd en werden de cellen opgelost in 5 ml vers DMEM medium, met serum en antibiotica. De celsuspensie werd tenslotte verdeeld over twee falcons, respectievelijk in een 1/5 en een 4/5 verdunning. De dag nadien dient het medium ververst te worden om de cellen voldoende groei mogelijkheid te geven en de niet aangehechte cellen te verwijderen.

4.2.1.4 Cellen invriezen

In een T75 falcon worden de cellen opgekweekt. Nadat ze voldoende gegroeid zijn volgt de trypsinisering. Dit is dezelfde werkwijze als bij het splitsen, enkel wordt in plaats van DMEM medium 3 ml freezing medium (10 % DMSO en 90 % FBS) toegevoegd aan de cellen. Er wordt per CryoTube™ Vials telkens 1 ml celsuspensie ingebracht, en vervolgens worden deze overgebracht in de CoolCell® Freezing Container (Biocision) en in een -80 °C diepvries geplaatst. Deze box heeft de eigenschap om de temperatuur gematigd te laten dalen, met een daling van 1 °C per minuut. Na acclimatisering worden de CryTubes overgebracht naar de vloeibare stikstof, bij een temperatuur van -196 °C.

4.2.1.5 Mycoplasma test

Mycoplasma is een visueel niet waarneembare bacteriële besmetting, die de groei van de cellen gaat belemmeren. Met behulp van de MycoAlert™ mycoplasma detection kit (Lonza) werden de cellen getest op de aanwezigheid van mycoplasma. De kit bevat het MycoAlert™ reagens en MycoAlert™ substrate, beide poeders werden elk afzonderlijk opgelost in 600 µl buffer. Van iedere cellijn werd 1 ml supernatans van het medium afgenomen, minstens 24 uur na splitsen of verversen, en gecentrifugeerd bij 1500 rpm gedurende 5 minuten. 50 µl van het supernatans werd dan overgebracht naar een Tissue Culture Testplate (SPL life science). 50 µl van het opgeloste MycoAlert™ reagens werd dan toegevoegd aan het supernatans van ieder staal. Na 5 minuten wachttijd werd de luminescentie (A) gemeten. Hierna werd per staal 50 µl MycoAlert™ substrate toegevoegd, en na 10 minuten werd opnieuw de luminescentie (B) gemeten. Bij iedere test werd ook een positieve en negatieve controle meegenomen zodat een vergelijking kon gemaakt worden. Een negatief resultaat voor mycoplasma werd verkregen wanneer de verhouding B/A lager dan 0,9 was, een verhouding hoger dan 1 gaf een positief resultaat aan. Wanneer mycoplasma aanwezig is kan een specifieke kit worden toegepast om de besmetting te bestrijden. Een andere oplossing is het volledig verwijderen van de cellen en met een nieuwe cellijn starten. Waar de

besmetting vandaan komt is moeilijk te achterhalen, vandaar dat uit voorzorg na besmetting alle gebruikte oplossingen werden vernietigend en de incubator gesteriliseerd werd.

4.2.2 *In vitro* model

4.2.2.1 Uitzaaïen cellen

Twee dagen voor de start van een *in vitro* experiment werd het basale gedeelte klaar gemaakt. De orale epitheelcellenlaag werd gemaakt uit 250.000 TR146 cellen. De epitheelcellen werden voor de uitzaaiïng fluorescent gekleurd met Vybrant DiI cell-labeling solution (Molecular probes® by life technologies™) gedurende 20 minuten bij 37 °C. Deze fluorescentie is nodig om later de wonden via fluorescentie microscopie te kunnen bekijken. Om de cellen te kunnen tellen werd 50 µl celstaal genomen en gekleurd met Trypan Blue solution (0,4 %) (SIGMA-ALDRICH) in een 1:1 verhouding. De celtelling gebeurde in een telplaat zodat een eventuele verdunning kon berekend worden. Een Neubauer (MARIENFELD Germany) telplaat heeft 4 kwadranten; binnen ieder kwadrant werd geteld en daaruit werd het gemiddeld aantal berekend. De berekening van het aantal cellen per ml gebeurde via volgende formule:

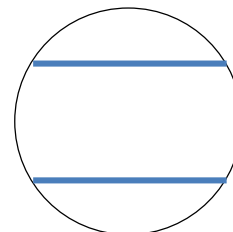
$$\frac{\text{gemiddeld aantal cellen} \times 1000 \frac{\text{mm}^3}{\text{ml}}}{\text{oppervlakte} \times \text{diepte} \times \text{verdunning}} = \text{aantal cellen per ml}$$

In deze formule is de oppervlakte 1mm² en de diepte 0,1 mm.

De celoplossing werd tweemaal verdunt met Trypan Blue solution. Na de berekening van het aantal cellen per ml vond een eventuele verdunning plaats zodat het gewenste aantal cellen per ml werd bekomen. In een 24-Well Transwell® plaat werd in iedere well 1 ml met 250.000 cellen/ml toegevoegd. Aangezien hier nog geen bacteriële groei gewenst was, werd DMEM medium met serum en antibiotica gebruikt. De cellen werden 72 uur geïncubeerd bij 37 °C en 10 % CO₂, om een mooi egale cellaag op de bodem te verkrijgen.

4.2.2.2 Wondhelingstest

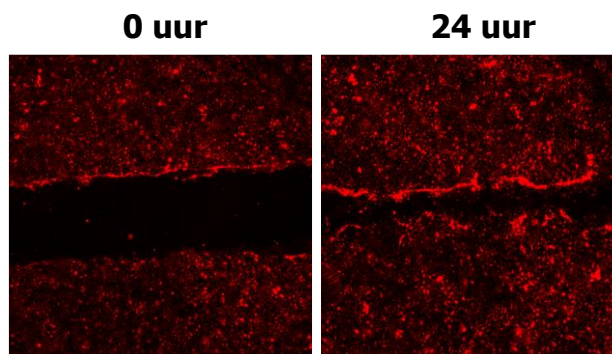
Om de wondheling te kunnen testen werd het proces van mucositis nagebootst via beschadiging van de epitheel laag. Wanneer de cellen na twee dagen incubatie een confluente monolaag hadden gevormd, werden per well telkens met een steriele gele pipettip twee inserties in de cellaag gemaakt (Figuur 4). Losse celresten werden verwijderd door het medium af te nemen. Daarna werd vers serum-vrij DMEM zonder antibiotica toegevoegd om de testen te kunnen uitvoeren.



Figuur 4 Voorbeeld wondinsertie

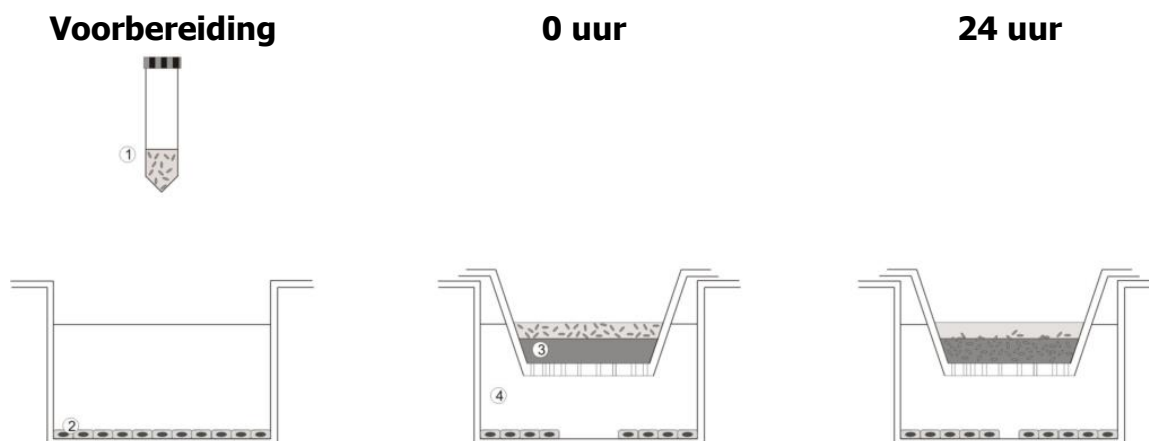
Wanneer het 5-FU effect op de cellen werd nagegaan, kregen de cellen na de wondinsertie behandeld medium toegediend. Enerzijds was er serum-vrij DMEM medium, met 5-FU in een concentratie van 10 µM. Anderzijds was er het DMSO medium waarbij DMSO (1/1000) toegevoegd werd aan het serum-vrij DMEM medium. Dit medium diende als controle voor de in DMSO opgeloste 5-FU.

Met de fluorescentie microscoop Nikon Ti werden de fluorescerende cellen bekeken op tijdstip 0 uur en na 24 uur incubatie (37 °C, 5 % CO₂) bij een 4x vergroting. (Figuur 5) Met de Nicor lens werden op vier verschillende punten, per well, foto's genomen. Het N5 element AR programma zorgde voor de directe data in een ND2-bestand. Het fiji-programma kon met de macro Woundhealing de relatieve oppervlakte van de wondes berekenen. Verdere resultaatverwerking gebeurde in excel via de procentuele vergelijking tussen de wondoppervlakte na 24 uur en op tijdstip 0 uur. Ook werd een vergelijking gemaakt tussen de verschillende staalnamen en de invloed van de aanwezigheid van 5-FU.



Figuur 5 Voorbeeld foto wondhelingstest, 0 uur en 24 uur

4.2.2.3 Co-cultuur model



Figuur 6 Co-cultuur *in vitro* model (1: bacteriecultuur, 2: TR146 monolaag, 3: agarmucine laag, 4: serum-vrij DMEM zonder antibiotica)

Het *in vitro* model (Figuur 6) bestaat uit een 24-well Transwell® plaat, waarbij in elke well een filter, bestaande uit een 0,4 μm polycarbonaat membraan, voorkomt. De filter zorgt ervoor dat het model bestaat uit twee aparte delen, zodat een indirect contact ontstaat tussen de bacteriën en de cellen. Het apicaal deel, boven de filter bestaat uit een agarmucine laag (zie 4.1.4 Agarmucine) met daarboven op een oraal monster (zie 4.1.2 Orale stalen). De TR146 cellen (zie 4.1.1 Celcultuur) vormen een monolaag in het basale gedeelte (zie 4.2.2.1 Uitzaaïing cellen).

Bij de start van het experiment werden orale monsters (speeksel, wang- of tongswab) verzameld. Donoren waren zowel gezonde personen als patiënten met mucositis. Na de staalvoorbereiding volgde de filter preparatie. Omdat de mondflora zo nauwgezet mogelijk nagebootst dient te worden, werd er op de filter een 75 μl agarmucine laag aangebracht. Na stollen van deze laag werd er 20 μl van een voorbereid oraal staal of 20 μl PBS^{D-} (blanco) bovenop gebracht. Hierna werden de filters boven de cellaag met de wonden geplaatst. De 24-well plaat werd geïncubeerd bij 37 °C en 5 % CO₂, gedurende 24 uur. Het behandelde DMEM medium op de epitheelcellen (1ml) zorgde voor de communicatie tussen het apicaal en het basaal gedeelte van het model. Na 24 uur incubatie vonden de analyses van het medium, de cellen en de filter plaats. Voor de basale stalen werd het medium afgenomen en bewaard bij -20 °C. Voor de apicale stalen werd de biofilm opgelost in 100 μl steriel PBS^{D-} en de resterende vloeistof werd overgebracht in een epje. Hierin bevonden zich nu de planktonische cellen, waarvan het aantal berekend werd via uitplating en/of flow cytometrie.

4.2.2.4 Analyse van de orale stalen

Het aantal bacteriën in de stalen werd bij 0 uur bepaald via uitplating en flow cytometrie.

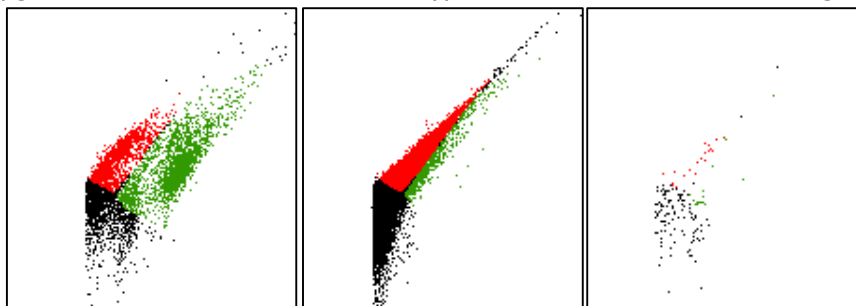
4.2.2.4.1 Uitplating

Van iedere type staal werd een verdunningsreeks van 10^{-1} tot 10^{-6} gemaakt door telkens 20 μl uit de voorgaande verdunning over te brengen in 180 μl PBS^{D-} of gefilterd evian water. Driemaal werd 10 μl van iedere verdunning uitgeplaat op BHI agar en overnacht geïncubeerd bij 37 °C. De kolonies werden geteld en per type staal werd het initieel aantal kve berekend.

4.2.2.4.2 Flow cytometrie

De stalen werden verdund in gefilterd evian water. Van iedere type staal werd een dood monster gemaakt door de verdunde oplossing 10 minuten bij 110 °C te incuberen. Ook werd ieder type staal gefiltreerd zodat later de achtergrond kon berekend worden. De bacteriestalen werden gekleurd (in triplicaat) met SYBR Green propidium jodide (SGPI) en voor 13 minuten geïncubeerd bij 37 °C. SGPI zorgt ervoor dat de dode (beschadigde) van de levende (intacte) cellen konden afgezonderd worden. [41] SG zal namelijk alle cellen kleuren terwijl PI enkel in de beschadigde cellen kan binnen treden. Enkel SG zal de intacte cellen binnendringen en een groene fluorescentie (FL1) weergeven bij 488 nm, in de beschadigde cellen zullen zowel SG als PI worden gebonden aan het DNA, dit zal voor een rode fluorescentie (FL3) kleur zorgen bij 488 nm.

20 μl van de gewenste verdunde bacterieoplossing werd toegevoegd aan 2 μl SGPI en aangelengd tot 200 μl met gefiltreerd evian water. De staining vond plaats gedurende 13 minuten incubatie bij 37 °C. De Accuri flowcytometer nam 25 μl monster op met een event/seconde tussen 200 en 2000. De threshold voor FL1 werd standaard op 500 ingesteld maar kon naargelang de achtergrond waarneming aangepast worden naar 1000. BD CSampler software gaf de resultaten weer in een FL1-A;FL3-A grafiek. Aan de hand van het dode staal kon de gate van de beschadigde cellen worden ingesteld. Via het gefilterd staal kon de achtergrond bepaald worden. Per test werd een gating gevormd voor zowel de intacte als de beschadigde cellen (Figuur 7). De software telde via de aangebrachte gating het aantal cellen. Verdere verwerking van de resultaten gebeurde in excel. Als eerste moest er rekening worden gehouden met de verdunning en of het aantal per ml of per filter gewild is. De log-waarde werd berekend en een grafiek werd opgesteld waarmee de verschillende types staal met elkaar konden vergeleken worden.



Figuur 7 Voorbeeld flow cytometrie: staal, dood, gefilterd

4.2.2.5 Cellulaire analyses

4.2.2.5.1 MTT

De MTT-assay werd gebruikt om de viabiliteit van de epitheelcellen te bepalen na co-incubatie met de microbiota. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) heeft een gele kleur en wordt voornamelijk door de mitochondriën omgezet in blauwe formazan kristallen. Na 24 uur incubatie werd het medium van de cellen verwijderd en werd in iedere well 1 ml vers serum-vrij DMEM zonder antibiotica en 200 μl MTT (5 mg/ml in PBS^{D-}) toegevoegd en geïncubeerd voor 2 uur bij 37 °C. Nadien werd alle medium verwijderd en de gevormde kristallen werden opgelost in 1 ml dimethylsulfoxide

(DMSO). 100 µl van deze suspensie werd in een 96-well plaat gebracht om de optische densiteit te bepalen bij 492 nm en 540 nm (infinite F50 Tecan®, magellan for F50).

4.2.2.6 Filteranalyse

4.2.2.6.1 Uitplating

Uitplating vond plaats om het aantal kolonievormende eenheden (kve) in de apicale stalen van het model te bepalen. Een verdunningsreeks in stappen van 10 werd gemaakt in een 96 well plaat, telkens werd 200 µl onverdund staal in de eerste kolom gebracht, daarna werd 20 µl uit de voorgaande kolom in een nieuwe cel gevuld met 180 µl PBS^{D-} of gefilterd evian water gebracht. Iedere verdunning werd drievoudig uitgeplaat door telkens 10 µl op de BHI agar plaat te brengen. De platen werden overnacht geïncubeerd bij 37 °C en de gevormde kolonies werden geteld. Voor de planktonische cellen van het model werd een verdunningsreeks van 10⁻¹ tot 10⁻⁶ opgesteld.

4.2.2.6.2 Flow cytometrie

De planktonische cellen werden 1000 maal verdund met gesteriliseerd evian water. Net als bij de analyse van de orale stalen werden de monsters gestaind met SGPI. De gating werd overgenomen van de 0 uur stalen zodat een duidelijke vergelijking gemaakt kon worden. Ook hier werden de resultaten verder verwerkt in excel en zal via de grafiek de verschillende stalen en het effect van de aanwezigheid van 5-FU vergeleken worden.

4.2.2.6.3 Analyse aangehechte cellen in de mucinelaag

Om ook de mucinelaag te kunnen onderzoeken werd de filter eerst nog driemaal nagewassen met telkens 100 µl PBS^{D-}. Nadat alle planktonische cellen waren verwijderd, werd de filter met 500 µl BHI doordruwt in een lege well. De volledige mucinelaag werd opgelost om het aantal aangehechte cellen te bepalen via uitplating.

4.2.2.7 Mediumanalyses

4.2.2.7.1 Vetzuuranalyse

Een kwantitatieve analyse van de vluchtige korte keten vetzuren werd uitgevoerd met capillaire gaschromatografie. 2,0 ml van het mediumstaal (na 24 uur incubatie) werd in een 12 ml tube gebracht, bij niet voldoende staal werd met demi water precies aangevuld tot 2,0 ml. Daarna werd aangezuurd met een overmaat H₂SO₄ (0,5 ml 50 %). Tevens werd een overmaat NaCl en 400 µl interne standaard (1,5 ml 2-methyl hexaanzuur, 98,5 ml NaOH (1M/MilliQ water) en 100,0 ml MilliQ water) toegevoegd. Nadien werden de vetzuren geëxtraheerd met 2 ml diethylether. De extractie startte met de tubes 2 minuten te laten ronddraaien gevolgd door een centrifugatie van 3 minuten bij 3000 rpm. Met behulp van gaschromatografie werden de concentraties azijnzuur, propionzuur, iso-boterzuur, boterzuur, iso-valeriaanzuur, valeriaanzuur, iso-capronzuur en capronzuur bepaald.

4.2.3 Mono-cultuur

De gebruikte bacteriën zijn *Streptococcus mitis* (LMG 14557, BSL2) en *Streptococcus oralis* (LMG 14553, BSL2). Door de classificatie onder biosafety level 2 (BSL2) werd altijd gewerkt in een laminaire flow.

4.2.3.1 Bacteriën in cultuur brengen

Beide bacteriën worden bewaard in de -80 °C diepvries in een 50 % glycerol oplossing. Na ontdooien volgde een uitdunningsenting op een BHI agar plaat. Na overnacht incuberen bij 37 °C werd per bacteriesoort 1 kolonie overgeënt in 9 ml vers BHI en terug overnacht geïncubeerd bij 37 °C.

4.2.3.2 Bacteriën onderhouden

Uit de 9 ml BHI (zie 4.2.3.1) werd 1 ml bacteriën genomen en overbracht in 9 ml vers BHI medium. Deze werd overnacht gegroeid bij 37 °C.

4.2.3.3 Controle van de specificiteit via Sanger sequencer

Om de specificiteit per bacteriesoort te kunnen achterhalen werd eerst een DNA-extractie uitgevoerd gevolgd door een PCR-amplificatie. Beiden analyses werden gecontroleerd op een agarosegel. Bij een positieve controle volgde een opzuivering van de PCR-stalen. Deze werden dan opgestuurd naar LGC genomics waar een Sanger sequencer werd uitgevoerd.

4.2.3.3.1 DNA-extractie

Er werd 1 ml van de overnacht gegroeide cultuur genomen en afgedraaid bij 18 000 g gedurende 10 minuten. Het supernatans werd verwijderd. 200 mg glaspereels en 1000 µl lyse buffer (5 ml Tris (1 M pH 8), 10 ml EDTA (0,5 M pH8), 1 ml NaCl (5 M), 5 ml PVP (10 %), 10 ml SDS (10 %) aangelengd tot 50 ml met demi water) werd aan de pellet toegevoegd. De glaspereels zullen het DNA van de bacteriën kapot maken en de lyse buffer zorgt met zijn hoog zoutgehalte voor een osmotisch effect. Om de werking te optimaliseren werd tweemaal gedurende 60 seconden bij 1400 rpm geschud met fast prep 96™. Hierna volgde een centrifugatie bij 18 000 g gedurende 5 minuten. 500 µl fenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1 pH 7-8) werd toegevoegd aan het afgehaalde supernatans. Na vortexen volgde 1 minuut centrifugatie bij maximale snelheid. Het supernatans werd afgehaald en 700 µl chloroform werd hieraan toegevoegd. Fenol en chloroform zorgden voor de precipitatie van de eiwitten. Na centrifugatie van 1 minuut bij maximale snelheid werden alle eiwitten verwijderd uit het supernatans. 45 µl natriumacetaat (3 M) en 500 µl isopropyl alcohol werden toegevoegd aan 450 µl supernatans, isopropanol zorgde voor de precipitatie van het DNA. Na vortexen werden de cellen voor minimum 1 uur bewaard bij -20 °C. Hierna volgde een centrifuge van 30 minuten bij 4 °C op maximale snelheid. De pellet werd ongeveer 45 minuten gedroogd en daarna opgelost 50 µl T10E1.

4.2.3.3.2 Opzuivering DNA-staal

De DNA opzuivering werd uitgevoerd met de Wizard® DNA Clean-Up system kit (Promega). Iedere DNA monster moet een volume tussen 50 en 500 µl bezitten. Bij een te laag volume werd aangelengd tot 50 µl met steriel water. De opzuivering bestaat uit drie stappen, als eerste werd het DNA gebonden aan de filter. 1 ml van het DNA Clean-Up Resin werd toegevoegd aan het DNA monster. Dit volume werd via een kolom door de filter gebracht (Figuur 8). In de tweede stap werd het DNA op de filter gewassen, door toevoeging van 2 ml 80 % isopropanol. Hierna werd de filter gedroogd via centrifugatie gedurende 2 minuten op 10 000 g. Als laatste stap werd het DNA terug ontbonden van de filter door toevoeging van 50 µl steriel water (65 °C). Na 1 minuut werd de filter een laatste maal gecentrifugeerd om het gebonden DNA te elueren.



Figuur 8 Werking DNA opzuivering

4.2.3.3.3 PCR-amplificatie

Als voorbereiding werd de mastermix klaar gemaakt. Voor een volume van 200 µl (genoeg voor 8 stalen) werd 154,5 µl PCR water in een PCR-epje gebracht. 20 µl 10x TAQ buffer (KCl positief en MgCl₂ negatief), 12 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTP (10 mM) en 4 µl van primer 63f en primer 1378r (Biolegio) (1/100 verdund in PCR water) werden eerst gevortexd en dan toegevoegd aan het PCR water. Als laatste werd nog 0,5 µl BSA en 1 µl Taq polymerase (bewaard bij -20 °C) toegevoegd. Voor de staalmonsters werd 1 µl DNA staal overgebracht in 24 µl mastermix. Telkens werden ook twee negatieve en één positieve controle meegevoerd. De eerste negatieve controle bevatte 24 µl mastermix en werd onmiddellijk gesloten (ter controle van de mastermix), de tweede negatieve controle bevatte evenals 24 µl mastermix maar werd pas gesloten na afronding van de PCR-amplificatie (zo werd de werkwijze

gecontroleerd). De PCR-amplificatie gebeurde in een T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD). Het programma ziet er als volgt uit: de eerste stap bestaat een eerste denaturatie bij 94 °C gedurende 5 minuten, een tweede denaturatie bij 95 °C gedurende 1 minuut, de annealing bij 55 °C gedurende 1 minuut en de elongatie bij 72 °C gedurende 2 minuten. Als tweede stap werd stap 1, met uitzondering van de eerste denaturatie, 29 keer herhaald. De derde stap bestaat uit een eind elongatie bij 72 °C gedurende 10 minuten. De stalen werden na amplificatie bewaard bij 4 °C.

4.2.3.3.4 Opzuivering PCR-staal

Met de InnuPREP PCRpure Kit (analytikjena, Life Science) (Figuur 9) werden de PCR stalen opgezuiverd voor de Sanger sequenering. Als eerste werd 400 µl van de binding buffer aangebracht op de filter en 100 µl werd toegevoegd aan het PCR staal. De volledige PCR oplossing werd overgebracht op de filter en gecentrifugeerd bij 10 000 g gedurende 2 minuten. Het PCR staal zit op de filter gebonden en werd geëluëerd door toevoeging van 10 µl elution buffer. Na incubatie van 1 minuut op kamertemperatuur werd het PCR staal van de filter los gemaakt door centrifugatie bij 6000 g gedurende 1 minuut. De PCR stalen werden gecombineerd met de gebruikte primers. 4 µl van de forward primer (63f) werd toegevoegd aan 8 µl van het bekomen PCR staal. De resterende 8 µl van het PCR staal werd toegevoegd aan 4 µl van de revers primer (1378r). De bekomen stalen werden opgestuurd naar LGC genomics waar de Sanger sequenering plaats vond.



Figuur 9 Werking PCR opzuivering

4.2.3.3.5 Controle op agarose

Zowel na DNA-extractie als na PCR-amplificatie volgde een controle op agarose. Een 1,2 % gel werd gemaakt uit 0,6 g agarose (invitrogen™) opgelost in 50 ml TAE (1x). De gel coaguleerde gedurende 20 minuten. Hierna werd de agarosegel in de elektroforese buffer (TAE 1x) gebracht. Voor de staalvoorbereiding werd per monster 2 µl ladingbuffer op een stuk parafilm gebracht. 4 µl van het DNA- of PCR-monster werd via pipettering gemixt met de ladingsbuffer. Uiteindelijk werden de stalen in de agarosegel geladen, 6 µl monster en telkens twee maal 2 µl DNA ladder (ThermoScientific). De electroforese ging door bij 100 volt gedurende 20 minuten. Na electroforese werd de gel 15 minuten gekleurd in het ethidium bromide bad, hierna werd de gel ondergedompeld in het wasbad en op de UV-plaat (Biorad gel DOC™) gebracht. Met de Image Lab™ software werd een foto van de UV-belichte agarosegel genomen.

4.2.3.4 Aantal bacteriën bepalen

Om een juiste hoeveelheid bacteriën te kunnen toevoegen aan het *in vitro* experiment, is het belangrijk het initieel aantal te weten zodat een eventuele verdunning kan toegepast worden. Ook werd tijdens het *in vitro* experiment gekeken naar de pure culturen concentratie tegenover de orale stalen.

4.2.3.4.1 Uitplating

Om een vergelijking te kunnen maken met de literatuur gegevens [35] werden de bacteriën uitgeplaat op BHI agar, in een verdunningsreeks van 10^{-2} tot 10^{-7} .

4.2.3.4.2 Flow cytometrie

Om het initieel aantal bacteriën te kunnen tellen werd zowel *Streptococcus mitis* als *Streptococcus oralis* 1/10 000 verdund en gekleurd met SYBR Green. (zie 4.2.2.4.2 Flow cytometrie)

4.2.3.5 *In vitro* model

Voor de start van het experiment, werden de bacteriën in cultuur gebracht (zie 4.2.3.1 Bacteriën in cultuur brengen). Telkens werd gemaakt dat er een goed groeiende kolonie één dag op voorhand kon overgeënt worden in vers BHI medium. Op de dag van het experiment werd een pre-incubatie van de pure culturen uitgevoerd gedurende 4 uur bij 37 °C en 5 % CO₂. Dit om de overlevingskans van de bacteriën te vergroten tijdens de interactie met de orale stalen in het *in vitro* model. 20 µl van de pure cultuur of 20 µl PBS^D als blanco werd op de agarmucine laag aangebracht. Onder de filter werd 1 ml DMEM medium toegevoegd als voedingsbron voor de bacteriën. Na de pre-incubatie werd bij combinatie 20 µl van het orale staal toegevoegd op de filter. Omdat uit de vorige resultaten bleek dat het speekselstaal de grootste aantal bacteriën bevat, werd enkel hiermee combinaties opgezet. Ook in dit experiment werd het speeksel staal 10 maal of 100 maal verdund gebruikt. Hierna werden de filter op de voorbereide cellen (zie 4.2.2.1 Uitzaaïen cellen) geplaatst. Net zoals bij de vorige experimenten werd terug een fluorescentie foto op tijdstip 0 uur en na 24 uur genomen, om de opening van de wonden met elkaar te vergelijken. Als eindpuntdetectie werden dezelfde methoden toegepast als bij het vorige experiment. (4.2.2.4 Analyse van de orale stalen, 4.2.2.5 Cellulaire analyses en 4.2.2.6 Filteranalyse)

4.2.4 5-FU effect op orale stalen

Om de directe effecten van 5-flourouracil op het microbiom te kunnen onderzoeken werd 5-FU toegevoegd aan de orale stalen en geïncubeerd in groeimedium (BHI:DMEM 1:1).

Er werd een dosisresponscurve opgesteld vanuit een 100-0,1 mM 5-FU verdunningsreeks. In eerste instantie werd een verdunning gemaakt met DMSO uit de 100 mM 5-FU stockoplossing, als blanco werd een DMSO staal meegenomen.

Tabel 3 5-FU verdunningsreeks

| | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|----|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| mM | 100 | 50 | 25 | 12,5 | 6,3 | 3,1 | 1,6 | 0,8 | 0,4 | 0,2 | 0,1 | DMSO |
|----|-----|----|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|

In de werkoplossing werd de chemoreeks nog eens 50 keer verdund: 10 µl verdunde 5-FU-DMSO oplossing werd toegevoegd aan 490 µl medium, bestaande uit BHI en DMEM in een 1:1 verhouding, als blanco werd 500 µl medium genomen.

De orale stalen werden op hun beurt verdund. Het speeksel staal werd (1/1000) verdund terwijl de swabmonsters (1/100) verdund werden in het BHI-DMEM medium.

10 µl van de chemo werkoplossingen (50x verdund) werd in een 96 well-plaat samengebracht met 190 µl van de verdunde bacteriën suspensie. In totaal zal 5-FU 1000x verdund zijn zodat een chemo concentratie in µM werd bekomen.

In het experiment werden drie blanco oplossingen meegenomen. Als eerst werd 5-FU weggelaten en blijft enkel DMSO en de bacterie suspensie over. Bij blanco 2 werd enkel de bacteriesuspensie toegevoegd terwijl in blanco 3 geen bacteriën meer aanwezig waren en enkel het BHI-DMEM medium overbleef. Na 24 uur incubatie bij 37 °C vormde er zich een biofilm, de bacteriën hechten zich aan de bodem/wand van de well.

4.2.4.1 MTT analyse

Het doel is om de viabiliteit van de bacteriën na te gaan in de aanwezigheid van 5-FU. De orale stalen in een 5-FU behandelde well-plaat werden 24 uur geïncubeerd bij 37 °C. Na incubatie werd het medium afgenomen en vervangen door vers serum-vrij DMEM medium zonder antibiotica. Om de planktonische cellen te bepalen kon de optische dichtheid van het afgenomen medium gemeten worden bij 600 nm.

In de 96 well-plaat werd per well 40 μ l MTT toegevoegd en volgde een incubatie van 15 minuten of 2 uur (naargelang de snelheid van de kleuring) bij 37 °C. Tijdens de incubatie zal het gele MTT omgezet worden naar het paarse formazan door de mitochondriale reductase, dat enkel functioneel is in levende cellen. Na de incubatie werd het medium terug verwijderd en vervangen door 100 μ l DMSO, die de biofilm oploste. Wanneer een homogene oplossing werd bekomen, werd de optische densiteit gemeten bij 492 nm en 540 nm.

5 RESULTATEN

5.1 *IN VITRO* MODEL

Om de interacties tussen het chemotherapeuticum 5-FU, de humane epitheelcellen en de orale microbiota na te gaan, werd gebruik gemaakt van een *in vitro* model. [34] Hierbij werd de groei van de microbiota, de wondheling van de epitheelcellen en de cel viabiliteit en - activiteit opgevolgd.

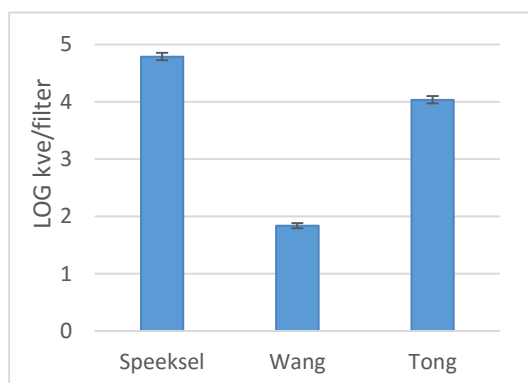
Voor de orale stalen werd gekozen om zowel gezonde personen als mucositis patiënten uit dezelfde leeftijdscategorie (6 tot 14 jaar) te onderzoeken. Als type staal werd speeksel, wang- en tongswab gebruikt. Omdat het speeksel het grootste absolute aantal bacteriën bevat, werd telkens een tienmaal verdunnende oplossing op de filter gebracht, de swabstalen werden onverdund toegevoegd.

Ook werd met het *in vitro* model een combinatie uitgevoerd tussen orale stalen en de pure culturen, *Streptococcus mitis* en *S. oralis*. De interactie tussen beide bacterie species werd onderzocht naar het potentieel stimulerend effect op de wondheling.

5.1.1 Planktonische microbiota versus biofilmcellen

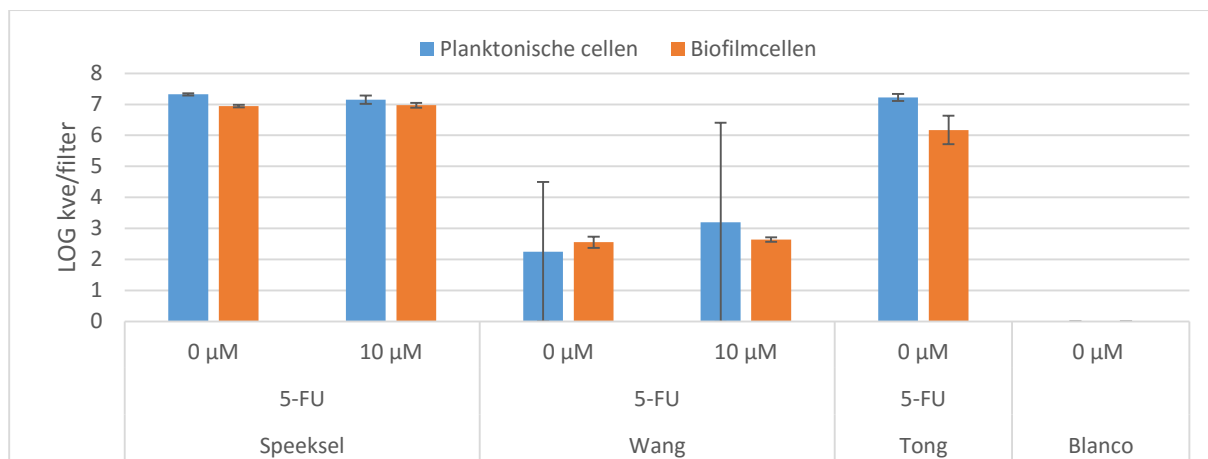
Een proefpersoon werd in dit experiment als donor gebruikt. De opzet van dit experiment bestond uit 12 wells met zes condities. Het medium van de speeksel- en wangstalen werd behandeld met 10 μ M 5-FU. Als controle op de 5-FU werd DMSO aan het medium van de orale stalen (speeksel, wang- en tongswab) toegevoegd. Als blanco oplossing werd een DMSO behandeld DMEM medium meegenomen. Iedere conditie werd tweemaal herhaald. Het was de bedoeling om het aantal cellen in de mucinelaag te bepalen en deze te vergelijken met het aantal planktonische cellen op de mucinelaag van de filter.

Voor de start van de test (op tijdstip 0 uur) werd het aantal kve bepaald in het microbiële staal aan de hand van uitplatingen. Uit de resultaten bleek de grootste aantal microbiota zich te bevinden in het speekselstaal, terwijl het wangstaal het laagste aantal kve bevat. (Figuur 10)



Figuur 10 Kve per filter op tijdstip 0 uur bepaald adhv uitplating ($GEM \pm STDEV$)

Na 24 uur incubatie bij 37 °C en 10 % CO₂ treedt er bij ieder type staal een groei op van ongeveer 2 log eenheden. De aanwezigheid van 5-FU zal de bacteriële groei van planktonische cellen afkomstig van het wangstaal licht stimuleren, terwijl het speekselstaal geen invloed ondervindt (Figuur 11). Verder wordt ook waargenomen dat het aantal kve aan biofilmcellen in de mucinelaag in dezelfde grootteorde ligt als de planktonische cellen op de filter. (Figuur 11)



Figuur 11 Planktonische microbiota VS biofilmcellen in af- of aanwezigheid van 5-FU (GEM±STDEV)

5.1.2 Gezonde stalen

Om de vergelijking te kunnen maken met de mucositis patiënten, werden gezonde donoren gekozen in dezelfde leeftijdscategorie (6 tot 14 jaar) als de patiënten.

Voor het *in vitro* experiment werd gekozen voor drie verschillende types stalen (speeksel, wang- en tongswab) afkomstig van twee gezonde donoren. Deze werden op de agarmucine laag aangebracht en daarna op de cellen geplaatst. Het medium zorgde voor een interactie tussen het apicaal en basaal gedeelte van het *in vitro* model. Om het effect van de aanwezigheid van 5-FU na te gaan, werd telkens als blanco controle DMSO (1/1000) toegepast, aangezien 5-FU werd opgelost in DMSO. In een 24 well plaat werd iedere conditie (speeksel 5-FU/DMSO, wang 5-FU/DMSO, tong 5-FU/DMSO, blanco 5-FU/DMSO) driemaal herhaald.

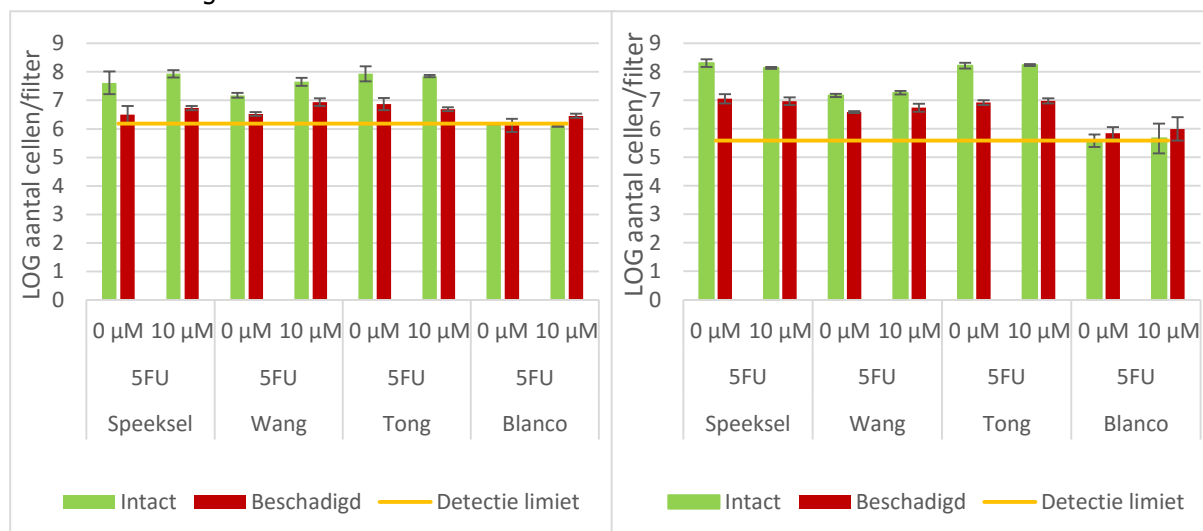
Het aantal kve zal een effect uitoefenen op de wondheling. Bij ieder experiment werd daarom het aantal kve bepaald via flow cytometrie en uitplating. Telkens werden de stalen op 0 uur en na 24 uur incubatie bij 37 °C en 5 % CO₂ onderzocht.

Algemeen kan gesteld worden dat het speekselstaal de grootste initiële populatie bezit, gevolgd door de tongswab. De wangswab bezit het kleinste startaantal. (Figuur 12) Aan de hand van flow cytometrie wordt bij 0 uur gekeken naar het aantal intacte cellen, omdat enkel deze zich verder zullen ontwikkelen.



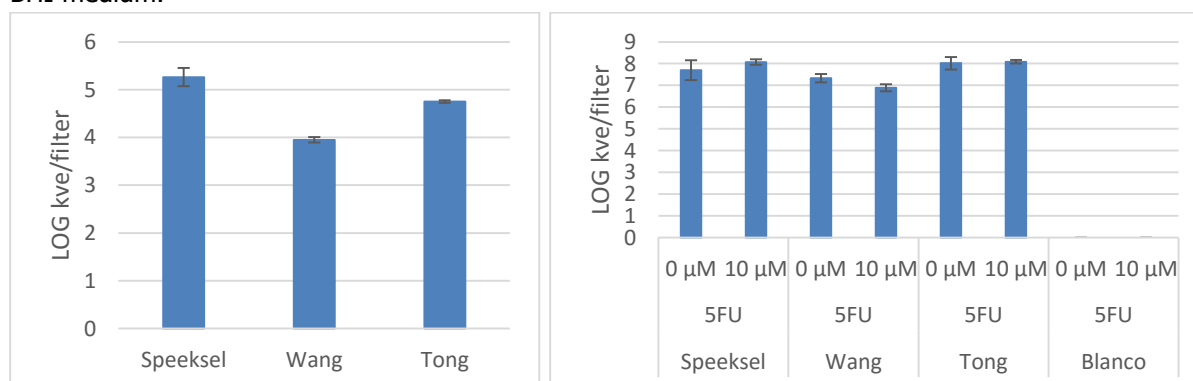
Figuur 12 Aantal cellen per filter op tijdstip 0 uur voor gezonde donor 1 (links) en gezonde donor 2 (rechts) adhv flow cytometrie (GEM±STDEV)

Algemeen wordt een groei van ongeveer 2 log geconstateerd na 24 uur incubatie bij 37 °C en 5 % CO₂. Na deze incubatieperiode werd bij gezonde donor 1 voor het wangstaal een lichte groeistimulatie waargenomen in aanwezigheid van 5-FU. Voor beide donoren werd de microbiële groei in het speeksel- en tongstaal niet beïnvloed door de 5-FU behandeling. (Figuur 13) Ook na 24 uur worden de intacte cellen samen met de beschadigde cellen bekeken bij een flow cytometrie analyse. De beschadigde cellen liggen steeds 1 tot 1,5 log eenheden lager dan het aantal intacte cellen, wanneer dit niet zo is kan een 5-FU behandeling de cellen extra schade berokkenen.



Figuur 13 Aantal cellen per filter na 24 uur incubatie voor gezonde donor 1 (links) en gezonde donor 2 (rechts) adhv flow cytometrie (GEM±STDEV)

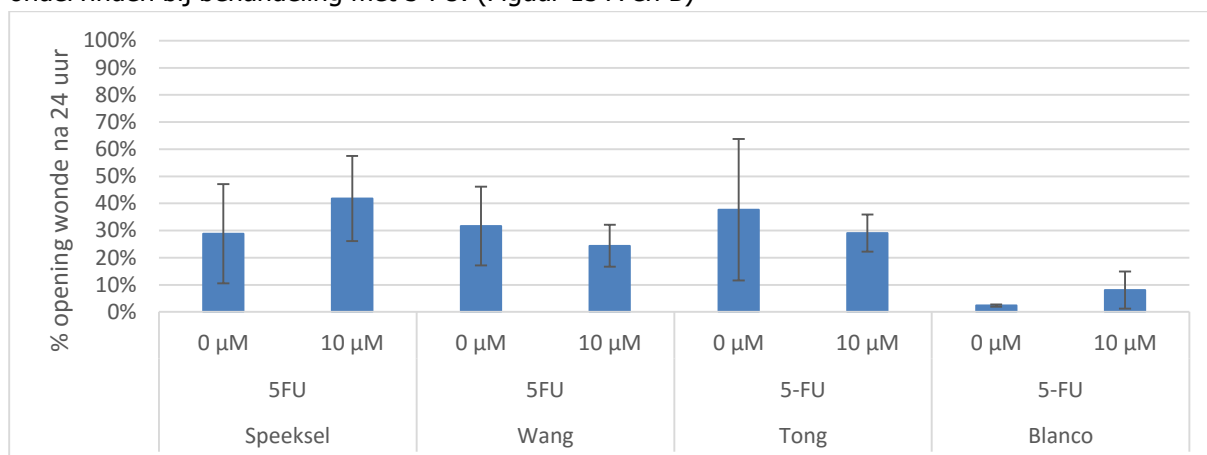
Aan de hand van uitplating op BHI agar, kunnen dezelfde conclusies getrokken worden voor het speeksel- en tongstaal. In tegenstelling tot de flow cytometrie resultaten is er bij de 5-FU behandelde wangstalen geen stimulatie zichtbaar (Figuur 14, rechter paneel). Er moet wel opgemerkt worden dat voor de 0 uur situatie de uitplatingsdata 1 log eenheid lager liggen dan de flow cytometrie resultaten (Figuur 14, linker paneel). De reden is dat bij flow cytometrie alle aanwezige cellen geteld worden, en bij uitplating wordt enkel rekening gehouden met aëroob groeiende bacteriën die cultiveerbaar zijn op BHI medium.



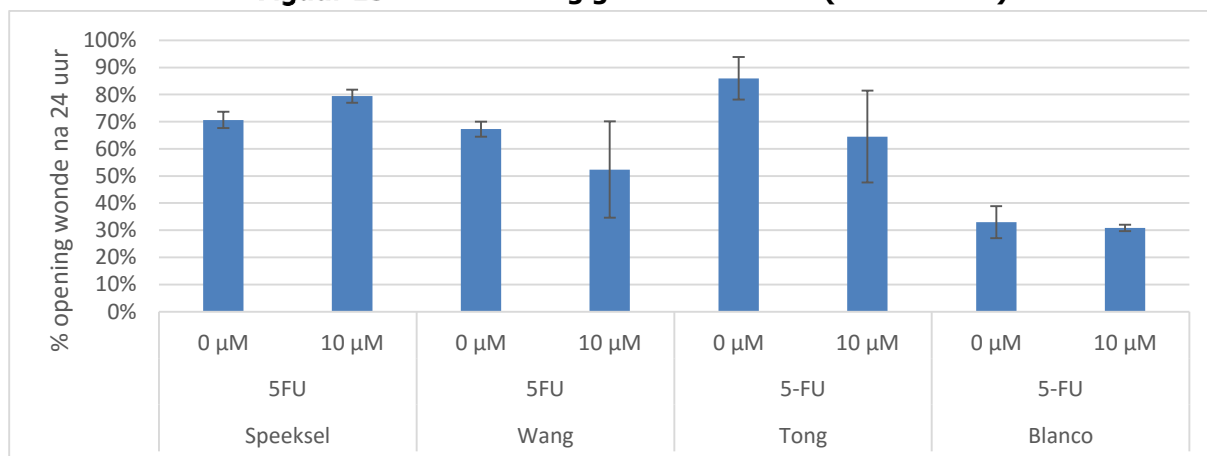
Figuur 14 Kve per filter voor gezonde donor 1 op tijdstip 0 uur (links) en na 24 uur incubatie (rechts) adhv uitplating (GEM±STDEV)

De wondheling werd bestudeerd via fluorescentie kleuring van de cellen met DiI-oplossing. Zowel op 0 uur als na 24 uur incubatie werd met de fluorescentie microscoop een foto van de wonden genomen. Hoe lager de procentuele wondopening na 24 uur, hoe beter de wondheling heeft plaats gevonden. Algemeen heeft de aanwezigheid van bacteriën een negatieve invloed op het wondhelingsproces; hoe meer bacteriën er voorkomen, hoe trager de genezing van de wonde zal plaats vinden.

Voor beide gezonde donoren, treedt een tragere wondheling op bij het speekselstaal in aanwezigheid van 5-FU terwijl voor het wang- en tongstaal een lichte stijging in de wondheling, tegenover de niet behandelde oplossing, te zien is. Het blanco monster, zonder bacteriën, zal ook een daling in wondheling ondervinden bij behandeling met 5-FU. (Figuur 15 A en B)



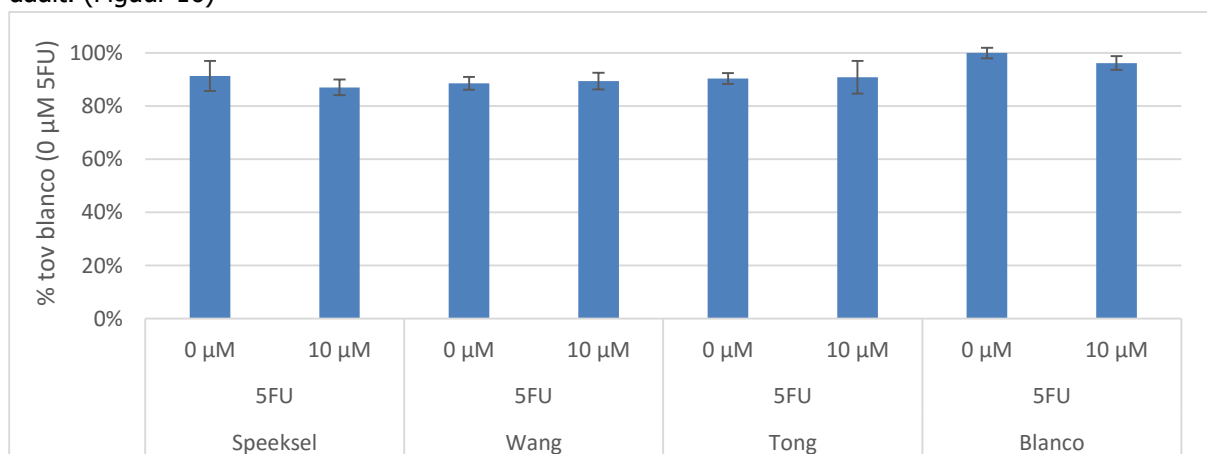
Figuur 15 A Wondheling gezonde donor 1 (GEM±STDEV)



Figuur 15 B Wondheling gezonde donor 2 (GEM±STDEV)

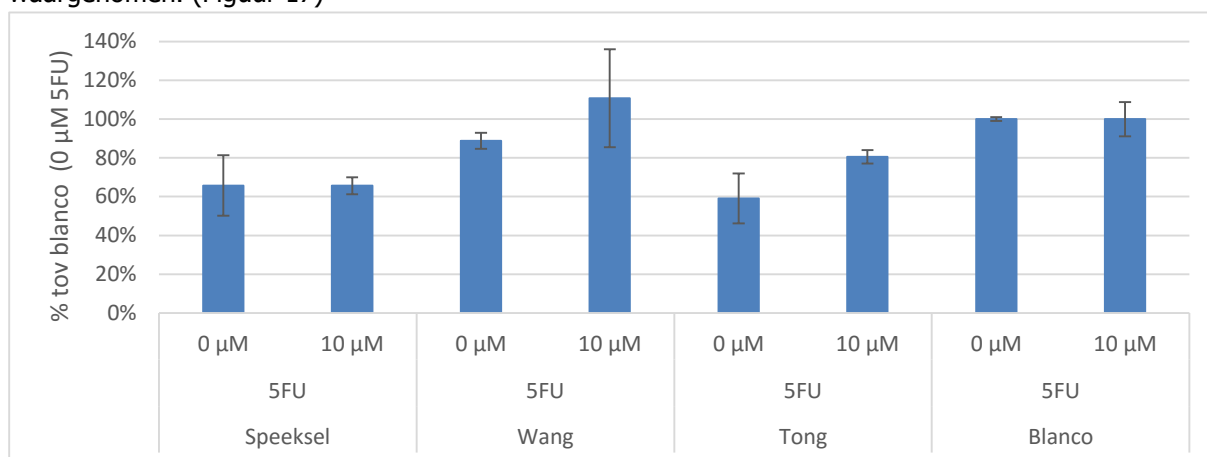
De viabiliteit van de cellen wordt nagegaan met de MTT-analyse methode, waarbij de levende cellen MTT omzetten naar formazan gekleurde kristallen. Deze worden opgelost in DMSO en de optische densiteit van de oplossing wordt gemeten bij 492 nm en 540 nm.

Voor de gezonde donor 1 kan gesteld worden dat de cellen nog voldoende viabel zijn na 24 uur co-incubatie, gezien het overlevingspercentagepercentage ten opzichte van de blanco niet onder de 80 % daalt. (Figuur 16)



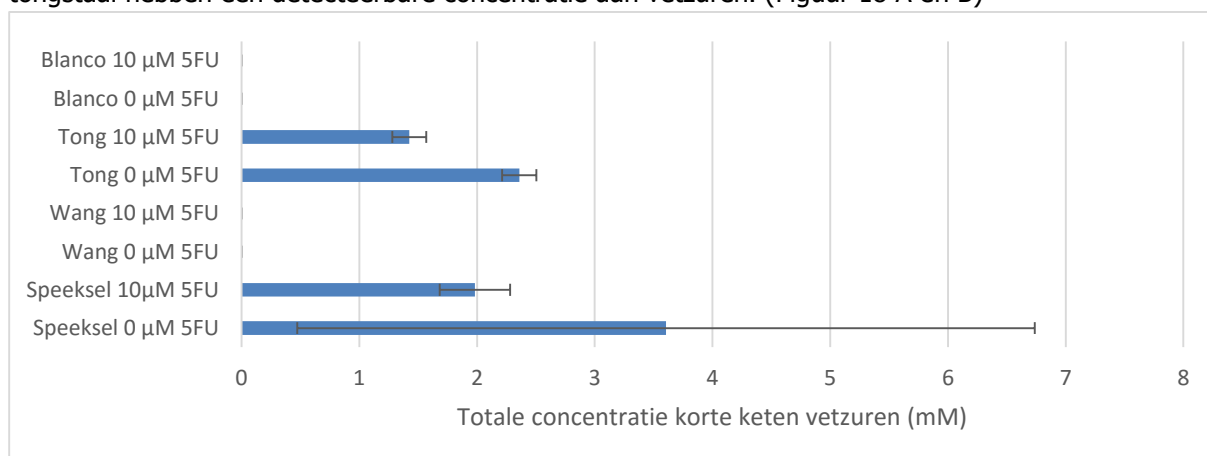
Figuur 16 MTT-analyse gezonde donor 1 (492 nm) (GEM±STDEV)

Bij de gezonde donor 2 wordt voor speeksel- en tongstaal een lagere viabiliteit (< 80 %) van de cellen waargenomen. (Figuur 17)

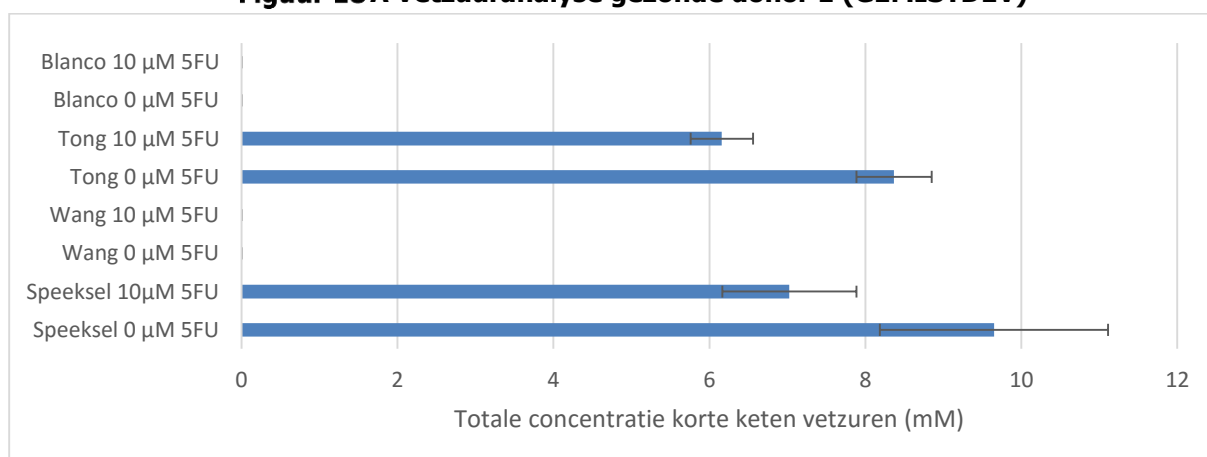


Figuur 17 MTT-analyse gezonde donor 2 (492 nm) (GEM±STDEV)

De activiteit van de cellen werd geanalyseerd via korte keten vetzuuranalyse met gaschromatografie. Een daling in celactiviteit wordt waargenomen bij aanwezigheid van 5-FU. Enkel het speeksel- en tongstaal hebben een detecteerbare concentratie aan vetzuren. (Figuur 18 A en B)



Figuur 18 A Vetzuuranalyse gezonde donor 1 (GEM±STDEV)

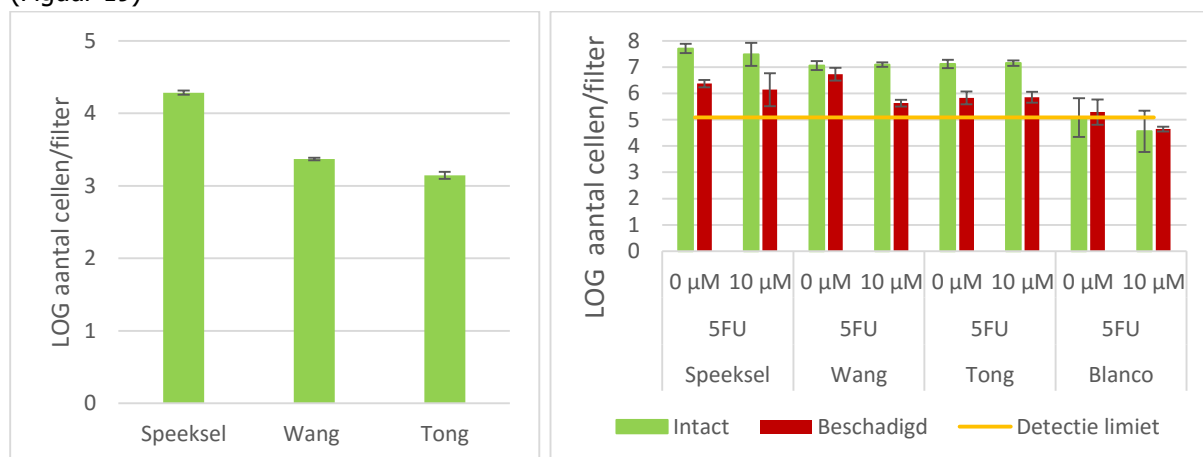


Figuur 18 B Vetzuuranalyse gezonde donor 2 (GEM±STDEV)

5.1.3 Mucositisstalen

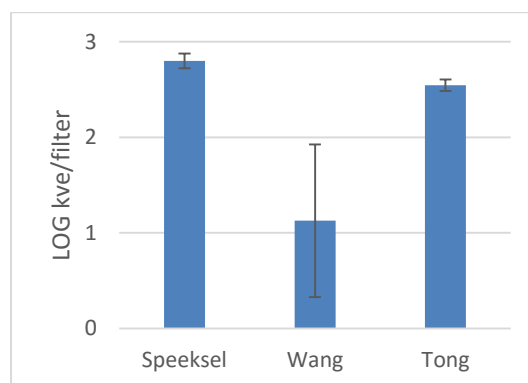
Om orale mucositis van dicht bij te kunnen bestuderen werd ook een patiënt als donor genomen. De stalen werden afgenomen in aanwezigheid van mucositis. Het *in vitro* experiment had dezelfde opzet zoals bij gezonde donors.

Algemeen kan gesteld worden dat een mucositis patiënt een lager aantal bacteriën bezit dan gezonde personen (2 log eenheden minder), het speekselstaal was ook viskeuzer. Omdat er werd gestart met een lager aantal werden de verschillen tussen het wang- en tongstaal kleiner. Speeksel toonde wel nog steeds het hoogste aantal bacteriën in vergelijking met de andere stalen. Na 18 uur incubatie bij 37 °C en 5 % CO₂ steeg het bacteriënaantal met 4 log eenheden. Deze waarde is 2 log eenheden groter dan bij gezonde personen. De aanwezigheid van 5-FU heeft geen invloed op de groei van de bacteriën. (Figuur 19)



Figuur 19 Aantal cellen per filter voor de mucositis donor op tijdstip 0 uur (links) en na 24 uur incubatie (rechts) adhv flow cytometrie (GEM±STDEV)

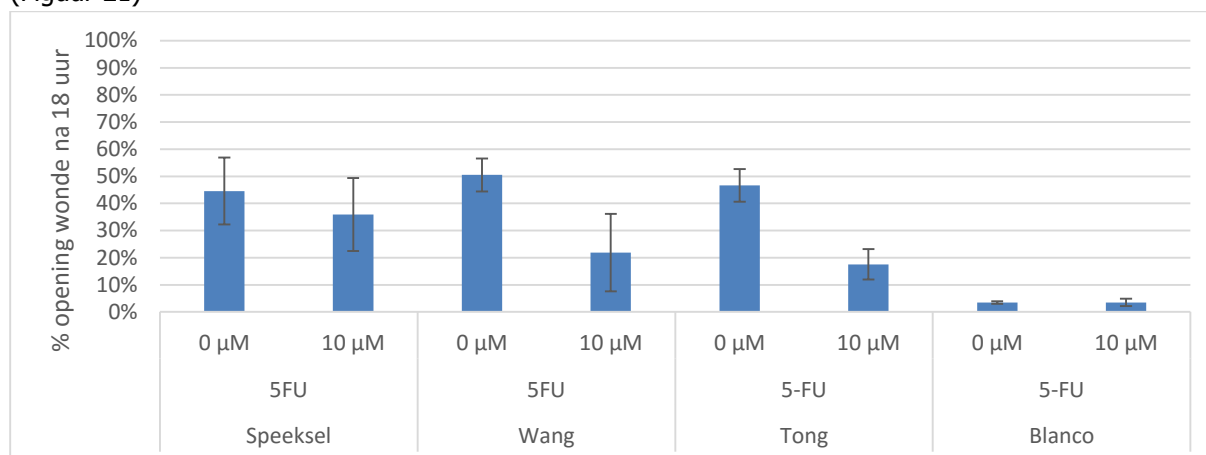
Via de uitplating van de stalen bij 0 uur kan de algemene opmerking van 1 log verschil tussen flow cytometrie en uitplating worden bevestigd. Enkel het wangstaal bezit minder cultiveerbare aëroob groeiende kolonies (Figuur 20). Op de plaat werden ook twee verschillende (grootte en kleine) kolonies waargenomen.



Figuur 20 Aantal kve per filter voor de mucositis donor op tijdstip 0 uur adhv uitplating (GEM±STDEV)

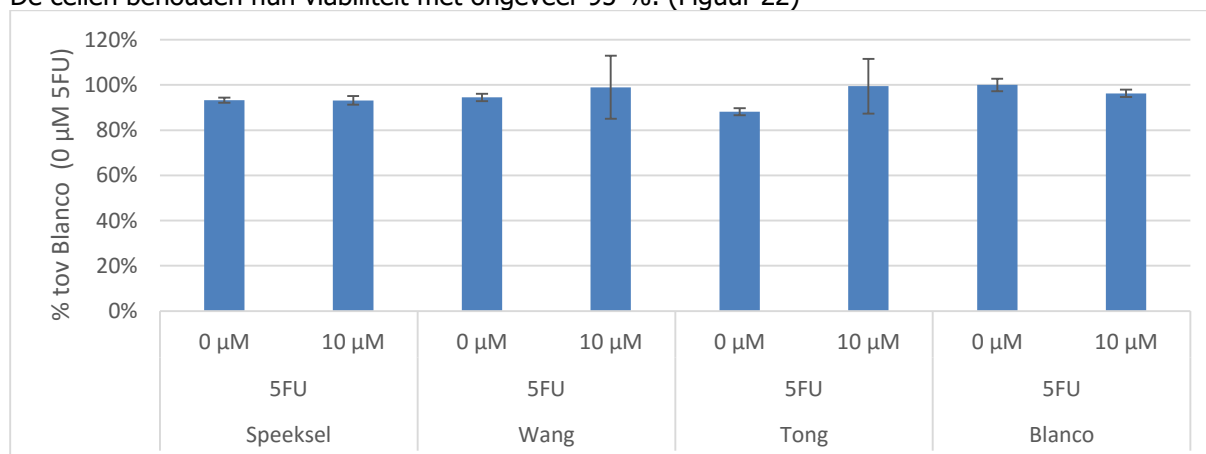
Voor de wondheling moet opgemerkt worden dat de start van het experiment niet gelijklopend is met het aanbrengen van de orale stalen. Dit omdat de patiëntstalen opnieuw moesten worden afgenomen wegens het spoelen, met mondspoeling, van de mond bij de eerste staalafname. De cellen werden 6 uur geïncubeerd met het behandeld medium, hierna werden de orale stalen pas toegevoegd en nog voor 18 uur verder in co-cultuur geïncubeerd. Door deze pre-incubatie van de cellen werd een duidelijker verschil waargenomen in aan- of afwezigheid van 5-FU. Ieder staaltype ondervindt een positief effect

op de wondheling in aanwezigheid van 5-FU. Het aantal planktonische cellen lag het hoogst bij speeksel, waardoor deze nog de grootste wondopening heeft na 18 uur incubatie. Voor de blanco oplossing, zonder bacteriën, werd een gelijkwaardige genezing vastgesteld in aan- of afwezigheid van 5-FU. (Figuur 21)



Figuur 21 Wondheling mucositis donor (GEM±STDEV)

De cellen behouden hun viabiliteit met ongeveer 95 %. (Figuur 22)



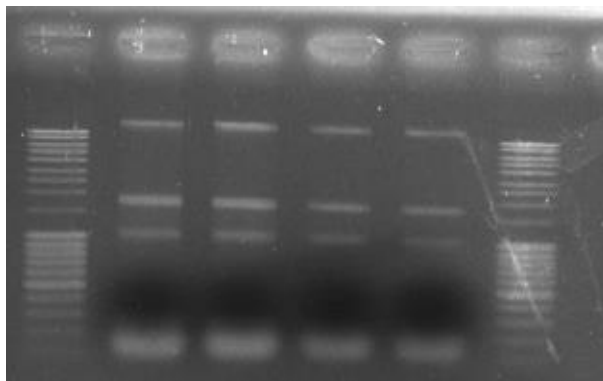
Figuur 22 MTT-analyse mucositis donor (GEM±STDEV)

5.1.4 Monocultuur

In vorige onderzoek [35] werd de impact van orale monoculturen op wondheling getest. Als resultaat bleken de monoculturen *Streptococcus oralis* (LMG 14553) en *Streptococcus mitis* (LMG 14557) het helingsproces met ~15 % te gaan stimuleren.

5.1.4.1 Sanger sequencing

Om het effect van een pure cultuur op het *in vitro* model na te gaan, werden *Streptococcus oralis* en *Streptococcus mitis* opgekweekt. De zuiverheid van de pure cultuur werd geanalyseerd via Sanger sequencing. Er werd per bacteriesoort 1 ml suspensie met de centrifuge afgedraaid, en op de bekomen pellet werd DNA extractie uitgevoerd; dit gebeurde in duplo. Een controle via elektroforese op agarosegel liet toe het al of niet welslagen van de DNA extractie te bevestigen (Figuur 23).



Figuur 23 Positieve DNA controle op agarose: *S. oralis* / *S. mitis*

Nadien werd PCR amplificatie uitgevoerd, en ook nu werd het verkregen DNA-materiaal gecontroleerd via agarose gelelectroforese. Wanneer er een bandje zichtbaar werd, was de analyse geslaagd. De PCR amplificatie gaf geen resultaat op de agarose gel. Als oplossing werd het DNA opgezuiverd (zie 4.2.3.3.2 Opzuivering DNA-staal) om de onzuiverheden te verwijderen. Op de opgezuiverde DNA stalen werd terug PCR amplificatie toegepast. Na een positieve controle op de agarosegel werd het PCR staal opgezuiverd (zie 4.2.3.3.4 Opzuivering PCR-staal) en opgestuurd naar LGC genomics voor Sanger sequencing.

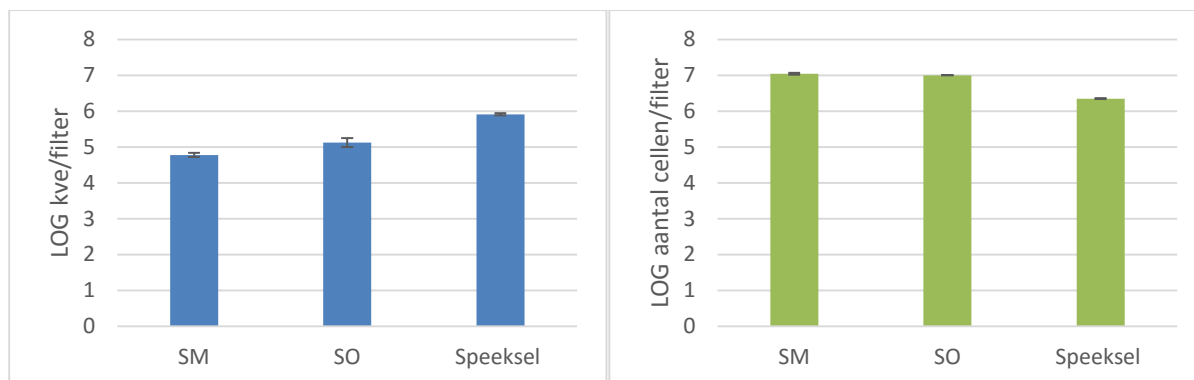
Om uit de resultaten een conclusie te trekken, moet het aantal baseparen tussen de 700 en 1000 liggen, het bereik en de identiteitspercentage moet zo hoog mogelijk zijn. Bij *Streptococcus mitis* werd voor het 16S ribosomaal RNA gen 932 forward baseparen en 1119 revers baseparen gevonden met een bereik van 100 % en 99 % identificatie. Uit deze resultaten kwam het ATCC 49456 als staining nummer wat overeenkomt met LMG 14557. Hieruit kan dus besloten worden dat het staal herkend wordt als *S. mitis*. Voor *Streptococcus oralis* werden slechts 200 baseparen gevonden, uit deze lage waarde kan geen besluit worden getrokken.

Om het effect van verschillende bacteriële species op orale wondheling na te gaan, werden verschillende combinaties opgezet. Zo werd eerst gekeken naar het effect van de pure culturen op zich, daarna werd een combinatie gemaakt met de orale stalen.

5.1.4.2 *Streptococcus mitis* en *S. oralis* monoculturen

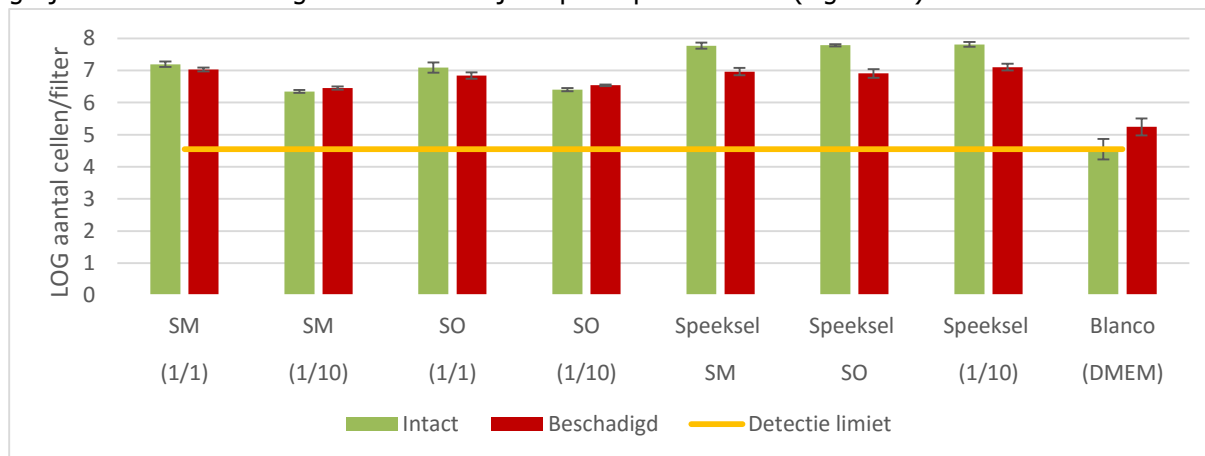
Streptococcus mitis en *S. oralis* werden aan het *in vitro* model toegevoegd in twee verschillende concentraties, onverdund en 1/10 verdund. De pure culturen werden gedurende 4 uur opgegroeid op de filter bij 37 °C en 5 % CO₂. Ook werd de combinatie van *S. mitis* en *S. oralis* (1/10 verdunding) met speeksel (1/10 verdunding) uitgetest. Als blanco werd een onbehandeld DMEM medium meegenomen. De plaat werd gedurende 22 uur opgevolgd, met om het uur een meting via de imaging technologie van de fluorescentie microscopie. Bij de start van het experiment, wanneer de wonden in de cellen werden gemaakt, werd het speekselstaal toegevoegd aan de filters met de opgegroeide pure culturen en werden de filters op de cellen gezet.

Het aantal microbiota per staal werden op 0 uur gemeten via uitplating en flow cytometrie. Zo wordt uit de resultaten waargenomen dat de drie stalen starten met een ongeveer gelijk aantal bacteriën (Figuur 24) en dat de pure culturen, *S. mitis* en *S. oralis*, niet goed groeien op een BHI bodem.



Figuur 24 Kve/aantal cellen per filter voor de afzonderlijke condities op tijdstip 0 uur adhv uitplating (links) en flow cytometrie (rechts) ($GEM \pm STDEV$)

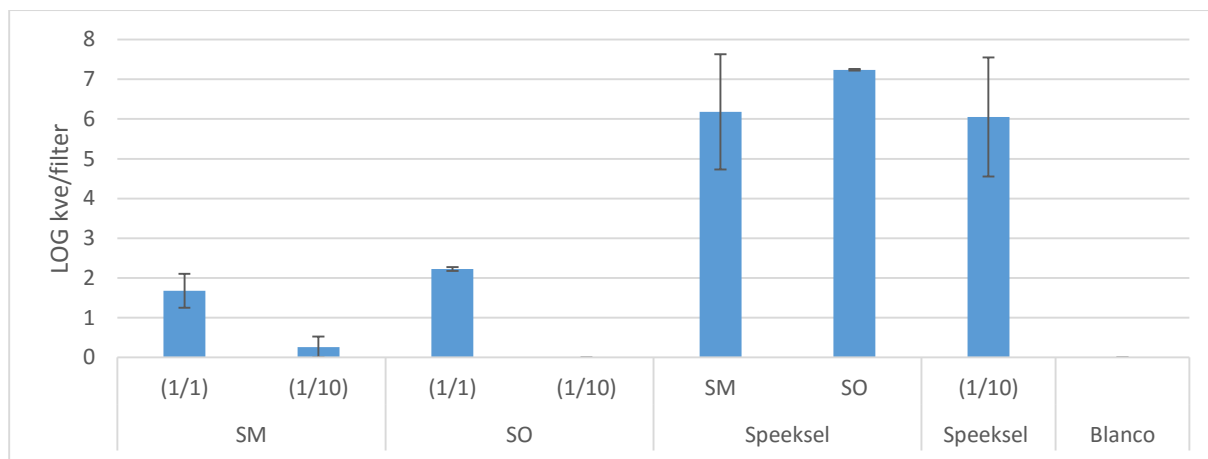
Via flow cytometrie kon het aantal cellen per filter van de pure culturen gemeten worden. De pure culturen *S. mitis* en *S. oralis* zijn niet toegenomen in aantal cellen na 22 uur incubatie. Het zuivere speekselstaal neemt qua aantal cellen met ongeveer 2 log eenheden toe. Bij de combinatie wordt een gelijk aantal cellen waargenomen zoals bij het pure speekselstaal. (Figuur 25)



Figuur 25 Aantal cellen per filter voor de verschillende condities na 22 uur incubatie adhv flow cytometrie ($GEM \pm STDEV$)

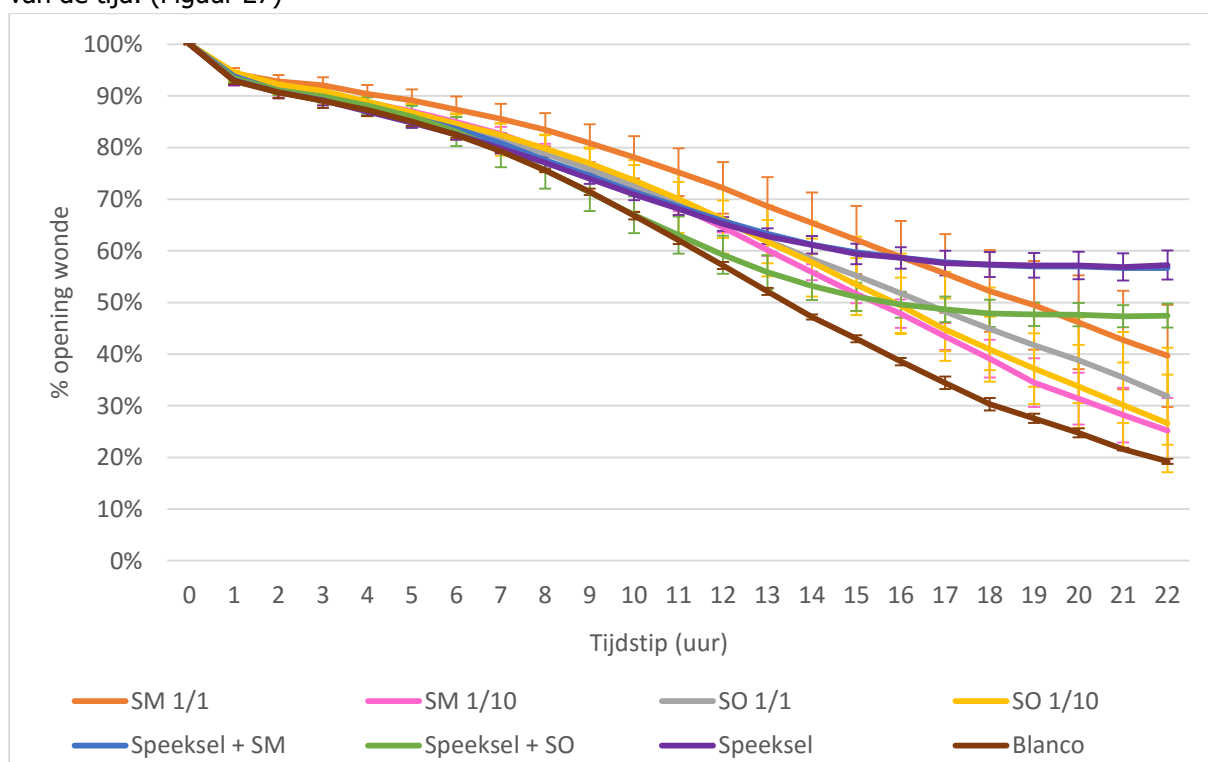
Na 22 uur, kan enkel voor de gecombineerde opzet (een pure cultuur en speeksel) het aantal bacteriën geteld worden via uitplating op BHI agar dit omdat de pure culturen, *S. mitis* en *S. oralis* na 22 uur niet goed groeien op een BHI medium. Speeksel in combinatie met *S. oralis* heeft een groter aantal bacteriën, en speeksel in combinatie met *S. mitis* heeft een gelijkwaardig aantal kve/filter met het oorspronkelijke speekselstaal. (Figuur 26)

Als opmerking moet hier meegegeven worden dat het aantal gemeten cellen/kve, de som van de speekselbacteriën en de bacterie species samen zijn. Een afzonderlijke telling kan via deze analyse methoden niet worden uitgevoerd.



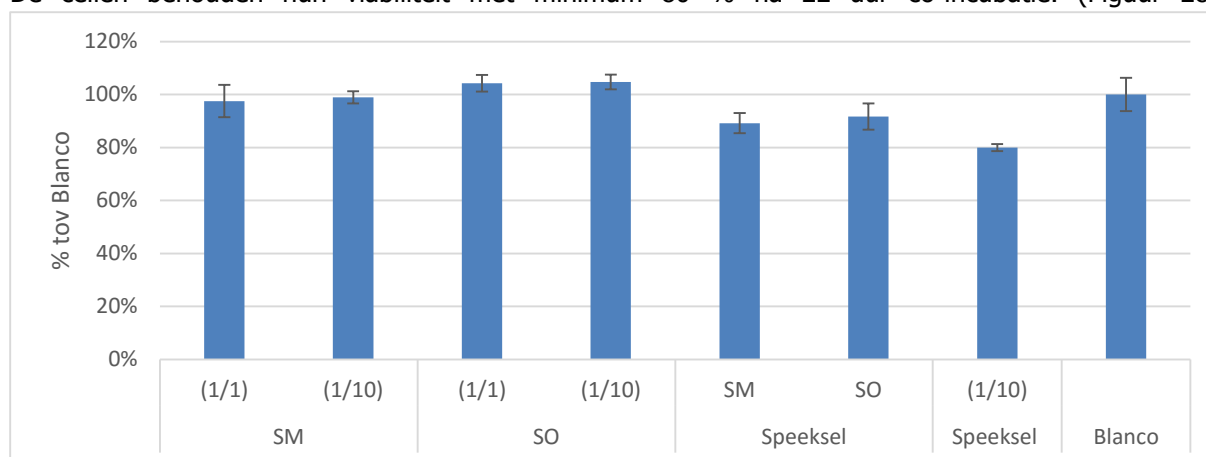
Figuur 26 Aantal kve per filter voor de verschillende condities na 24 uur incubatie adhv uitplating (GEM±STDEV)

De procentuele opening van de wonde wordt uitgezet tegenover de gemeten tijd. De wonde in het speekselstaal en bij speeksel in combinatie met *S. mitis* heeft nog de grootste opening op het einde van de meting. Deze stalen hebben een negatieve invloed op het genezingsproces. De combinatie tussen speeksel en *S. oralis* zal een betere wondheling opleveren dan het zuivere speeksel staal. *S. mitis* (1/10) heeft na de blanco het beste genezingsproces, gevolgd door *S. oralis* (1/10). Wanneer gekeken wordt naar het tijdsinterval, stagneert de opening van de wonde na 18 uur incubatie voor de combinaties met het orale staal. Bij de pure culturen zal de procentuele opening van de wonde blijven afnemen in functie van de tijd. (Figuur 27)



Figuur 27 Wondheling 22 uur opvolging (GEM±STDEV)

De cellen behouden hun viabiliteit met minimum 80 % na 22 uur co-incubatie. (Figuur 28)



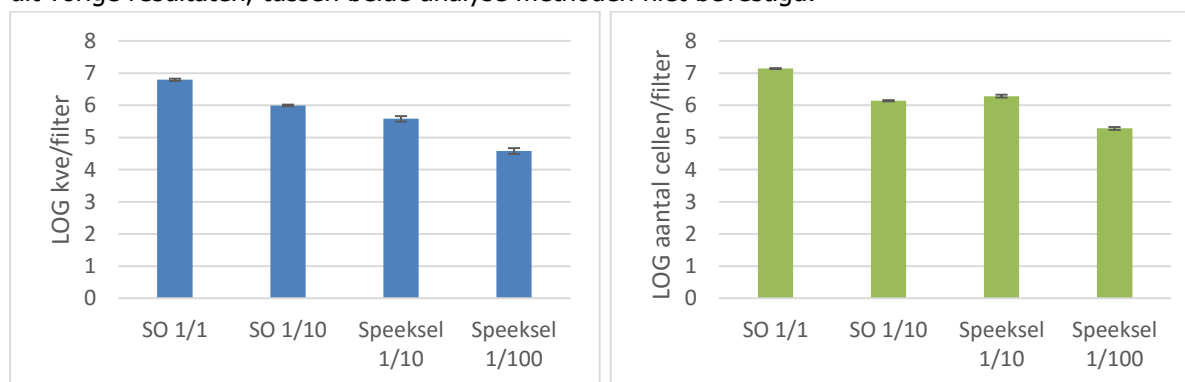
Figuur 28 MTT analyse (492 nm) (GEM±STDEV)

5.1.4.3 *S. oralis* in combinatie met speeksel

Uit vorige resultaten (5.1.4.2 *Streptococcus mitis* en *S. oralis* monoculturen) bleek *S. oralis* in combinatie met speeksel een positief effect te weeg te brengen op de wondheling. Daarom werd gekozen om enkel te focussen op *S. oralis* en een optimale concentratieverhouding te gaan onderzoeken.

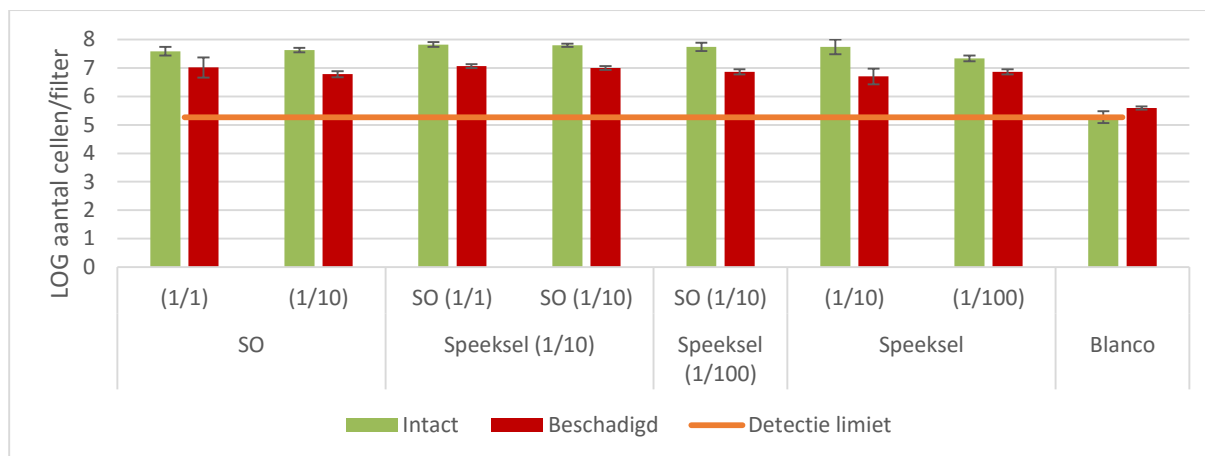
Terug werd *S. oralis* onverdund en 1/10 verdund aan het *in vitro* model toegevoegd, daarnaast werd een combinatie gemaakt tussen de onverdunde *S. oralis* en het speeksel (1/10 verdunning). Vervolgens werd *S. oralis* (1/10 verdunning) aan het speekselstaal (1/10 en 1/100 verdunning) toegevoegd. Om een vergelijking te kunnen maken werden de pure speekselstalen in hun gebruikte verdunning ook apart meegenomen. Als blanco werd een onbehandeld DMEM medium toegepast. Opnieuw werd *S. oralis* opgegroeid gedurende 4 uur bij 37 °C en 5 % CO₂. Na het maken van de wonden, werd het speekselstaal in de juiste verdunning aan de filters toegevoegd vooraleer ze op de cellen werd geplaatst.

De resultaten van de stalen gemeten op 0 uur via uitplating, liggen in dezelfde grootte orde als de gemeten waarden via flow cytometrie (Figuur 29). Hiermee wordt de trend van 1 log-waarde verschil, uit vorige resultaten, tussen beide analyse methoden niet bevestigd.



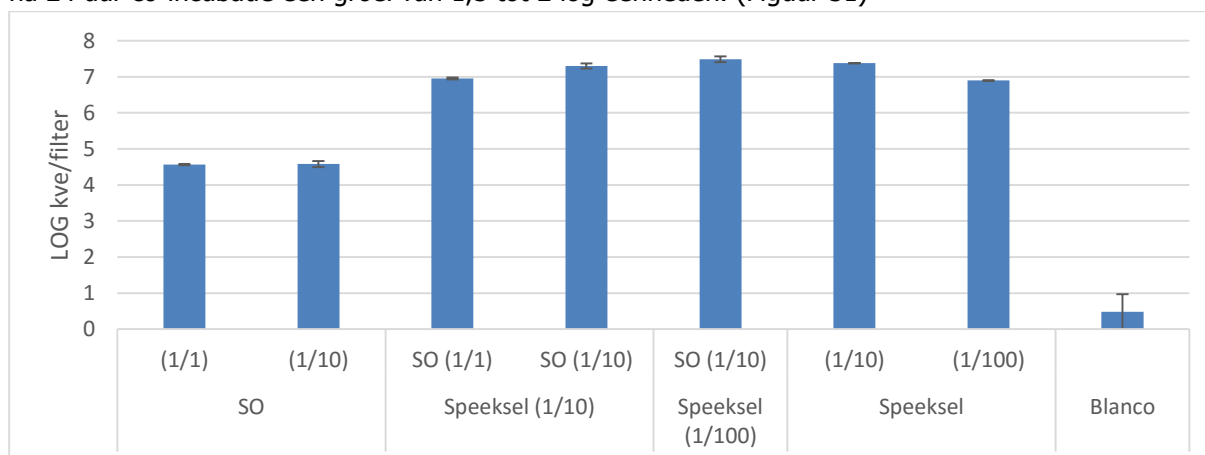
Figuur 29 Kve/aantal cellen per filter voor de afzonderlijke condities op tijdstip 0 uur adhv uitplating (links) en flow cytometrie (rechts) (GEM±STDEV)

Voor *S. oralis* is er een lichte stijging in groei waarneembaar na 24 uur incubatie. Het pure speekselstaal neemt met 2 log eenheden toe. De combinaties tussen het speekselstaal en *S. oralis* heeft een gelijk aantal planktonische cellen als de pure cultuur en het speekselstaal afzonderlijk, na 24 uur co-incubatie bij 37 °C en 5 % CO₂. (Figuur 30)



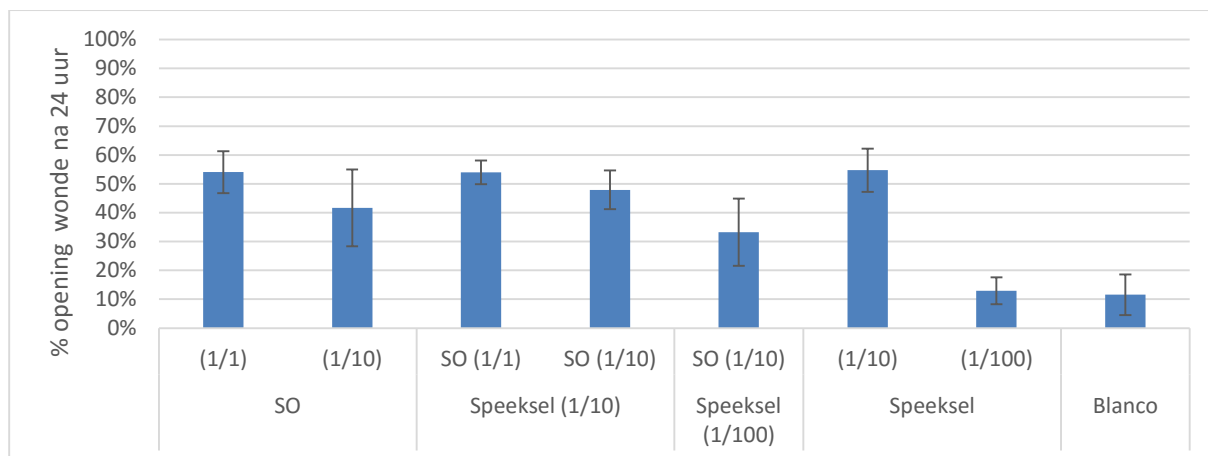
Figuur 30 Aantal cellen per filter voor de verschillende condities na 24 uur incubatie adhv flow cytometrie (GEM ± STDEV)

De stalen werden na 24 uur co-incubatie uitgeplaat, na 88 uur incubatie bij 37 °C werden de platen geteld. Deze langere incubatietijd is nodig zodat ook de *S. oralis* stalen tot ontwikkeling kunnen komen, deze hebben namelijk een langere adaptatietijd nodig. De resultaten van de speekselcombinaties zijn vergelijkbaar met deze van de flow cytometrie. Ook voor het pure speekselstaal wordt een gelijkwaardige trend waargenomen. Enkel *S. oralis* zal zich in aantal minder ontwikkelen op een BHI medium dan dat er geteld kan worden met flow cytometrie. In vergelijking met de uitplating op 0 uur is er een daling waarneembaar in de cultiveerbare *S. oralis*. De speekselstalen daarentegen ondervinden na 24 uur co-incubatie een groei van 1,5 tot 2 log eenheden. (Figuur 31)



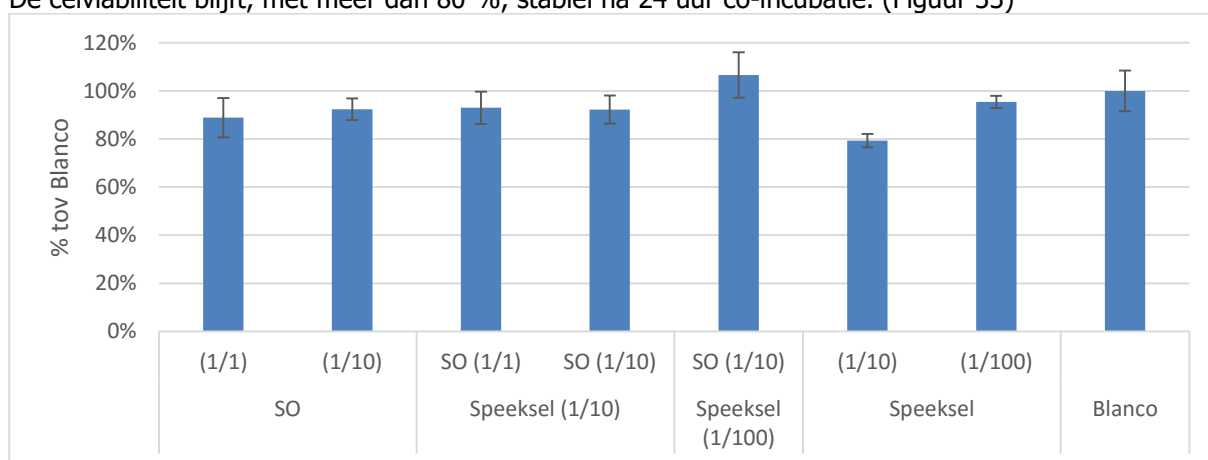
Figuur 31 Kve per filter voor de verschillende condities na 24 uur incubatie adhv uitplating (GEM±STDEV)

Afzonderlijk en in combinatie hebben *S. oralis* onverdund en speeksel 10 maal verdund het slechtste genezingsproces. Wanneer in combinatie gebruik gemaakt wordt van een 10 maal verdunde *S. oralis* zal de wondheling positief beïnvloed worden ten opzichte van het speekselstaal (1/10 verdunning) alleen. Het speekselstaal, 100 maal verdunt zal een minder reducerende werking gaan uitoefenen. (Figuur 32)



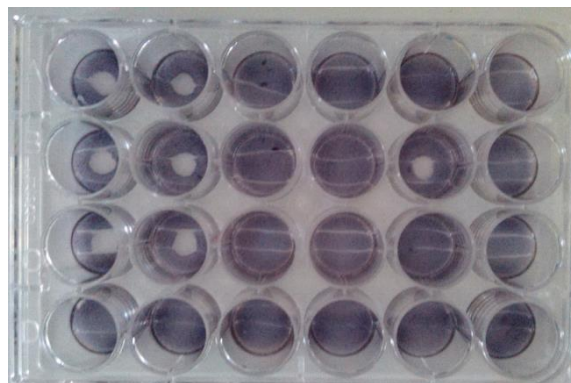
Figuur 32 Wondheling (GEM±STDEV)

De celviabiliteit blijft, met meer dan 80 %, stabiel na 24 uur co-incubatie. (Figuur 33)



Figuur 33 MTT- analyse (492 nm) (GEM±STDEV)

Wel moet opgemerkt worden dat er bij *S. oralis* (Tabel 4) geen celviabiliteit meer aanwezig is onder de filter (Figuur 34). Wat een negatief effect zal uitoefenen op de wondheling, aangezien de cellen niet meer actief zullen deelnemen aan het genezingsproces.



Figuur 34 Resultaat MTT-analyse

Tabel 4 Opzet 24 well plaat

| SO 1/1 | SO 1/10 | SO 1/1+ Speeksel 1/10 | SO 1/10 + Speeksel 1/10 | SO 1/10 + Speeksel 1/100 | Speeksel 1/10 |
|---------------|---------|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Speeksel 1/10 | | | Blanco DMEM | | |

5.2 5-FU EFFECT OP ORALE STALEN

Om de interacties tussen het chemotherapeuticum 5-fluorouracil en de orale microbiota na te gaan, werd gebruik gemaakt van een combinatie tussen bacteriële stalen en een 5-FU verdunningsreeks. De opzet van dit experiment is om de verandering in de viabiliteit van de bacteriën na te gaan bij een behandeling met verschillende 5-FU concentraties (0,1-100 μM).

5.2.1 MTT analyse

De MTT analyse werd gebruikt om de viabiliteit van de bacteriën te bepalen na 24 uur incubatie in aanwezigheid van 5-FU. De incubatietijd, om MTT om te zetten naar formazan, was oorspronkelijk 15 minuten maar werd soms verlengd tot 2 uur, wanneer de biofilm te traag kleurde. Binnen een test werd steeds eenzelfde incubatietijd gebruikt voor alle stalen.

Om ervoor te zorgen dat de biofilm, die niet steeds volledig was vastgehecht, niet los kwam bij het verversen van het medium werd enkel 200 μl medium afgenomen zodat de losse biofilm in de resterende 40 μl achterbleef. Het zelfde volume DMSO (100 μl) werd toegevoegd maar de oplossing van de biofilm verliep hierdoor wel iets moeizamer.

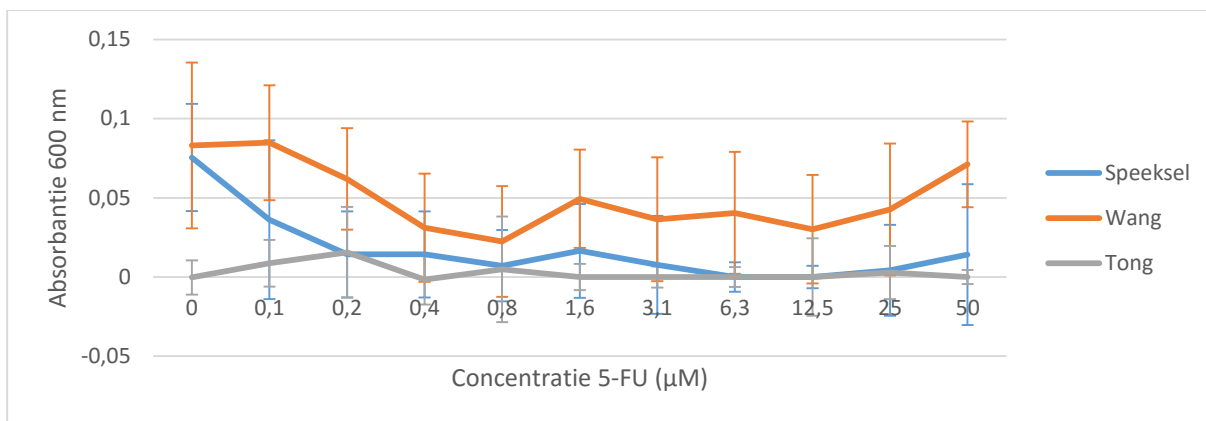
5.2.1.1 Gezonde donors

Vier gezonde donoren werden gebruikt voor speeksel-, wang- en tongstalen zodat ook met het *in vitro* model een vergelijking kan gemaakt worden. Ook hier is de groei van de bacteriën, in aanwezigheid van 5-FU, tijdens de incubatie belangrijk omdat het aantal de interactie tussen beiden kan beïnvloeden. Daarom werd net als in het *in vitro* model het aantal kolonievormende eenheden bij 0 uur bepaald adhv uitplating en na 24 uur incubatie werd de optische dichtheid van het medium gemeten bij 600 nm, om zo het aantal planktonische cellen te kunnen bepalen. De resultaten zijn gelijkaardig als deze in gebruikmakend van het *in vitro* model.

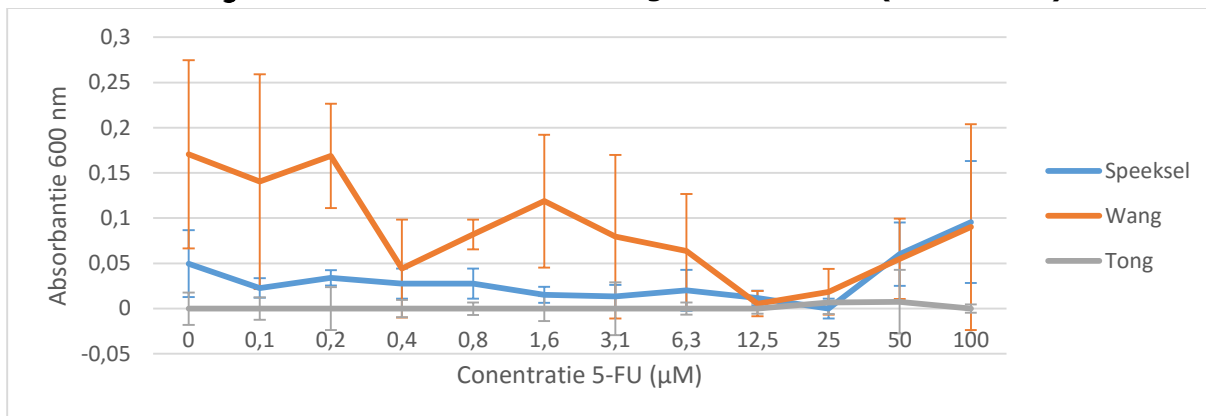
Algemeen werd een 1/1000 verdund speekselstaal en een 1/100 verdund swab gebruikt. Enkel bij donor 3 werd een tienmaal geconcentreerdere verdunning gebruikt, om het effect van een dikkere biofilm te gaan bekijken.

Het 5-FU experiment werd viermaal uitgevoerd met telkens een verschillende gezonde donor. De resultaten geven telkens andere waarden, maar er is wel een overeenkomstige trend waarneembaar.

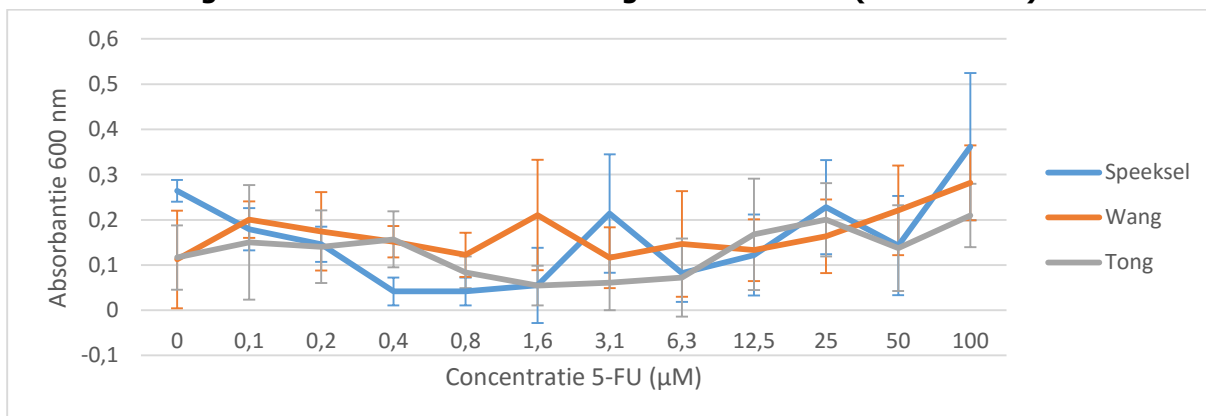
Voor de planktonische cellen op basis van optische dichtheid meting, werd bij het speekselstaal een daling waargenomen tussen 0 μM en $\pm 12,5$ μM 5-FU bij donor 2 en 3 daarna stijgt het aantal planktonische cellen terug. Voor de andere donoren (4 en 5) wordt een wisselend aantal waargenomen bij de verschillende 5-FU concentraties. Het wangswab ondervindt een daling in aantal planktonische cellen tussen 0 μM en $\pm 0,8$ μM 5-FU hierna stijgt en daalt het aantal opnieuw en eindigt met een stijging (uitgezonderd bij donor 5). Uit de tongswab resultaten kan geen besluit genomen worden wegens een te lage waarde. (Figuur 35 A, B, C en D)



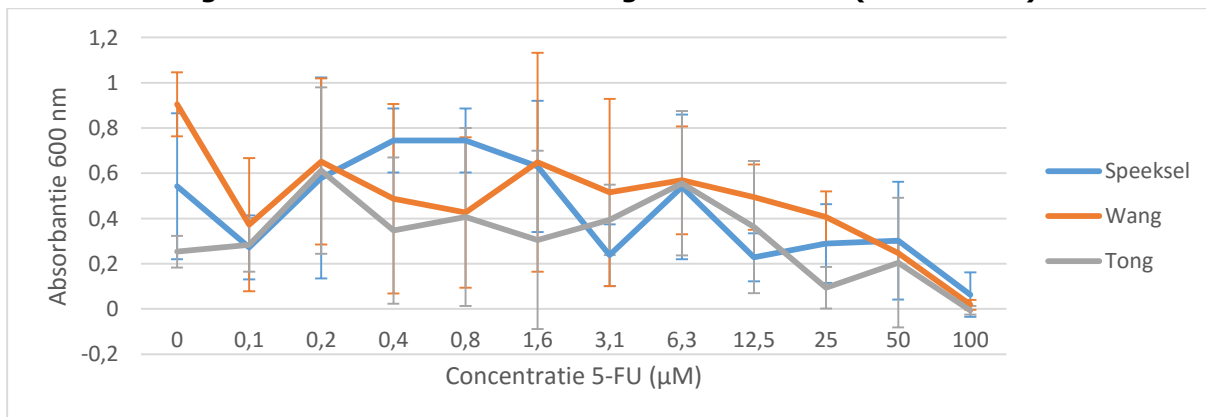
Figuur 35 A Planktonische cellen gezonde donor 2 (GEM±STDEV)



Figuur 35 B Planktonische cellen gezonde donor 3 (GEM±STDEV)

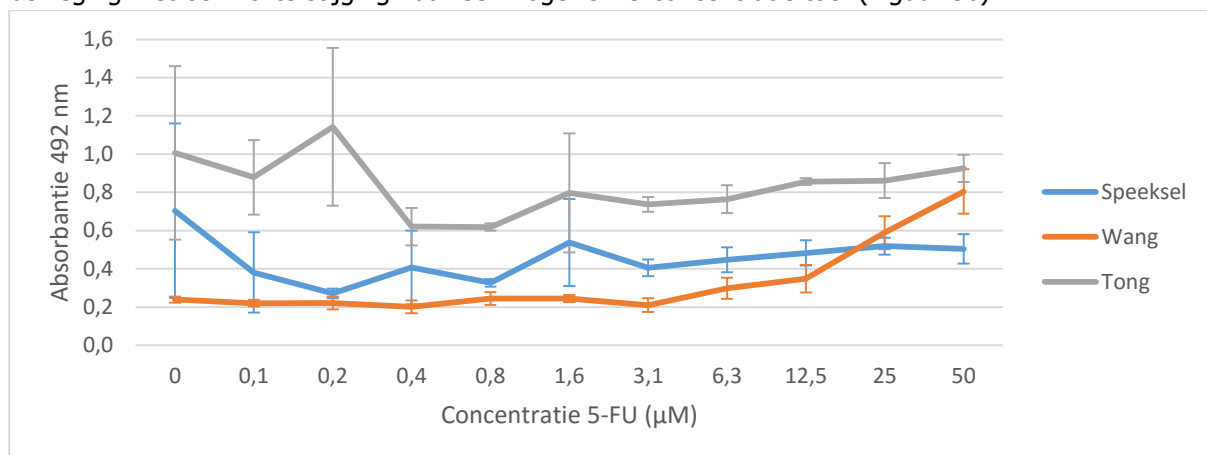


Figuur 35 C Planktonische cellen gezonde donor 4 (GEM±STDEV)



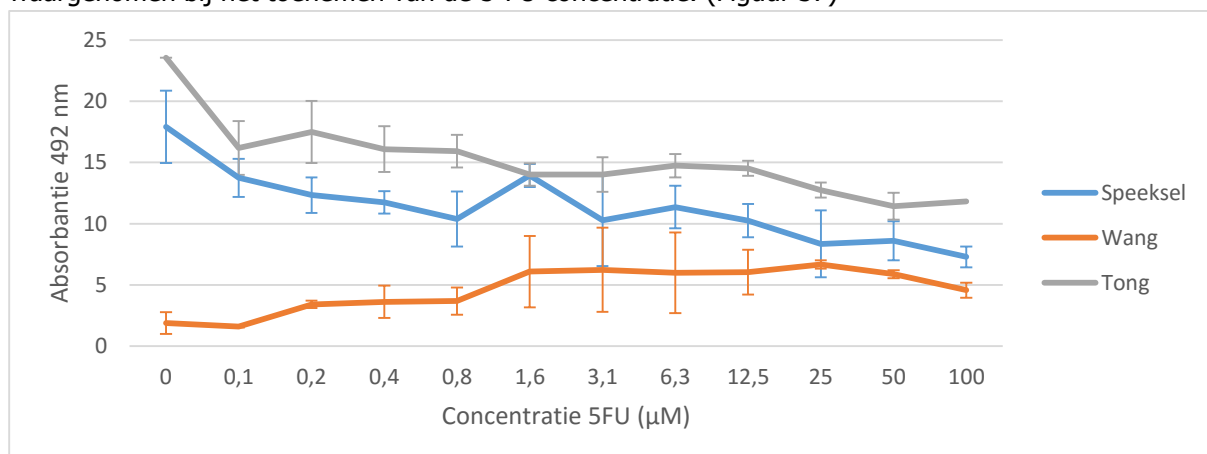
Figuur 35 D Planktonische cellen gezonde donor 5 (GEM±STDEV)

Aan de hand van de MTT analyse werd de viabiliteit van de biofilmcellen geanalyseerd. Bij donor 2 werd in het bijzijn van 5-FU voor het wangstaal een stimulatie voor de viabiliteit waargenomen, bij hogere 5-FU concentraties (tot 50 μM). Voor het speeksel- en tongstaal werd geen constant resultaat verkregen. De viabiliteit voor het speekselstaal daalt tot $\pm 0,2 \mu\text{M}$, hierna fluctueert de viabiliteit tot 3,1 μM , gevolgd door een licht stijging bij het toenemen van de 5-FU concentratie. Het tongstaal volgt een golvende beweging met een lichte stijging naar een hoger 5-FU concentratie toe. (Figuur 36)



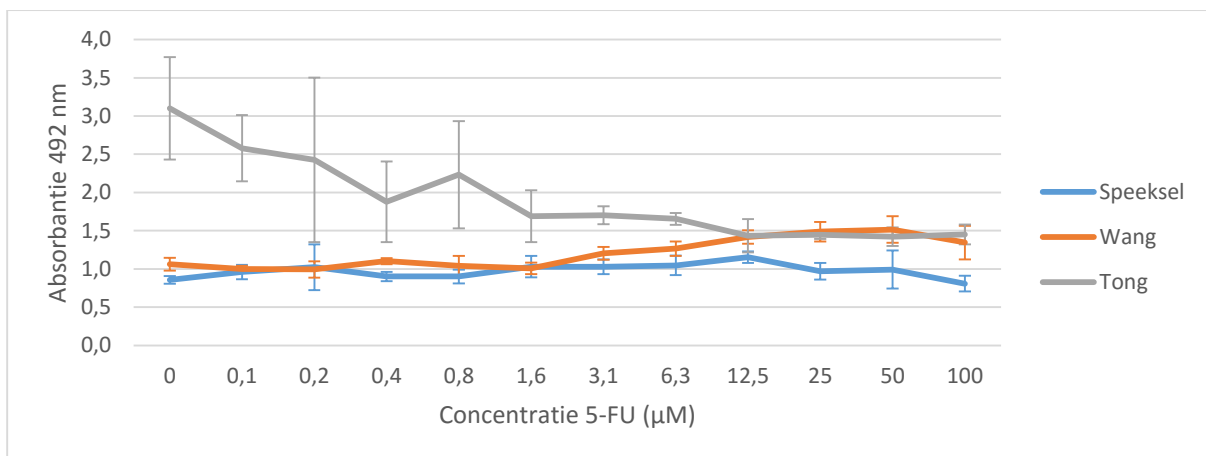
Figuur 36 Viabiliteit biofilmcellen van gezonde donor 2 ($\text{GEM} \pm \text{STDEV}$)

Zoals ook te zien was bij donor 2, wordt de biofilm viabiliteit van het wangstaal ook bij donor 3 licht gestimuleerd in aanwezigheid van 5-FU. Voor zowel het speeksel- als tongstaal wordt echter een daling waargenomen bij het toenemen van de 5-FU concentratie. (Figuur 37)



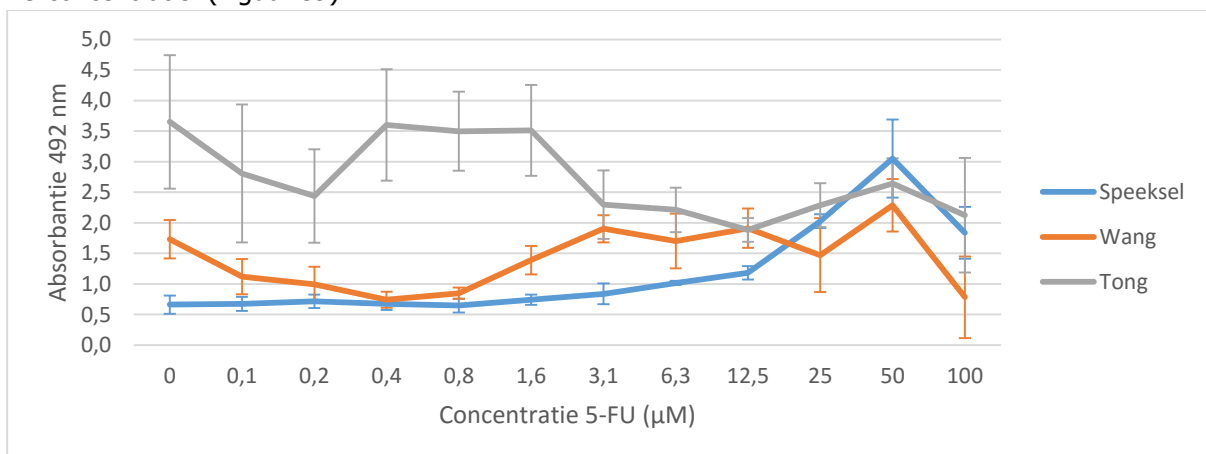
Figuur 37 Viabiliteit biofilmcellen van gezonde donor 3 ($\text{GEM} \pm \text{STDEV}$)

Bij donor 4 werd terug een stijging voor de bacteriële viabiliteit waargenomen voor het wangstaal in aanwezigheid van 5-FU. De viabiliteit van speekselstaal werd in dit experiment niet beïnvloed door de verschillende 5-FU concentraties. Voor het tongstaal werd een daling waargenomen bij het stijgen van de 5-FU concentratie. (Figuur 38)



Figuur 38 Viabiliteit biofilmcellen van gezonde donor 4 (GEM±STDEV)

Bij donor 5 werd voor het wangstaal een daling in viabiliteit waargenomen tot 0,8 µM, hierna stijgt de viabiliteit in een fluctuatieve beweging tot 50 µM. De viabiliteit in het speekselstaal stijgt vanaf 3,1 µM tot 50 µM. Het tongstaal heeft een schommelend resultaat met daling in viabiliteit bij het stijgen van de 5-FU concentratie. (Figuur 39)



Figuur 39 Viabiliteit biofilmcellen van gezonde donor 5 (GEM±STDEV)

Als algemeen besluit kan genomen worden dat enkel bij het wangstaal de viabiliteit van de biofilm positief beïnvloed wordt in aanwezigheid van 5-FU. Deze conclusie is enkel geldig bij hoge concentraties (behalve bij 100 µM). De bekomen resultaten voor het speeksel- en tongstaal waren uiteenlopend voor de verschillende experimenten, maar algemeen kan gesteld worden dat de aanwezigheid van 5-FU een licht nadelig effect zal uitoefenen op de viabiliteit van de biofilm.

6 DISCUSSIE

Orale mucositis is een vaak voorkomend neveneffect van chemo- of radiotherapie bij kanker. Erytheem, zwelling, bloeding, verzwering en vorming van een pseudomembraan zijn de meest frequent voorkomende kenmerken. [37] Door deze bijwerkingen zal de levenskwaliteit van de patiënt dalen.

Algemeen is er al veel geweten over het mechanisme van mucositis dankzij het werk van Stephen Sonis. [14] Maar de aandacht voor de rol van de bacteriën in het proces is nog grotendeels onduidelijk. Wel is geweten dat bij chemotherapie patiënten de samenstelling van het orale microbioom verandert. Een studie toonde aan dat de *Streptococcus* species worden vervangen door meer pathogene anaerobe gramnegatieve soorten. De gramnegatieve bacteriën versterken het ontstekingsproces en stimuleren de zweervorming door het produceren van endotoxine of LPS. [42]

Om de interactie tussen het microbioom en de gastheer te gaan onderzoeken werd gebruik gemaakt van een *in vitro* model. [34] Door gebruik te maken van twee aparte compartimenten die indirect met elkaar in contact staan, kan de interactie tussen de gastheer en zijn microbioom zowel op korte als langere termijn onderzocht worden. De opzet van deze bachelorproef is om de epitheliale wondheling na te gaan in aanwezigheid van bacteriën al dan niet onderworpen aan het chemotherapeutikum 5-FU. Het menselijk epitheel vormt namelijk de belangrijkste barrière bij fysische, chemische of biologische aanvallen op de gastheer. Wanneer er toch schade optreedt, is het erg belangrijk dat het menselijk lichaam de inwendige weefsels kan beschermen via spontane wondgenezing. Tijdens deze bachelorproef werd eerst de onderlinge interactie tussen de bacteriën, afkomstig van een gezonde donor of van een mucositis patiënt, en de epitheelcellen bestudeerd in aan- en afwezigheid van 5-FU. Later werd onderzocht of specifieke bacteriën het wondhelingsproces kunnen stimuleren, opdat een sneller genezingsproces kan plaatsvinden en de hospitalisatie kan ingekort worden.

Algemeen kan gesteld worden dat het initieel aantal orale bacteriën lager ligt bij een mucositis patiënt dan bij een gezonde donor. Het aantal planktonische cellen na 24 uur incubatie in het *in vitro* model ligt in dezelfde grootteorde, dit wil zeggen dat de bacteriën van de patiënt zullen uitgroeien tot een gelijkwaardige aantal als bij een gezonde donor. In dit experiment werden de orale stalen van de patiënten genomen terwijl er mucositis aanwezig was. Vorige studies [16] onderzochten de bacteriële groei bij mucositis patiënten gedurende de volledige behandeling. Hieruit bleek dat bij een radiotherapeutische behandeling het aantal bacteriën pas stijgt bij initiatie van mucositis, en dat veranderingen in de samenstelling van het speeksel of het orale microbioom geen aanleiding geven tot ontstaan van orale mucositis. Het aantal bacteriën bij de mucositis patiënt heeft met 7 log eenheden dezelfde waarde zoals deze gemeten in dit onderzoek. [16] Aangezien in deze studie enkel een staal van de mucositis patiënt is genomen, dient in de toekomst ook gekeken te worden naar de bacteriële interactie voor, tijdens en na de behandeling. Hierdoor zal voor eenzelfde patiënt de interactie tussen het microbioom en de humane epitheelcellen, in functie van de tijd kunnen uitgezet worden.

Bij het bekijken van de initiële stalen kan besloten worden dat het aantal aanwezige bacteriën het hoogst ligt in het speekselstaal en dat de wangstaal het minst aantal bacteriën bevat. Na 24 uur incubatie werd bij gezonde personen een groei van ongeveer 2 log geconstateerd, bij de mucositis patiënt was dit 4 log. Voor het bepalen van het aantal kve's werden twee analyses uitgevoerd, uitplating en flow cytometrie. Doordat bij uitplating enkel rekening werd gehouden met aëroob groeiende bacteriën die cultiveerbaar zijn op BHI, was het aantal kve/filter telkens 1 log-waarde lager dan het aantal cellen dat geteld werd via flow cytometrie. Uit de literatuur blijkt dat deze trend ook onder meer voorkomt bij de opsporing en telling van de totale bacteriën in melk. [43] Voor de gezonde donoren werd in aanwezigheid van 5-FU enkel voor het wangstaal, na 24 uur incubatie, een stimulatie in bacteriële groei waargenomen, tong en speeksel bacteriën ondervinden geen invloed van de 5-FU behandeling. De bacteriën van de patiënten stalen ondervinden geen verschil in groei in aan- of afwezigheid van 5-FU. Een vorige studie ontdekte micro-organismen (*Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus*

salivarius, *S. mitis*, *S. oralis* en *Pseudomonas aeruginosa*) met een resistentie voor 5-FU. Deze groep ondervindt slechts een lichte afname in groei en viabiliteit in aanwezigheid van 5-FU bij hogere concentraties (12,5-50 μ M). De microbiële resistentie tegen 5-FU moet dus beschouwd worden als een belangrijke risicofactor voor infecties, in het bijzonder in aanwezigheid van orale mucositis. [44]

Er werd al aangetoond dat het aantal bacteriën en hun metaboliëten een invloed kunnen te weeg brengen op de wondheling. [17] Algemeen werd een negatieve interactie vastgesteld tussen het aantal bacteriën en het genezingsproces. [35] Uit vorige onderzoek bleek niet de aanwezigheid van bacteriën, maar de uitgescheiden stoffen voor dit nadelig effect te zorgen. [45] Via het *in vitro* experiment werd zowel rekening gehouden met het aantal bacteriën als met de uitgescheiden stoffen, door de scheiding met de filter kon er namelijk geen direct contact tussen de cellen en de bacteriën plaats vinden.

Voor de mucositis patiënt werd in aanwezigheid van 5-FU een snellere heling na 24 uur ondervonden voor alle types stalen in vergelijking met de onbehandelde monsters, dit effect kan ook het gevolg zijn van de pre-incubatie van de cellen met het behandeld medium. In de toekomst kan het effect van deze per-incubatie verder onderzocht worden. Wel moet opgemerkt worden dat de stimulatie voor het speekselstaal lager ligt dan bij de andere twee monsters, dit omdat het speekselstaal nog altijd een hoger aantal bacteriën bezit dan tong- en wangswab.

Deze stijging in wondgenezing werd ook waargenomen bij de gezonde personen maar dit enkel voor de tong- en wangstalen. Het verschil in aantal bacteriën was hier onbeduidend wegens een gelijkwaardig aantal voor het behandeld als onbehandeld staal. Voor het speekselstaal van de gezonde donoren werd de wondheling vertraagd in aanwezigheid van 5-FU. Het hogere aantal bacteriën zal een negatief effect teweeg brengen op de wondheling, wat overeenkomt met de hypothese. [35]

Het genezingsproces is niet enkel afhankelijk van het aantal aanwezige bacteriën maar ook de delingssnelheid van de cellen zal een grote invloed uitoefenen op het dichtgroeien van de wonde. Algemeen kan gesteld worden dat de cellen hun viabiliteit voor ongeveer 90 % behouden bij 37°C en 5% CO₂. Gedurende 24 uur is er bij behandeling met het tong- en speekselstaal nog steeds celactiviteit waarneembaar op basis van de geproduceerde vetzuren acetaat, propionzuur en butyraat. Voor het wangstaal werd er geen activiteit meer geconstateerd.

Om de interactie tussen het orale microbioom en het chemotherapeuticum 5-FU beter te kunnen onderzoeken werd een concentratiereeks opgesteld waar telkens de viabiliteit van de biofilm werd gemeten na 24 uur incubatie. Er werden vier gezonde donoren onderzocht. Algemeen kan gesteld worden dat de viabiliteit van de biofilm bestaande uit bacteriën afkomstig van speeksel of tongswab, een licht nadelig effect ondervinden in aanwezigheid van 5-FU. Er is echter geen duidelijk concentratie-afhankelijk effect waarneembaar. Voor het wangstaal werd na 24 uur een groter aantal planktonische cellen en viabiliteit van biofilmcellen waargenomen na behandeling met 5-FU, in vergelijking met de andere types stalen. De grootste stijging in viabiliteit werd waargenomen tussen 25 en 50 μ M aan 5-FU.

Wanneer het aantal cellen geteld werd met SYBR Green kleuring via flow cytometrie, worden de intacte cellen gebruikt als indicator voor de celviabiliteit. [44] Hiermee kunnen de twee experimenten, het *in vitro* model en het 5-FU effect op het orale microbioom, met elkaar vergeleken worden. Bij het *in vitro* model werd de bacteriële groei van het gezonde wangstaal gestimuleerd in aanwezigheid van 5-FU, terwijl de ander twee staal types, speeksel en tongswab, geen verschil in groei ondervonden in aan- of afwezigheid van 5-FU. Voor het 5-FU effect op het orale microbioom werd dezelfde conclusie genomen, de biofilm bestaande uit wangbacteriën bevatte het grootste aantal planktonische cellen en had de hoogste viabiliteit bij het toenemen van de 5-FU concentratie. De viabiliteit van het speekselstaal werd gemiddeld niet beïnvloed door de dosis-respons curve bestaande uit verschillende concentraties (0,1-100 μ M) 5-FU. Voor het tongstaal werd in beide experimenten geen effect op de aanwezigheid van 5-FU waargenomen.

Infectie speelt een belangrijke rol in het pathobiologisch proces van orale mucositis, daarom werden verschillende soorten antibiotica 's in vorig onderzoek getest. Er werd gekeken of via een antibiotica behandeling mucositis voorkomen kan worden en hoe deze behandeling de ziekte beïnvloed. Uit de studie is gebleken dat het toedienen van antibiotica geen effect uitoefent op de genezing van mucositis. [37] Een andere optie om het genezingsproces te versnellen is het toedienen probiotica. Deze levende bacterie species oefenen een stimulerende werking uit op fysiologische en therapeutische activiteiten. Uit gastro-intestinaal onderzoek is gebleken dat het niet de levende bacteriën zijn die het risico op infectie zullen doen dalen, maar het supernatans bestaande uit componenten zoals korte vetzuur ketens en bacteriocins, zal een invloed uitoefenen op de bacteriële populatie in de darm. [38] Ook de microbiële samenstelling van de gastheer zal een invloed uitoefenen op de probiotische werking. [46] Er werd aangetoond dat *Streptococcus oralis* en *S. mitis* een positief effect zullen uitoefenen op de wondheling, terwijl *Lactobacillus plantarum*, *L. salivarius*, *Klebsiella oxytoca* en *Streptococcus salivarius* de wondheling negatief gaan beïnvloeden. Hieruit werd geconcludeerd dat het effect op de wondheling soortafhankelijk is. [35] Via het *in vitro* model werden *S. mitis* en *S. oralis* onderzocht naar hun effect op wondheling van humane epitheel cellen. Hieruit bleek dat *S. oralis* een positievere invloed uitoefende op de wondheling, zelfs in combinatie met microbiota-rijk speeksel. Deze resultaten zijn te vergelijken met de literatuur, *S. oralis* gaf voor de wondheling een verbetering van +15 % terwijl *S. mitis* iets lager scoorde met +13 %. [35]

Uit de eerste resultaten bleek dat vooral *S. oralis* een positief effect heeft op de wondheling, daarom werd de focus verschoven naar enkel *S. oralis*, zodat een juiste concentratie-verhouding kan gevonden worden voor het wondgenezingsproces. Uit de resultaten met *S. oralis* in combinatie met speeksel, werd een hogere groei in aantal *S. oralis* waargenomen via flow cytometrie in vergelijking met de vorige test met zowel *S. oralis* als *S. mitis*. Deze groei heeft een effect uitgeoefend op de viabiliteit van de cellen, waardoor de resultaten van de wondheling voor het pure *S. oralis* staal niet geheel betrouwbaar kunnen worden geacht. Er kunnen verschillende hypothesen over de oorzaak van de mitochondriale schade aan de cellen opgesteld worden. Als eerste kan de groei van *S. oralis* tot het kritisch aantal een invloed uitoefenen, het hoge aantal bacteriën kan zorgen voor het uitscheiden van een toxisch product. De competitie voor het substraatgebruik tussen de cellen en de bacteriën zou hier geen invloed mogen uitoefenen, theoretisch gezien is er genoeg aanwezig om beide de kans tot ontwikkeling te geven. Het precieze substraatverbruik kan niet gemeten worden. Wanneer enkel gekeken wordt naar de combinatie *S. oralis* en speeksel, kan besloten worden dat de verhouding *S. oralis* 1/10 en speeksel 1/10 verdund een stimulatie in wondheling te weeg brengt in vergelijking tot het pure speekselstaal. Hierom zal in de toekomst deze verhouding worden uitgetest op verschillende donoren zodat een algemeen besluit kan genomen worden over het stimulerend effect van *S. oralis* op de wondheling bij speekselstalen. Verder kan er ook gekeken worden naar andere types stalen, tong- en wangswab, maar hiervoor zal terug een andere concentratieverhouding onderzocht moeten worden omdat deze stalen geen vergelijkbaar bacteriën aantal bezit met het speekselstaal. Omdat de stalen in dit experiment enkel geteld worden in algemeen aantal, levend of dood, is er geen duidelijkheid over het aantal *S. oralis* cellen in vergelijking met de speekselbacteriën. Alvorens een conclusie genomen kan worden zal het aantal *S. oralis* geteld moeten worden via een specifieke FISH probe want enkel zo kan een definitief besluit genomen worden dat het weldegelijk door een stijging in het aantal *S. oralis* is dat de wondheling gestimuleerd wordt. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of de wondstimulatie enkel het gevolg is van het aantal of eerder aan een specifiek metabooliet, die het negatief effect van de speekselbacteriën op de wondheling zal belemmeren, dat door *S. oralis* wordt uitgescheiden.

Deze bachelorproef geeft dus een eerste aanzet ter ontwikkeling van een probioticum dat kan ingezet worden zodat de pijnlijke ulceratie fase kan ingekort worden door een sneller genezingsproces.

7 ALGEMEEN BESLUIT

Algemeen kan besloten worden dat de aanwezigheid van 5-FU op wangstalen een positief effect teweegbrengt op wondheling en op de viabiliteit van de biofilm. Voor het tongstaal wordt in aanwezigheid van 5-FU enkel een stimulatie in wondheling waargenomen. De resultaten voor het speekselstaal geven het grootste aantal bacteriën weer, maar dit resulteert in een negatief effect op de wondheling. De biofilm-viabiliteit van zowel het tong- als speekselstaal ondervindt geen invloed bij een 5-FU behandeling. Wanneer stalen van een gezond persoon vergeleken worden met die van een mucositis patiënt kan gesteld worden dat de patiënt start met een lager aantal bacteriën waardoor er een meer uitgesproken positief effect van 5-FU waarneembaar is. Bij de wondheling werd eenzelfde patroon waargenomen tussen beide types donoren, namelijk dat 5-FU zowel bij het wang- als tongstaal de wondheling zal stimuleren in vergelijking met het onbehandeld staal, dit effect is nog meer uitgesproken bij de mucositis patiënt. Voor de toekomst wordt aangeraden om nog meerdere mucositis patiënten te onderzoeken, en dient de bacteriële interactie voor, tijdens en na de behandeling bestudeerd te worden.

Om na te gaan of bepaalde bacteriële species de wondheling kunnen stimuleren, werd *S. oralis* of *S. mitis* aan speeksel toegevoegd. De combinatie met *S. mitis* gaf geen stimulerend effect in tegenstelling tot de combinatie met *S. oralis*. Een concentratietest gaf een stimulerend effect aan voor *S. oralis* bij een 1/10 verdunning in combinatie met een 1/10 verdund speekselstaal. In de toekomst zal getest worden of deze stimulatie ook waarneembaar is bij andere donoren. Bij eenzelfde resultaat kan dit de aanzet zijn voor het ontwikkelen van een probioticum, die wondheling zal stimuleren en zo de genezing van mucositisletsel kan versnellen.

LITERATUURLIJST

- [1] LabMET, „About us,” UGent, [Online]. Available: <http://www.labmet.ugent.be/content/about-us>.
- [2] Gluon & LabMET, „OPEN CALL – RESIDENCY @ LABMET,” [Online]. Available: <http://gluon.be/nl/open-call-water-war/>.
- [3] vliz, „Laboratorium voor Microbiële Ecologie en Technologie (UGent-LabMET),” [Online]. Available: <http://www.vliz.be/nl/instituten-opzoeken?module=institute&insid=6702&printversion=1&dropIMISitle=1>.
- [4] LabMET, „Staff,” [Online]. Available: <http://www.labmet.ugent.be/content/staff>.
- [5] LabMET, „Host microbe interactions,” [Online]. Available: <http://www.labmet.ugent.be/content/host-microbe-interactions?destination=node/341>.
- [6] A. Trotti, L. Bellm, J. B. Epstein, D. Frame, H. J. Fuchs, C. K. Gwede, E. Komaroff, L. Nalysnyk en M. D. Zilberberg, „Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review,” *Radiotherapy & oncology*, nr. 66, pp. 253-262, 2003.
- [7] Stichting tegen kanker, „Mucositis & slijmvliesontsteking in de mond,” Kanker, [Online]. Available: <http://www.kanker.be/alles-over-kanker/bijwerkingen/mucositis-slijmvliesontsteking-de-mond>.
- [8] Ziekenhuis.nl, „Wat is orale mucositis,” 2003. [Online]. Available: <http://www.ziekenhuis.nl/dossiers/orale-mucositis-een-veelvoorkomende-bijwerking-van-radio-en-chemotherapie/wat-is-orale-mucositis/item24970>.
- [9] C. Potting, N. A. M. Blijlevens, J. P. Donnelly, T. Feuth en T. Van Achterberg, „A scoring system for the assessment of oral mucositis in daily nursing practice,” *European Journal of Cancer Care*, vol. 15, pp. 228-234, 2006.
- [10] B. Vanhoecke, T. De Ryck, A. Stringer, T. Van der Wiele en D. Keefe, „Microbiota and their role in the pathogenesis of oral mucositis,” *Oral Diseases*, nr. 21, pp. 17-30, 2015.
- [11] L. M. Collins en C. Dawes, „The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa,” *Journal Dent*, nr. 66, pp. 1300-1302, 1987.
- [12] S. T. Sonis, „Pathobiology of mucositis,” *Seminars in Oncology Nursing*, nr. 20, pp. 11-15, 2004.
- [13] H. Al-Fahaad, „A Clinicopathologic study of Lichen Planus at Assir area, Kingdom of Saudi Arabia,” *Internal medicine*, vol. 7, nr. 3, pp. 10-19, 2014.
- [14] S. T. Sonis, „Oral Mucositis in Cancer Therapy,” *Journal Support Oncology*, nr. 2, pp. 3-8, 2004.
- [15] S. T. Sonis, „Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities,” *The journal of supportive oncology*, nr. 5, pp. 3-11, 2007.
- [16] S. T. Sonis, „Mucositis: The impact, biology and therapeutic opportunities of oral mucositis,” *Oral Oncology*, nr. 45, pp. 1015-1020, 2009.
- [17] T. De Ryck, „Radiotherapy-induced oral mucositis; The host microbe interactions come into play,” UGent, Faculteit van Geneeskunde en Gezondheidswetenschappen, 2015.
- [18] „Mucositis Stages,” Medical Centre, 13 mei 2010. [Online]. Available: <http://www.myvmc.com/videos/mucositis-stages/>.
- [19] E. Donetti, M. Bedoni, P. Capone, A. Gualerzi, G. Tartaglia en C. Sforza, „An in vitro model of human oral explants to study early effects of radiation mucositis,” *Eur J Oral Sci*, nr. 117, pp. 169-174, 2009.
- [20] M. A. Stokman, F. K. L. Spijkervet, H. M. Boezen, J. P. Schouten, J. L. N. Roodenburg en E. G. E. de Vries, „Preventive Intervention Possibilities in Radiotherapy- and Chemotherapy-induced Oral Mucositis: Results of Meta-analyses,” *Journal of dental research*, nr. 85, pp. 690-700, 2006.

- [21] T. De Ryck, T. Boterberg, F. M. Kerckhof, J. De Schrijver, M. Bracke, T. Van de Wiele en B. Vanhoecke, „Effects of Irradiation on Epithelial Wound Healing and Microbial Diversity in an in-vitro Oral Mucosa Model,” *Journal of Nuclear Medicine & Radiation Therapy*, nr. 6, pp. 1-4, 2015.
- [22] C. J. H. van de Velde, W. T. A. van der Graag, J. H. J. M. van Krieken, C. A. M. Marijnen en J. B. Vermorken, *Oncologie*, Houten: Bohn Stafleu van Loghum, 2011.
- [23] Apotheek, „5-FU,” 21 03 2016. [Online]. Available: <http://www.apotheek.nl/medicijnen/fluorouracil?product=5-fu#belangrijk-om-te-weten-over-fluorouracil>.
- [24] J. E. Raber-Durlacher, S. Elad en A. Barasch, „Oral mucositis,” *Oral oncology*, nr. 45, pp. 452-456, 2010.
- [25] Ziekenhuis.nl, „Hoe is orale mucositis te behandelen,” [Online]. Available: <https://www.ziekenhuis.nl/dossiers/orale-mucositis-een-veelvoorkomende-bijwerking-van-radio-en-chemotherapie/hoe-is-orale-mucositis-te-behandelen/item24972>.
- [26] S. W. Lee, K. I. Jung, Y. W. Kim, H. D. Jung, H. S. Kim en J. P. Hng, „Effect of epidermal growth factor against radiotherapy-induced oral mucositis in rats,” *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 64, nr. 4, pp. 1172-1178, 2007.
- [27] R. V. Lalla, D. P. Saunders en D. E. Peterson, „Chemotherapy or Radiation-Induced Oral Mucositis,” *Dental Clinics of North America*, vol. 58, nr. 2, pp. 341-349, 2014.
- [28] P. E. Kolenbrander, R. J. Palmer, S. Periasamy en N. S. Jakobovics, „Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance.,” *Nat. Rev. Microbiol*, nr. 8, pp. 471-480, 2010.
- [29] M. Handfield, H. V. Baker en R. J. Lamont, „Beyond good and evil in the oral cavity: insights into host-microbe relationships derived from transcriptional profiling of gingival cells,” *Journal of dental research*, nr. 87, pp. 203-223, 2008.
- [30] J. J. Napeñas, M. T. Brennan, S. Coleman, M. L. Kent, J. Noll en G. Frenette, „Molecular methodology to assess the impact of cancer chemotherapy on the oral bacterial flora: a pilot study,” *Oral Surg. Oral med*, nr. 109, pp. 554-560, 2010.
- [31] Y. Hu, Q. Wang, Y. Jiang, R. Ma, W. Xia, Z. Tang en Z. Liu, „Characterization of oral bacterial diversity of irradiated patients by high-throughput sequencing,” *Oral Science*, nr. 5, pp. 21-25, 2013.
- [32] A. M. Stringer, „Interaction between host cells and microbes in chemotherapy-induced mucositis,” *Nutrients*, nr. 5, pp. 1488-1499, 2013.
- [33] J. M. Zahm, H. Kaplan, A. L. Herard, F. Doriot, D. Pierrot, P. Somelette en E. Puchelle, „Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium,” *Cell Motility and the Cytoskeleton*, vol. 37, nr. 1, pp. 33-43, 1997.
- [34] T. De Ryck, C. Grootaert, L. Jaspert, M. F. Kerckhof, M. Van Gele, J. De Schrijver, P. Van Den Abbeele, S. Swift, M. Bracke, T. Van De Wiele en B. Vanhoecke, „Development of an oral mucosa model to study host-microbiome interactions during wound healing,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, nr. 98, pp. 6831-6846, 2014.
- [35] T. De Ryck, E. Vanlancker, C. Grootaert, B. I. Roman, L. M. De Coen, I. Vandenberghe, C. V. Stevens, M. Bracke, T. Van de Wiele en B. Vanhoecke, „Microbial inhibition of oral epithelial wound recovery: potential role for quorum sensing molecules?,” *AMB Express*, nr. 27, pp. 1-12, 2015.
- [36] L. Häkkinen, V. J. Uitto en H. Larjava, „Cell biology of gingival wound healing,” *Periodontology*, nr. 24, pp. 127-152, 2000.
- [37] J. Donnelly, L. Bellm, J. Epstein, S. T. Sonis en P. R. Symonds, „Antimicrobial therapy to prevent or treat oral mucositis.,” *The Lancet infectious diseases*, vol. 3, pp. 405-412, 2003.

- [38] R. B. Sartor, „Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: Antibiotics, probiotics, and prebiotics.,” *Gastroenterology*, vol. 6, nr. 126, pp. 1620-16300, 2004.
- [39] H. T. Rupniak, E. B. Rowlatt, J. G. Lane, L. K. Steele, B. Trejdosiewicz, S. Laskiewicz, Povey en B. T. Hill, „Characteristics of 4 human cell-lines derived from squamous-cell carcinomas of the head and neck,” *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 75, nr. 4, pp. 621-635, 1985.
- [40] J. M. Joulia, F. Pinguet, M. Ychou, J. Duffour, C. Astre en F. Bressolle, „Plasma and salivary pharmacokinetics of 5-fluorouracil (5-FU) in patients with metastatic colorectal cancer receiving 5-FU bolus plus continuous infusion with high-dose folinic acid,” *European journal of cancer*, vol. 35, nr. 2, pp. 296-301, 1999.
- [41] M. F. Berney, F. Hammes, F. Bosshard, H. U. Weilenmann en T. Egli, „Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD 356 BacLight kit in combination with flow cytometry,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, nr. 10, pp. 3283-3290, 2007.
- [42] J. J. Napeñas, M. T. Brennan, F. K. Bahrani-Mougeot, P. C. Fox en P. B. Lockhart, „Relationship between mucositis and changes in oral microflora during cancer chemotherapy,” *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, vol. 103, nr. 1, pp. 48-59, 2007.
- [43] T. S. Gunasekera, P. V. Atfield en D. A. Veal, „A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of fungal spores in the atmosphere,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, nr. 3, pp. 1228-1232, 2000.
- [44] E. Vanlancker, B. Vanhoecke, R. Smet, R. Props en T. Van de Wiele, „5-Fluorouracil sensitivity varies among oral microorganisms (in voorbereiding)”.
- [45] R. Edwards en K. G. Harding, „Bacteria and wound healing,” *Opinion in Infectious Diseases*, vol. 17, nr. 2, pp. 91-96, 2004.
- [46] L. D. Prisciandaro, M. S. Geier, R. N. Butler, A. G. Cummins en G. S. Howarth, „Evidence supporting the use of probiotics for the prevention and treatment of chemotherapy-induced intestinal mucositis.,” *Critical reviews in food science and nutrition*, vol. 3, nr. 51, pp. 239-247, 2011.
- [47] E. B. Rubenstein, D. E. Peterson, M. Schubert, D. Keefe, D. McGuire, J. Epstein, L. S. Elting, P. C. Fox, C. Cooksley en S. T. Sonis, „Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis,” *Cancer*, nr. 100, pp. 2026-2046, 2004.
- [48] Fluoruracil.Lexicomp Online, „Fluorouracil,” Chemocare, 11 september 2015. [Online]. Available: <http://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/fluorouracil.aspx>.
- [49] G. D. M. G. Lima, M. C. Severo, G. D. F. Santana-Melo, M. A. Carvalho, M. D. G. Vilela-Goulart, M. A. C. Salgado en M. F. Gomes, „Amniotic membrane as a biological dressing for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in rats,” *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, nr. 44, pp. 845-851, 2015.
- [50] S. T. Sonis, „The pathobiology of mucositis,” *Nature Reviews Cancer*, nr. 4, pp. 277-284, 2004.
- [51] S. Poppert, D. Nickel, A. Berger, T. Yildiz, N. Kaestner, S. Mauerer en B. Spellerberg, „Rapid identification of beta-hemolytic streptococci by fluorescence in situ hybridization (FISH),” *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 6, pp. 421-426, 2009.