

# Voorwoord

Aan de Katholieke Hogeschool Limburg bestaat het tweede semester voor alle laatstejaarsstudenten Biochemie uit een praktische proef. Vijftien weken heb ik stage gelopen bij de Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek (VITO). Ik ben het Onderzoeksteam Toxicologie binnen de Unit milieurisico en gezondheid zeer dankbaar om mij deze kans te geven. Met beide voeten stond ik in het bedrijfsleven. Op die manier heb ik zelf kunnen ontdekken hoe het eraan toegaat op de werkvloer.

Op een relatief korte tijd heb ik veel bijgeleerd, het waren soms lange dagen en niet alles lukte van de eerste keer, maar deze ervaring is zeker een verrijking.

Omdat je bij zulke opdracht nood hebt aan veel mensen die je helpen en steunen om uiteindelijk een degelijk en goed gestructureerd eindwerk af te leveren, maak ik graag van de gelegenheid gebruik om een aantal mensen te danken.

In de eerste plaats dr. Rosette Van Den Heuvel om het project in goede banen te leiden en ervoor te zorgen dat ik het overzicht bewaarde door regelmatig verslag uit te brengen. Ook voor het nalezen van dit eindwerk wil ik haar bedanken.

Speciale dank aan mijn begeleider dr. Jef Hooyberghs om een verhelderend beeld te schetsen over statistiek en me te helpen om dit eindwerk tot een mooi resultaat te brengen.

Ik zou nog een woordje van dank willen brengen aan diegenen die me het reilen en zeilen in het labo hebben aangeleerd.

Daniëlla Ooms, bedankt om de eerste weken zoveel tijd in mij te investeren om de kneepjes van het vak aan te leren. Je goede begeleiding heeft van mij een betere laborante gemaakt.

Nathalie Lambrechts, ook al had je andere studenten die je moest begeleiden, toch kon ook ik met al mijn vragen bij jou terecht en was je steeds bereid om een helpende hand toe te steken.

Karen Hollanders en Hilde Leppens wil ik ook nog bedanken omdat ik ook bij hun altijd terecht kon met mijn vragen.

Voorts zou ik de medestagiaires willen bedanken voor de aangename sfeer.

Mijn schoolpromotor ir. Maria Frederix wil ik bedanken om haar raad en het lezen van dit stagerapport.

Tenslotte zou ik mijn familie, vrienden en kotgenoten willen bedanken voor hun geduld, hun raad en steun gedurende het afgelopen half jaar.

**Chiara Destino**

**juni 2009**

# Inhoudstafel

Voorwoord.....	1
Inhoudstafel .....	2
Lijst van figuren .....	4
Lijst van tabellen.....	5
Lijst met afkortingen.....	6
Abstract.....	7
Inleiding.....	8
1 Allergische contactdermatitis .....	9
1.1 Algemeen .....	9
1.2 Epidemiologie.....	9
1.3 Pathogenese.....	10
1.3.1 Sensitizatie .....	10
1.3.2 Elicitatiefase .....	11
1.4 Testen voor allergische contactdermatitis.....	12
1.4.1 <i>In vivo</i> testen.....	12
1.4.2 <i>In vitro</i> testen.....	13
2 VITOSENS <sup>®</sup> .....	15
2.1 Classificatiemodel.....	15
2.2 Het principe van de VITOSENS <sup>®</sup> .....	15
2.3 Model op basis van THP-1 cellijn .....	16
2.4 Belang van cryopreservatie en cytotoxiciteitstest .....	17
3 Cytotoxiciteitstest .....	18
3.1 AlamarBlue <sup>™</sup> .....	18
3.2 Propidiumjodide .....	18
3.3 Overzicht van de gebruikte methoden .....	19
4 Materiaal en methoden.....	20
4.1 <i>In vitro</i> cultuur van dendritische cellen .....	20
4.1.1 Isolatie van mononucleaire cellen .....	20
4.1.2 Magnetische labeling van CD34 <sup>+</sup> stamcellen.....	22
4.1.3 Magnetische isolatie van CD34 <sup>+</sup> stamcellen.....	24
4.1.4 In cultuur brengen van CD34 <sup>+</sup> progenitorcellen .....	25
4.2 Cryopreservatie van CD34 <sup>+</sup> stamcellen .....	27
4.2.1 Invriesprocedure .....	27
4.2.2 Ontdooiprocedure .....	28
4.3 Fenotypering.....	29
4.4 Bepaling van de cytotoxiciteit .....	31
4.4.1 Testchemicaliën .....	31
4.4.2 Tot stand komen van IC20 .....	32
4.4.3 AlamarBlue <sup>™</sup> .....	33
4.4.4 Propidiumjodide .....	34
4.4.5 Statistische berekeningen .....	37
5 Resultaten.....	39
5.1 Analyse: AlamarBlue <sup>™</sup> versus Propidiumjodide .....	39
5.1.1 AlamarBlue <sup>™</sup> en Propidiumjodide: non-cryopreservatie .....	41
5.1.2 AlamarBlue <sup>™</sup> en Propidiumjodide na cryopreservatie.....	42
5.2 Non-cryopreservatie versus cryopreservatie .....	44
5.2.1 AlamarBlue <sup>™</sup> .....	44
5.2.2 Propidiumjodide .....	45
6 Besluit .....	47

7	Bibliografie.....	48
7.1	Artikels.....	48
7.2	Elektronische bronnen .....	49

## Lijst van figuren

Figuur 1: Schematische voorstelling van de sensitizatiefase.....	11
Figuur 2: Schematische voorstelling van de elicitatiefase. ....	12
Figuur 3: Afbeelding van dendritische cellen.....	16
Figuur 4: Schematisch overzicht van de gebruikte methoden.....	19
Figuur 5: Uitzicht voor centrifugeren.....	21
Figuur 6: Uitzicht na centrifugeren.....	21
Figuur 7: NucleoCounter™ (links) en NucleoCassette™ (rechts) ( <a href="http://www.chemometec.com/sw2490.asp">http://www.chemometec.com/sw2490.asp</a> ). ....	23
Figuur 8: Werking van PI.....	23
Figuur 9: MidiMACS™ Separation Unit vastgemaakt op een MACS® MultiStand met een LS kolom ( <a href="http://www.miltenyibiotec.com/en/PG_124_182_MidiMACS_Separator.aspx">http://www.miltenyibiotec.com/en/PG_124_182_MidiMACS_Separator.aspx</a> ). .....	25
Figuur 10: Structuurformule van DNFB. ....	31
Figuur 11: Structuurformule van Formaldehyde. ....	31
Figuur 12: Structuurformule van HQ.....	31
Figuur 13: Structuurformule van ZnSO <sub>4</sub> . ....	31
Figuur 14: Cytotoxiciteitscurve van ZnSO <sub>4</sub> geanalyseerd met AB. ....	33
Figuur 15: Scatterplot ZnSO <sub>4</sub> van de negatieve controle.....	36
Figuur 16: Histogram ZnSO <sub>4</sub> van de negatieve controle. ....	36
Figuur 17: Scatterplot ZnSO <sub>4</sub> met concentratie 8000 µM.....	37
Figuur 18: Histogram ZnSO <sub>4</sub> met concentratie 8000 µM.....	37
Figuur 19: Overzicht DC-culturen van ZnSO <sub>4</sub> (non-cryo): AlamarBlue™.....	40
Figuur 20: Overzicht DC-culturen van ZnSO <sub>4</sub> (non-cryo): Propidiumjodide.....	40

## Lijst van tabellen

Tabel 1: Overzicht van enkele oorzaken van ACD in bepaalde beroepssectoren. ....	9
Tabel 2: Blootstelling aan DNFB: AB versus PI: non-cryopreservatie. ....	41
Tabel 3: Blootstelling aan formaldehyde: AB versus PI: non-cryopreservatie. ....	41
Tabel 4: Blootstelling aan HQ: AB versus PI: non-cryopreservatie. ....	41
Tabel 5: Blootstelling aan ZnSO <sub>4</sub> : AB versus PI: non-cryopreservatie. ....	41
Tabel 6: Samenvatting van de teststoffen: AB versus PI: non-cryopreservatie. ....	42
Tabel 7: Blootstelling aan DNFB: AB versus PI na cryopreservatie. ....	42
Tabel 8: Blootstelling aan formaldehyde: AB versus PI na cryopreservatie. ....	42
Tabel 9: Blootstelling aan HQ: AB versus PI na cryopreservatie. ....	42
Tabel 10: Blootstelling aan ZnSO <sub>4</sub> : AB versus PI na cryopreservatie. ....	43
Tabel 11: Samenvatting van de teststoffen: AB versus PI na cryopreservatie. ....	43
Tabel 12: Blootstelling aan DNFB met AB. ....	44
Tabel 13: Blootstelling aan formaldehyde met AB. ....	44
Tabel 14: Blootstelling aan HQ met AB. ....	44
Tabel 15: Blootstelling aan ZnSO <sub>4</sub> met AB. ....	45
Tabel 16: Samenvatting van de teststoffen: non-cryopreservatie versus cryopreservatie met AB. ....	45
Tabel 17: Blootstelling aan DNFB met PI. ....	45
Tabel 18: Blootstelling aan formaldehyde met PI. ....	45
Tabel 19: Blootstelling aan HQ met PI. ....	46
Tabel 20: Blootstelling aan ZnSO <sub>4</sub> met PI. ....	46
Tabel 21: Samenvatting van de teststoffen: non-cryopreservatie versus cryopreservatie met PI. ....	46

## Lijst met afkortingen

AB	AlamarBlue™
ACD	Allergische contactdermatitis
APC	Antigeenpresenterende cel
CD	Cluster Designation
DC	Dendritische cel
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	DesoxyriboNucleic Acid - Desoxyribonucleïnezuur
DNFB	1-fluoro-2,4-dinitrobenzeen
EC20	Effect concentratie van 20 %
FCA	Freund's Complete Adjuvant
FSC	Forward scatter – Voorwaartse lichtverstrooiing
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPMT	Guinea Pig Maximization Test
h-CLAT	human Cell Line Activation Test
HQ	Hydroquinone
IC20	Inhibitie concentratie van 20 %
ICD	Irriterende contactdermatitis
IDC	Interdigiterende cellen
IFN	Interferon
IL	Interleukine
LC	Langerhanscel
LLNA	Mouse Local Lymph Node Assay
MACS	Magnetic Activated Cell Separation
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNC	Mononucleaire cellen
NiSO <sub>4</sub>	Nikkelsulfaat
PI	Propidiumjodide
rpm	Revolutions per minute – Toeren per minuut
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
SC	Stamcellen
SCF	Stemcell Factor – Stamcel factor
SD	Standaarddeviatie
SSC	Sideward scatter – Zijwaartse lichtverstrooiing
THP-1	Human monocytic leukemia cell line
TNF	Tumor Necrosis Factor
WWB	Warmwaterbad
ZnSO <sub>4</sub>	Zinksulfaat

---

## Abstract

Eén van de onderzoeksthema's binnen VITO (Vlaamse Instelling voor Technologisch Onderzoek) is de ontwikkeling van nieuwe toxicologische *in vitro* technologieën voor het klasseren van toxische stoffen. Een belangrijk toxicologisch eindpunt dat op VITO bestudeerd wordt, is huidsensitizatie. Momenteel wordt er intensief gewerkt aan een nieuwe *in vitro* test: de VITOLENS<sup>®</sup>. De test stelt dendritische cellen (DC), afgeleid van CD34<sup>+</sup> stamcellen uit humaan navelstrengbloed, *in vitro* bloot aan een bepaalde concentratie van de chemische teststof. De respons van de DC wordt gemeten op het niveau van genexpressie en laat toe te voorspellen of de teststof al dan niet een allergene werking heeft.

Een belangrijk onderdeel van de test bestaat uit een cytotoxiciteitstest om de geschikte blootstellingsconcentratie te bepalen. Hiervoor kunnen twee assays worden gebruikt: AlamarBlue<sup>™</sup> (AB) en Propidiumjodide (PI). Tot op heden werd alleen gebruik gemaakt van de AB test in functie van de VITOLENS<sup>®</sup> test. Omdat men van AB wenst over te schakelen naar PI is een vergelijkende studie noodzakelijk wat tevens de eerste doelstelling van deze thesis is. Een tweede doelstelling is nagaan of gecryopreserveerde CD34<sup>+</sup> stamcellen eveneens gebruikt kunnen worden. Belangrijk in deze toepassing is dat de CD34<sup>+</sup> stamcellen nog differentieerbaar zijn tot DC die biologisch vergelijkbaar blijven met verse DC.

De experimenten tonen geen significant effect ten gevolge van cryopreservatie maar wel een significant verschil tussen AB en PI, wat niet onverwachts is gezien het verschillende meetprincipe: AB meet inhibitie van de metabolische activiteit terwijl PI inhibitie van viabiliteit bepaalt.

---

## Inleiding

Deze thesis kadert in het onderzoek naar dierproefvervangende toxicologische testen dat sinds een aantal jaren een extra impuls heeft gekregen door de veranderde Europese wetgeving. Zo is er het REACH beleid van de Europese Unie (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals) dat op 1 juni 2007 in werking is getreden met als doel het beter beschermen van mens en omgeving tegen de risico's van chemische stoffen. Volgens REACH moeten chemicaliën die in de Europese Unie in gebruik worden genomen of in gebruik zijn, getest worden op een set van mogelijke risico's. Dit betekent dat er in de komende jaren een sterk verhoogde nood is aan toxicologische testen. Een belangrijk toxicologisch eindpunt dat beoogd wordt in het REACH beleid is huidsensitizatie of allergische contactdermatitis. De toxicologische evaluatie hiervan is momenteel geheel afhankelijk van *in vivo* dierproeven en de implementatie van REACH zou op basis van deze testen nog honderdduizenden dieren vergen. Naast de wetgeving voor de chemicaliën is er ook nog het 7<sup>de</sup> amendement aan de EU Cosmetics Richtlijn dat een handelsverbod oplegt voor cosmetische producten die getest zijn op dieren. Voor huidsensitizatie gaat dit verbod vanaf 2009 in voor zowel afgewerkte cosmetische producten als ingrediënten ervan. Om de ethische en economische gevolgen van deze reguleringen op te vangen stimuleert het Europees beleid dan ook sterk de ontwikkeling van alternatieve (dierproefvervangende) testen.

In de onderzoeksgroep milieutoxicologie van de Vlaamse Instelling voor Technologische Onderzoek (VITO) wordt gewerkt aan een mogelijke *in vitro* test voor huidsensitizatie, de zogenaamde VITOLENS<sup>®</sup>. Deze test maakt gebruik van dendritische cellen (DC) afgeleid van CD34<sup>+</sup> stamcellen uit humaan navelstrengbloed. De DC worden *in vitro* blootgesteld aan de chemische teststof en de respons van de cellen hierop wordt gemeten op niveau van genexpressie; sensitizerende stoffen blijken een herkenbaar genexpressiepatroon te induceren. Belangrijk hierbij is dat de blootstelling gebeurt aan een concentratie die een goed immunologisch effect induceert, deze concentratie wordt bepaald met een cytotoxiciteitstest. Het eerste doel van deze thesis was het vergelijken van twee verschillende cytotoxiciteitstesten: AlamarBlue<sup>™</sup> (AB) en Propidiumjodide (PI) staining. Tot op heden werd AB gebruikt, maar omdat men wenst over te schakelen op PI was een vergelijkende studie noodzakelijk.

Omdat het bekomen van DC afhankelijk is van de frequentie van aanlevering van navelstrengbloed door het ziekenhuis, was de tweede doelstelling van dit onderzoek nagaan of het invriezen en ontdooien van CD34<sup>+</sup> stamcellen mogelijk is voor deze toepassing. Hierbij is van belang dat CD34<sup>+</sup> stamcellen na cryopreservatie nog differentieerbaar zijn tot DC die biologisch vergelijkbaar blijven met DC afkomstig van niet gecryopreserveerde stamcellen.

Met dit eindwerk hoop ik een bijdrage te leveren in de zoektocht naar een volwaardige *in vitro* test zodat de VITOLENS<sup>®</sup> kan bijdragen aan een toekomst met dierproefvrije onderzoeken.



# 1 Allergische contactdermatitis

## 1.1 Algemeen

Allergische contactdermatitis (ACD) of contact sensitizatie is een veelvoorkomende huidaandoening van de epidermis en/of dermis na blootstelling aan een allergeen. De inflammatoire aandoening wordt vaak veroorzaakt doordat kleine-moleculaire substanties via het huidoppervlak of van binnenuit in de huid terecht komen en contactallergische reacties verwekken (Pentinga & Rustemeyer, 2008).

Nadat de huid wordt blootgesteld aan een chemische stof kan dit naast ACD ook een ICD (irriterende contactdermatitis) uitlokken. ICD onderscheidt zich van ACD doordat bij ICD er reeds na het eerste contact, met de irriterende stof, lokaal een cytotoxisch effect ontstaat zonder de tussenkomst van lymfocyten (Staquet et al., 2004). In tegenstelling tot ICD zal ACD, dat behoort tot type IV van de overgevoeligheidsreacties, een T-celgemedieerde allergische reactie uitlokken na herhaaldelijke blootstellingen (dos Santos et al., 2009).

## 1.2 Epidemiologie

Huidsensitizatie treft ongeveer 7 % van de hele bevolking en is één van de meest frequent waargenomen klinische dermatose in de geïndustrialiseerde samenleving (Schoeters, 2007). ACD kan veralgemeend voorkomen bij systematische blootstelling aan het allergisch product, via inhalatie of via transcutane absorptie, maar kan ook zeer gelokaliseerd zijn in bepaalde beroepstakken. Zo zullen kappers en verplegers vaker blootgesteld worden aan allerlei irriterende en allergische stoffen. Vooral vrouwen lopen een hoger risico om een allergie te ontwikkelen omdat zij in grotere maten te werk gesteld zijn in de gezondheidszorg, schoonmaaksector, horeca, ... . Bovendien ontwikkelen als maar meer vrouwen in West-Europa een allergie tegen de geurstoffen in cosmetische producten en zou vijftien procent van alle vrouwen allergisch zijn voor nikkel, dat gebruikt wordt in fantasiejuwelen (Universitair Ziekenhuis Antwerpen, 2006). Onderstaande tabel geeft een overzicht van de enkele oorzaken van ACD in bepaalde beroepssectoren (Nederlandse Vereniging voor Dermatologie en Venereologie).

**Tabel 1: Overzicht van enkele oorzaken van ACD in bepaalde beroepssectoren.**

Sector	Contactallergenen
Kledingindustrie	Kunstzijde (zinksulfaat)
Schilders	Stabilisator voor verf en vernis (hydroquinone)
Horeca	Reinigingsmiddelen Sigarettenrook (formaldehyde)
Gezondheidszorg	Rubber handschoenen (latex)
Cosmetica	Huidcrème (hydroquinone) Deodorant (eugenol)
Kappers	Haarverf Permanentvloeistof

Het huidbeeld van ACD is afhankelijk van verschillende factoren. Zo spelen de duur, de frequentie en de intensiteit van de blootstelling aan een chemische stof een grote rol bij het verwekken van een allergie (Fonds voor beroepziekten). Eén van de huidsymptomen bij

allergie is eczeem. Contactallergisch eczeem ontstaat doordat er na het eerste contact met de allergische stof sensitizatie optreedt waarbij het afweersysteem de mogelijkheid ontwikkeld om met het allergeen te reageren. Slechts na een volgend, al dan niet meermaals, contact met dezelfde of een verwante stof is eczeemvorming mogelijk. Kenmerkend voor een contactallergie is het optreden van jeuk en als gevolg van het krabben kan de huid oppervlakte beschadiging oplopen dat het klinisch beeld van ACD beïnvloedt.

## 1.3 Pathogenese

### 1.3.1 Sensitizatie

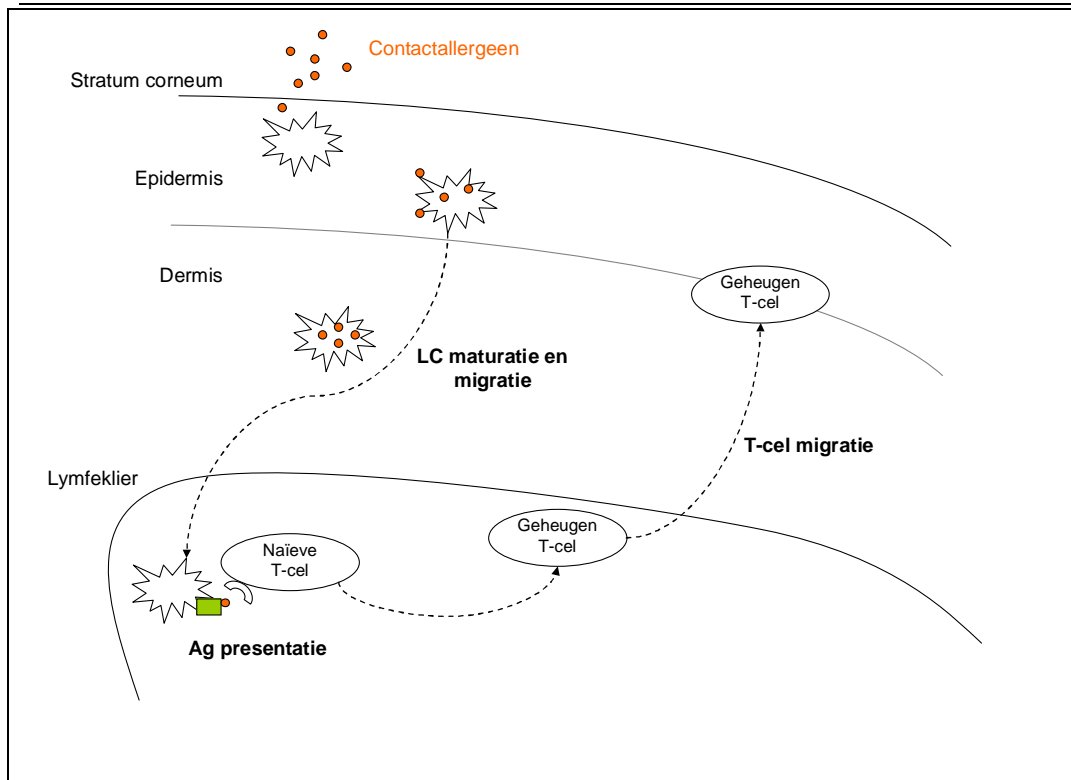
Nadat het eerste contact met het allergeen en de huid heeft plaatsgevonden, treedt er sensitizatie op (zie Figuur 1). Tijdens deze inductiefase heeft het contactallergeen voor het eerst het stratum corneum kunnen penetreren en komt het zo in aanraking met de antigeen presenterende cellen (APC) in de huid, namelijk de Langerhanscel (LC) die zich in de suprabasale epidermis bevindt. Van zodra allergenen de huid binnendringen bestaat de functie van LC erin om de indringers te herkennen, op te nemen en vervolgens te transporteren naar de paracortex van een regionale lymfeklier via afferente lymfebanen. Daar worden ze omringd met T-cellen en kunnen vanaf dat moment interdigiterende cellen (IDC's) genoemd worden. IDC's vertonen veel Major Histocompatibility Complex (MHC) klasse II moleculen, wat belangrijk is bij de presentatie van antigenen aan T-cellen.

Specifieke structuren van het contactallergeen worden via MHC klasse I- en II-receptoren gepresenteerd aan het LC-oppervlak. Door interactie met antigene epitopen en vrijkomende cytokines start de maturatie en de migratie van de LC. De cytokines zoals interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-18, IL10 en tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) zouden een regulerende rol spelen in deze maturatie en migratie (dos Santos et al., 2009).

Eens de regionale lymfeklier is bereikt, vindt er contact plaatst tussen het epitooop en de naïeve T-cel, indien deze laatste geschikte T-celreceptoren draagt. In aanwezigheid van voldoende stimulerende factoren kan de naïve T-cel geactiveerd worden en effector- en geheugen- T-cellen met dezelfde T-celreceptoren aanmaken.

Door deze activiteiten kan de lymfeklier tijdelijk uitzetten, wat voor de patiënt het enige waarneembare teken kan zijn van de sensitizatie.

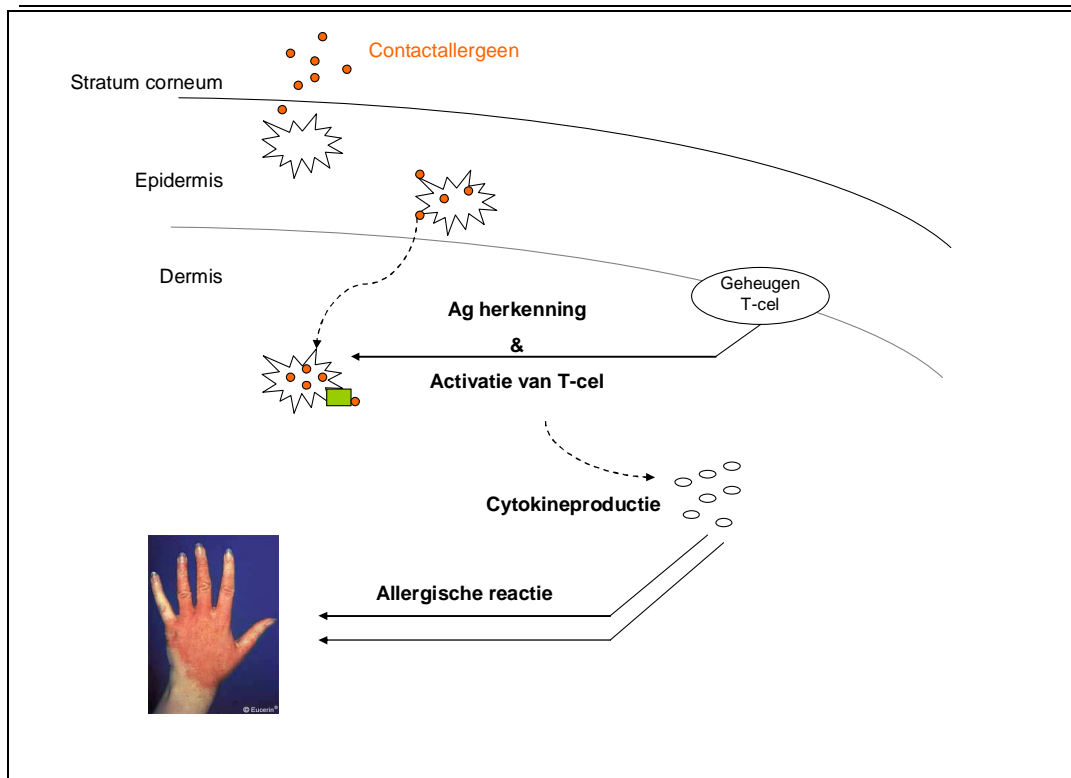
Zeven à tien dagen later komen de effector T-cellen vrij in de circulatie en verplaatsen ze zich via bloed en lymfe naar ander weefsel, vanaf dat moment is de inductiefase afgerond en blijft deze levenslang aanwezig (Ryan et al., 2001, 2007).



**Figuur 1: Schematische voorstelling van de sensitizatiefase.**

### 1.3.2 Elicitatiefase

Als de sensitizatie volledig heeft plaats gevonden treedt er bij hernieuwd contact met het contactallergeen de elicitatiefase op (zie Figuur 2). Tijdens deze elicitatiefase reageren de geheugen- en effector T-cellen onmiddellijk met de antigene epitopen van het contactallergeen op het membraan van de LC via hun specifieke T-celreceptoren. Wanneer de gevormde cellen geactiveerd worden, scheiden ze inflammatoire cytokines uit waaronder interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Hierdoor ontstaat een dermaal ontstekingsinfiltraat en deze reactie is vaak pas 24 of 72 uur na blootstelling aan het contactallergeen merkbaar op de huid. Na het verbreken van de blootstelling neemt de reactie geleidelijk af en geneest de huid (dos Santos et al., 2009; Ryan et al., 2001).



**Figuur 2:** Schematische voorstelling van de elicitatiefase.

## 1.4 Testen voor allergische contactdermatitis

Tot op heden is er geen *in vitro* test beschikbaar of algemeen aanvaard om chemicaliën te classificeren als sensitiserend. *In vivo* testen vergen nog steeds een aanzienlijk aantal proefdieren en dus blijft de vraag naar *in vitro* alternatieven zeer groot. Hieronder worden enkele *in vivo* en *in vitro* testen besproken.

### 1.4.1 *In vivo* testen

#### Guinea Pig Maximization Test (GPMT)

De GPMT wordt beschouwd als een gevoelige procedure en heeft meer dan 25 jaar een hoofdrol gespeeld in de evaluatie van potentiële huidsensitiserende stoffen. Een studie die deze test vergeleek met de Buehler test en LLNA heeft aangetoond dat de GPMT het meest gevoelig is, hoewel er meerdere vergelijkingen nodig zijn. De gevoeligheid kan verklaard worden doordat de testsubstantie intradermaal toegediend wordt en omdat er gebruik gemaakt wordt van het Freund's Complete Adjuvant (FCA). Immunologische adjuvantia, zoals het FCA, zijn stoffen die met het antigeen gemengd worden of gelijktijdig mee worden ingespoten en die een vergroting van het immunologisch respons tot gevolg hebben (Raymaekers, 2007).

In deze test wordt de cavia intradermaal ingespoten met een volume FCA en een volume testsubstantie met en zonder FCA. Indien de testsubstantie na een week geen lokale irritatie vertoont, wordt de plaatst van inspuiting gedurende 48 uur afgedekt met een pleister die 24 uur voor gebruik behandeld werd met natriumdodecylsulfaat en 10 % vaseline.

Twee weken na de inductie wordt er gedurende 24 uur een gesloten "patch" test uitgevoerd met een niet-irriterende concentratie van de testsubstanties. De reacties zijn meestal

ingedeeld in twee tot drie herhalingen met tussenpozen van 24 uur. De interpretatie van deze test wordt uitgevoerd aan de hand van de Magnusson en Kligman schaal (Andersen & Frankild, 1997).

#### Buehler test

De Buehler test maakt gebruik van een pleister waarlangs de testsubstantie wordt toegevoegd om zo de cavia bloot te stellen aan de teststof. Deze inductiefase en de daaropvolgende incubatieperiode nemen drie weken in beslag. Nadien wordt de cavia opnieuw blootgesteld aan de teststof om na te gaan of er sensitizatie is opgetreden. De 'patch' test wordt beoordeeld met een puntensysteem dat gaat van niet sensitizerend naar zwak sensitizerend tot sterk sensitizerend. Een humane variant hiervan is de Human Repeated Insult Patch Test (HRIPT'-s) (Andersen & Frankild, 1997).

#### Mouse local lymph node assay (LLNA)

LLNA is de meest gebruikte en meest geschikte test om sensitizerende stoffen te onderscheiden van niet sensitizerende sinds het einde van de jaren '90. Terwijl bij de Buehler test het allergisch vermogen van een chemische stof na de elicitatiefase wordt gemeten, gaat LLNA dit reeds na tijdens de inductiefase (Kimber et al., 2002; Gerberick et al., 2005). De test is gebaseerd op de eigenschap dat sensitizerende stoffen proliferatie van lymfocyten in de lymfeklieren veroorzaken. De muis wordt bij deze test gedurende drie dagen blootgesteld aan verschillende testconcentraties. Om na te gaan of er sensitizatie is opgetreden wordt er op dag vier radioactief gelabelde thymidine in de staartader gespoten. Vijf uur na blootstelling wordt de muis gedood en worden de lymfeklieren geïsoleerd. Omdat het gelabelde thymidine geïncorporeerd wordt in het DNA van de lymfocyten tijdens de proliferatie zal de gemeten radioactiviteit een maat zijn voor het aantal geprofileerde lymfocyten. Indien één of meer concentraties een drievoudige verhoging van de lymfocyten veroorzaakt wordt de LLNA beschouwd als zijnde positief (Andersen & Frankild, 1997). De concentratie die deze drievoudige verhoging veroorzaakt noemt men de Effect Concentratie waarde (EC3-waarde) en deze wordt bepaald aan de hand van de dosisrespons door gebruik te maken van lineaire interpolatie. De EC3-waarden kunnen gebruikt worden als basis voor kwantitatieve risico schatting want des te lager de EC3-waarde van een stof, des te groter het sensitizerend potentieel (Hooyberghs et al., 2008).

## **1.4.2 *In vitro* testen**

Het onderzoek naar *in vitro* alternatieven voor huidsensitizatie is vooral gebaseerd op het gebruik van gespecialiseerde cellen, namelijk antigeenpresenterende cellen zoals LC, als celmodel. Deze cellen zijn, zoals eerder besproken, betrokken bij de eerste fase van het sensitizatieproces waarbij een antigeen gecapteerd, verwerkt en gepresenteerd wordt aan T-cellen via membraanreceptoren. Omdat LC in geringe mate in de huid voorkomen (1-4 %) en dus in onvoldoende aantallen te isoleren zijn, worden dendritische cellen (DC), gekweekt uit stamcellen aanwezig in menselijk bloed, beschouwd als een waardig alternatief. Dendritische cellen zijn de belangrijkste APC in het lichaam. *In vitro* werd aangetoond dat ze in staat zijn om sensitizers te onderscheiden van non-sensitizers (Hooyberghs et al., 2008).

Er zijn twee verschillende bronnen van humane cellen om een *in vitro* methode te ontwikkelen gebaseerd op dendritische cellen. Als eerst zijn er de DC die afkomstig zijn van progenitorcellen uit vers bloed en als tweede de DC-like cellijnen. Deze laatste zijn onafhankelijk van de donor omdat een cellijn afkomstig is van een enkele donor, anderzijds

zijn cellijnen echter minder fysiologisch relevant dan donorafgeleide DC (dos Santos et al., 2009).

#### Dendritische cellen afgeleid van progenitorcellen uit humaan bloed

Twee vaak gebruikte bronnen van humane bloedcellen, om DC te verkrijgen, zijn CD14<sup>+</sup> monocyten gewonnen uit perifere bloed en CD34<sup>+</sup> progenitorcellen gehaald uit navelstrengbloed of beenmerg. Voor beide celtypes geldt dat het transport van vers bloed naar het laboratorium, het complexe en tijdrovende protocol om DC te bekomen en de donorvariabiliteit het opstellen van een standaard procedure bemoeilijkt.

Monocyt-afgeleide DC worden verkregen door CD14<sup>+</sup> monocyten in cultuur te brengen met GM-CSF en IL-4 gedurende 6 dagen en brengen volgende oppervlaktemerkers tot expressie; CD14, CD1a, MHC klasse II, CD40, CD80 en CD86.

CD34<sup>+</sup> progenitorcellen kunnen tot verschillende celtypes differentiëren afhankelijk van de stimuli. In aanwezigheid van GM-CSF, SCF, TNF- $\alpha$  en IL-4 differentiëren ze tot DC (dos Santos et al., 2009).

#### DC-like cellijnen

In tegenstelling tot primaire DC, zijn cellijnen gemakkelijk beschikbaar. Dit betekent dat een groot aantal cellen in cultuur gebracht kan worden onder gevalideerde omstandigheden in een korte tijd en dat de experimenten op voorhand gepland kunnen worden. Om een volwaardige kandidaat te zijn voor een *in vitro* test moet een DC-like cellijn fenotypische veranderingen vertonen na blootstelling aan een sensitizer die kenmerkend zijn voor DC maturatie (dos Santos et al., 2009).

#### *Human monocytic leukemia cell line (THP-1)*

THP-1 cellen zijn een voorbeeld van DC-like cellijnen. Het zijn fagocyten die afkomstig zijn uit het perifere bloed van een man met een acute monocytische leukemie. THP-1 werd al vaak gebruikt in vele studies omwille van hun makkelijke kweekmethode.

In hun ongedifferentieerde vorm uiten deze cellen typische monocytische merkergeren zoals CD58<sup>+</sup>. Als de cellen in cultuur gebracht worden met GM-CSF, IL-4 en TNF- $\alpha$  ondergaan ze veranderingen en krijgen daardoor een fenotype gelijkend op dat van DC-afgeleide cellen (dos Santos et al., 2009).

Deze cellijn is gebaseerd op het Japanse 'human Cell Line Activation Test' (h-CLAT) model (Ashikaga et al., 2006). De h-CLAT methode werd ook naar voren geschoven als een potentiële alternatieve test en wordt momenteel gevalideerd in een internationale ringstudie. In deze test, gebaseerd op THP-1 cellen, wordt het sensitizerend vermogen van chemicaliën voorspeld door het meten van de differentiële expressie van CD54 en CD86 op de oppervlakte van THP-1 cellen (Sakaguchi et al., 2006, 2009).

## 2 VITOSENS<sup>®</sup>

### 2.1 Classificatiemodel

Er zijn enkele voorwaarden die in acht genomen moeten worden voor het ontwikkelen van een *in vitro* sensitizatie model. Om een *in vivo* te mogen vervangen door een *in vitro* sensitizatie model moet dit laatste in staat zijn om een sensitizerende stof te onderscheiden van een niet-sensitizerende en dit minstens in dezelfde betrouwbaarheidsgraad als het geval is bij de huidige dierproeven. Hoe dan ook is de evenaring van de *in vivo* situatie het allerbelangrijkst bij het ontwikkelen van een *in vitro* model. Zo moet de antigeenopname, -verwerking, migratie en maturatie van LC in overweging genomen worden bij de ontwikkeling (dos Santos et al., 2009). Het is van groot belang dat deze assay efficiënt is en dat de bekomen resultaten betrouwbaar en bruikbaar zijn (Schoeters, 2007).

### 2.2 Het principe van de VITOSENS<sup>®</sup>

VITO is volop bezig met het ontwikkelen van een *in vitro* classificatiemodel dat een onderscheid kan maken tussen niet-sensitizerende (irriterende en niet-irriterende stoffen) en allergische stoffen, namelijk de VITOSENS<sup>®</sup> (Hooyberghs et al., 2008). In de zoektocht naar *in vitro* alternatieven werd de aandacht vooral gevestigd op dendritische cellen, deze ondergaan verschillende veranderingen na contact met een allergeen. Eerdere onderzoeken op VITO waren gericht op deze veranderingen (opregulatie van oppervlaktemerkers en productie van inflammatoire cytokines). Deze eindpunten maken echter geen eenduidig onderscheid tussen irriterende en allergische stoffen.

In verder onderzoek werd daarom de focus herlegd naar genexpressie. CD34<sup>+</sup>-DC werden blootgesteld aan vier model allergische stoffen (nikkelsulfaat, dinitrochlorobenzeen, eugenol en oxazolone) en twee irriterende stoffen (natriumdodecylsulfaat en benzalkoniumchloride). Om de genen te kunnen identificeren die differentieel werden beïnvloed na blootstelling aan allergenen werden microarray analyses aangewend. Hieruit werden 119 genen geselecteerd die een basis kunnen vormen voor verder onderzoek naar geschikte specifieke genetische merkers voor sensitizatie.

Een deel van de genen die uit de microarray analyses naar voren kwamen, werd verder op een set van 21 chemicaliën getest op hun vermogen om het onderscheid te maken tussen allergische en niet-allergische stoffen. Omdat het aantal genen werd afgeslankt tot 14, werd real-time RT-PCR gekozen als techniek om het expressieprofiel van de genen te analyseren. Aan de hand van de bekomen resultaten werd een *p*-waarde, een maat voor het discriminerend vermogen van een gen, berekend. In een *in vitro* test zullen de genen met een kleine *p*-waarde het grootste onderscheidend vermogen vertonen.

Vervolgens werden de beste genen gecombineerd tot een classificatiemodel met behulp van een lineaire discriminant analyse. Het voorspellend vermogen van het resulterende model werd met een cross-validatie bepaald en resulteerde in een sensitiviteit (voorspellend vermogen voor positieve stoffen) van 82 % en een specificiteit (voorspellend vermogen voor negatieve stoffen) van 97 % (Hooyberghs et al., 2008).

Uit het voorgaande kan geconcludeerd worden dat CD34<sup>+</sup>-DC een geschikt celmodel is om het sensitizerend vermogen van chemische stoffen na te gaan op niveau van genexpressie.

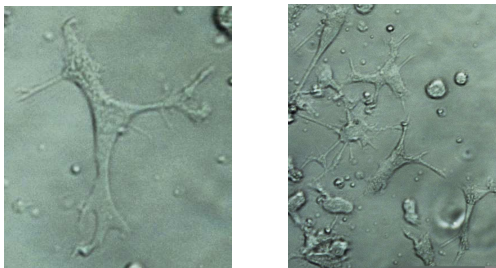
Door middel van microarray analyses is er een set van genen gedefinieerd kunnen worden die specifiek is voor blootstelling aan allergische stoffen en die niet beïnvloed worden na blootstelling aan niet-sensitiserende stoffen. Ook is gebleken dat real-time RT-PCR een geschikte techniek is om op een snelle manier de expressie van een beperkt aantal genen na te gaan.

Om uiteindelijk een classificatiemodel te bekomen dat in staat is om het sensitizerend en irriterend potentieel van stoffen te onderscheiden, moet aan de hand van de genen een hele set chemicaliën getest worden om dan een *in vitro* alternatief op punt te stellen en te valideren.

De VITOSENS<sup>®</sup> methode is gebaseerd op genexpressie metingen na een blootstelling aan de teststof bij een welbepaalde concentratie. Deze concentratie, effect concentratie van 20 % (EC20), moet vooraf bepaald worden met behulp van een cytotoxiciteitsassay. In onderzoek van deze thesis is er gebruik gemaakt van een IC20, inhibitie concentratie van 20 %, omdat de gebruikte meetmethoden een maat voor de inhibitie weergeven (zie 4.4.2 voor meer uitleg). De IC20 geeft weer hoeveel toxische stof er nodig is om een cytotoxiciteit van 20 % te veroorzaken. Er werd gekozen voor een IC20 omdat uit onderzoek is gebleken dat bij deze concentratie de veranderingen van genexpressie na blootstelling aan een sensitizerende stof duidelijk merkbaar zijn en het discriminerend vermogen van de genen optimaal is (Schoeters, 2007).

## 2.3 Model op basis van THP-1 cellijn

Dendritische cellen (zie Figuur 3) spelen een hoofdrol bij het tot stand brengen van een *in vitro* sensitizatie model.



**Figuur 3: Afbeelding van dendritische cellen.**

Zoals eerder vermeld is het isoleren van LC een moeilijke opdracht en omdat DC een nauw verwante werking vertonen aan LC tijdens de sensitizatiefase, zijn deze geschikt om gebruikt te worden in de ontwikkeling van een *in vitro* sensitizatie model. Voorgaande studies toonden aan dat dendritische cellen, afgeleid van humane CD34<sup>+</sup> progenitorcellen afkomstig uit navelstrengbloed, specifieke genen tot expressie brengen na blootstelling aan sensitizerende chemicaliën met een lage molecuulmassa. (Hooyberghs et al., 2008)

Er werd ook nagegaan of de THP-1 cellijn, een menselijke monocyt cellijn die het potentieel heeft om de DC te vervangen, een gelijkaardig discriminerend vermogen had als DC. Uit de resultaten bleek dat deze cellijn een discriminerend potentieel vertoont voor sensitizerende en niet-sensitizerende chemicaliën, alleen vertoonde het DC-model een superieur onderscheidend gedrag (Lambrechts et al., 2009).



## 2.4 Belang van cryopreservatie en cytotoxiciteitstest

In dit onderzoek werd gewerkt met dendritische cellen die afgeleid zijn van CD34<sup>+</sup> stamcellen afkomstig uit navelstrengbloed. Binnen de 24 uur na de bevalling moeten de stamcellen uit het navelstrengbloed geïsoleerd worden om nadien in aanwezigheid van de correcte groeifactoren en cultuurmedium te differentiëren tot dendritische cellen. Het genereren van deze CD34<sup>+</sup> stamcellen is tijdrovend en de hoeveelheid is afhankelijk van de toelevering van het navelstrengbloed. Daarom werd er in dit onderzoek nagegaan of dat DC, afkomstig van gecryopreserveerde CD34<sup>+</sup> stamcellen, eenzelfde cytotoxisch respons geven na blootstelling aan chemische stoffen. Indien deze DC een overeenstemmend resultaat geven aan die DC afkomstig van niet gecryopreserveerde stamcellen, zou dit zowel economisch als praktisch voordelen met zich meebrengen omdat het uitvoeren van de test op voorhand ingepland kan worden en minder afhankelijk is van de tijdstippen van toelevering van navelstrengbloed.

De methode van StemCell Technologies Inc. werd gebruikt om CD34<sup>+</sup> stamcellen in te vriezen omdat deze als beste methode werd beschouwd in voorgaande studies.

Er worden cytotoxiciteitstesten uitgevoerd op DC om aan de hand van de resultaten de concentratie te bepalen waarbij 20 % inhibitie optreedt. Het bepalen van deze concentratie is de eerste en zeer essentiële stap bij de uitvoering van de VITASENS<sup>®</sup> test. De IC20 wordt bepaald door de DC bloot te stellen aan een concentratiereeks van de teststof en door middel van een opgestelde dosisrespons-curve kan de concentratie worden afgelezen die 20 % inhibitie veroorzaakt.

De bepaling van de IC20 kan met verschillende meetmethodes gebeuren zoals Alamar Blue<sup>™</sup> assay en Propidiumjodide assay. In het verleden werd op VITO in deze context vooral gewerkt met Alamar Blue<sup>™</sup> maar men is vooral geïnteresseerd in het vervangen hiervan door Propidiumjodide assay. De reden hiervoor is dat AB kan reageren met de teststof omdat de fluorescente stof rechtstreeks wordt toegevoegd in de wells. Dit probleem wordt bij de PI assay omzeild omdat PI aan de celsuspensie wordt toegevoegd nadat de sensitizerende stof verwijderd is en dus niet meer met de chemische stof kan interfereren. Nog een verschil tussen de twee assays is dat AB de inhibitie van de celmetaboliteit meet, terwijl PI de inhibitie van celviabiliteit weergeeft.

De vergelijking van deze twee assays was dan ook een doelstelling van deze thesis.

## 3 Cytotoxiciteitstest

Cytotoxiciteitstesten worden uitgevoerd om de potentie van een chemische stof om cellen te beschadigen na te gaan. Aan de basis van de cytotoxiciteitstest ligt het feit dat een chemische stof interfereert met de celgroei op een dosisafhankelijke manier. Er bestaan verschillende cytotoxiciteitstesten die ieder een specifiek eindpunt meten, onder andere verandering in metabolische activiteit, membraanintegriteit, schade aan lysosomen, ... . Naast beschadiging van de cellen kunnen chemische stoffen ook celdood veroorzaken. Er bestaan verschillende methodes om de hoeveelheid dode cellen te bepalen.

### 3.1 AlamarBlue<sup>TM</sup>

De AlamarBlue<sup>TM</sup> (AB) assay kan gebruikt worden om de metabolische celactiviteit te meten en op die manier de geteste chemische stoffen te beoordelen op hun vermogen tot celgroei-inhibitie (cytotoxiciteit). Nadat de cellen zijn blootgesteld aan chemicaliën zal de metabolische activiteit van de cel veranderen, inhiberend of stimulerend. Deze verandering kan gedetecteerd worden door de AB assay omdat AB een fluorometrisch/colorimetrisch indicator bevat die gevoelig is voor de metabolische activiteit. Wanneer er reductie plaats vindt van de toxische stof zal de redoxindicator van kleur veranderen en zal er fluorescerende emissie optreden wat de celgroei en celontwikkeling weergeeft. De fluorescentie is zichtbaar bij 530 nm en het emissiespectrum bij 590 nm, deze laatste is de golflengte waarop de meting gebeurt.

### 3.2 Propidiumjodide

Propidiumjodide (PI) assay wordt gebruikt om celdood na te gaan en wordt door sommige onderzoekers ook gebruikt als cytotoxiciteitstest.

PI kan enkel in de cel dringen en zich binden aan DNA indien het celmembraan is aangetast. De fluorescente stof zal zich vestigen tussen DNA-basen zonder enige voorkeurvulgorde. Eens de stof gebonden is aan een nucleïnezuur wordt de fluorescentie van de cellen 20 tot 30 keer versterkt. De fluorometrische detectie gebeurt met behulp van de FACSCalibur flow cytometer (zie 4.4.4.1).

### 3.3 Overzicht van de gebruikte methoden

De verschillende handelingen die werden uitgevoerd tijdens de stageperiode zijn schematisch weergegeven in Figuur 4.

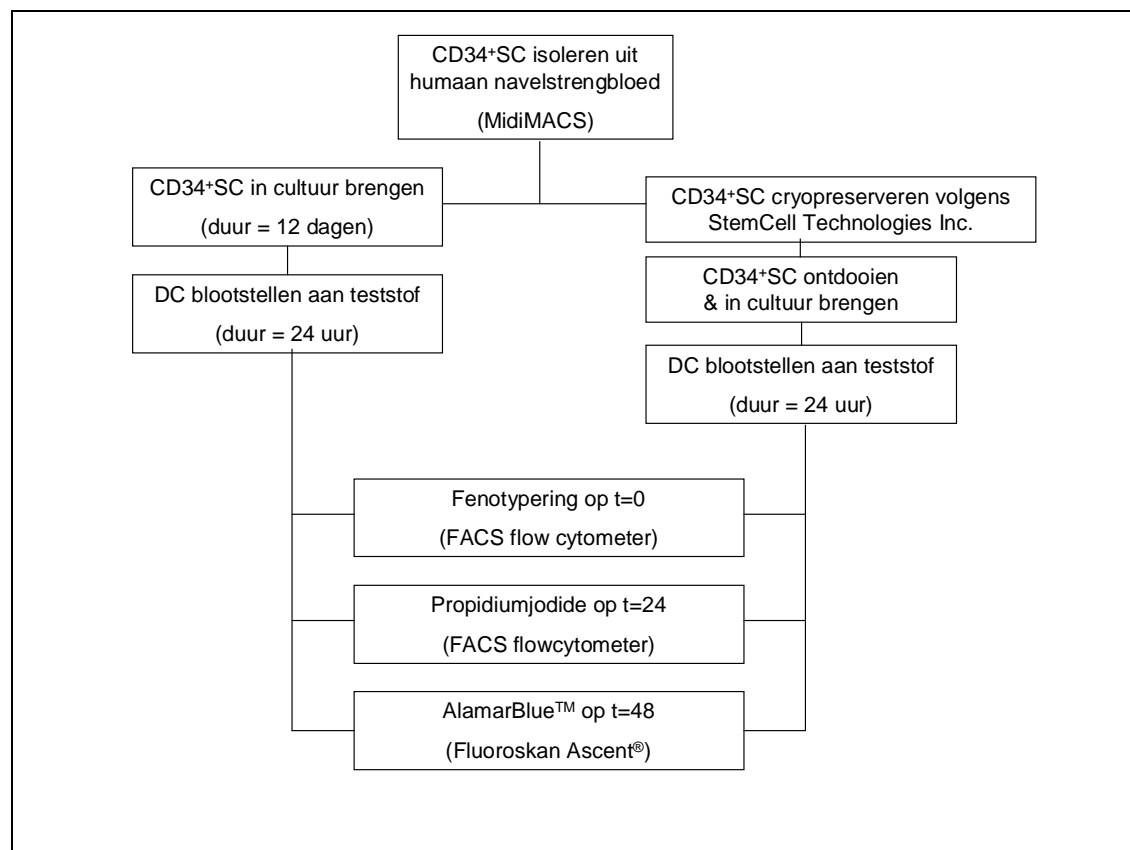
Allereerst moeten de  $CD34^+$  stamcellen (SC) geïsoleerd worden uit humaan navelstrengbloed om deze te laten differentiëren tot dendritische cellen. Dit is een belangrijke stap omdat DC noodzakelijk zijn om de cytotoxiciteitstesten uit te voeren. Niet enkel werd er gewerkt met DC afkomstig van niet ingevroren stamcellen, maar de cytotoxiciteitstest werd ook uitgevoerd op DC die afkomstig waren van gecryopreserveerde stamcellen. Het duurt 12 dagen om  $CD34^+$ SC te laten differentiëren tot  $CD34^+$ DC.

Op dag 12 wordt door middel van fenotypering nagegaan of de bekomen cellen effectief DC zijn. Diezelfde dag worden de DC blootgesteld aan de teststof gedurende 24 uur.

Om de cytotoxiciteit van de teststof na te gaan met de PI methode worden de cellen op dag 13 gescheiden van de teststof en hun celviabiliteit wordt achterhaald met behulp van de FACSCalibur flow cytometer.

Indien de AB methode wordt gebruikt wordt op de dertiende dag AB kleurstof toegevoegd aan de cellen, de incubatieperiode neemt 24 uur in beslag. Nadien wordt de metabolische celactiviteit nagegaan met behulp van de Fluoroskan Ascent<sup>®</sup>.

De methoden, opgesomd in onderstaande figuur, komen in het volgend hoofdstuk uitgebreid aan bod.



**Figuur 4:** Schematisch overzicht van de gebruikte methoden.

## 4 Materiaal en methoden

In dit hoofdstuk worden de gebruikte technieken samen met de benodigdheden die werden uitgevoerd tijdens de stageperiode omschreven.

Het is evident dat er in het labo zo steriel mogelijk gewerkt moet worden om contaminatie te vermijden. Zo wordt er steeds gewerkt onder een Laminaire AirFlowkast (LAF-kast) (*Clean Air, Woerden, Nederland*) die steriele lucht aanvoert en niet steriele lucht afvoert om besmetting met toxische stoffen, bacteriën, schimmels of gisten te vermijden. Tijdens de proef worden er steeds handschoenen gedragen die net zoals het werkblad regelmatig ontsmet worden met ethanol Nalgene<sup>TM</sup> (*Merck, Darmstadt, Duitsland*). Om vuile oppervlakken te desinfecteren kan ook Umonium<sup>38®</sup> (*Huckert's international, Nivelles, België*) gebruikt worden.

Gebruikte oplossingen die bij toevoeging steriel moeten zijn, zoals bijvoorbeeld DC-cultuurmedium, worden telkens vooraf gefiltreerd met een Stericup<sup>®</sup> Filter Unit (*Millipore, Billerica, USA*) in een geautoclaveerde fles. Reagentia worden afgewogen op Balans AG 204 (*Mettler Toledo, Zwitserland*) die GLP gelabeld is.

### 4.1 *In vitro* cultuur van dendritische cellen

De CD34<sup>+</sup> progenitorcellen worden geïsoleerd uit humaan navelstrengbloed dat verzameld wordt door het medisch personeel van de materniteitsdienst van het Heilig Hart ziekenhuis te Mol en van het A.Z. St-Dimpna te Geel. Het bloed wordt opgevangen in een daarvoor bestemd recipiënt dat 10 ml heparine-oplossing, 200 U/ml, bevat om bloedstolling te inhiberen. Het bloed mag maximaal 24 uur bewaard worden op kamertemperatuur, datum en uur van de bevalling worden zorgvuldig genoteerd. Vervolgens worden de geïsoleerde CD34<sup>+</sup> progenitorcellen in cultuur gebracht om te differentiëren tot dendritische cellen.

#### 4.1.1 Isolatie van mononucleaire cellen

Bij aankomst van de bloedstalen in het labo worden de stalen onmiddellijk gecodeerd. Binnen 24 uur na de bevalling moeten de mononucleaire cellen (MNC) geïsoleerd worden uit het bloed.

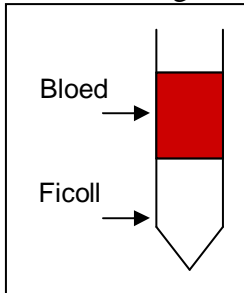
##### Materiaal:

- 50 ml tube (*Iwaki, Barlorworld Scientific, Straffordshire, UK*).
- 5 ml, 10 ml, 25 ml wegwerppipetten (*Sterilin, London, UK*).
- Centrifuge (*Rotanta 46, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Duitsland*).
- Fetal Bovine Serum (FBS) (*Biochrom AG, Berlijn, Duitsland*).
- Ficoll-Paque PLUS (*GE Healthcare, Diegem, België*).
- Finnpijette<sup>®</sup> Labsystems (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*).
- Fosfaat gebufferde zoutoplossing, zonder calcium en magnesium (PBS) (*Gibco, Paisley, Verenigd Koninkrijk*).
- Heparineoplossing, 200 U/ml (*Sigma Aldrich, Steinheim, Duitsland*).
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (*Gibco, Paisley, UK*), bevat L-Glutamine en 25 mM HEPES.
- Koelkast / diepvries (*Liebherr, Lindenberg, Duitsland*).

- Pasteurpipetten (*International Medical, Marche en Femenne, België*).
- Pipet-aid (*Matrix, Cheshire, UK*).
- Recipiënt voor navelstrengbloed (*Greiner Bio One, Kremsmünster, Oostenrijk*).
- Steriele pipetten (*Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- Vacuümpomp (*Millipore, Axel, Nederland*).
- Vortexmixer L46 (*Labinco, Breda, Nederland*).

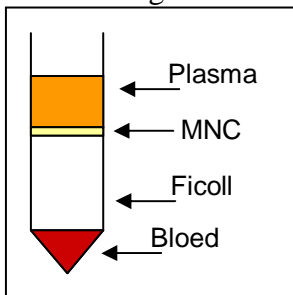
Protocol:

- Verdun het navelstrengbloed met eenzelfde hoeveelheid PBS<sup>-</sup>.
- Spoel 50 ml tubes met FBS.
- Pipetteer in 50 ml tube, gevuld met 20 ml Ficoll, voorzichtig 20 ml verdund navelstrengbloed (zorg voor een even aantal tubes).



**Figuur 5: Uitzicht voor centrifugeren.**

- Centrifugeer: 20' aan 2000 rpm zonder rem.



**Figuur 6: Uitzicht na centrifugeren.**

- Verzamel de MNC in nieuwe FBS gecoate 50 ml tubes en leng aan met PBS<sup>-</sup>.
- Centrifugeer: 5' aan 1250 rpm met rem.
- Verwijder het supernatans en maak de cellen los.
- Halveer het aantal tubes (even aantal behouden) en los de cellen op in 20 ml PBS<sup>-</sup>.
- Pipetteer voorzichtig 20 ml celsuspensie op 20 ml Ficoll (gebruik 50 ml tubes gecoate met FBS).
- Centrifugeer: 20' aan 2000 rpm zonder rem.
- Verzamel de MNC in nieuwe FBS gecoate 50 ml tubes en leng aan met PBS<sup>-</sup>.
- Centrifugeer: 10' aan 1250 rpm met rem.
- Verwijder het supernatans en maak de cellen los.
- Voeg alle cellen samen en suspendeer in 20 ml IMDM + 10 % FBS.

De mononucleaire cellen kunnen nu overnacht bewaard worden op 4 °C maar kunnen ook onmiddellijk verder behandeld worden.

### 4.1.2 Magnetische labeling van CD34<sup>+</sup> stamcellen

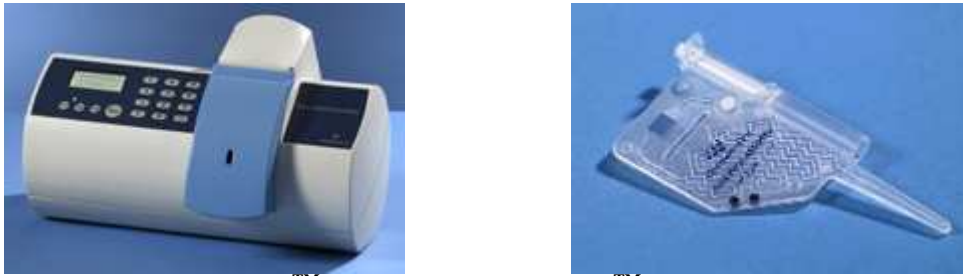
De isolatie van de CD34<sup>+</sup> progenitorcellen gebeurt door een positieve selectie van mononucleaire cellen die CD34 tot expressie brengen op hun membraanoppervlak. Bij de directe kleuring is het antilichaam dat gericht is tegen CD34 rechtstreeks gelabeld met MACS MicroBeads. Hierbij wordt er gebruik gemaakt van de MACS Direct CD34 Progenitor Cell Isolation kit human. De gelabelde cellen worden gescheiden van de niet gelabelde cellen door de celsuspensie op een magnetische separatie kolom te brengen. Doordat de kolom zich in een sterk magnetisch veld bevindt zullen de gelabelde cellen in de kolom blijven hangen, de ongelabelde zullen geëluëerd worden. Na het verwijderen van het magnetisch veld kunnen de gewenste cellen, CD34<sup>+</sup> progenitorcellen die zijn achtergebleven in de kolom, verzameld worden.

Bij de magnetische labeling is het belangrijk dat er vlug gewerkt wordt en dat er steeds koude oplossingen gebruikt worden om aspecifieke kleuring te vermijden.

#### Materiaal:

- 2 ml epjes (*Eppendorf, Hamburg, Duitsland*).
- 50 ml tube (*Iwaki, Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- 5 ml, 10 ml, 25 ml wegwerppipetten (*Sterilin, London, UK*).
- ACD-A 1 liter 6 % Anticoagulant Citrate Dextrose-formula A (*Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, USA*) bevat 22,3 g glucose, 22 g natriumcitraat, 8 g citroenzuur opgelost in gedemineraliseerd water.
- Centrifuge (*Rotanta 46, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Duitsland*).
- Finnpijette<sup>®</sup> Labystems (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*).
- Koelkast / diepvries (*Liebherr, Lindenberg, Duitsland*).
- MACSbuffer: 100 ml Magnetic Activated Cell Separation–buffer bestaat uit 100 ml 0,6 % ACD-A (6 % ACD-A 10 keer verdund in PBS<sup>-</sup>) en 0,5 g BSA.
- MACS CD34 Microbead Kit, human (*Miltenyi Biotec B.V., Utrecht, Nederland*). De kit bevat CD34<sup>+</sup> antilichamen gelabeld met magnetische beads en een FcR blocking buffer om aspecifieke bindingen te voorkomen.
- NucleoCounter<sup>™</sup> met NucleoCassette<sup>™</sup> (*Chemometec, Allerod, Denemarken*).
- NucleoCounter<sup>™</sup> buffer A en B (*Chemometec, Allerod, Denemarken*).
- Pasteurpipetten (*International Medical, Marche en Femenne, België*).
- Pipet-aid (*Matrix, Cheshire, UK*).
- Steriele pipetten (*Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- Vortexmixer L46 (*Labinco, Breda, Nederland*).
- Vacuümpomp (*Millipore, Axel, Nederland*).

## Principe van de NucleoCounter™:



**Figuur 7: NucleoCounter™ (links) en NucleoCassette™ (rechts)**  
(<http://www.chemometec.com/sw2490.asp>).

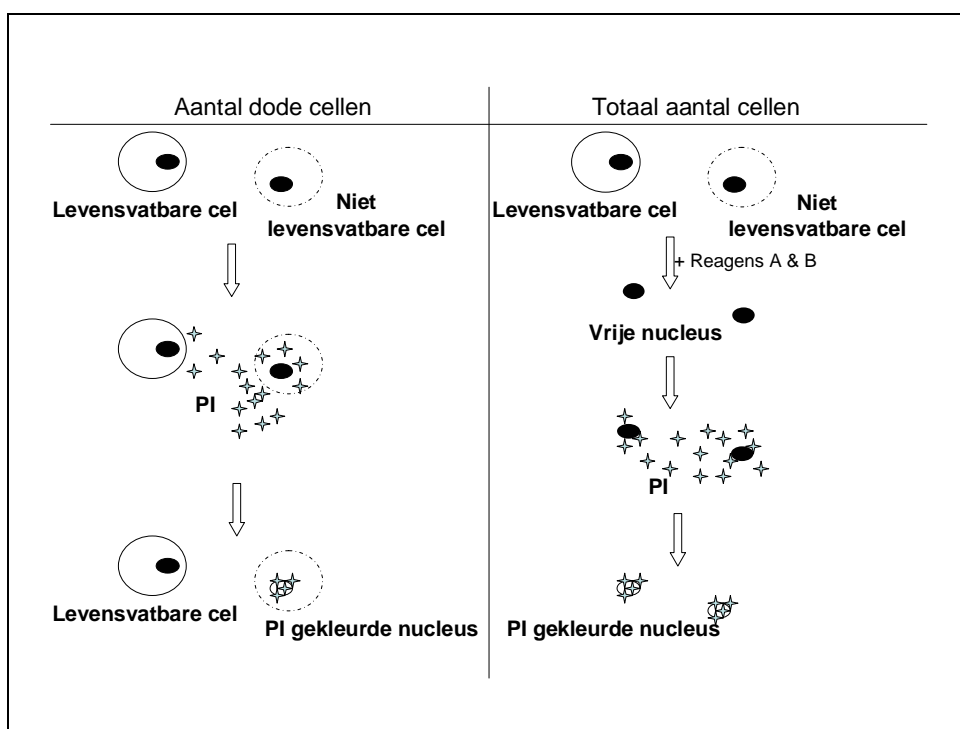
De NucleoCounter™ telt mammaliacellen, zoogdiercellen, omdat deze een relatief stabiele hoeveelheid DNA bevatten. De celsuspensie wordt opgezogen in de NucleoCassette™ die gecoat is met PI. Aangezien PI geen cellen kan penetreren met een intacte celmembraan zal deze enkel de dode cellen kleuren (zie Figuur 8). De cassette wordt in de NucleoCounter™ geplaatst en de celsuspensie wordt voortgeduwd tot aan de transparante meetkamer. Met behulp van een fluorescentiemicroscoop kan daar de fluorescentie van de cellen gemeten worden. De NucleoCounter™ geeft op de display het aantal cellen per ml weer.

Het aantal levende cellen van de celsuspensie wordt bepaald door het totaal aantal cellen (T) en de dode cellen (D) te bepalen. Om het totaal aantal cellen te weten te komen wordt het 10 keer verdunde staal nogmaals verdund met één volume reagens A en één volume reagens B. De cellen worden geteld met de NucleoCounter™, bij de berekening moet rekening gehouden worden met de verdunningsfactor (VF).

Om het aantal dode cellen te weten te komen is er geen voorbehandeling nodig, de cellen kunnen rechtstreeks in de cassette worden opgezogen.

Het aantal levende cellen (per ml) kan dan met onderstaande formule berekend worden:

$$\text{Aantal levende cellen} = (T * VF) - D$$



**Figuur 8: Werking van PI.**

Protocol:

- Bepaal de celconcentratie van de MNC met de NucleoCounter™.
- Centrifugeer: 5' aan 1250 rpm met rem.
- Verwijder het supernatans en maak de cellen los.
- Voeg 300 µl MACS-buffer toe per 10<sup>8</sup> MNC en homogeniseer.
- Voeg 100 µl FcR Blocking Reagent toe per 10<sup>8</sup> MNC (om aspecifieke bindingen van de met MicroBeads gelabelde antilichamen uit te sluiten) en homogeniseer.
- Voeg 100 µl CD34 MicroBeads toe per 10<sup>8</sup> MNC (kleurt de CD34<sup>+</sup>) en homogeniseer.
- Incubeer 30' op 4 °C (kleuringvolume voor 10<sup>8</sup> MNC = 500 µl).
- Was de celsuspensie met 10 ml MACS-buffer.
- Centrifugeer: 5' aan 1250 rpm met rem.
- Zuig het supernatans af en maak de cellen los.
- Resuspendeer de celpellet in 1 ml MACS-buffer per 10<sup>8</sup> MNC.

### 4.1.3 Magnetische isolatie van CD34<sup>+</sup> stamcellen

Bij deze stap wordt er gebruik gemaakt van een MACS<sup>®</sup> Separation Column die geoptimaliseerd is voor de positieve selectie van CD34<sup>+</sup> progenitorcellen uit 10<sup>8</sup> tot 2.10<sup>9</sup> MNC. De kolom wordt in het magnetisch veld van de Magnetic cell separator MidiMACS geplaatst die voor ieder gebruik gereinigd wordt met ethanol.

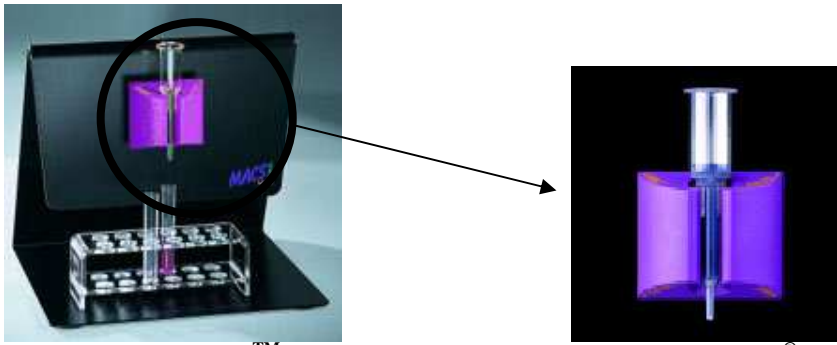
Materiaal:

- 2 ml epjes (*Eppendorf, Hamburg, Duitsland*).
- 15 ml polystyrentube (*BD Biosciences, Canaan, USA*).
- 5 ml, 10 ml, 25 ml wegwerppipetten (*Sterilin, London, UK*).
- Centrifuge (*Rotanta 46, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Duitsland*).
- DC-cultuurmedium: 100 ml Dendritisch Cel (DC) –cultuurmedium bestaat uit 88 ml IMDM, 10 ml FBS, 2 ml Penicilline/Streptomycine (*Gibco, Paisley, UK*) en 1 g BSA.
- Finnpipette<sup>®</sup> LabSystems (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*).
- MACS Separatiekolom (*Miltenyi, Biotec B.V., Utrecht, Nederland*).
- Magnetic cell separator MidiMACS (*Miltenyi Biotec BV, Utrecht, Nederland*).
- NucleoCounter™ met NucleoCassette™ (*Chemometec, Allerod, Denemarken*).
- NucleoCounter™ buffer A en B (*Chemometec, Allerod, Denemarken*).
- Pipet-aid (*Matrix, Cheshire, UK*).
- Pasteurpipetten (*International Medical, Marche en Femenne, België*).
- Steriele pipetten (*Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- Vortexmixer L46 (*Labinco, Breda, Nederland*).



Protocol:

- Zet de opstelling met de MACS<sup>®</sup> Separation Column klaar.



**Figuur 9: MidiMACS™ Separation Unit vastgemaakt op een MACS<sup>®</sup> MultiStand met een LS kolom** ([http://www.miltenyibiotec.com/en/PG\\_124\\_182\\_MidiMACS\\_Separator.aspx](http://www.miltenyibiotec.com/en/PG_124_182_MidiMACS_Separator.aspx)).

- Plaats onder de kolom een 15 ml polystyrentube om de wasvloeistof op te vangen.
- Bevochtig de kolom met 3 ml MACS-buffer (niet laten drooglopen!).
- Pipetteer de celsuspensie over de kolom (ml per ml) wanneer de buffer bijna door de kolom is gelopen.
- Spoel de kolom 3 keer met 3 ml MACS-buffer.
- Laat de kolom volledig drooglopen.
- Haal de kolom van de magneet en plaats het in een nieuwe 15 ml polystyrentube.
- Berg de Magnetic cell separator MidiMACS zorgvuldig op.
- Breng 5 ml MACS-buffer over de kolom (om de gelabelde cellen te elueren).
- Bepaal de celconcentratie van de CD34<sup>+</sup> progenitorcellen met de NucleoCounter™.
- Centrifugeer: 5' aan 1200 rpm met rem.
- Verwijder het supernatans en maak de cellen los.
- Suspendeer de celpellet in 500 µl DC-cultuurmedium per 10<sup>8</sup> MNC.

#### 4.1.4 In cultuur brengen van CD34<sup>+</sup> progenitorcellen

Om de CD34<sup>+</sup> stamcellen in cultuur te brengen moeten de cellen eerst verdund worden met dendritisch celcultuurmedium dat 1 % Bovine Serum Albumine bevat zodat er een celsuspensie verkregen wordt van 100000 cellen per ml. Hier worden ook groeifactoren aan toegevoegd om de stamcellen te differentiëren tot dendritische cellen.

Materiaal:

- 5 ml, 10 ml, 25 ml wegwerppipetten (*Sterilin, London, UK*).
- Albumine Bovine Serum (BSA) (*Sigma-Aldrich, Steinheim, Duitsland*).
- Cultuurfles 25 cm<sup>2</sup> (*Corning incorporated, Corning, USA*).
- Cultuurfles 75 cm<sup>2</sup> (*Iwaki, Barlorworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- DC-cultuurmedium: 100 ml Dendritisch Cel (DC) –cultuurmedium bestaat uit 88 ml IMDM, 10 ml FBS, 2 ml Penicilline/Streptomycine (*Gibco, Paisley, UK*) en 1 g BSA.
- Finnpipette<sup>®</sup> LabSystems (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*).
- Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (rh-GM-CSF), 500 ng/ml (*Gentaur, Brussel, België*). De werkconcentratie bedraagt 1 µg/ml in PBS<sup>-</sup> + 10 % FBS.
- Incubator (*Jouan IG50 incubator, Jouan, Frankrijk*).
- Interleukine 4 (IL4) (*Gibco, Paisley, UK*). De werkconcentratie bedraagt 500 ng/ml.
- Pipet-aid (*Matrix, Cheshire, UK*).
- Pasteurpipetten (*International Medical, Marche en Femenne, België*).

- 
- Stem Cell Factor (SCF), 50 ng/ml (*Biosource, Camarillo, USA*). De werkconcentratie bedraagt 1 µg/ml in PBS<sup>-</sup> + 10 % FBS.
  - Steriele pipetten (*Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
  - Tumour Necrosis Factor-α (hr-TNF-α), 2,5 ng/ml (*Roche Applied Science, Vilvoorde, België*). De werkconcentratie bedraagt 1 µg/ml in PBS<sup>-</sup> + 10 % FBS.

Protocol:

- Verdun de cellen in DC-cultuurmedium + 1 % BSA (100000 cellen/ml).
- Voeg groeifactoren toe: rh-GM-CSF (500 ng/ml), hr-TNF-α (2,5 ng/ml) en SCF (50 ng/ml).
- Verdeel de celsuspensie in cultuurflessen (25 cm<sup>2</sup>) met maximaal 10 ml of 1.10<sup>6</sup> cellen per fles.
- Incubeer 12 dagen op 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> en 95 % relatieve vochtigheid.
- Dag 4: verdun de culturen met 2 volumes vers DC-cultuurmedium en met een supplementaire groeifactor Interleukine 4 (IL4, tot 34 ng/ml eindconcentratie), om de differentiatie naar monocytten en macrofagen te verhinderen, en breng over in grote cultuurflessen (75 cm<sup>2</sup>).
- Dag 8: voeg 1 volume vers DC-cultuurmedium toe aan de celsuspensie.

## 4.2 Cryopreservatie van CD34<sup>+</sup> stamcellen

Het woord cryopreservatie betekent bewaren onder koude omstandigheden. CD34<sup>+</sup> stamcellen worden ingevroren om ze nadien te kunnen gebruiken als er geen verse navelstrengbloedstalen voor handen zijn. Om na te gaan of cryopreservatie van stamcellen een optie is, zal enerzijds nagegaan worden of hun respons bij de cytotoxiciteitstest dezelfde is en anderzijds of er veranderingen zijn opgetreden in hun genexpressie.

Het is belangrijk dat de cellen hun eigenschappen blijven behouden na invriezen en ontdooien.

Zowel voor het invriezen als voor het ontdooien maken we gebruik van het protocol van StemCell Technologies Inc.

### 4.2.1 Invriesprocedure

#### Materiaal:

- 2 ml CryoTube<sup>TM</sup>Vials (*Nunc<sup>TM</sup>, Roskilde, Denemarken*).
- 15 ml polystyrentube (*BD Biosciences, Canaan, USA*).
- 50 ml Reagent Reservoir (*Corning Incorporated, NY, USA*).
- Cryo 1 °C freezing container; -1 °C/min (*Nalgene<sup>TM</sup>, USA*).
- Diepvries -80 °C (*Liebherr, Lindenberg, Duitsland*).
- Dimethylsulfoxide (DMSO) (*Lab-Scan, Dublin, Ierland*).
- Fetal Bovine Serum (FBS) (*Biochrom AG, Berlijn, Duitsland*).
- Finnpipette<sup>®</sup> Labsystems (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*).
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (*Gibco, Paisley, UK*), bevat L-Glutamine en 25 mM HEPES.
- Steriele pipetten (*Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- Stikstof tank -196 °C (*LS 4800 LabSystems Taylor-Wharton*).

#### Protocol:

- Start nadat de CD34<sup>+</sup> progenitorcellen magnetisch geïsoleerd en geteld zijn.
- Breng het gewenste aantal cellen in cultuur en vries de overige cellen in.
- Voeg aan de in te vriezen cellen zeer traag 1 ml invriesmedium (50 % IMDM + 40 % FBS + 10 % DMSO) toe.
- Breng de celsuspensie over in een CryoTube<sup>TM</sup>Vial (maximaal 10.10<sup>6</sup> cellen per vial).
- Plaats deze in een vriescontainer en vries in op -80 °C gedurende 24 uur.
- Verplaats de CryoTube<sup>TM</sup>Vial van -80 °C naar -196 °C (stikstof tank).

Het invriesmedium bevat een cryoprotectants, DMSO, zodat een aantal cruciale factoren onder controle kunnen gehouden worden. Zo is het belangrijk dat de osmotische druk tijdens het toevoegen en het verwijderen van het cryoprotectants ongewijzigd blijft. Andere factoren die gecontroleerd moeten worden zijn de chemische toxiciteit van de cryoprotectants t.o.v. de stamcellen en de onderlinge verhouding tussen de concentratie van de cryoprotectants en de koelingsgraad. De aanwezigheid van dit cryoprotectants is cruciaal bij het invriezen o.w.v. bovenstaande redenen maar het is noodzakelijk dat dit weer verwijderd wordt na ontdooien o.w.v. zijn toxisch karakter (Hunt et al., 2003; Berz et al., 2007).

Het is belangrijk om zo langzaam en voorzichtig mogelijk te werken in deze stap om een optimaal resultaat te bekomen. De vriescontainer zorgt ervoor dat de cellen aan 1 °C/min worden ingevroren.

## 4.2.2 Ontdooiprocedure

### Materiaal:

- 50 ml tube (*Iwaki, Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- 5 ml, 10 ml, 25 ml wegwerppipetten (*Sterilin, London, UK*).
- Centrifuge (*Rotanta 46, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Duitsland*).
- DC-cultuurmedium: 100 ml Dendritisch Cel (DC) –cultuurmedium bestaat uit 88 ml IMDM, 10 ml FBS, 2 ml Penicilline/Streptomycine (*Gibco, Paisley, UK*) en 1 g BSA.
- Dimethylsulfoxide (DMSO) (*Lab-Scan, Dublin, Ierland*).
- DNase 1 recombinant, RNase-vrij (*Roche, Mannheim, Duitsland*).
- Ethanol Nalgene™ (*Merck, Darmstadt, Duitsland*).
- Fetal Bovine Serum (FBS) (*Biochrom AG, Berlijn, Duitsland*).
- Finnpijette® Labsystems (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*).
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (*Gibco, Paisley, UK*), bevat L-Glutamine en 25 mM HEPES.
- NucleoCounter™ buffer A en B (*Chemometec, Allerød, Denemarken*).
- Pasteurpipetten (*International Medical, Marche en Famenne, België*).
- Pipet-aid (*Matrix, Cheshire, UK*).
- Steriele pipetten (*Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- Warmwaterbad (WWB) (*Memmert, Schwabach, Duitsland*).

### Protocol:

- Haal de CryoTube™ Vial uit de stikstof tank.
- Ontdooi snel op 37 °C m.b.v. WWB totdat alle ijskristallen verdwenen zijn en spoel de buitenkant met 70 % ethanol.
- Pipetteer 20 µl DNase 1 recombinant, RNase-vrij in een 50 ml tube.
- Pipetteer hierbij zeer traag de celsuspensie, zwenk voorzichtig.
- Voeg druppelsgewijs, tijdens zachtjes zwenken, 1 ml warm IMDM met 10 % FBS toe.
- Pipetteer hierbij druppelsgewijs 20 ml IMDM met 10 % FBS.
- Centrifugeer: 10' aan 1500 rpm.
- Verwijder het supernatans zorgvuldig tot op 2 ml na.
- Resuspendeer de celpellet voorzichtig in het resterende supernatans.
- Voeg druppelsgewijs, tijdens zachtjes zwenken, 20 ml warm vers DC-cultuurmedium toe.
- Centrifugeer: 10' aan 1500 rpm.
- Verwijder het supernatans zorgvuldig tot op 2 ml na.
- Bepaal de celconcentratie van de CD34<sup>+</sup> progenitorcellen met de NucleoCounter™.
- Breng de CD34<sup>+</sup> stamcellen in cultuur om te differentiëren tot dendritische cellen.

## 4.3 Fenotypering

Fenotypering is het controleren van *in vitro* gekweekte cellen op typische membraan kenmerken. In dit geval wordt de typische morfologie van DC nagegaan (de cellen vertonen kleine uitsteekseltjes) en er wordt gecontroleerd op de aanwezigheid van hun specifieke membraanmerkers: CD1a<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup> en CD14<sup>-</sup>.

Door de DC te kleuren met specifieke antilichamen tegen deze membraanmerkers kan de aanwezigheid van de merker op de cel nagegaan worden via flow cytometrie. Eveneens kan het aantal positieve cellen bepaald worden.

### Materiaal:

- Anti-HLA-DR PhycoErythrine (PE): Clone L243 (*BD Biosciences, New York, USA*).
- BD Falcon™ FACStube (*BD Biosciences, Bedford, USA*).
- CellQuest software for Macintosh (*BD Biosciences, New York, USA*).
- Centrifuge (*Rotanta 46, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Duitsland*).
- FACSCalibur flow cytometer (*BD Biosciences, New York, USA*).
- Fetal Bovine Serum (FBS) (*Biochrom AG, Berlijn, Duitsland*).
- Finnpipette® Labsystems (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*).
- FITC Mouse Anti-Human IgG1 κ Isotype Control: Clone MOPC-21, Isotype (BALB/c) IgG1 κ (*BD Bioscience*).
- Fluoresceïne IsoThioCyanat (FITC) Mouse Anti-Human CD1a: Clone HI149, Isotype Mouse IgG1 κ (*BD Biosciences*).
- Fosfaat gebufferde zoutoplossing, zonder calcium en magnesium (PBS<sup>-</sup>) (*Gibco, Paisley, Verenigd Koninkrijk*). PBS<sup>-</sup>, in poedervorm, wordt opgelost in gedemineraliseerd water.
- Koelkast / diepvries (*Liebherr, Lindenberg, Duitsland*).
- PE Mouse Anti-Human CD14: Clone 4C1/CD14, Isotype (BALB/c) IgG1 κ (*BD Biosciences*).
- PE Mouse Anti-Human CD54: Clone HA58, Isotype Mouse IgG1 κ (*BD Biosciences*).
- PE Mouse Anti-Human CD83: Clone HB15e, Isotype Mouse IgG1 κ (*BD Biosciences*).
- PE Mouse Anti-Human CD86: Clone IT2.2, Isotype Mouse IgG2b κ (*BD Biosciences*).
- PE Mouse IgG1 κ Isotype Control: Clone MOPC-21, Isotype (BALB/c) IgG1 κ (*BD Biosciences*).
- PE Mouse IgG2a κ Isotype Control: Clone G155-178, Isotype (BALB/c) IgG2a κ (*BD Biosciences*).
- PE Mouse IgG2b κ Isotype Control: Clone 27-35, Isotype Mouse (C.SW) IgG2b κ (*BD Biosciences*).
- Propidiumjodide (PI), 50 µg/ml (*Sigma Aldrich, Steinheim, Duitsland*).
- Steriele pipetten (*Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- Vacuümpomp (*Millipore, Axel, Nederland*).
- Vortexmixer L46 (*Labinco, Breda, Nederland*).
- Worklist Manager software for Macintosh (*BD Biosciences, New York, USA*).

---

Protocol:

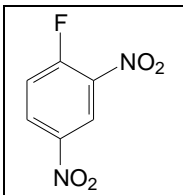
- Los  $1 \cdot 10^6$  DC op in 550  $\mu$ l PBS<sup>-</sup> met 1 % FBS.
- Werk vanaf deze stap in het donker o.w.v. de fluorescentie.
- Pipetteer telkens 2  $\mu$ l antilichaam in een BD Falcon<sup>TM</sup> FACStube.
- Voeg 50  $\mu$ l celsuspensie toe en dek af met zilverpapier.
- Incubeer 30' op 4 °C.
- Was de cellen door 1 ml PBS<sup>-</sup> toe te voegen.
- Centrifugeer: 5' aan 1250 rpm.
- Verwijder het supernatans en maak de cellen los.
- Resuspendeer de cellen in 300  $\mu$ l PBS<sup>-</sup> (waar nodig in 300  $\mu$ l PI) en homogeniseer.
- Meet met de FACSCalibur flow cytometer.

## 4.4 Bepaling van de cytotoxiciteit

Cytotoxiciteitstesten worden uitgevoerd om de potentie van een chemische stof om cellen te beschadigen na te gaan. Er werden drie sensitizerende stoffen en één niet-sensitizerende stof getest op hun toxisch effect volgens twee verschillende assays; AlamarBlue<sup>TM</sup> en Propidiumjodide. De concentratiereeks van chemische stoffen is gebaseerd op een dose-range finding afkomstig van vorige onderzoeken. Voor alle stoffen wordt de concentratie die 20 % inhibitie van de celgroei of celviabiliteit veroorzaakt (IC<sub>20</sub>) berekend en vergeleken met beide assays.

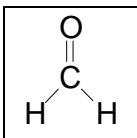
### 4.4.1 Testchemicaliën

- 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzeen (DNFB) (*Sigma-Aldrich*, CASnr: 70-34-8) is een extreme sensitizer.



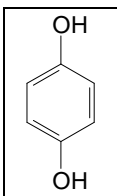
Figuur 10: Structuurformule van DNFB.

- Formaldehyde (*Sigma-Aldrich*, CASnr: 50-00-0) is een sterke sensitizer.



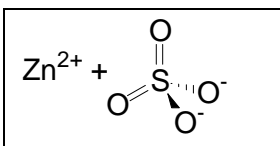
Figuur 11: Structuurformule van Formaldehyde.

- Hydroquinone (HQ) (*Sigma-Aldrich*, CASnr: 123-31-9) is een sterke sensitizer.



Figuur 12: Structuurformule van HQ.

- Zinksulfaat ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) (*Sigma-Aldrich*, CASnr: 7446-20-0) is een non-sensitizer.



Figuur 13: Structuurformule van  $ZnSO_4$ .

#### 4.4.2 Tot stand komen van IC20

Het principe van een cytotoxiciteitsbepaling is gebaseerd op het percentage inhibitie-effect relatief ten opzichte van een solvent. Hiervoor zijn twee referentiepunten nodig,  $X_{\text{solvent}}$  en  $X_{100\% \text{ inhibitie}}$ , met  $X$  als gemeten grootte die gerelateerd is aan een inhibitie.

Bij AB is  $X$  een maat voor metabolische celactiviteit en bij PI geeft  $X$  het percentage weer van de geselecteerde cellen als maat voor dode of levende cellen, al naargelang de keuze.

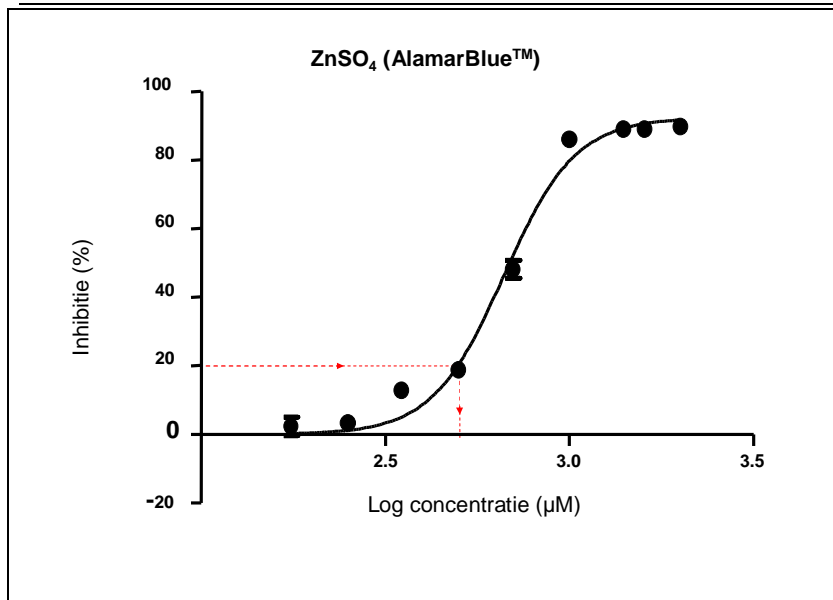
Omdat er bij PI geen referentiepunt is voor inhibitie bij 100 % wordt er eveneens een positieve controle meegenomen die gegarandeerd 100 % inhibitie veroorzaakt. Dit is geen probleem bij AB omdat daar de blanco als referentiepunt wordt beschouwd. De blanco wordt verkregen door een well zonder metabolische activiteit mee te incuberen. Deze maat komt overeen met een well met 100 % inhibitie, dat een minimale meetwaarde weergeeft. Samen met de solventmeting, maat voor maximale meetwaarde, kan een range van mogelijke meetresultaten opgesteld worden. In onderstaande formule wordt weergegeven hoe de berekening voor inhibitie effect verloopt.

$$\text{inhibitie effect} = 100 - 100 * \frac{X - X_{100\% \text{ inhibitie}}}{X_{\text{solvent}} - X_{100\% \text{ inhibitie}}}$$

Indien technisch alles goed verloopt, zal, door het gebruik van deze twee referentiepunten, blootstelling aan zeer lage concentraties een effect opleveren dat steeds gelijk is aan nul en een effect van 100 geven indien er volledige inhibitie optreedt. Voor de analyses in GraphPad Prism 5 betekent dit dat de 'bodem' van de curve vastgelegd wordt op nul en de 'top' op 100 als dat van toepassing is.

Een voorbeeld van een grafiek, bekomen na analyse in GraphPad Prism 5, is te zien in Figuur 14. In dit voorbeeld werden dendritische cellen blootgesteld aan een concentratiereeks van  $\text{ZnSO}_4$ , de metingen zijn gebeurd met AlamarBlue<sup>TM</sup> methode. De gebruikte concentraties worden logaritmisch getransformeerd alvorens op de grafiek in te voegen om een betere verdeling te bekomen. Op de x-as worden de logaritmische waarden van de concentraties, uitgedrukt in  $\mu\text{M}$ , van  $\text{ZnSO}_4$  uitgezet in functie van het inhibitiepercentage. Vervolgens kan de IC20 bepaald worden door het snijpunt met de curve te bepalen waarbij 20 % inhibitie optreedt. De overeenkomstige concentratie is de concentratie die 20 % inhibitie van de metabolische celactiviteit veroorzaakt. In het geval van PI zou die concentratie 20 % inhibitie van de celviabiliteit veroorzaken.





**Figuur 14:** Cytotoxiciteitscurve van ZnSO<sub>4</sub> geanalyseerd met AB.

#### 4.4.3 AlamarBlue™

De AlamarBlue™ assay kan gebruikt worden om de metabolische celactiviteit te meten en op die manier de geteste chemische stoffen te beoordelen op hun vermogen tot celgroei-inhibitie (cytotoxiciteit).

Bij deze assay worden DC uitgeplaat op een 96-well plaat aan  $0,5 \cdot 10^5$  DC per well. Voor iedere celcultuur worden er per teststof drie technische herhalingen uitgevoerd. De DC worden 24 uur blootgesteld aan de teststof. Nadien wordt er 22 µl AB toegevoegd om vervolgens weer 24 uur te incuberen. De reductie van de metabolische celactiviteit wordt gemeten met de Fluoroskan Ascent® die de fluorescentie emissie afleest bij 590 nm.

Deze metingen worden in een Excel-template ingevoegd, de blanco wordt verrekend per concentratie en nadien kan het percentage inhibitie berekend worden. De bekomen resultaten worden met hun respectievelijke concentraties geïmporteed naar GraphPad Prism 5 software om zo een dosisrespons-curve op te stellen waaruit de concentratie bepaald kan worden die 20 % inhibitie veroorzaakt.

##### Materiaal:

- 15 ml polypropyleentube (*Corning Incorporated, NY, USA*).
- 96-well plaat (*Iwaki, Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- AlamarBlue™ (AB) (*ImmunoSource, Halle-Zoersel, België*).
- Ascent 2004 software for Fluoroskan (*Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland*).
- Centrifuge (*Rotanta 46, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Duitsland*).
- Finnpipette® Labsystems (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA*).
- Fluoroskan Ascent (*Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland*).
- GraphPad Prism 5 software (*GraphPad, California, USA*).
- Incubator (*Jouan IG50 incubator, Jouan, Frankrijk*).
- Microscoop (*Axiovert 25 Carl Zeiss, Duitsland*).
- Pasteurpipetten (*International Medical, Marche en Famenne, België*).
- Pipet-aid (*Matrix, Cheshire, UK*).
- Steriele pipetten (*Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- Vortexmixer L46 (*Labinco, Breda, Nederland*).

Protocol:

- Maak een concentratiereeks van een chemische stof (8 à 9 verschillende concentraties), zodat de concentratie in de 15 ml polypropyleentube 2 keer hoger is dan de uiteindelijke concentratie.
- Verzamel de CD34<sup>+</sup>DC uit de cultuurfles.
- Centrifugeer: 5' aan 1200 rpm.
- Verwijder het supernatans en maak de cellen los.
- Resuspendeer de cellen in geconditioneerd medium zodat de celconcentratie  $0,5 \cdot 10^6$  cellen/ml bedraagt.
- Vul de wells van de 96-well plaat met 100  $\mu$ l celsuspensie zodat 3 technische herhalingen mogelijk zijn voor elke concentratie van de chemische stof.
- Gebruik de 1<sup>e</sup> kolom als blanco (200  $\mu$ l medium per well).
- Voeg aan de celsuspensie 100  $\mu$ l chemische stof toe (van lage concentratie naar hoge); behoud kolom 2 en 3 respectievelijk voor negatieve controle (medium) en solvent controle.
- Incubeer 24 uur op 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> en 95 % relatieve vochtigheid.
- Controleer de cellen m.b.v. een microscoop.
- Voeg 22  $\mu$ l (10 % van het totaal volume) AlamarBlue<sup>TM</sup> toe aan de wells.
- Incubeer 24 uur op 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> en 95 % relatieve vochtigheid.
- Meet de inhibitie van de metabolische celactiviteit m.b.v. de Ascent Fluoroskan (lees de fluorescentie emissie af bij 590 nm).
- Analyseer de meetwaarden met GraphPad Prism Software.
- Bepaal a.d.v. de opgestelde dosisrespons-curve de IC20.

#### 4.4.4 Propidiumjodide

Propidiumjodide assay wordt gebruikt om celdood na te gaan en wordt door sommige onderzoekers ook gebruikt als cytotoxiciteitstest.

Het gebruikte protocol voor de uitvoering van deze assay in dit onderzoek verschilt van de gebruikte VITO-procedure. Vooreerst werden de DC blootgesteld in een 96-well plaat i.p.v. in een 24-well plaat. Hierbij bedraagt de celconcentratie  $0,8 \cdot 10^5$  DC per well. Net zoals bij AB worden er per teststof drie technische herhalingen uitgevoerd per celcultuur. Na 24 uur blootstelling wordt de celsuspensie verzameld in de daarvoor bestemde FACStubes en worden de cellen gescheiden van de teststof. Alvorens de celviabiliteit te meten met de FACSCalibur flow cytometer wordt er in elke tube, behalve voor de negatieve controle, PI toegevoegd.

De bekomen resultaten worden met hun respectievelijke concentraties geïmporteerd naar GraphPad Prism 5 software om zo een dosisrespons-curve op te stellen waaruit de concentratie bepaald kan worden die 20 % inhibitie veroorzaakt.

Materiaal:

- 15 ml polypropyleentube (*Corning Incorporated, NY, USA*).
- 96-well plaat (*Iwaki, Barlorworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- CellQuest software for Macintosh (*BD Biosciences, New York, USA*).
- Centrifuge (*Rotanta 46, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Duitsland*).
- FACSCalibur flow cytometer (*BD Biosciences, Carlifornia, USA*).
- Finnpiptette<sup>®</sup> Labsystems (*Thermo Scientific, Waltham, Massachusettes, USA*).
- Fosfaat gebufferde zoutoplossing, zonder calcium en magnesium (PBS<sup>-</sup>) (*Gibco, Paisley, Verenigd Koninkrijk*). PBS<sup>-</sup>, in poedervorm, wordt opgelost in gedemineraliseerd water.
- GraphPad Prism 5 software (*GraphPad, California, USA*).

- Incubator (*Jouan IG50 incubator, Jouan, Frankrijk*).
- Microscoop (*Axiovert 25 Carl Zeiss, Duitsland*).
- Pasteurpipetten (*International Medical, Marche en Femenne, België*).
- Pipet-aid (*Matrix, Cheshire, UK*).
- Propidiumjodide (PI), 50 µg/ml (*Sigma Aldrich, Steinheim, Duitsland*).
- Steriele pipetten (*Barloworld Scientific, Staffordshire, UK*).
- Vortexmixer L46 (*Labinco, Breda, Nederland*).
- Worklist Manager software for Macintosh (*BD Biosciences, New York, USA*).

Protocol:

- Maak een concentratiereeks van een chemische stof (8 à 9 verschillende concentraties), zodat de concentratie in de 15 ml polypropyleentube 2 keer hoger is dan de uiteindelijke concentratie.
- Verzamel de CD34<sup>+</sup>DC uit de cultuurfles.
- Centrifugeer: 5' aan 1200 rpm.
- Verwijder het supernatans en maak de cellen los.
- Resuspendeer de cellen in geconditioneerd medium zodat de celconcentratie  $0,8 \cdot 10^6$  cellen/ml bedraagt.
- Vul de wells van de 96-well plaat met 100 µl celsuspensie zodat 3 technische herhalingen mogelijk zijn voor elke concentratie van de chemische stof.
- Gebruik de 1<sup>e</sup> kolom als blanco (200 µl medium per well).
- Voeg aan de celsuspensie 100 µl chemische stof toe (van lage concentratie naar hoge); behoud kolom 2 en 3 respectievelijk voor negatieve controle (medium) en solvent controle.
- Incubeer 24 uur op 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> en 95 % relatieve vochtigheid.
- Controleer de cellen m.b.v. een microscoop.
- Verzamel de cellen in BD Falcon<sup>TM</sup> FACStube en voeg 500 µl PBS<sup>-</sup> toe.
- Centrifugeer: 5' aan 1200 rpm.
- Verwijder het supernatans en maak de cellen los.
- Resuspendeer de cellen in 200 µl PBS<sup>-</sup> en voeg 20 µl PI toe, goed homogeniseren.
- Meet onmiddellijk de inhibitie van de celviabiliteit met de FACSCalibur flow cytometer.
- Analyseer de meetwaarden met GraphPad Prism Software.
- Bepaal a.d.v. de opgestelde dosisrespons-curve de IC20.

#### 4.4.4.1 Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) Calibur Flow Cytometer

Het doel van flow-cytometrie is het meten van fysische en chemische karakteristieken van de cel aan de hand van lichtverstrooiing en fluorescentie (National Institute of Environmental Health Sciences). Elk type cel heeft een unieke combinatie van grootte, vorm, DNA-inhoud en proteïnen. Deze parameters kunnen met behulp van flow-cytometrie bepaald worden.

Zo kan de verstrooiing opgedeeld worden in een voorwaartse (FSC) en een zijwaartse (SSC) verstrooiing. FSC geeft aan hoe groot de cel is, terwijl SSC de granulariteit weergeeft.

In Figuur 15 is een scatterplot te zien van een negatieve controle, in de linkerbovenhoek (in de rode cirkel) is een dichte wolk van DC zichtbaar. Deze liggen hoog in het FSC gebied wat duidt op gezonde, levende cellen. De ligging van de cellen in Figuur 17 is totaal anders. Hierbij werden de DC blootgesteld aan een concentratie van 8000 µM ZnSO<sub>4</sub> en doordat er celdood optreedt verschuiven de cellen naar het SSC gebied (de rode cirkel verschuift).

In het onderzoek wordt het percentage dode cellen in het blootgestelde staal gemeten na toevoeging van PI. Zoals eerder vermeld is PI een intercalerende, fluorescente stof die

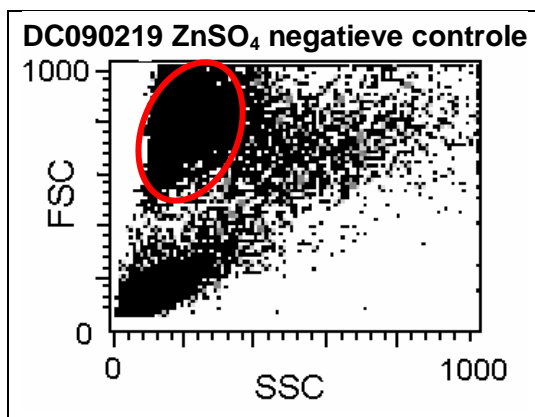
enkel de dode cellen kan binnendringen. De gemeten fluorescentie is dus een maat voor het aantal dode cellen.

Tijdens de meting wordt er eveneens een histogram opgesteld. Deze geeft het aantal cellen weer in functie van de fluorescentie-intensiteit (PI kleuring). Bij het staal van de negatieve controle (zie Figuur 16) wordt er een “merker” (M1) geplaatst zodanig dat alle (>99 %) niet-PI gekleurde DC, dit zijn de levende cellen, hierin liggen. Deze “merker” blijft voor de daaropvolgende metingen van blootgestelde cellen dezelfde zodat bij blootgestelde DC het aantal dode cellen kan bepaald worden. Figuur 18, waar de DC zijn blootgesteld aan een concentratie van 8000  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , geeft een duidelijke piek weer die buiten de “merker” valt, wat duidt op dode cellen ten gevolge van de blootstelling aan de teststof.

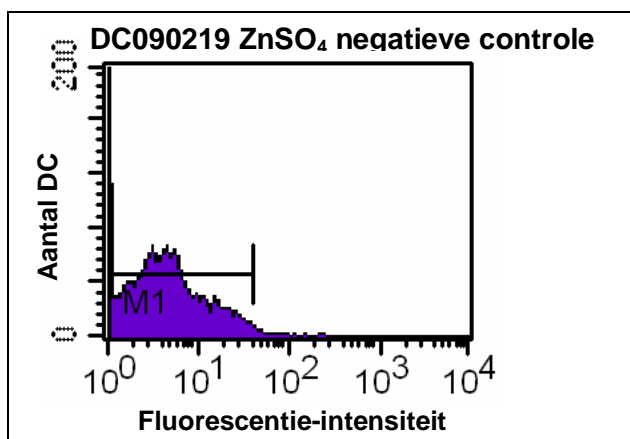
Het aantal levende cellen wordt als volgt bepaald:

$$\text{relatieve celviabiliteit (\%)} = 100 \% * \frac{\text{celviabiliteit in behandelde cellen (\%)}}{\text{celviabiliteit in met solvent behandelde cellen (\%)}}$$

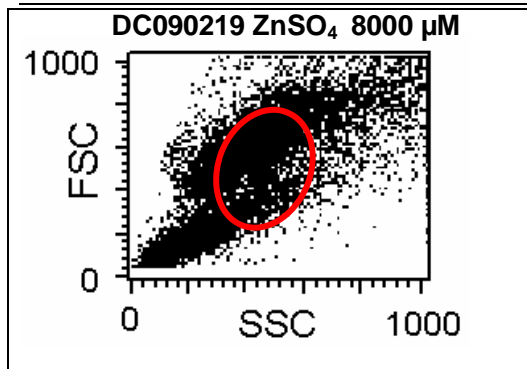
Worklist Manager is het softwarepakket dat gebruikt wordt tijdens de meting.



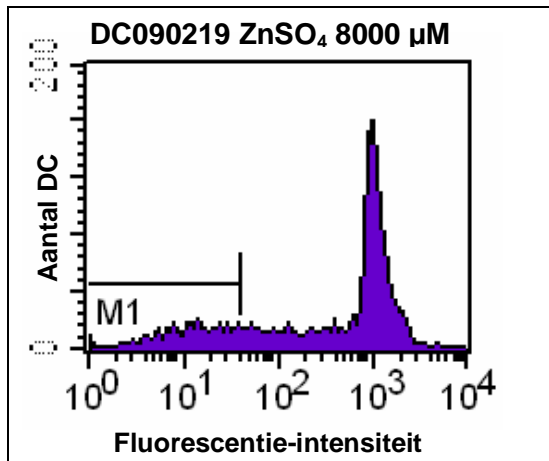
Figuur 15: Scatterplot  $\text{ZnSO}_4$  van de negatieve controle.



Figuur 16: Histogram  $\text{ZnSO}_4$  van de negatieve controle.



Figuur 17: Scatterplot ZnSO<sub>4</sub> met concentratie 8000 µM.



Figuur 18: Histogram ZnSO<sub>4</sub> met concentratie 8000 µM.

#### 4.4.5 Statistische berekeningen

##### De gemiddelde waarde:

Op basis van analysesresultaten bekomt men een bepaalde verwachting waar de ware waarde van een concentratie ligt. Er wordt gesproken van een verwachtingswaarde, dit is de benadering van de ware waarde door de toegepaste schattingswijze (Klaessens, 2006). Het gemiddelde ( $\bar{x}$ ) is de methode die gebruikt werd om de verwachtingswaarde te bepalen van de resultaten van dit eindwerk.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad \text{met } x_i \text{ de } i^{\text{e}} \text{ individuele meting in een reeks van 1 tot } n.$$

##### Standaarddeviatie of standaardafwijking:

Wanneer de analyse een groot aantal keer herhaald wordt, liggen de resultaten in een interval waarbij het gemiddelde over het algemeen het midden markeert. De grootte van het interval zegt iets over de spreiding in de analysemethode. De standaarddeviatie ( $s$ ) of standaardafwijking is een maat voor het uitdrukken van de spreiding van dit interval (Klaessens, 2006).

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

met  $x_i$  de  $i^{\text{e}}$  individuele meting in een reeks van 1 tot  $n$  en  $\bar{x}$  het gemiddelde.

---

### Gepaarde T-toets:

De gepaarde T-toets wordt toegepast wanneer er gebruik gemaakt wordt van groepen die beide gepaarde metingen bevatten, dat wil zeggen dat iedere meting in de ene groep gekoppeld is aan een meting in de andere groep. Zo kunnen twee analysemethoden met elkaar vergeleken worden (Klaessens, 2006).

In deze thesis is er nagegaan of er een significant (betekenisvol) verschil bestaat tussen de twee meetmethoden, AlamarBlue<sup>TM</sup> en Propidiumjodide, door een gepaarde T-toets op de logaritmische IC<sub>20</sub> waardes uit te voeren.

De test gaat na of twee steekproeven (AB en PI) een gemiddelde hebben dat al dan niet significant van elkaar verschilt. Dit wil dus zeggen dat er kan nagegaan worden hoe groot de kans ( $p$ ) is dat een gevonden verschil tussen de gemiddelden van twee steekproeven veroorzaakt is door toeval. Hierbij gaat men uit van de zogenaamde 0-hypothese ( $H_0$ ) die zegt dat het verschil gelijk is aan nul.

Omdat ieder verschil ontstaan kan zijn door toeval, heeft men ergens een kunstmatige grens getrokken. Als de kans, dat een verschil door toeval is ontstaan, kleiner is dan 5 % (waarbij  $p = 0,05$ ) dan noemt men het verschil significant. Bij  $p = 0,05$  is er dan 5 % kans dat het verschil door toeval is ontstaan en 95 % kans dat het een écht verschil is (Bioplek).

## 5 Resultaten

Er werden drie sensitizerende stoffen (DNFB, Formaldehyde en HQ) en één niet-sensitizerende stof ( $\text{ZnSO}_4$ ) getest op hun cytotoxisch effect op dendritische cellen met twee verschillende assays; AlamarBlue™ en Propidiumjodide kleuring. De concentratiereeks van de chemische stoffen is gebaseerd op een dose-range finding afkomstig van vorige onderzoeken. Voor elke teststof wordt door middel van een cytotoxiciteitstest de concentratie die 20 % inhibitie van de metabolische celactiviteit veroorzaakt (IC20) of 20 % celdood veroorzaakt berekend. Om deze berekening statistisch te verantwoorden werd de DC-cultuur door middel van een 3-voudige technische herhaling blootgesteld aan de teststof.

In het verleden werd op VITO in deze context vooral gewerkt met AB, maar omdat men eerder geïnteresseerd is in de PI methode was het vergelijken van deze twee assays dan ook één van de doelstellingen van deze thesis.

Een andere doelstelling was het achterhalen of dendritische cellen afgeleid van gecryopreserveerde  $\text{CD34}^+$  stamcellen eenzelfde respons geven na blootstelling aan chemicaliën in vergelijking met gedifferentieerde dendritische cellen afkomstig van niet gecryopreserveerde  $\text{CD34}^+$  cellen. Indien experimenten na cryopreservatie een overeenstemmend resultaat geven zou dit zowel economisch als praktisch voordelen met zich meebrengen.

### 5.1 Analyse: AlamarBlue™ versus Propidiumjodide

Niet gecryopreserveerde stamcellen (zie 5.1.1), afkomstig van vijf verschillende navelstrengbloeddonoren, werden elk gedifferentieerd tot DC-culturen die op hun beurt werden blootgesteld aan een concentratiereeks van de geselecteerde chemicaliën:

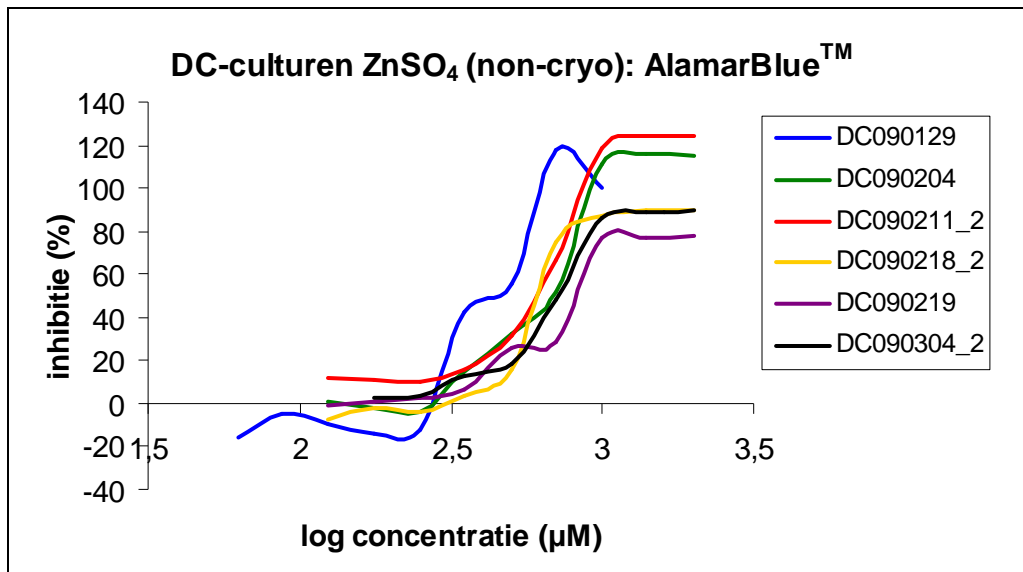
- Dinitrofluorobenzeen (extreme sensitizer) met concentratierange: 1,50  $\mu\text{M}$  – 600  $\mu\text{M}$ .
- Formaldehyde (sterke sensitizer) met concentratierange: 50  $\mu\text{M}$  – 30000  $\mu\text{M}$ .
- Hydroquinone (sterke sensitizer) met concentratierange: 7,81  $\mu\text{M}$  – 16000  $\mu\text{M}$ .
- Zinksulfaat (non-sensitizer) met concentratierange: 62,5  $\mu\text{M}$  – 6000  $\mu\text{M}$ .

Voor elk experiment en voor elke teststof werd de IC20 berekend via GraphPad. De resultaten voor DNFB, formaldehyde, HQ en  $\text{ZnSO}_4$  worden respectievelijk weergegeven in Tabel 2, Tabel 3, Tabel 4 en Tabel 5.

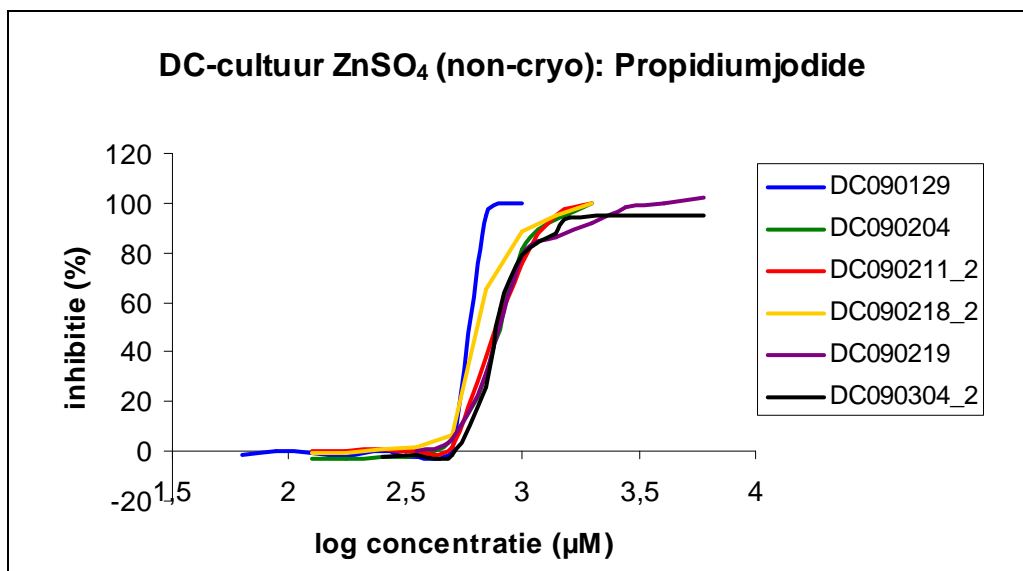
Ook DC-culturen afkomstig van drie verschillende navelstrengbloedstalen van gecryopreserveerde stamcellen (zie 5.1.2), werden aan dezelfde chemicaliën en dezelfde concentratiereeks blootgesteld. De resultaten van de IC20 worden weergegeven in Tabel 7, Tabel 8, Tabel 9 en Tabel 10.

In de tabellen met de resultaten worden in de linkse kolom de nummers van de blootgestelde DC-culturen weergegeven, daarnaast zijn de IC20 waardes uitgezet voor zowel AB als PI. Voor elke chemische stof worden het gemiddelde en de standaarddeviatie (SD) van de IC20 waardes weergegeven. Eveneens werd er een gepaarde T-toets uitgevoerd op de logaritmische IC20 waardes die terug te vinden is in de samenvattende tabel, Tabel 6 voor non-cryopreservatie en Tabel 11 voor cryopreservatie.

De DC-culturen, non-cryopreservatie, van zinksulfaat zijn voor zowel AB (Figuur 19) als PI (Figuur 20) in één grafiek weergegeven om zo een visueel idee te geven over de spreiding tussen de verschillende DC-culturen per meetmethoden.



Figuur 19: Overzicht DC-culturen van ZnSO<sub>4</sub> (non-cryo): AlamarBlue™.



Figuur 20: Overzicht DC-culturen van ZnSO<sub>4</sub> (non-cryo): Propidiumjodide.



### 5.1.1 AlamarBlue™ en Propidiumjodide: non-cryopreservatie

Tabel 2: Blootstelling aan DNFB: AB versus PI: non-cryopreservatie.

Dinitrofluorobenzeen		
DC-cultuur	IC20 (µM) AB	IC20 (µM) PI
DC090318_1	23,388	34,356
DC090402_1	20,845	31,405
DC090403_2	38,019	64,565
DC090409_1	8,156	27,040
DC090409_3	11,830	32,137
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	20,448	37,900
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	11,650	15,141

Tabel 3: Blootstelling aan formaldehyde: AB versus PI: non-cryopreservatie.

Formaldehyde		
DC-cultuur	IC20 (µM) AB	IC20 (µM) PI
DC090318_1	231,206	322,107
DC090402_1	35,892	54,450
DC090403_2	449,780	228,560
DC090409_1	237,137	205,116
DC090409_3	169,824	169,434
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	224,768	195,933
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	149,598	97,196

Tabel 4: Blootstelling aan HQ: AB versus PI: non-cryopreservatie.

Hydroquinone		
DC-cultuur	IC20 (µM) AB	IC20 (µM) PI
DC090204	162,555	182,810
DC090211_2	119,950	165,577
DC090218_2	108,643	179,061
DC090219	187,499	133,352
DC090304_2	39,994	79,433
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	123,728	148,047
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	56,629	43,016

Tabel 5: Blootstelling aan ZnSO<sub>4</sub>: AB versus PI: non-cryopreservatie.

Zinksulfaat		
DC-cultuur	IC20 (µM) AB	IC20 (µM) PI
DC090129	341,979	574,116
DC090204	487,528	639,735
DC090211_2	461,318	610,942
DC090218_2	506,991	557,186
DC090219	489,779	620,869
DC090304_2	486,407	657,658
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	462,334	610,084
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	60,742	38,344

### 5.1.1.1 Conclusie: AlamarBlue™ versus Propidiumjodide: non-cryopreservatie

Tabel 6: Samenvatting van de teststoffen: AB versus PI: non-cryopreservatie.

DC van niet gecryopreserveerde stamcellen (5 verschillende navelstrengbloeddonoren)			
teststof	IC20 (µM) gemiddelde ± SD <b>AB</b>	IC20 (µM) gemiddelde ± SD <b>PI</b>	Gepaarde T-toets <b>PI versus AB</b>
<b>DNFB</b>	20,5 ± 11,7	37,9 ± 15,1	<b>0,013</b>
<b>Formaldehyde</b>	224,8 ± 149,6	195,9 ± 97,2	0,942
<b>HQ</b>	123,7 ± 56,6	148,1 ± 43,0	0,219
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	462,3 ± 60,7	610,1 ± 38,3	<b>0,004</b>

Uit de gegevens van Tabel 6 zien we duidelijk een significant verschil ( $p < 0,05$ ) tussen de twee meetmethoden, AlamarBlue™ en Propidiumjodide, bij de blootstelling aan dinitrofluorobenzeen en zinksulfaat (in het vet gemarkeerd).

Voor hydroquinone en formaldehyde werd er geen significant verschil ( $p > 0,05$ ) aangetoond en was de 0-hypothese dus correct.

### 5.1.2 AlamarBlue™ en Propidiumjodide na cryopreservatie

Tabel 7: Blootstelling aan DNFB: AB versus PI na cryopreservatie.

Dinitrofluorobenzeen		
DC-cultuur	IC20 (µM) <b>AB</b>	IC20 (µM) <b>PI</b>
DC090403_2_cryo	27,542	60,395
DC090409_1_cryo	8,989	27,669
DC090409_3_cryo	11,246	26,915
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	15,926	38,327
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	10,123	19,115

Tabel 8: Blootstelling aan formaldehyde: AB versus PI na cryopreservatie.

Formaldehyde		
DC-cultuur	IC20 (µM) <b>AB</b>	IC20 (µM) <b>PI</b>
DC090403_2_cryo	250,035	489,779
DC090409_1_cryo	10,965	38,548
DC090409_3_cryo	207,491	198,609
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	156,164	242,312
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	127,532	228,768

Tabel 9: Blootstelling aan HQ: AB versus PI na cryopreservatie.

Hydroquinone		
DC-cultuur	IC20 (µM) <b>AB</b>	IC20 (µM) <b>PI</b>
DC090219_cryo	24,155	56,364
DC090304_2_cryo	13,243	69,183
DC090403_2_cryo	216,272	155,597
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	84,557	93,714
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	114,199	53,973

**Tabel 10: Blootstelling aan ZnSO<sub>4</sub>: AB versus PI na cryopreservatie.**

<b>ZnSO<sub>4</sub></b>		
<b>DC-cultuur</b>	<b>IC20 (µM) AB</b>	<b>IC20 (µM) PI</b>
DC090129_cryo	466,659	592,925
DC090219_cryo	467,735	519,996
DC090304_2_cryo	524,807	630,957
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	486,401	581,293
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	33,266	56,388

### 5.1.2.1 Conclusie: AlamarBlue™ versus Propidiumjodide na cryopreservatie

**Tabel 11: Samenvatting van de teststoffen: AB versus PI na cryopreservatie.**

<b>DC van gecryopreserveerde stamcellen (3 verschillende navelstrengbloeddonoren)</b>			
<b>teststof</b>	<b>IC20 (µM) gemiddelde ± SD AB</b>	<b>IC20 (µM) gemiddelde ± SD PI</b>	<b>Gepaarde T-toets PI versus AB</b>
<b>DNFB</b>	15,9 ± 10,1	38,3 ± 19,1	<b>0,012</b>
<b>Formaldehyde</b>	156,2 ± 127,5	242,3 ± 228,8	0,267
<b>HQ</b>	84,6 ± 114,2	93,7 ± 54,0	0,336
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	486,4 ± 33,3	581,3 ± 56,4	<b>0,045</b>

Uit Tabel 11 kan geconcludeerd worden dat ook hier, bij DC afkomstig van gecryopreserveerde stamcellen, een stofafhankelijk significant verschil is tussen AB en PI, al is het verschil bij ZnSO<sub>4</sub> niet zo uitgesproken als bij DC afkomstig van niet gecryopreserveerde stamcellen. Maar eveneens treedt het significant verschil ( $p < 0,05$ ) op bij dezelfde teststoffen, namelijk dinitrofluorobenzeen en zinksulfaat (in het vet gemarkeerd).

## 5.2 Non-cryopreservatie versus cryopreservatie

Van drie navelstrengbloedstalen werden de CD34<sup>+</sup> stamcellen in twee verdeeld. Een deel werd onmiddellijk gedifferentieerd tot DC, terwijl de overige CD34<sup>+</sup> stamcellen werden ingevroren, nadien ontdooid om tenslotte te differentiëren tot DC-culturen.

De dendritische cellen die afkomstig waren van gecryopreserveerde stamcellen werden aan dezelfde teststoffen met de dezelfde concentraties op dezelfde manier blootgesteld als niet gecryopreserveerde. Voor elke stof werd de IC20 bepaald met behulp van AB en PI. Per meetmethode en per teststof werd er nagegaan of er een significant verschil optrad, wat betreft de respons van DC na blootstelling, als de stamcellen al dan niet gecryopreserveerd zijn geweest.

De resultaten voor AB van de teststoffen DNFB, formaldehyde, HQ en ZnSO<sub>4</sub> worden respectievelijk weergegeven in Tabel 12, Tabel 13, Tabel 14 en Tabel 15.

De resultaten voor PI worden weergegeven in Tabel 17, Tabel 18, Tabel 19 en Tabel 20.

### 5.2.1 AlamarBlue™

Tabel 12: Blootstelling aan DNFB met AB.

AlamarBlue™: dinitrofluorobenzeen		
DC-cultuur	IC20 (µM) non-cryo	IC20 (µM) cryo
DC090403_2	38,019	27,542
DC090409_1	8,156	8,989
DC090409_3	11,830	11,246
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	19,335	15,926
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	16,284	10,123

Tabel 13: Blootstelling aan formaldehyde met AB.

AlamarBlue™: formaldehyde		
DC-cultuur	IC20 (µM) non-cryo	IC20 (µM) cryo
DC090403_2	449,780	250,035
DC090409_1	237,137	10,965
DC090409_3	169,824	207,491
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	285,581	156,164
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	146,129	127,532

Tabel 14: Blootstelling aan HQ met AB.

AlamarBlue™: hydroquinone		
DC-cultuur	IC20 (µM) non-cryo	IC20 (µM) cryo
DC090219	187,499	24,155
DC090304_2	39,994	13,243
DC090403_2	319,154	216,272
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	182,216	84,557
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	139,655	114,199

Tabel 15: Blootstelling aan ZnSO<sub>4</sub> met AB.

AlamarBlue™: zinksulfaat		
DC-cultuur	IC20 (µM) non-cryo	IC20 (µM) cryo
DC090129	341,979	466,659
DC090219	489,779	467,735
DC090304_2	486,407	524,807
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	439,388	486,401
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	84,376	33,266

### 5.2.1.1 Conclusie: non-cryopreservatie versus cryopreservatie met AlamarBlue™

Tabel 16: Samenvatting van de teststoffen: non-cryopreservatie versus cryopreservatie met AB.

AlamarBlue™			
teststof	IC20 (µM) gemiddelde ± SD non-cryo	IC20 (µM) gemiddelde ± SD cryo	Gepaarde T-toets cryo versus non-cryo
<b>DNFB</b>	19,3 ± 16,3	15,9 ± 10,1	0,532
<b>Formaldehyde</b>	285,6 ± 146,1	156,2 ± 127,5	0,363
<b>HQ</b>	182,2 ± 139,7	84,6 ± 114,2	0,133
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	439,4 ± 84,4	486,4 ± 33,3	0,391

Uit de gegevens van Tabel 16 kan er geconcludeerd worden dat cryopreservatie geen significante invloed heeft op de IC20 waarde van AB-test. De p-waarden van alle stoffen liggen beduidend hoger dan 0,05.

### 5.2.2 Propidiumjodide

Tabel 17: Blootstelling aan DNFB met PI.

Propidiumjodide: dinitrofluorobenzeen		
DC-cultuur	IC20 (µM) non-cryo	IC20 (µM) cryo
DC090403_2	64,565	60,395
DC090409_1	27,040	27,669
DC090409_3	32,137	26,915
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	41,247	38,327
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	20,354	19,115

Tabel 18: Blootstelling aan formaldehyde met PI.

Propidiumjodide: formaldehyde		
DC-cultuur	IC20 (µM) non-cryo	IC20 (µM) cryo
DC090403_2	228,560	489,779
DC090409_1	205,116	38,548
DC090409_3	169,434	198,609
<b>gemiddelde IC20 (µM)</b>	201,037	242,312
<b>standaarddeviatie IC20 (µM)</b>	29,773	228,768

Tabel 19: Blootstelling aan HQ met PI.

Propidiumjodide: hydroquinone		
DC-cultuur	IC20 ( $\mu\text{M}$ ) non-cryo	IC20 ( $\mu\text{M}$ ) cryo
DC090219	133,352	56,364
DC090304_2	79,433	69,183
DC090403_2	79,799	155,597
<b>gemiddelde IC20 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	97,528	93,714
<b>standaarddeviatie IC20 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	31,025	53,973

Tabel 20: Blootstelling aan  $\text{ZnSO}_4$  met PI.

Propidiumjodide: zinksulfaat		
DC-cultuur	IC20 ( $\mu\text{M}$ ) non-cryo	IC20 ( $\mu\text{M}$ ) cryo
DC090129	574,116	592,925
DC090219	620,869	519,996
DC090304_2	657,658	630,957
<b>gemiddelde IC20 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	617,548	581,293
<b>standaarddeviatie IC20 (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	41,870	56,388

### 5.2.2.1 Conclusie: non-cryopreservatie versus cryopreservatie met Propidiumjodide

Tabel 21: Samenvatting van de teststoffen: non-cryopreservatie versus cryopreservatie met PI.

Propidiumjodide			
teststof	IC20 ( $\mu\text{M}$ ) gemiddelde $\pm$ SD non-cryo	IC20 ( $\mu\text{M}$ ) gemiddelde $\pm$ SD cryo	Gepaarde T-toets cryo versus non-cryo
<b>DNFB</b>	41,3 $\pm$ 20,4	38,3 $\pm$ 19,1	0,331
<b>Formaldehyde</b>	201,0 $\pm$ 29,8	242,3 $\pm$ 228,8	0,765
<b>HQ</b>	97,5 $\pm$ 32,0	93,7 $\pm$ 54,0	0,826
<b><math>\text{ZnSO}_4</math></b>	617,6 $\pm$ 41,9	581,3 $\pm$ 56,4	0,418

Net zoals bij AB heeft ook hier bij PI cryopreservatie geen significante invloed op de IC20 waarde. In Tabel 21 is er geen stof die een lagere p-waarde dan 0,05 heeft en dus is het verschil tussen niet- en gecryopreserveerde cellen niet significant.

## 6 Besluit

Deze thesis kadert in het onderzoek naar dierproefvervangende toxicologische testen dat sinds een aantal jaren een extra impuls heeft gekregen door de veranderde Europese wetgeving. Het ontwikkelen van nieuwe toxicologische *in vitro* technologieën voor het klasseren van toxische stoffen, met als eindpunt huidsensitizatie, is dan ook één van de onderzoeksthema's binnen VITO. Momenteel wordt er intensief gewerkt aan een *in vitro* classificatiemodel dat een onderscheid kan maken tussen niet-sensitizerende en sensitizerende stoffen, namelijk de VITOLENS<sup>®</sup>. De test stelt dendritische cellen, afgeleid van CD34<sup>+</sup> uit humaan navelstrengbloed, *in vitro* bloot aan een bepaalde concentratie van de chemische teststof. Een belangrijk onderdeel van deze test bestaat uit een cytotoxiciteitstest om de geschikte blootstellingsconcentratie te bepalen. Tot op heden werd daarvoor enkel gebruik gemaakt van de AlamarBlue<sup>™</sup> assay in functie van de VITOLENS<sup>®</sup> en omdat men wenst over te schakelen naar de Propidiumjodide test was er nood aan een vergelijkende studie.

In dit onderzoek werd er gewerkt met dendritische cellen, maar omdat het isoleren van CD34<sup>+</sup> stamcellen tijdrovend is en afhankelijk is van de toelevering van navelstrengbloed zou het een pluspunt zijn als gecryopreserveerde stamcellen gebruikt kunnen worden voor deze toepassing. Belangrijk hierbij is dat ingevroren en ontdooide stamcellen nog differentieerbaar zijn tot dendritische cellen en eenzelfde cytotoxisch respons geven na blootstelling aan chemische stoffen in vergelijking met gedifferentieerde dendritische cellen afkomstig van niet gecryopreserveerde CD34<sup>+</sup> stamcellen.

Het eerste doel van dit eindwerk was om de Propidiumjodide meetmethode te vergelijken met de AlamarBlue<sup>™</sup> assay voor het bepalen van de cytotoxiciteit bij dendritische cellen afgeleid van CD34<sup>+</sup> stamcellen uit humaan navelstrengbloed. In de vergelijkende studie die werd uitgevoerd tijdens deze stage, kan er geconcludeerd worden dat er, afhankelijk van de gebruikte blootstellingsstof, soms een significant verschil is tussen PI en AB en soms niet. Dit zien we zowel bij DC die afkomstig zijn van niet gecryopreserveerde stamcellen als bij gecryopreserveerde CD34<sup>+</sup> stamcellen.

Het is geen onverwacht resultaat vanwege het verschillend principe van deze twee meetmethodes. AB meet namelijk de inhibitie van de metabolische activiteit, terwijl PI de inhibitie van de celviabiliteit bepaalt.

Een tweede doelstelling van dit onderzoek was nagaan of DC afgeleid van gecryopreserveerde CD34<sup>+</sup> stamcellen eenzelfde cytotoxisch respons geven na blootstelling aan chemische stoffen. Uit de bekomen resultaten kan besloten worden dat cryopreservatie van CD34<sup>+</sup> stamcellen geen significante invloed uitoefent op de respons van DC na blootstelling aan een teststof. De IC20 waarde van de teststoffen gaven dus geen significant verschil voor zowel AlamarBlue<sup>™</sup> als voor Propidiumjodide.

Dit is een belangrijke factor voor de uitvoering van de VITOLENS<sup>®</sup>. De testen die onder deze noemer moeten uitgevoerd worden zijn minder afhankelijk van de tijdstippen van toelevering van navelstrengbloed. CD34<sup>+</sup> stamcellen kunnen ingevroren worden wanneer een bloedstaal zich aandient en DC-culturen kunnen geïnitieerd worden op andere dagen. Organisatorisch betekent dit een groot voordeel. De praktische proeven kunnen in het werkschema ingecalculereerd worden doordat er gebruik gemaakt kan worden van gecryopreserveerde CD34<sup>+</sup> stamcellen.

## 7 Bibliografie

### 7.1 Artikels

- Andersen, K.E., Frankild, S., 1997. Allergic Contact Dermatitis. *Clinics in Dermatology* 15, 645-654.
- Ashikaga, T., Yoshida, Y., Hirota, M., Yoneyama, K., Itagaki, H., Sakaguchi, H., et al., 2006. Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell Lines; human Cell Line Activationtest (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro* 20, 767-73.
- Berz, D., McCormack, E.M., Winer, E.S., Colvin, G.A., Quesenberry, P.J., 2007. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells. *American Journal of Hematology* 82, 000-000.
- dos Santos, G. G., Reinders, J., Ouwehand, K., Rustemeyer, T., Scheper, R.J., Gibbs, S., 2009. Progress on the development of human *in vitro* dendritic cell based assays for assessment of the potential of a compound. *Toxicology and Applied Pharmacology* 236, 372-382.
- Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Schlatter, H., Dearman, R.J., Kimber, I., Patlewicz, G.Y., Basketter, D.A., 2005. Compilation of Historical Local Lymph Node Data for Evaluation of Skin Sensitization Alternative Methods. *Dermatitis*, Vol. 16, Nr. 4, 157-202.
- Hooyberghs, J., Schoeters, E., Lambrechts, N., Nelissen, I., Witters, H., Schoeters, G.E.R., Van Den Heuvel, R.L., 2008. A cell-based *in vitro* alternative to identify skin sensitizers by gene expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 231, 103-111.
- Hunt, C.J., Armitage, S.E., Pegg, D.E., 2003. Cryopreservation of umbilical cord blood: 1. Osmotically inactive volume, hydraulic conductivity and permeability of CD34<sup>+</sup> cells to dimethyl sulphoxide. *Cryobiology* 46, 61-75.
- Hunt, C.J., Armitage, S.E., Pegg, D.E., 2003. Cryopreservation of umbilical cord blood: 2. Tolerance of CD34<sup>+</sup> cells to multimolar dimethyl sulphoxide and the effect of cooling rate on recovery after freezing and thawing. *Cryobiology* 46, 76-87.
- Kimber, I., Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Dearman, R.J., 2002. Allergic contact dermatitis. *International Immunopharmacology* 2, 201-211.
- Klaessens, J.W.A., 2006. Statistiek, validatie en meetonzekerheid voor het laboratorium. *Syntax Media-Arnhem*, 19-24.
- Lambrechts, N., Verstraelen, S., Lodewyckx, H., Felicio, A., Hooyberghs, J., Witters, H., Van Tendeloo, V.F.I., Van Cauwenberge, P., Nelissen, I., Van Den Heuvel, R.L. Schoeters, G.E.R., 2009. THP-1 monocytes but not macrophages as a potential alternative for CD34<sup>+</sup> dendritic cells to identify chemical skin sensitizers. *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- Pentinga, S.E., Rustemeyer, T., 2008. Immunopathofysiologie en huidbeeld van contactallergie. *Nederlands tijdschrift voor allergie*, Vol. 8, Nr. 4, 122-126.
- Raymaekers, G., 2007. Immunologische technieken, productie van antilichamen. 2<sup>e</sup> jaar Professionele Bachelor in de chemie afstudeerrichting biochemie, KHLim departement IWT, 43-45.
- Ryan, C.A., Hulette, B.C., Gerberick, G.F., 2001. Approaches for the development of cell-based *in vitro* methods for contact sensitization. *Toxicology in Vitro* 15, 43-55.
- Ryan, C.A., Kimber, I., Basketter, D.A., Pallardy, M., Gildea, L.A., Gerberick, G.F., 2007. Dendritic cells and skin sensitization: biological roles and uses in hazard identification. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221, 384-394.



- Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Yoshida, Y., Ito, Y., Yoneyama, K., et al., 2006. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol In Vitro* 20, 774-84.
- Sakaguchi, H., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Kosaka, N., Ito, Y., Yoneyama, K., Sono, S., Itagaki, H., Toyoda, H., Suzuki, H., 2009. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test – human cell line activation test (h-CLAT). *Cell Bio Toxicol* 25, 109-126.
- Schoeters, E., Verheyen, G.R., Nelissen, I., Van Rompay, A.R., Hooyberghs, J., Van Den Heuvel, R.L., Witters, H., Schoeters, G.E.R., Van Tendeloo, V.F.I., Berneman, Z.N., 2007. Microarray analyses in dendritic cells reveal potential biomarkers for chemical-induced skin sensitization. *Molecular Immunology* 44, 3222-3233.
- Solves, P., Mirabet, V., Planelles, D., Carbonell-Uberos, F. Riog, R., 2008. Influence of volume reduction and cryopreservation methodologies on quality of thawed umbilical cord blood units for transplantation. *Cryobiology* 56, 152-158.
- Staquet, M.J., Sportouch, M., Jacquet, C., Schmitt, D., Guesnet, J., Péguet-Navarro, J., 2004. Moderate skin sensitizers can induce phenotypic changes on in vitro generated dendritic cells. *Toxicology In Vitro* 18, 493-500.

## 7.2 Elektronische bronnen

Bioplek, *T-toets*, online,

<http://www.bioplek.org/techniekkartenbovenbouw/techniek99ttoets.html>,  
29.05.2009.

Nederlandse Vereniging voor Dermatologie en Venereologie, *Ziektebeelden*, online,

[http://www.ziekenhuis.nl/index.php?cat=ziektebeelden&ziektebeelden=ziektebeeld\\_](http://www.ziekenhuis.nl/index.php?cat=ziektebeelden&ziektebeelden=ziektebeeld_item&item_id=272&letter=H)  
[item&item\\_id=272&letter=H](http://www.ziekenhuis.nl/index.php?cat=ziektebeelden&ziektebeelden=ziektebeeld_item&item_id=272&letter=H), 29.04.2009.

Universitair Ziekenhuis Antwerpen, *Contactallergenen*, online,

<http://www.maguza.be/dossiers/p/artikel-dossier/contactallergieen>, 29.04.2009.

Fonds voor beroepsziekten, *Beroepsdermatosen*, online,

<http://www.fbz.fgov.be/Pdfdocs/MedicalN/beroepsdermatosen.pdf>, 29.04.2009.