

Het effect van cadmiumtoxiciteit op stamcellen in M.lignano

Olivier Degheselle

promotor :
Prof. dr. Tom ARTOIS

INHOUDSOPGAVE

INHOUDSOPGAVE	I
VOORWOORD	III
SAMENVATTING	IV

I	INLEIDING	1
1	Probleemstelling	1
2	Platyhelminthes	1
2.1	Het fylum Platyhelminthes	1
2.2	<i>Macrostomum lignano</i>	2
2.3	Modelorganismen voor regeneratie	3
2.3.1	Traditionele modelorganismen: Tricladen	4
2.3.2	Nieuw modelorganisme: <i>Macrostomum lignano</i>	5
2.4	Het stamcelsysteem bij Platyhelminthes	6
2.4.1	Distributie van de neoblastpopulatie in <i>Macrostomum lignano</i>	7
2.4.2	Kenmerken van de neoblast	8
2.4.3	Indeling van de neoblast	9
2.4.4	Regeneratie bij <i>Macrostomum lignano</i>	9
3	Cadmium	10
3.1	Effecten op de mens	10
3.2	Effecten op Platyhelminthes	11
3.3	Effecten op het neoblastsysteem	11
II	MATERIALEN EN METHODEN	13
1	Culturen	13
1.1	Oorsprong van de cultuur	13
1.2	Onderhoud van de cultuur	13
1.3	Bestrijding van parasitaire besmetting van de cultuur	13
1.4	Opstarten van testcultuur	13
2	LC50-test	13
3	BrdU-labeling	14
3.1	Standaard protocol	14
3.2	Distributie experiment	14
3.3	Migratie/differentiatie experiment	15
4	Confocale microscopie	15
4.1	Principe (confocale) microscopie aan levende cellen en weefsels	15
4.2	Instellingen	15
4.3	Metten van de BrdU-kleuring bij <i>Macrostomum lignano</i>	16
5	Beeldverwerking	17
6	Statistiek	17

III	RESULTATEN	19
1	LC50 voor cadmium bij <i>Macrostomum lignano</i>	19
2	Distributie experiment	19
2.1	Visuele analyse	19
2.1.1	Verschillen in BrdU-labeling.....	19
2.1.2	Distributiepatroon van de delende neoblasten	21
2.2	Kwantitatieve analyse	22
2.2.1	Optimalisatie van het standaardprotocol voor de beeldanalyse	23
2.2.2	Optimalisatie van de thresholdkeuze	25
2.2.3	Procedure voor het tellen van het aantal partikels.....	28
2.3	Statistische analyse	30
3	Migratie-experiment.....	32
IV	DISCUSSIE	34
1	LC50-waarde voor cadmium bij <i>Macrostomum lignano</i>	34
2	Opstarten van de testculturen	34
3	BrdU-labeling	34
4	Distributie experiment	35
4.1	Visuele analyse	35
4.2	Optimalisatie van de beeldverwerking	36
4.3	kwantitatieve en statistische analyse	37
5	Migratie experiment	38
	REFERENTIELIJST	40

VOORWOORD

Hier zit ik dan! Dinsdag 19 juni 2007, 1:23u. de dag waarop die beruchte 'thesis' moet ingeleverd worden. Het klinkt zelfs als een beest dat getemd moet worden. En wees daar maar zeker van, want hier zit ik dan (nog altijd). Al van 9.30u bezig achter de computer met de allerlaatste verbeteringen na te kijken. Het was de meest vermoeiende dag uit heel het thesisgebeuren. Maar die is het definitief waard geweest.

Een jaar terug begon het allemaal. Toen werd er een beurs voor de 3^e bachelor studenten Biomedische wetenschappen georganiseerd. En vanaf toen wist ik dat ik met platwormen verder zou gaan. In het begin was het wel allemaal spannend, want alle biomedici die gingen biomedici-achtige stages doen. Ik daarentegen koos voor een stage bij de biologie. Fylogenetische toestanden, soortbeschrijvingen, effectief werken met wormen. Iieeeeeeeeeuw!!!! Dat was de reactie van de meeste mensen in mijn omgeving. Iedereen had zo het beeld alsof ik met van die glazen bokalen rondliep waar enorme, slijmerige en vooral wormachtige wormen in zaten. Ik herinner me nog goed het eerste contact met onze minuscuul kleine wormpjes. Het was een magisch moment! Het klikte enorm goed en vanaf toen werden we onafscheidbaar. Nu ja, ..., tot ik met mijn BrdU-kleuringen begon en er gemiddeld per week toch wel 50 van mijn vriendjes moesten sneuvelen. Maar ze hebben me zoveel teruggegeven, zelfs resultaten. Het zag er niet altijd even rooskleurig uit en ik heb er heel veel moeite voor moeten doen, maar na een dikke 5 maanden kreeg ik dan toch wat ik wou. Enkele getalletjes en voila mijn thesis was een feit.

Uiteraard is dit mij niet alleen gelukt en daarom zou ik graag nog enkele mensen willen bedanken. Eerst en vooral wil ik mijn Tom Artois, mijn promotor bedanken voor het enthousiasme en de kennis waarmee hij mij altijd heeft bijgestaan. Daarnaast wil ik ook Emmy Van Kerkhove willen bedanken die als tweede beoordelaar het volledige werk heeft nagelezen.

Het meeste dank gaat natuurlijk uit naar mijn begeleidster, Michelle Plusquin, die ondanks het zwanger zijn enorm veel geduld en tijd voor mij heeft gehad. Bedankt voor altijd zo positief te blijven, voor het geduld dat je hebt gehad met mij en zeker voor het nalezen op de laatste momenten.

Verder wil ik iedereen bedanken van het CMK voor de goede ontvangst en in het bijzonder wil ik hierbij Natasha Steffanie bedanken die me tijdig de juiste producten kon aanbieden en die bovendien ervoor gezorgd heeft dat ik nooit de afwas moest doen.

Een speciaal bedankwoordje voor Martin Vandeven, die me enorm veel heeft geholpen. Ten eerste voor het te leren werken met de confocale microscoop en voor de vele avonden die je me daar bezorgd hebt. En ten tweede voor het uitwerken van de beeldverwerkingsprocedure. Zonder jou was deze thesis geen feit.

Eveneens wil ik de nematologie van Gent bedanken en in het bijzonder Maxime Willems die me toen het licht bijna uitging, met open armen hebben ontvangen.

Verder wil ik Kim Donckers en Ellen Geerdens bedanken voor de leuke labomomenten die we gehad hebben.

Tot slot wil ik graag 'ons ma', Dominique, Micheline, Bert en Steven bedanken voor de goede moed die ze me tijdig konden inspreken. Ook ontzettend veel dank aan de piano waarop in het weekend vaak mijn frustraties werden losgelaten en die het dan ook overleefde.

SAMENVATTING

Cadmium komt voor in mariene sedimenten dewelke de natuurlijke habitat zijn van de platworm *Macrostomum lignano*. Deze worm werd recent ontdekt als een nieuw modelorganisme binnen het fylum van de Platyhelminthes. *Macrostomum lignano* vertoont, net als vele andere platwormen, een enorme regeneratiecapaciteit. Deze regeneratiecapaciteit danken zij aan de aanwezigheid van neoblasten. De cellen die het unieke stamcelsysteem van de platworm vormen. Neoblasten zijn namelijk de enige cellen in adulte wormen die in staat zijn tot deling. De neoblast is dus een fundamenteel en essentieel celtype, dat instaat voor regeneratie en celvernieuwing. Omwille van deze reden is het interessant om het effect van cadmium op de neoblasten te onderzoeken.

In deze studie werden de effecten van cadmium op de distributie, de migratie en differentiatie van delende neoblasten onderzocht. Dit werd mogelijk gemaakt met behulp van bromodeoxy-uridine (BrdU), een thymidine-analoog dat wordt geïncorporeerd in het DNA gedurende de S-fase van de celcyclus. Voor het nagaan van distributiepatronen en aantal delende neoblasten werden de wormen kortstondig blootgesteld aan BrdU, terwijl voor het nagaan van migratie- en differentiatiepatronen de wormen continu werden blootgesteld aan BrdU. Voor beide experimenten werden er naast een blancogroep, twee groepen blootgesteld aan respectievelijk 2,5 μM CdCl_2 en 5 μM CdCl_2 (sublethale concentraties).

Het distributiepatroon van neoblasten bleek ongewijzigd te zijn onder invloed van cadmium. Voor het kwantificeren van het aantal delende neoblasten, al dan niet blootgesteld aan cadmium, werd er eerst een methode ontwikkeld om ze te kunnen tellen met ImageJ, gebaseerd op de verdeling van de celvolumes. Hierbij werd er een geautomatiseerde methode uitgewerkt die snel uitgevoerd kon worden en waarbij de foutenmarge zo klein mogelijk gehouden werd. Na deze beeldverwerking bleek dat bij een blootstelling aan 2,5 μM CdCl_2 het aantal delende neoblasten na 2 dagen toeneemt. Na 4 dagen daalde het aantal delende neoblasten echter terug tot normale waarden en na 6 dagen daalde het aantal delingen nog meer. Hieruit kan men vaststellen dat een blootstelling aan 2,5 μM op korte termijn (2 dagen) het neoblastsysteem gaat reageren doordat het aantal delingen toeneemt. Op lange termijn (6 dagen) lijkt het echter alsof het neoblastsysteem aangetast wordt ten gevolge van cadmium waardoor de mitotische activiteit afneemt. Bij een blootstelling aan 5 μM werden er geen significante wijzigingen in het aantal delende neoblasten terug gevonden. Dit kan erop wijzen dat het effect van cadmium voor 2 dagen of na 6 dagen zal optreden, verder zou het kunnen dat cadmium bij deze concentratie andere pathways gaat aanspreken die geen invloed hebben op het neoblastsysteem. Een laatste hypothese hieromtrent is dat de algen bij 5 μM aangetast worden waardoor de wormen onvoldoende voedsel tot zich hebben kunnen nemen. Hierdoor gaat de stress van uithongering ervoor zorgen dat het aantal delende neoblasten afneemt wat een antagonistisch effect zou kunnen hebben ten opzicht van een eventuele stijging die 5 μM cadmium veroorzaakt.

De effecten van 2,5 μM en 5 μM CdCl_2 bleken op de migratie en differentiatie een toename in het aantal gemigreerde en gedifferentieerde cellen te veroorzaken na één en drie dagen blootstelling. Een kwantitatieve analyse was hier echter niet mogelijk omdat de continue blootstelling aan BrdU resulteerde in een aankleuring van teveel cellen..

I INLEIDING

1 Probleemstelling

Het onderzoek naar stamcellen is één van de meest revolutionaire. Verschillende studies naar humane stamcellen proberen reeds aan te tonen dat deze cellen gemanipuleerd kunnen worden voor doeleinden zoals tissue engineering. Dit laatste concept is gebaseerd op het feit dat humane organen dankzij stamcellen kunnen regenereren. De regeneratiecapaciteit bij de mens is beperkt tot regeneratie van enkele organen. Platwormen daarentegen kunnen volledig regenereren en beschikken over een uniek stamcelsysteem, het neoblastsysteem. Onderzoek naar stamcellen bij platwormen zou fundamentele eigenschappen en processen omtrent deze celtypes kunnen blootleggen.

In deze verhandeling wordt het effect van cadmiumtoxiciteit op de neoblasten in S-fase (celcyclus) onderzocht. Cadmium is een toxisch metaal dat nefaste gevolgen kan hebben voor levende organismen. Aangezien de neoblast de meest fundamentele cel is bij platwormen is het niet meer dan logisch dat het onderzoeken van het effect van cadmium hierop van fundamenteel belang is.

2 Platyhelminthes

De Platyhelminthes (platwormen) zijn een groep van organismen die behoren tot het rijk der Metazoa en meer specifiek tot de Bilateria. In totaal zijn er ongeveer 20.000 soorten gekend. Hun algemene lichaamsbouw werd vaak beschouwd als het basisbouwplan van de Bilateria. De oorsprong van de platwormen, hun relatie ten opzichte van andere taxa, en evolutie binnen de groep is tot op heden nog een punt van discussie.

2.1 *Het fylum Platyhelminthes*

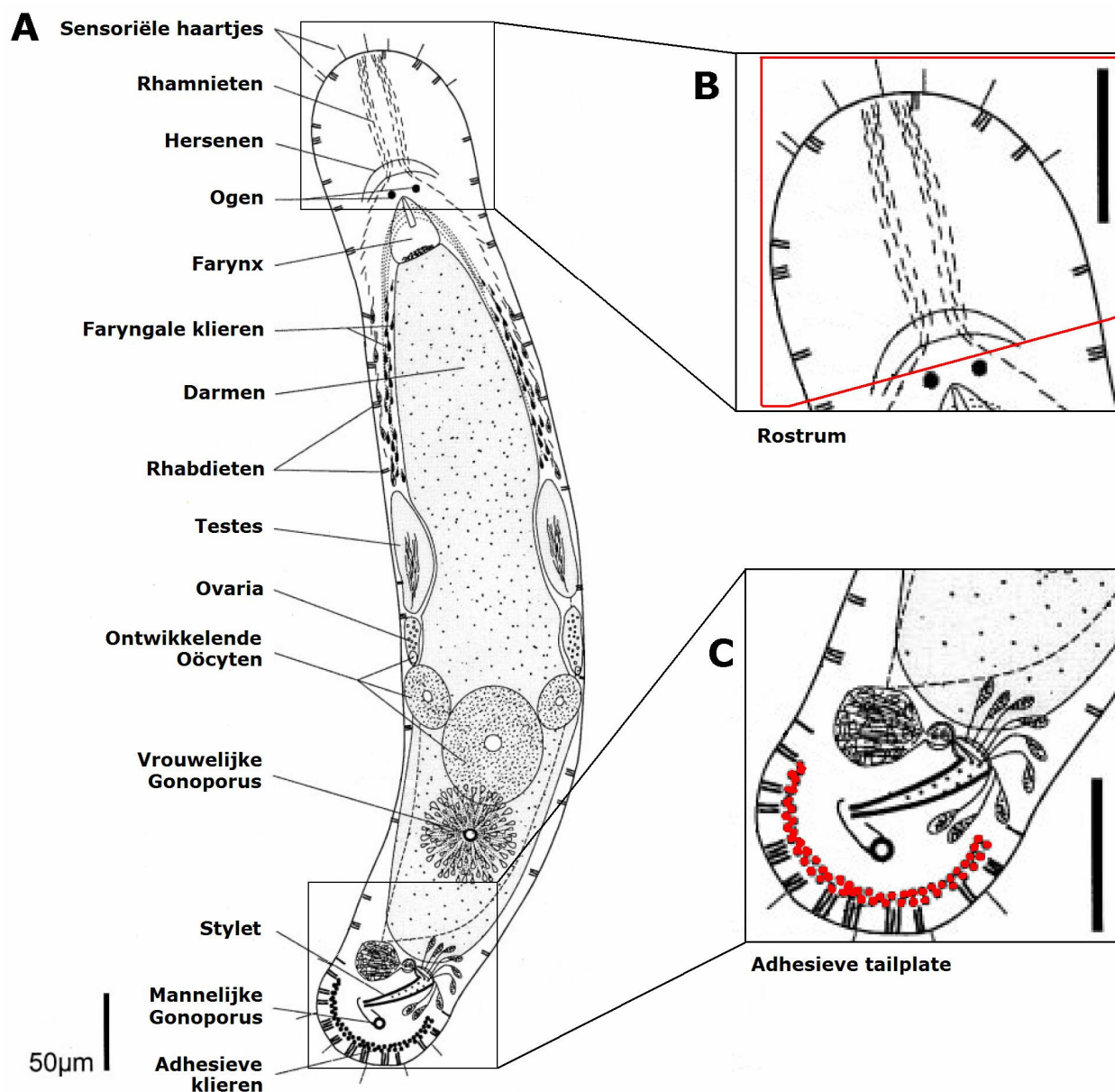
Platyhelminthes vormen een extreem divers taxon van dieren, gaande van microscopisch kleine organismen die zowel intersitueel als epifytisch en zowel in mariene als limnische milieus worden aangetroffen, tot grote parasitaire vormen die zich nestelen in verschillende organen van vertebraten. Vroeger werden ze min of meer op basis hiervan ingedeeld in twee groepen, de vrijlevende Turbellaria en de parasitaire Neodermata, die zelf weer werden ingedeeld in de Trematoda (botten) en de Cestoidea (lintwormen). Modernere morfologische en moleculaire analyses hebben aangetoond dat de Platyhelminthes opgedeeld kunnen worden in vier monofyletische taxa, de Acoela, de Nemertodermatida, de Catenulida en de Rhabditophora (1). Lang werden de meest eenvoudige gebouwde platwormen verondersteld meest te gelijken op de voorouder van alle Bilateria (1). Moleculaire analyses tonten echter aan dat het taxon Platyhelminthes polyfyletisch is. De Acoelomorpha (Acoela en Nemertodermatida) bevinden zich aan de basis van de Bilateria terwijl de Catenulida en de Rhabditophora tot de Spiralia behoren. Acoela en Nemertodermatida zijn hierbij (waarschijnlijk) zustergruppen van elkaar, net zoals de Rhabditophora en Catenulida dit zijn binnen de Spiralia (1).

Platwormen vertonen een bilaterale symmetrische lichaamsbouw en zijn ze triploblastisch. Dit wil zeggen dat ze naast het ectoderm en mesoderm tevens beschikken over mesoderm. Meestal beschikken ze over een farynx die uitmond in een darm die blind eindigt. Ze zijn één van de eerst

gekende organismen met een vorm van cephalisatie. Ze beschikken namelijk over een vooraan gelegen hersenganglion waaruit laterale zenuwstrengen vertrekken die op hun beurt verbonden zijn door transversale verbindingen (touwladder structuur). Tevens zijn er protonefridia aanwezig, die hun functie hebben in excretie en/of osmoregulatie. Tot slot beschikken de platwormen over een zeer complex voorplantingssysteem, en zijn ze bijna zonder uitzondering hermafrodiet. Ze beschikken niet over een bloedvatensysteem en daardoor is transport van essentiële elementen zoals zuurstof afhankelijk van diffusie. Tot slot wordt het inwendige van de platworm omringd door een huidspierzak bestaande uit epidermis en hieronder liggende spieren die tevens instaan voor de ondersteuning en beweging (1).

2.2 *Macrostomum lignano*

Macrostomum lignano varieert in lengte van 1 mm tot 2 mm en heeft een doorsnede van 0,3 mm (Figuur 1a). Buiten de sensorische haartjes, die zich vooral bevinden ter hoogte van het rostrale en caudale uiteinde van het dier, vertonen ze geen externe structuren. Deze sensorische haartjes zijn essentieel voor het efficiënt voortbewegen doorheen hun omgeving (2). De huidspierzak bestaat uit de epidermis en de onmiddellijk daaronder gelegen spierlagen. De epidermis vertoont drie regio's waar secretie plaats vindt. Een secretiegordel ter hoogte van de overgang tussen de farynx en het spijsverteringsstelsel is verantwoordelijk voor de secretie van kleine staafvormige secretieproducten, de rhabdieten. Deze hebben vermoedelijk hun functie in de bescherming van het organisme tegen predatoren (3). Verder zijn er klieren die een gelijkaardig sereet produceren, rhamnieten genoemd. Deze klieren vertrekken vanuit de cephale regio van de darm en van daaruit vormen ze kliernekken die de hersenen doorboren en openen ter hoogte van het topje van het rostrum. Tot slot is er een u-vormige gordel van duo-klieren die zich situeert ter hoogte van de adhesieve staartplaat. Deze klieren secreteren twee producten waardoor de staartplaat zich kan vasthechten en losmaken van een substraatoppervlak (Figuur 1c) (2). *M. lignano* beschikt over drie spierlagen, een buitenste circulaire, een intermediaire diagonale en een binnenste longitudinale spierlaag (2). Het spijsverteringsstelsel bij *M. lignano* start bij een ventraal gelegen mondopening, welke zich in bovenaanzicht net achter de ogen bevindt. Hierna volgt een gespierde, gecilieerde farynx simplex die overgaat in een blind eindigende darm die tevens gecilieerd is. Door de afwezigheid van een anus worden afvalstoffen door middel van reflux via de mondopening verwijderd (2, 3). Het zenuwstelsel bij *M. lignano* bestaat uit een vooraan gelegen hersenganglion dat zich net voor de ogen ter hoogte van het rostrum bevindt (Figuur 1b). Van hieruit vertrekken er twee laterale zenuwstrengen richting de staart toe, waar ze samenkomen en een klein ganglion vormen. Daarnaast lopen er tevens zenuwstrengen aan de dorsale en ventrale zijde van het organisme. Dorsaal, net achter de hersenen, liggen twee ogen. De dieren zijn sterk negatief fototactisch waardoor ze van het licht zullen wegzwemmen (2, 3). *M. lignano* is simultaan hermafrodiet en plant zich enkel door middel van kruisbevruchting voort. *M. lignano* beschikt dus over zowel testes als ovaria (2, 3). Het parenchym of mesenchym, de ruimte die zich tussen epidermis en gastrodermis bevindt, bevat het zenuwstelsel, het voortplantingssysteem en één paar protonefridia. Elk protonephridium bestaat uit een kanaal, dat dorsaal van de zenuwstreng verloopt en dat proximaal eindigt in een aantal vlamcellen (solenocyten, cyrtocyten). Deze protonephridia staan in voor de osmoregulatie bij *M. lignano* (2, 3).



Figuur 1: Schematische weergave van *Macrostomum lignano* (ventraal zicht) (2)

A. Schematische weergave van het volledige organisme waarop alle organen en lichaamsdelen zijn weergegeven **B.** Rostrum (gebied boven de ogen) **C.** Adhesieve staartplaat waar de duokliertjes weergegeven worden in het rood.

2.3 Modelorganismen voor regeneratie

Regeneratie is een eigenschap die slechts een kleine groep organismen bezit. Verschillende studies hebben reeds waargenomen dat de meeste fyta binnen de metazoa regeneratie vertonen (2, 5). Verschillende gradaties van regeneratie zijn waar te nemen bij verschillende modelorganismen binnen deze groep. Hieruit kan dus geconcludeerd worden dat regeneratie in verschillende niveaus voor kan komen, gaande van regeneratie van de ledematen tot volledige regeneratie. In Figuur 2 wordt een fylogenetische boom van de Metazoa weergegeven op basis van de belangrijkste taxa en modelorganismen met betrekking tot regeneratie.

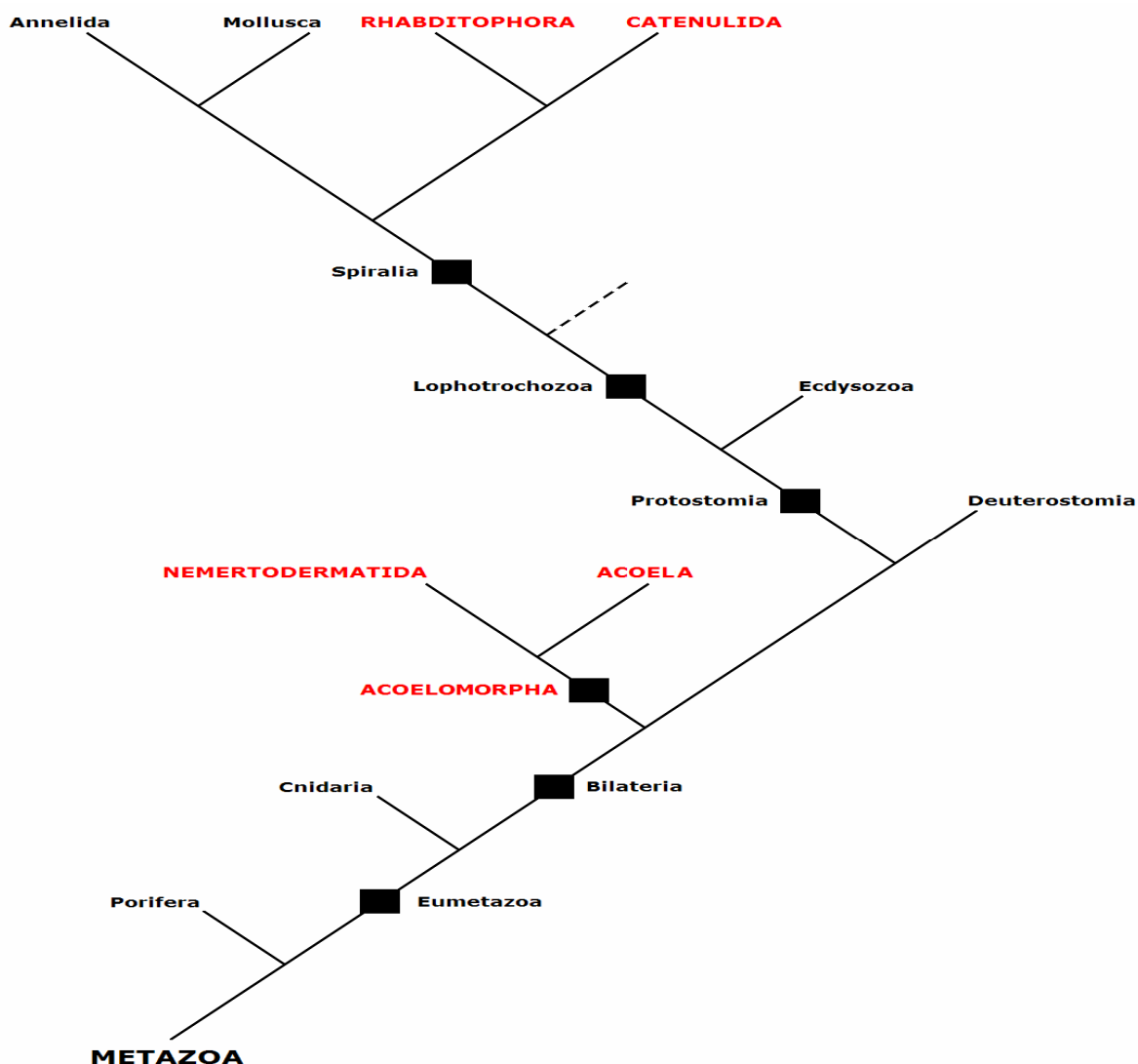
Wanneer men binnen twee van de drie grote groepen van de Bilateria gaat kijken, de Deuterostomia en de Ecdysozoa, zijn er diverse gradaties van regeneratie waar te nemen. Enerzijds zijn er onder de Echinodermata (Bilateria, Deuterostomia) een beperkt aantal organismen die over een volledige regeneratiecapaciteit beschikken waaronder zeesterren (Asteroidea). Anderzijds zijn er meerdere modelorganismen die een beperkte graad van regeneratie vertonen gaande van regeneratie van de ledematen zoals bij *Ambystoma mexicanum* (axolotl; Deuterostomia) en *Drosophila melanogaster* (fruitvliegje; Ecdysozoa), tot regeneratie van organen zoals bij *Mus musculus* (de muis; Deuterostomia) en *Homo sapiens sapiens* (de mens; Deuterostomia) (6, 7, 8, 9, 10). Wanneer men naar basale taxa gaat kijken die aan de basis binnen de Metazoa, zoals Cnidaria en Porifera is er sprake van zowel seksuele als asexuele voortplanting. Deze laatste vorm van voortplanting gaat altijd gepaard met een hoge regeneratiecapaciteit tot zelfs volledige regeneratie (11, 12, 13).

Asexuele voortplanting en de hiermee gepaarde hoge regeneratiegraad komt echter het meeste voor bij organismen die behoren tot de Lophotrochozoa, de derde grote groep binnen de Bilateria, waaronder de Mollusca, de Annelida en de Platyhelminthes (13, 14, 15).

Het onderzoek naar de ontwikkelingsbiologie binnen de basale Bilateria wordt vooral gehinderd door het gebrek aan geschikte modelorganismen. De Platyhelminthes kunnen hier een oplossing bieden omdat ze over een uniek stamcelsysteem (zie Inleiding, paragraaf 2.4) beschikken waardoor sommige species een uitzonderlijk hoge regeneratiecapaciteit vertonen (1). Tevens zijn er de Acoela en de Nemertodermatida die zich aan de basis van de Bilateria bevinden, en de Catenulida en de Rhabditophora die zich binnen de Spiralia bevinden (2).

2.3.1 Traditionele modelorganismen: Tricladen

Binnen de Platyhelminthes is het meeste onderzoek verricht binnen het taxon Rhabditophora. Ten eerste omdat het onderzoek naar de Acoela, de Nemertodermatida en de Catenulida een gebrek heeft aan geschikte modelorganismen en ten tweede omdat regeneratie binnen deze groepen niet zo grondig onderzocht is als binnen de Rhabditophora. Tot op heden werd het meeste onderzoek naar regeneratie uitgevoerd op tricladen, meer bepaald op *Schmidtea mediterranea* en *Dugesia japonica*, dewelke zich asexueel kunnen voortplanten. Dit vergemakkelijkt de voortplanting aanzienlijk en wijst er ook op dat deze organismen een uitgesproken regeneratiepotentieel bezitten. Het regeneratiepotentieel van *S. mediterranea* is zelfs zo extreem dat 1/279^{ste} deel van het dier na een week kan uitgroeien tot een compleet, anatomisch correct gevormd organisme (2, 16). Wanneer men onderzoek verricht op *S. mediterranea* moet er rekening gehouden worden met de positie van dit organisme binnen het fylum Platyhelminthes. Moleculaire analyses hebben reeds aangetoond dat de Triclada zich niet basaal bevinden binnen de Rhabditophora (17). Ze bezitten bovendien vele unieke, afgeleide kenmerken zoals hun aberrante embryonale ontwikkeling (18).



Figuur 2: Fylogenie van de Metazoa.

De taxa die behoren tot de Platyhelminthes zijn weergegeven in het rood

2.3.2 Nieuw modelorganisme: *Macrostomum lignano*

Omwille van het feit dat tricladen zoveel afgeleide eigenschappen vertonen, is men geruime tijd op zoek geweest naar een modelorganisme dat in veel meer eigenschappen overeenkomt met het basisbouwplan binnen de platwormen, en een grote regeneratiecapaciteit vertoonde. In de Noord-Adriatische zee, bij Lignano, werd zo'n modelorganisme gevonden, *Macrostomum lignano*, welk geschikt is voor het onderzoeken van de ontwikkeling en evolutie van het stamcelsysteem binnen de Bilateria. *M. lignano* heeft verschillende voordelen ten opzichte van voorgaande modelorganismen zoals *Schmidtea mediterranea*.

2.3.2.1 Fylogenie

Het genus *Macrostomum* is met meer dan 100 soorten het grootste taxon binnen Macrostromorpha, de meest basale clade binnen de Rhabditophora, welk op zijn beurt het meest soortenrijke taxon is binnen de Platyhelminthes (Figuur 2). Vooral door de basale positie binnen de Rhabditophora die *M. lignano* bekleedt, zijn extrapolaties naar organismen binnen de Rhabditophora met een afgeleide ontwikkeling mogelijk (1, 3).

2.3.2.2 Uniek stamcelsysteem

Aseksuele voortplanting gaat gepaard met een hoge graad van regeneratie (13). Binnen de Platyhelminthes zijn de Acoela, de Catenulida, de Tricladida en de Macrostromorpha de enige groepen waar tot dusver organismen voorkomen die op aseksuele manier voortplanten (19). *Macrostomum lignano* daarentegen kan zich enkel op seksuele manier voortplanten en beschikt toch over een uitzonderlijk hoge graad van regeneratie (Zie Inleiding, paragraaf 2.4.4) (20, 2). Dit komt omdat ze beschikken over neoblasten dewelke de enige cellen zijn, aanwezig bij adulte organismen, die in staat zijn om te delen.

2.3.2.3 Praktische hanteerbaarheid

Macrostomum lignano heeft een ideale lengte (1 tot 2 mm) voor microscopisch onderzoek (2). In vergelijking met *S. mediterranea* die tienmaal groter is, vertoont *M. lignano* een gelijkaardige anatomische organisatie en beschikt het tevens over een zelfde aantal celtypes en graad van differentiatie. De kleinere grootte van *M. lignano* impliceert ook een kleiner aantal cellen; een volwassen worm bestaat slechts uit ± 25.000 cellen. Dit laatste maakt de opvolging van individuele cellen en celtelling eenvoudiger (20).

Het meeste prominente voordeel van *M. lignano* is het gebrek aan pigmentatie in de epidermiscellen waardoor deze transparant zijn. Dit is vooral nuttig voor de visualisatie en opvolging van intern gekleurde neoblastpopulaties (21).

In het kader van stamcel- en regeneratieonderzoek heeft *M. lignano* nog een ander voordeel in vergelijking met tricliden, de stamcellen kunnen namelijk zeer efficiënt gelabeld worden. Wanneer men een gemerkte DNA-precursor toevoegt aan het omgevingsmilieu, wordt deze reeds na vijf minuten geïncorporeerd in het replicerend DNA. Bij tricliden daarentegen is injectie of opname via voedsel van een gemerkte DNA-precursor de enige mogelijkheid om stamcellen te merken (20).

Tot slot kan *M. lignano* zeer gemakkelijk gekweekt worden. Één worm legt gemiddeld één ei per dag en het duurt een drietal weken voordat ze volwassen zijn (20).

2.4 Het stamcelsysteem bij Platyhelminthes

Stamcellen bezitten enerzijds het potentieel om zichzelf te vernieuwen en anderzijds het potentieel om te differentiëren tot somatische cellen. Deze graad van differentiatie kan verschillen van stamcel tot stamcel en bepaalt tot welke types van somatische cellen de stamcel kan differentiëren. Platwormen beschikken over een uniek stamcelsysteem binnen het dierenrijk, aangezien hun stamcellen, neoblasten genoemd, (vermoedelijk) totipotent zijn (21). Totipotentie duidt op de

differentiatiecapaciteit van stamcellen die kunnen differentiëren tot alle types van somatische cellen (22).

De cellen bij deze organismen worden opgedeeld in twee celpopulaties, het proliferatieve compartiment en het functionele compartiment (22). Het eerste bevat alle cellen die behoren tot eender welk differentiatiestadium van de neoblast (Zie inleiding, paragraaf 2.4.3), terwijl het tweede alle gedifferentieerde somatische cellen (die mitotisch inactief zijn) bevat. Tot dusver werden neoblasten geïdentificeerd als de enige mitotisch actieve cellen binnen de Platyhelminthes. Daardoor zijn ze de enige bron waaruit gedifferentieerde cellen ontstaan die nodig zijn tijdens de groei, het onderhouden van weefsels (celvernieuwing) en regeneratie (20).

Één van de meest uitgesproken eigenschappen van het stamcelsysteem bij de Platyhelminthes heeft te maken met reproductie. De neoblastpopulatie is namelijk verantwoordelijk voor zowel asexuele als seksuele voortplanting, wat erop wijst dat neoblasten zowel aanleiding kunnen geven tot somatische cellen als tot gameten (zaad- en eicellen). Hierover is echter nog zeer weinig geweten (23).

Tot slot vertonen neoblasten verschillende vormen van heterogeniteit (24). Ten eerste zijn ze ruimtelijk ongelijk verdeeld over het lichaam en komen ze in drie relatief duidelijk onderscheidbare regio's (Zie inleiding, paragraaf 2.4.1). Ten tweede vertonen neoblasten een functionele heterogeniteit die weerspiegeld wordt in de verschillende differentiatiestadia die een neoblast doorloopt (Zie inleiding, paragraaf 2.4.3).

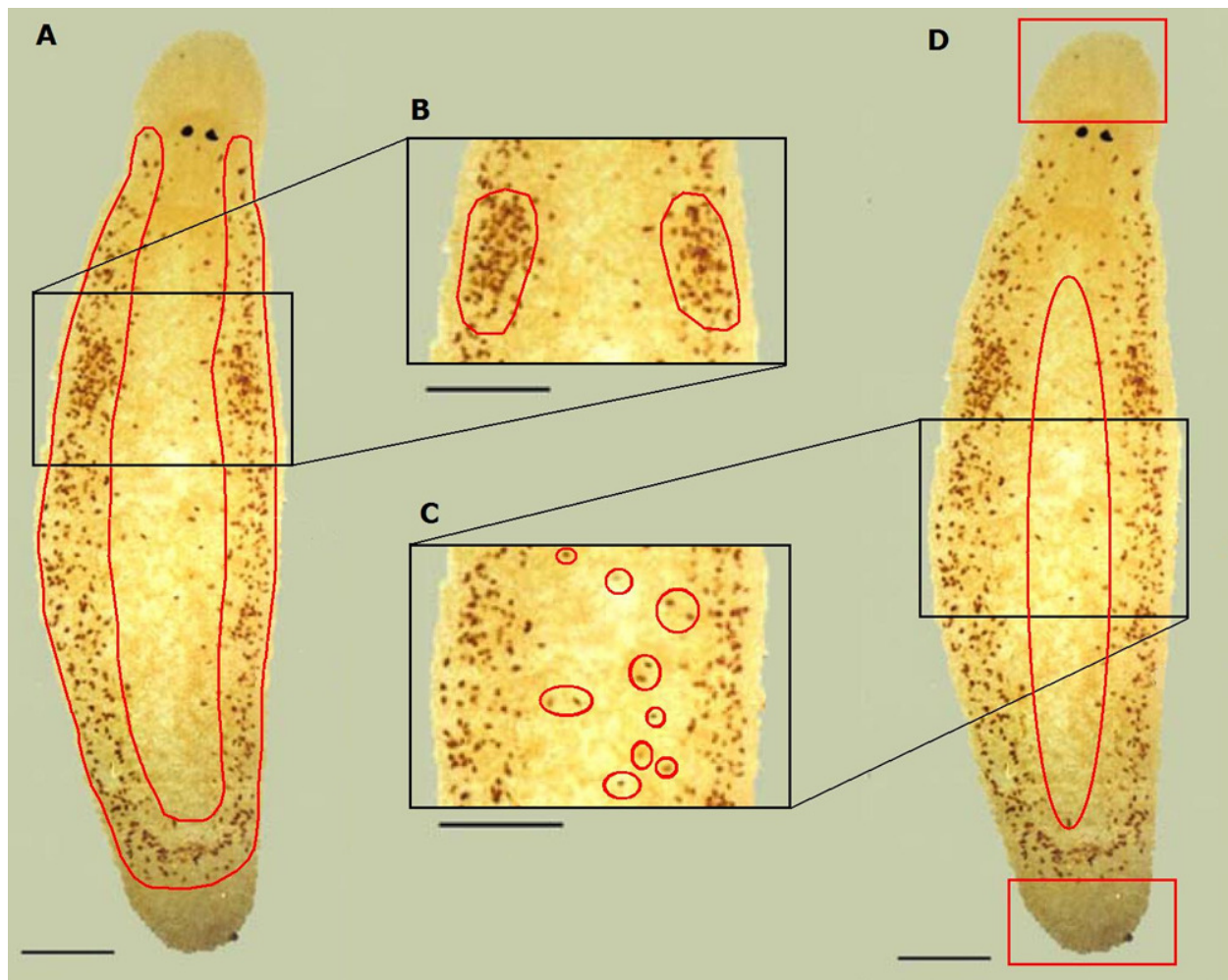
2.4.1 Distributie van de neoblastpopulatie in *Macrostomum lignano*

De neoblastpopulatie bij *Macrostomum lignano* vertoont een spatiale distributie die opmerkelijk verschilt van deze bij *Schmidtea mediterranea*. Bij deze Tricladen zijn de neoblasten gelijk verdeeld over het gehele organisme terwijl deze bij *M. lignano* in drie regio's voorkomen (24, 25). Deze drie regio's bestaan uit twee verschillende types van stamcellen, de somatische neoblasten (mesodermale en gastrodermale neoblasten) en gonadale neoblasten (testes en ovaria) (22).

De mesodermale neoblasten vormen een eerste groep van somatische neoblasten. Deze bevinden zich tussen gastrodermis en epidermis en vormen twee laterale banden (Figuur 3a). Deze neoblasten worden geassocieerd met de ventrolaterale hoofdzenuwstrengen wat erop kan wijzen dat proliferatie, differentiatie en migratie van neoblasten gestuurd wordt door cel-cel contact met zenuwcellen (20, 22). De gastrodermale neoblasten situeren zich ter hoogte van de gastrodermis en komen voor rondom de mediale as van de darmregio (Figuur 3b) (20). Deze neoblasten staan voornamelijk in voor de vervanging van beschadigde en afgestorven darmcellen. Tot slot zijn er nog de gonadale neoblasten die gaan differentiëren tot de kiemcellen en zich dus bevinden ter hoogte van de testes en ovaria (Figuur 3c) (20). Vooral de neoblasten ter hoogte van de testes omschrijven een tamelijk grote populatie in vergelijking met die van de ovaria. Dit komt omdat spermatogenese kwantitatief meer neoblasten vereist dan de oögenese (1, 3).

Opmerkelijk is het feit dat er weinig tot geen neoblasten aanwezig zijn ter hoogte van het rostrum (Figuur 1a), de posterieure vasthechtingsplaat en de mediale as (Figuur 3d) (op de gastrodermale neoblasten na). Dit wijst erop dat weefselvernieuwing hier berust op de migratie en differentiatie van neoblasten afkomstig uit de laterale mesodermale zones, aangezien somatische cellen in *M. lignano* niet in staat zijn om te delen (20).

M. lignano bestaat ongeveer uit 25,000 cellen waarvan 6,5% vermoedelijk neoblasten zijn (22). Dit staat in fel contrast met het aantal neoblasten in *S. mediterranea* dat 20 tot 30 procent van het totaal aantal cellen bedraagt. Het feit dat *S. mediterranea* tevens asexueel kan reproduceren terwijl *M. lignano* enkel seksueel voortplant, kan een verklaring zijn voor het procentuele verschil in aantal neoblasten.



Figuur 3: Het distributiepatroon van neoblasten in *Macrostomum lignano* (22).

A. Laterale distributie van mesodermale neoblasten (rood) ter hoogte van de twee laterale hoofdzenuwstrengen **B.** Gonadale neoblasten (rood) **C.** Gastrodermale neoblasten (rood) **D.** Gebieden waar zich weinig tot geen neoblasten bevinden (rood)

2.4.2 Kenmerken van de neoblast

Met betrekking tot onderzoek naar de neoblastpopulatie en het regeneratiefenomeen is een cytologische kennis van de neoblast vereist. Neoblasten worden gekenmerkt door hun kleine grootte (6-10 μ m) en zeer hoge nucleaire/cytoplasmatische ratio. Dit valt te verklaren doordat neoblasten niet-gedifferentieerde cellen zijn, waardoor de verschillende organellen nauwelijks of nog niet ontwikkeld zijn. Het cytoplasma bevat echter talrijke ribosomen die in eerste instantie nodig zijn wanneer differentiatie toch gaat optreden. Tevens zijn er mitochondriën aanwezig die als energiebron dienen tijdens proliferatie. Door het grote aantal ribosomen en de beperkte aanwezigheid van organellen zoals Golgi apparaat, polysomen en ruw endoplasmatisch reticulum vertoont het cytoplasma een sterk basofiel karakter (20).

2.4.3 Indeling van de neoblast

De term neoblast omschrijft niet één type stamcel, maar beschrijft een verzameling van verschillende types stamcellen. Eerst en vooral zijn er de zogenaamde 'ware' stamcellen die in staan voor zelfvernieuwing van de neoblastpopulatie. Vervolgens zijn er de progenitorcellen die over een proliferatiepotentieel beschikken die naargelang het aantal delingen afneemt (22, 26). Tot slot zijn er neoblasten die zich in vroege differentiatiestadia bevinden. Het totipotent karakter van de neoblasten blijft tot op heden onzeker. Een mogelijke hypothese is dat enkel de 'ware' stamcellen over een totipotent karakter beschikken. Andere hypothesen daarentegen stellen dat totipotentie van toepassing is op volledige proliferatieve compartiment (27).

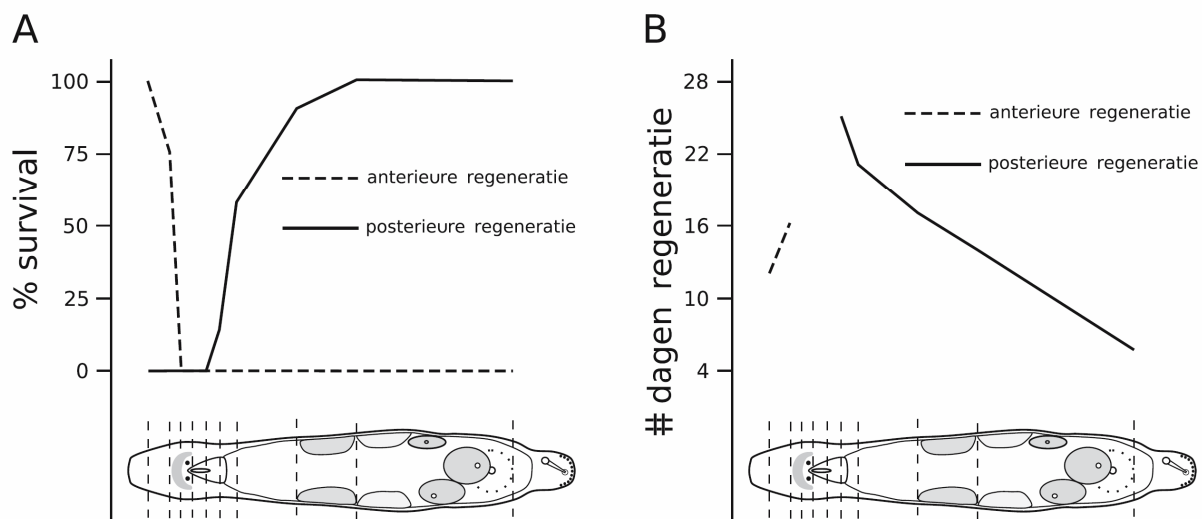
De neoblasten kunnen ingedeeld worden in drie differentiatiestadia op basis van hun cytoplasmatische en nuclaire organisatie (22, 26). In *Macrostomum lignano* kunnen er drie verschillende stadia van neoblasten worden onderscheiden. De fase één neoblasten zijn sferisch tot ovaal en zijn slechts beperkt basofiel aangezien ze geen organellen hebben met uitzondering van vrije ribosomen en verspreide mitochondriën. Het heterochromatine komt als aparte klompjes voor in de nucleus. Dit uit zich in een typisch gespikkeld patroon dat omgeven wordt door een beperkt ontwikkelde nucleaire lamina. De fase twee neoblasten zijn net zoals de fase één sferisch tot ovaal en lichtjes basofiel door het ontbreken van organellen. Naast de vrije ribosomen en mitochondriën bevatten de fase 2 neoblasten eveneens lipidedruppeltjes. Het grootste verschil bevindt zich op nucleair niveau, aangezien het heterochromatine strengen en klompjes vormt die meer met elkaar verbonden zijn. Tot slot zijn er de fase 3 neoblasten die zich onderscheiden van de andere twee door de aanwezigheid van ruw endoplasmatisch reticulum en Golgi-apparaat wat een indicatie is van cytoplasmatische differentiatie. De nucleus wordt gekenmerkt door prominente strengen van heterochromatine. Deze zijn vaak vastgehecht aan een goed ontwikkelde nucleaire lamina. De fase 3 neoblasten zijn het talrijkste onder de neoblasten en waarschijnlijk migratorisch (22).

2.4.4 Regeneratie bij *Macrostomum lignano*

Wanneer een volledig ontwikkeld organisme over de mogelijkheid beschikt om verloren fragmenten te vervangen door middel van groei of remodelering van somatisch weefsel, spreekt men over regeneratie (28). Dit proces kent twee vormen, morfallaxis en epimorfosis. Bij morfallaxis gaat het overgebleven weefsel zich herstructureren tot de wonde herstelt is, terwijl bij epimorfosis neoblasten worden aangetrokken die het verloren weefsel gaan herstellen en vervangen. Regeneratie bij platwormen is een combinatie van epimorfosis en morfallaxis. In *Macrostomum lignano* zal na het verlies van een deel van het lichaam, eerst het sluiten van de wonde optreden (morfallaxis) door middel van contractie van de circulaire spieren. Hierna zal er een regeneratieblastema gevormd worden. Dit is een celmassa die zich gaat vormen ter hoogte van de gesloten wonde en bestaat uit neoblasten omgeven door een laag epitheelcellen. Eens het blastema gevormd is zal er geleidelijk aan herstel optreden van het verloren weefsel door migratie en differentiatie van de neoblasten vanuit het blastema (epimorfosis) (5).

De regeneratiecapaciteit van *M. lignano* is opmerkelijk hoog voor een soort die zich uitsluitend door middel van kruisbevruchting voortplant. Van zodra een individu wordt gesneden buiten de regio van de hersenen en de farynx is de kans op overleven enorm hoog (Figuur 4a). De kans op overleven is nihil van zodra er gesneden wordt in de hersenen en is zeer laag als er ter hoogte van

de farynx gesneden wordt. Hieruit kan men concluderen dat de hersenen van cruciaal belang zijn bij de initiatie van regeneratie. Het feit dat de neoblasten verdeeld zijn ter hoogte van de laterale zenuwbanden versterkt deze conclusie. Wanneer *M. lignano* verwond wordt is het aantal dagen waarop de regeneratie beeindigd wordt afhankelijk van de afstand van het snijniveau ten opzichte van de hersenen. Hoe verder het snijvlak verwijderd is van de hersenen, hoe korter de regeneratietijd bedraagt (Figuur 4b) (5).



Figuur 4: Overlevingsgraad en het aantal dagen van regeneratie in *M.lignano* bij verschillende amputatieniveaus (5)

A. Percentage van het aantal wormen dat blijft leven uitgezet tegen het niveau van amputatie **B.** Het aantal dagen van regeneratie uitgezet tegen het niveau van amputatie

3 Cadmium

Cadmium is een element dat natuurlijk voorkomt in de aardkorst. Het verspreid wordt voornamelijk opgenomen in de lucht door aan luchtdeeltjes te binden maar het wordt onrechtstreeks ook opgenomen door water (29). Het is een metaal met een atomair gewicht van 112.41 g/mol. Het komt in het milieu normaal niet voor als puur metaal maar als tweewaardig kation in verbinding met andere elementen zoals zuurstof (cadmiumoxide, CdO), chlorine (cadmiumchloride, CdCl_2) of sulfaat (cadmiumsulfaat, CdSO_4). Cadmium is een toxisch metaal waarvan de verspreiding een sterke toename gekend heeft door middel van de industrie (vb. nikkel-cadmium batterijen) en de landbouw (meststoffen). Natuurlijke uitstoot van cadmium gebeurt door middel van bosbranden of vulkaanuitbarstingen die slechts voor een klein deel bijdragen aan de cadmiumverspreiding (30).

3.1 Effecten op de mens

De mens kan cadmium op orale wijze opnemen. Door het feit dat cadmium zich in de bodem en water bevindt, kan het opgenomen worden via planten die tevens worden gegeten door dieren. Hierdoor kan de mens het cadmium innemen door vervuilde groenten, fruit en vlees te eten en vervuild water te drinken. Ten tweede kan cadmium via de ademhaling opgenomen worden omdat deze toxische stof zich bindt aan stofdeeltjes in de lucht. Sigaretten zijn eveneens een bron van cadmium dat op deze manier rechtstreeks in de longen en dus de bloedbaan wordt gepompt. De

absorptie van cadmium door de longen gebeurt veel efficiënter dan deze door het gastrointestinaal stelsel (30).

Eens opgenomen in het bloed gaat cadmium zich via de bloedbaan verspreiden doordat het gaat binden aan albumine. Vervolgens kan het in de lever gaan binden aan Metallothioneïnen. Eens gebonden aan zulke eiwitten zal cadmium zijn schadelijk effecten niet kunnen uitoefenen. Van zodra dat er echter te weinig van deze eiwitten aanwezig zijn in de bloedbaan kan vrij cadmium opgenomen worden door cellen (31).

Op cellulair niveau gaat cadmium onrechtstreeks een verstoring van de balans tussen oxidanten en anti-oxidanten veroorzaken. Cadmium gaat er namelijk voor zorgen dat er relatief meer vrije zuurstofradicalen (ROS, Reactive Oxygen Species = oxidanten) aanwezig gaan zijn in de cel. Vrije zuurstofradicalen kunnen het DNA, eiwitten en lipiden verder beschadigen (32).

Deze verstoorde cellulaire homeostase kan tot verschillende fysiologische effecten leiden. Cadmium kan namelijk aanleiding geven tot de ontwikkeling en/of progressie van renale complicaties osteoporosis en kanker in verschillende organen zoals de longen, de nieren, de urineblaas, de pancreas, de borsten en de prostaat (32).

3.2 Effecten op Platyhelminthes

Over het effect van cadmium op platwormen was voor de jaren '90 niet veel gekend. Enkel acute effecten ten gevolge van een blootstelling aan cadmium werden vastgesteld (29, 33). Blootstelling aan het toxisch metaal heeft een negatief effect op de mortaliteit en op asexuele voortplanting. Beide effecten zijn afhankelijk van de dosis cadmium waaraan de platwormen blootgesteld worden. De mortaliteit neemt toe bij hogere concentraties en asexuele voortplanting wordt geïnhibeerd vanaf een bepaalde drempelwaarde (29).

Sindsdien werden de effecten van van cadmium op platwormen dieper uitgespit. Ondertussen werden er verschillende effecten waargenomen waaronder chronische, biochemische en neurotoxische effecten. Deze effecten worden niet in elke platworm waargenomen, maar zijn vaak soortspecifiek. Nu volgt een algemene opsomming van de effecten waargenomen in één of meerdere soorten van Platyhelminthes.

Een chronische blootstelling aan cadmium leidt tot de vorming van invasieve, prolifererende celmassa's, wat erop wijst dat Cd bij deze hoge concentraties bij platwormen carcinogene effecten heeft (33, 34, 35).

Chronische blootstelling kan eveneens veranderingen teweeg brengen op het niveau van eiwitten en lipiden (biochemische effecten). De synthese van eiwitten en fosfolipiden gaat na verloop van tijd afnemen(36).

Tot slot kan een blootstelling aan cadmium aanleiding geven tot neurotoxicologische effecten. Zoals reeds gezegd zal de mortaliteit toenemen en de asexuele voortplanting afnemen naargelang de concentratie aan cadmium toeneemt (29). Een ander, meer direct neurotoxisch effect is abnormaal gedrag, wat zich uit in een afwijkende vorm van voortbeweging (34).

3.3 Effecten op het neoblastsysteem

Het effect van cadmiumsulfaat op het neoblastsysteem in platwormen is tot op heden enkel onderzocht in *Polycelis felina* (Rhabditophora, Tricladida). Na een behandeling met cadmiumsulfaat

blijkt het aantal delende neoblasten te dalen. Deze daling is een gevolg van verschillende mitotische en chromosomale abnormaliteiten en mitotische vertragingen die ontstaan ten gevolge van cadmium.

Mitotische abnormaliteiten worden het vaakst geassocieerd met spoelfiguur dysfuncties in delende cellen (neoblasten). Dit kan enerzijds leiden tot neoblasten die vast zitten in de S-fase. Anderzijds kunnen er multipolaire spoelfiguren gevormd worden wat aanleiding geeft tot cellen met meerdere kernen. Beide abnormale celtypes worden weggewerkt door middel van apoptose (37).

Chromosomale abnormaliteiten kunnen op verschillende manieren ontstaan als gevolg van cadmiumsulfaat. Ten eerste kunnen multipolaire spoelfiguren leiden tot foute chromosoomverdelingen waardoor aneuploidie kan ontstaan. De chromosomen worden met andere woorden willekeurig verdeeld onder de dochtercellen waardoor deze een tekort aan chromosomen kunnen oplopen. Ten tweede kan cadmiumsulfaat ervoor zorgen dat er dubbelstrengige breuken worden gevormd in het DNA. Hierdoor kunnen de gebroken uiteinden gaan kleven aan andere chromosomen waardoor er 'sticky' chromosomen ontstaan. Deze hybride chromosomen bevatten meestal meer dan één centromeer en worden hierdoor tijdens de anafase vastgehecht aan verschillende spoelen. Hierdoor ontstaat er een brug tussen chromosomen gedurende de anafase (anafasebrug). De chromosomen blijven dus aaneen hangen in plaats van dat ze volledig uiteen worden getrokken (37).

Gezien het feit dat neoblasten de enige mitotisch actieve cellen zijn in volwassen platwormen, zijn ze van cruciaal belang bij het vervolledigen en beëindigen van regeneratie. Wanneer deze blootgesteld worden aan cadmium zal een deel van de neoblasten niet meer in staat zijn te delen, waardoor er een autoselectie zal optreden van normale neoblasten. De conclusie is dus dat hoe hoger de concentratie cadmium waaraan ze blootgesteld worden, hoe lager het aantal delende neoblasten zal zijn (37).

II MATERIALEN EN METHODEN

1 Culturen

1.1 Oorsprong van de cultuur

Macrostomum lignano (Rhabditophora; Macrostomida) komt in de natuur voor in het Middellands Zeegebied. Meer bepaald werd het aangetroffen in de mariene interstitiële zandfauna van de Noord Adriatische zee (Lignano, 45°41'31" E; World Geodesic System 1984) en in de omgeving van Thessaloniki, Griekenland (20). De platwormen gebruikt in dit experiment zijn afkomstig uit de culturen die onderhouden worden in het laboratoria van het CMK (U Hasselt).

1.2 Onderhoud van de cultuur

De culturen worden onderhouden in een medium bestaande uit artificeel zeewater met een zoutgehalte van 32‰) aangereikt met sporenelementen. De wormen werden opgekweekt in petrischalen en worden ad libitum gevoed met de diatomee *Nitzschia curvilineata*. Gedurende de kweek werd er een dag/nacht ritme aangehouden (14u/10u) bij 20°C en 50% humiditeit.

1.3 Bestrijding van parasitaire besmetting van de cultuur

Een probleem dat zich vaak voordoet bij het kweken van *Macrostomum lignano* is de aanwezigheid van een parasiet behorend tot het ééncellige protistentaxon *Thraustochytrida*. De infectie start bij de staartplaat en verspreid zich van hieruit verder naar de rest van de worm. Wormen geïnfecteerd met deze parasiet vertonen eerst een afstomping van de staartplaat. Vandaar dat het van cruciaal belang is om met een parasiet vrije cultuur te werken. Daarom werden de eitjes van geïnfecteerde wormen gewassen met triton X (0,25% Triton in ASW) gedurende drie dagen waardoor de parasiet geëlimineerd werd. Vervolgens werden de eitjes intensief gewassen met ASW om het triton X te verwijderen.

1.4 Opstarten van testcultuur

Voor het opstarten van een testcultuur is het belangrijk te weten dat de wormen die men uiteindelijk binnen hetzelfde experiment wil gebruiken, dezelfde leeftijd hebben. Daarom werden er vanuit parasiet vrije culturen, adulte wormen per 100 tot 200 overgezet naar nieuwe platen. Na ongeveer 24 uur (tijd waarop een adulte worm ongeveer één eitje legt) werden de adulten uit de plaat gehaald. De overgebleven eitjes kwamen na 5 dagen uit en na 21 dagen werden de wormen gebruikt voor experimentele doeleinden omdat vanaf dan de voortplantingsorganen genoeg ontwikkeld zijn waardoor ze in staat waren om zich voor te planten. Vanaf deze moment werden de wormen als adult en van dezelfde leeftijd beschouwd en dus geschikt om te gebruiken binnen eenzelfde experiment.

2 LC50-test

Met een LC50-test werd de concentratie CdCl₂ bepaald die voor 50% van de organismen lethaal is. De LC50-test is met andere woorden belangrijk voor het nagaan van de acute toxiciteit die cadmiumchloride in de tijd heeft op *Macrostomum lignano*. Voor dit experiment werd de LC50-

waarde bepaald voor 5 dagen. Hiervoor werden de wormen afkomstig uit testculturen blootgesteld aan concentraties CdCl_2 ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Merck) van 0 μM tot en met 80 μM met een interval van 5 μM (per conditie 10 wormen). Hiervoor worden de wormen at random verdeeld in aparte welletjes.

3 BrdU-labeling

Het selectief labelen van neoblasten in *Macrostomum lignano* is gebaseerd op het feit dat ze de enige mitotisch actieve cellen zijn in de adulte organismen. Deze labeling is gebaseerd op de incorporatie van het thymidine analoog 5'-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU: $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{BrN}_2\text{O}_5$ - Sigma) tijdens de synthese fase (S-fase) van de celcyclus.

3.1 Standaard protocol

Macrostomum lignano werden gedurende een bepaalde duur blootgesteld aan BrdU (Sigma) afhankelijk van de aard van het experiment (distributie – zie materialen en methoden, paragraaf 3.2 | migratie/differentiatie – zie materialen en methoden, paragraaf 3.3). Na de blootstelling werden de beesten gestrekt in MgCl_2 (7.14%). Zodra ze volledig gestrekt waren, werden ze gefixeerd in paraformaldehyde (PFA, 4%) gedurende 60 minuten. Vervolgens werd het PFA gewassen met behulp van fosfaatbuffer (PBS, 0.8% NaCl, pH 7.4) en werden ze gedurende een uur gewassen in PBS-T (PBS met 0.1% Triton X, Sigma) voor het op te lossen van de beschermende slijmlaag. Hierna werden ze permeabel gemaakt met behulp van proteïnase K (Sigma). Dit werd aangehouden totdat de randen van de wormen sporen van desintegratie begonnen te vertonen. Hierna werden ze geïncubeerd in 0.1N HCl gedurende 10 minuten op ijs en in 2N HCl gedurende een uur op 37.5 °C. Daarna werden ze grondig gewassen met PBS en vervolgens werd specifieke bindingsplaatsen gebokkeerd door gedurende een half uur PBS-BSA-T (PBS met 0.1% Triton X en 1% Bovine Serum Albumine, Sigma) toe te voegen. Vervolgens werd een primair monoclonaal antilichaam, muisanti-BrdU (1:800 in PBS-BSA-T, Roche) overnacht toegediend. Tot slot werd het primair antilichaam gewassen met PBS en werd het secundair monoclonaal antilichaam, geitanti-muis gelabeld met FITC (1:200 in PBS-BSA-T, DAKO) gedurende een uur toegevoegd. De wormen werden nog een laatste keer gewassen in PBS en overgebracht naar een objectieflaasje met vectashield (VECTOR).

3.2 Distributie experiment

Voor het nagaan van het effect van cadmium op de distributie van neoblasten in *Macrostomum lignano* werden organismen afkomstig uit dezelfde testculturen (met dezelfde leeftijd), blootgesteld aan respectievelijk 0 μM CdCl_2 (blanco), 2.5 μM CdCl_2 en 5 μM CdCl_2 opgelost in ASW. Voor elke groep werden er willekeurige subgroepen gemaakt van 12 wormen die respectievelijk over 2, 4 en 6 dagen blootgesteld werden in afzonderlijke welletjes waaraan diatomeën (ad libitum) werden toegevoegd. Na 4 dagen werden de diatomeën ververst om uithongering te voorkomen. Bij het bereiken van de tijdstippen (2, 4 en 6 dagen) werden de wormen blootgesteld gedurende een half uur aan 5 mM BrdU waarna het standaard protocol voor BrdU-labeling werd afgewerkt.

3.3 Migratie/differentiatie experiment

Voor het nagaan van het effect van cadmium op de migratie en differentiatie van neoblasten in *Macrostomum lignano* werden organismen afkomstig uit dezelfde testculturen tegelijkertijd blootgesteld aan 5 μM BrdU en respectievelijk 0 μM CdCl₂ (blanco), 2.5 μM CdCl₂ en 5 μM CdCl₂ opgelost in ASW. Voor elke groep werden er subgroepen gemaakt van 12 wormen die respectievelijk gedurende 1 dag en 3 dagen blootgesteld werden in afzonderlijke welletjes waaraan diatomeën (ad libitum) werden toegevoegd. Bij het bereiken van de tijdstippen (1 dag of 3 dagen) werd het standaard protocol voor BrdU-labeling afgewerkt.

4 Confocale microscopie

4.1 Principe (confocale) microscopie aan levende cellen en weefsels

Fluorescente partikels (zoals gelabelde antilichamen) kunnen onder excitatie van laserlicht, bekeken worden met behulp van een fluorescentie microscoop of een confocale microscoop. Deze laatste heeft als voordeel dat dunne optische secties opgenomen kunnen worden met sterke onderdrukking van strooilicht en fluorescentie buiten het focusvlak. Een fluorescente probe (die een specifieke binding kent) wordt aangeslagen binnen zijn absorptieband door middel van een lichtbundel met passende golflengte. Vervolgens zal de probe fluorescentielicht uitzenden doordat het geëxciteerde energieniveau (veel energie) terugvalt naar de grondtoestand. Deze fluorescentie wordt gemeten door middel van een of meerdere zeer gevoelige fotomultiplier detectoren met bijbehorende digitale verwerkingselectronica. Verder bevatten zulke microscopen een aantal optische elementen (emissiefilters, excitatiefilters, dichronische spiegels, verstelbare detector pinholes, ...) om het fluorescentie signaal te optimaliseren ten opzichte van storende signalen en om op die manier een hoge gevoeligheid te verkrijgen.

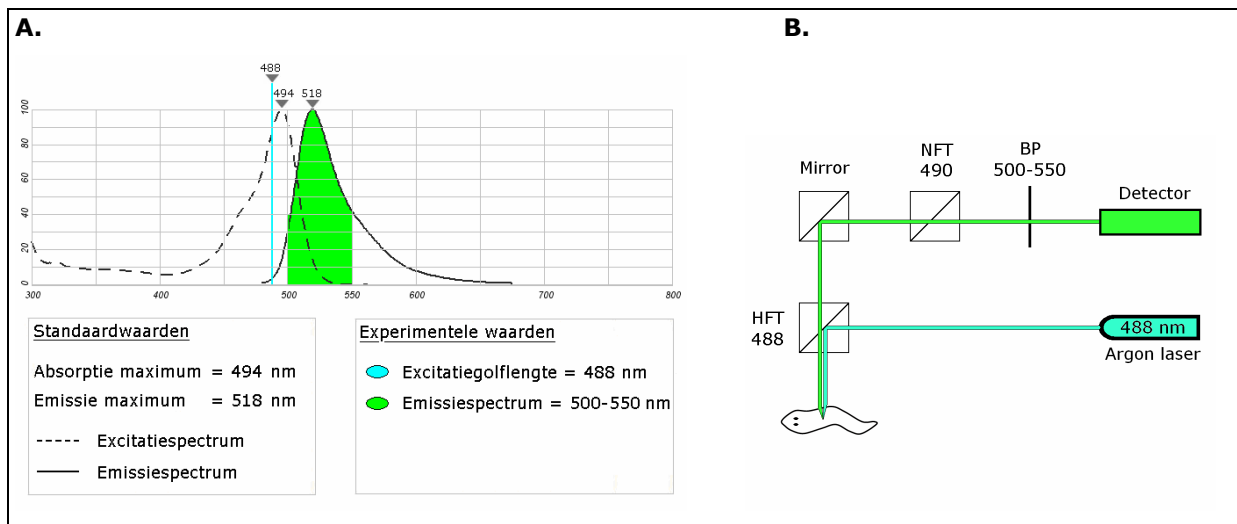
Confocale laser scanning microscopie (CLSM, Zeiss LSM 510Meta confocale microscoop) heeft twee belangrijke voordelen ten opzichte van een gewone fluorescentiemicroscoop. De CLSM beschikt namelijk over voor de detectoren geplaatste, aanpasbare pinholes die er in de eerste plaats voor zorgen dat beelden in de z-as een hoge scherpte opleveren met minimaal strooilicht en autofluorescentie. Dit komt erop neer dat achtergrondinformatie afkomstig van de fluorescente partikels (die zich boven of onder het gemeten z-vlak bevinden) niet gedetecteerd wordt. Enkel de informatie afkomstig van het gekozen z-vlak (de optische coupe) zal dus de detectoren kunnen bereiken waardoor een beeld met zeer hoge scherpte wordt bekomen. Door de aanwezigheid van de pinholes is het ten tweede mogelijk om een reeks optische secties op te nemen op verschillende hoogten in de z-richting, een zogenaamde z-stack. Hierdoor is men in staat om via software een 3D-reconstructie te genereren van levende cellen en weefsels.

4.2 Instellingen

In het BrdU-protocol werd gebruikt van geïntimuis-antilichamen gelabeld met fluoresceïn-5-isothiocyanate (FITC) voor het kleuren van de delende celpopulatie (neoblasten). Aan de hand van de excitatie en emissie-eigenschappen van FITC (Figuur 5a) werd, in overeenstemming met het excitatiemaximum van 494 nm, de 488 nm argon excitatie laserlijn gebruikt tesamen met een 488 nm cleanup interferentiefilter in de CLSM lasergolflengte verstem-eenheid. De filterinstellingen voor

de CLSM zijn weergegeven in Figuur 5b. De hoofd-dichroïsche spiegel HFT 488 reflecteert het 488 nm laserlicht onder een hoek van 90° naar het preparaat. Na absorptie werd de fluorescentie emissie gefilterd met behulp van een NFT 490 secundaire dichroïsche spiegel. Enkel fluorescentie met golflengten boven de 490 nm kunnen doorheen deze spiegel. Tot slot werd er nogmaals gefilterd met behulp van een bandpass BP 500-550 nm filter geplaatst voor de detector. Zoals weergegeven in Figuur 5a bevindt het emissiemaximum van FITC (518 nm) zich tussen deze waarden in.

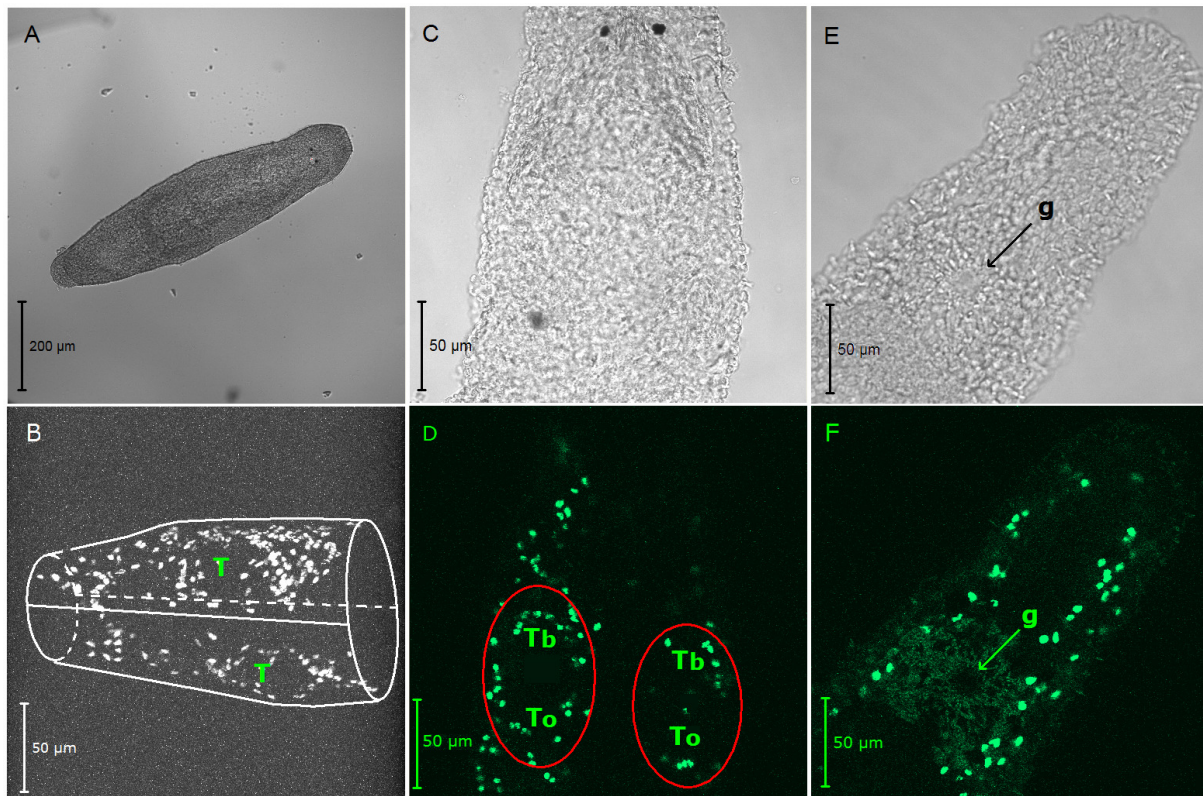
In het geval van *Macrostomum lignano* kan men dus het volume van het organisme nauwkeurig in hoge resolutie aftasten, om via een 3D z-stack reconstructie de ruimtelijke verdeling van de met FITC gelabelde neoblasten te achterhalen.



Figuur 5: A. FITC excitatie en emissie spectra B. CLSM optische configuratie

4.3 Meten van de BrdU-kleuring bij *Macrostomum lignano*

In eerste instantie werd getest met behulp van een fluorescentiemicroscoop (Nikon H600L) of er al dan niet fluorescentie aanwezig was. Op basis hiervan werden de wormen geselecteerd om vervolgens opgenomen te worden met behulp van de CLSM. Het meten van transmissiebeelden van volledige wormen gebeurde met behulp van het 10x objectief (Plan-Neofluar 10x/0.3, werkafstand 5.6 mm, Figuur 6a). Er werd geopteerd om in plaats van de volledige worm, enkel het hoofd en de staart te meten. Specifiek werden voor de beelden van het hoofd, de ogen in beeld gehouden en werd er nagegaan of de testes (omringd door stamcellen op een fluorescentiebeeld) in het beeld opgenomen waren (Figuur 6c-d). In de praktijk bleek dit echter altijd het geval te zijn en hoefde er geen extra beeld genomen te worden. Voor het staartuiteinde was de aanwezigheid van de vrouwelijke gonoporus een cruciale parameter voor het al dan niet nemen van extra beelden (Figuur 6e-f). Na deze selectie werd steeds een transmissiebeeld van het hoofd of de staart van wormen opgenomen met het 40x objectief (Plan-Neofluar 40x/1.3 Oil DIC, werkafstand 290 μ m). Voor de fluorescentiebeelden en de z-stacks werd hetzelfde 40x olie objectief ingezet. Steeds werd ervoor zorg gedragen dat de detector niet verzadigde door correcte instelling van de detector gain (spanning). Voor goed gelabelde preparaten werd standaard een laserspanning van 902 (Zeiss software setting) en een detector pinhole diameter van 66 μ m (1 Airy unit voor beelden met optimum detail).



Figuur 6: Schematische weergave van de beelden genomen met de Zeiss LSM 510 confocale microscoop.

A. Transmissiebeeld (PlanNeoFluar 10x objectief) van een volledige worm **B.** 3D-projectie van een z-stack van een hoofd met behulp van LSM Image Browser waar de testes (T) duidelijk omringd worden door gekleurde neoblasten **C.** Transmissiebeeld (PlanNeoFluar 40x oil objectief) van het hoofd waarbij de ogen net in beeld gehouden worden **D.** Fluorescentiebeeld (PlanNeoFluar 40x oil objectief) waarbij op ten minste de bovenkant van de testes (Tb = bovenkant testes, To = onderkant testes) in beeld worden gehouden **E.** Transmissiebeeld (PlanNeoFluar 40x oil objectief) van de staart waar de vrouwelijke gonoporus (g) meestal zichtbaar is **F.** Fluorescentiebeeld (PlanNeoFluar 40x oil objectief) van de staart waar de vrouwelijke gonoporus (g) duidelijk zichtbaar is.

5 Beeldverwerking

Voor het verwerken van de fluorescente z-stacks werd er gebruik gemaakt van ImageJ versie "1.37 bundled with Java 1.5.0_09". De volgende functies waren standaard aanwezig: Process-Enhance Contrast; Process-Smooth, Image-Adjust-Threshold; Image-Crop; Edit-Clear Outside; Edit-Invert; Analyze-Set Measurements; Analyze-Analyze Particles; Plugins-Macros; Polygon Selection tool. Daarnaast werden verschillende plugins geïnstalleerd: Filters-FFT filter, Stacks – 3D Object Counter.

6 Statistiek

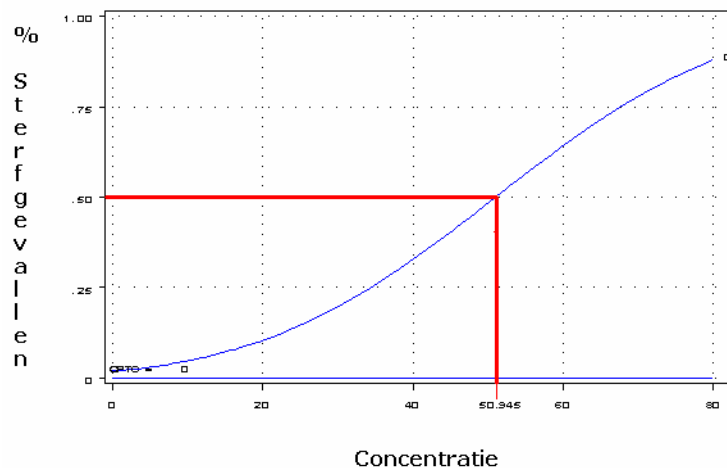
In deze studie werden de kwantitatieve resultaten statistisch getest met behulp van verschillende methoden. Een eerste test die gebruikt werd is de éénwegs-Anova (éénwegs analyse voor varianties) waarin men de gelijkheid gaat testen van meerdere populatiegemiddelden door gebruik te maken van varianties (within = binnen populaties; between = tussen populaties). Onder de nulhypothese wordt aangenomen dat alle gemiddelden gelijk zijn. Een uitbreiding van Anova

namelijk Dunnett's test wordt uitgevoerd die enkel de verschillende behandelingsgroepen gaat vergelijken ten opzichte van de controle. Daarenboven worden de verschillen tussen de groepen bekeken waarbij er een Bonferoni correctie toegepast wordt, waar het significantieniveau wordt aangepast als correctie voor meerdere analyses tegelijk uit te voeren. Het nieuwe significantieniveau wordt berekend door het oude te delen door het aantal toetsen.

III RESULTATEN

1 LC50 voor cadmium bij *Macrostomum lignano*

De LC50-waarde na 5 dagen voor cadmium bij *Macrostomum lignano* bedraagt 51 μM cadmium en kent een betrouwbaarheidsinterval van 44 μM tot en met 58 μM bij een steekproefgrootte van 10 wormen. In Figuur 7 wordt een curve weergegeven waar voor elke concentratie cadmium de probitregressielijn is weergegeven van het procentueel aantal sterfgevallen in functie van de concentratie cadmium waaraan ze blootgesteld worden.



Figuur 7: LC50 curve voor cadmium bij *Macrostomum lignano*

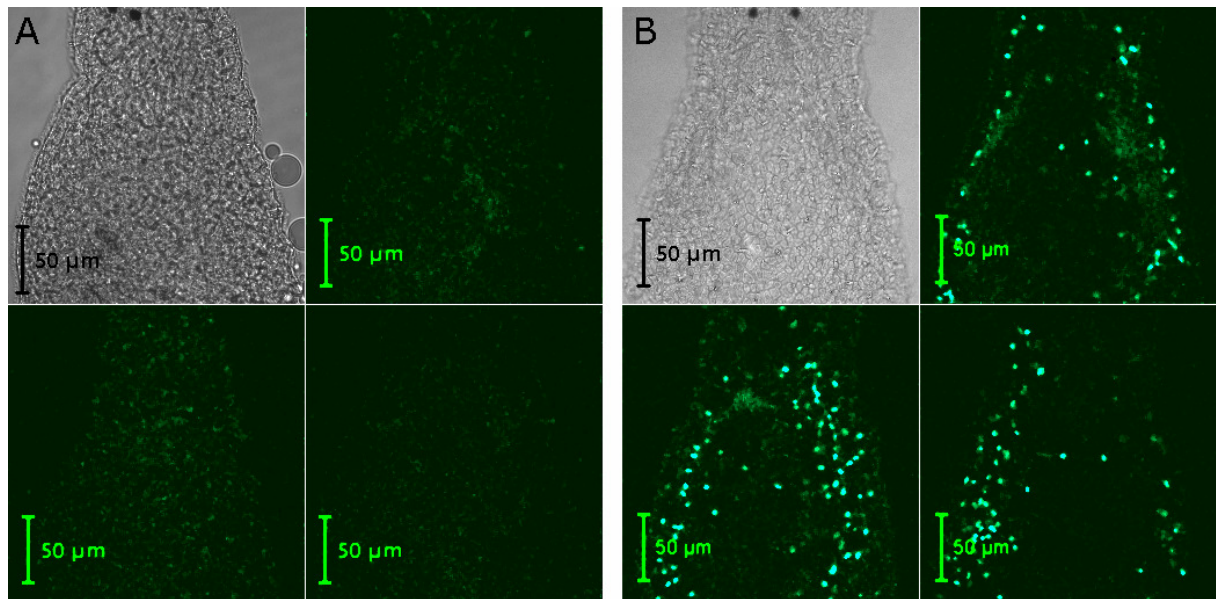
2 Distributie experiment

Één van de doelstellingen van deze studie is het nagaan van de distributie van het aantal delende neoblasten bij *M. lignano* die gedurende verschillende tijdstippen worden blootgesteld aan cadmium. Hiervoor worden de wormen *in vivo* gekleurd met BrdU. Vervolgens worden deze kleuringen gemeten met behulp van een confocale microscoop. De beelden die hierbij bekomen worden kunnen in eerste instantie bekeken worden om te kijken waar de neoblasten zich bevinden (visuele analyse). Daarna kunnen de beelden verwerkt worden met ImageJ om op die manier een kwantitatieve analyse uit te voeren van het aantal delende neoblasten.

2.1 Visuele analyse

2.1.1 Verschillen in BrdU-labeling

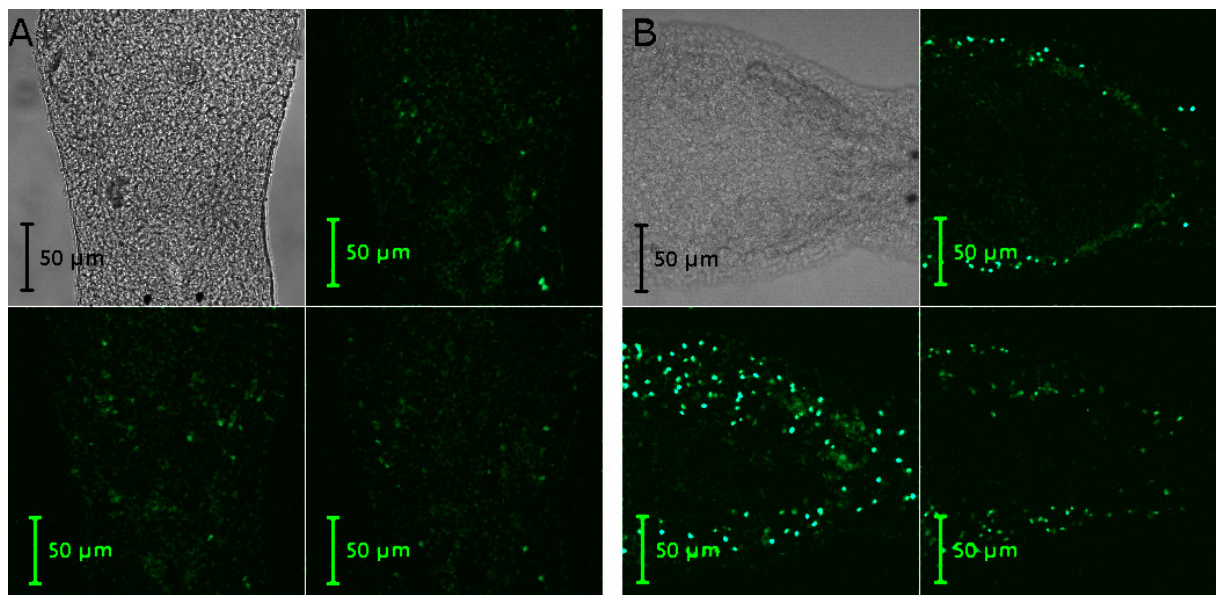
Bij het verkrijgen van de confocale fluorescentiebeelden werd vastgesteld dat een BrdU-kleuring varieert van worm tot worm, waardoor verschillende types preparaten kunnen ontstaan op basis van de kleuring alleen. Na het nemen van de confocale microscoopbeelden van de verschillende testgroepen kunnen er 6 verschillende types van kleuringresultaten onderscheiden worden van elkaar.



Figuur 8: Confocale microscoopbeelden van een goede en een mislukte BrdU-labeling

Transmissiebeeld (PlanNeoFluar 10x objectief) en drie fluorescentiebeelden (PlanNeoFluar 40x oil objectief) genomen op verschillende niveau's uit de z-stack van **A.** een niet gelukte BrdU-labeling **B.** een gelukte BrdU-labeling

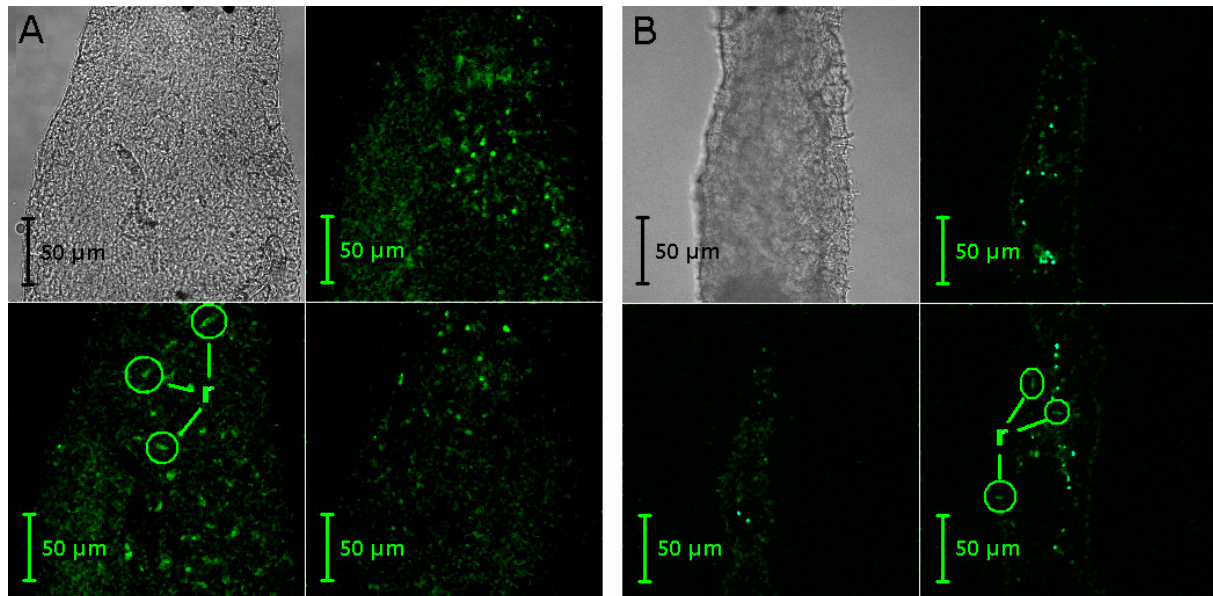
Als een kleuring mislukt is (Figuur 8a), is enkel een waas van achtergrondkleuring zichtbaar, en zijn de neoblasten niet zichtbaar gelabeld. Aan de andere kant kan een kleuring zeer goed gelukt zijn (Figuur 8b). Neoblasten zijn duidelijk zichtbaar, maar ook de achtergrondwaas is duidelijk. De neoblasten situeren zich vooral in twee laterale banden met uitzondering van enkele neoblasten die in het midden gesitueerd zijn. Dit zijn de gastrodermale neoblasten.



Figuur 9: Confocale microscoopbeelden van een zwakke en een zwakke/goede BrdU-labeling

Transmissiebeeld (PlanNeoFluar 10x objectief) en drie fluorescentiebeelden (PlanNeoFluar 40x oil objectief) genomen op verschillende niveau's uit de z-stack van **A.** een zwakke BrdU-labeling **B.** een BrdU-labeling waar zowel zwak als goed gelabelde neoblasten in voorkomen

Tussen beide extremen zijn er echter kleuringresultaten waarbij de neoblasten wel te zien zijn, maar het verschil in intensiteit met die van de achtergrondkleuring laag is. Hierbij kunnen neoblasten dermate zwak gekleurd zijn (Figuur 9a), dat ze moeilijk te onderscheiden zijn van de achtergrondkleuring. Daarnaast zijn er specimens waarin zowel neoblasten voorkomen die een sterke intensiteit vertonen, als neoblasten die een zwakke intensiteit vertonen (Figuur 9b).



Figuur 10: Confocale microscoopbeelden van een zwakke en een goede BrdU-labeling waar rhabdieten eveneens worden aangekleurd

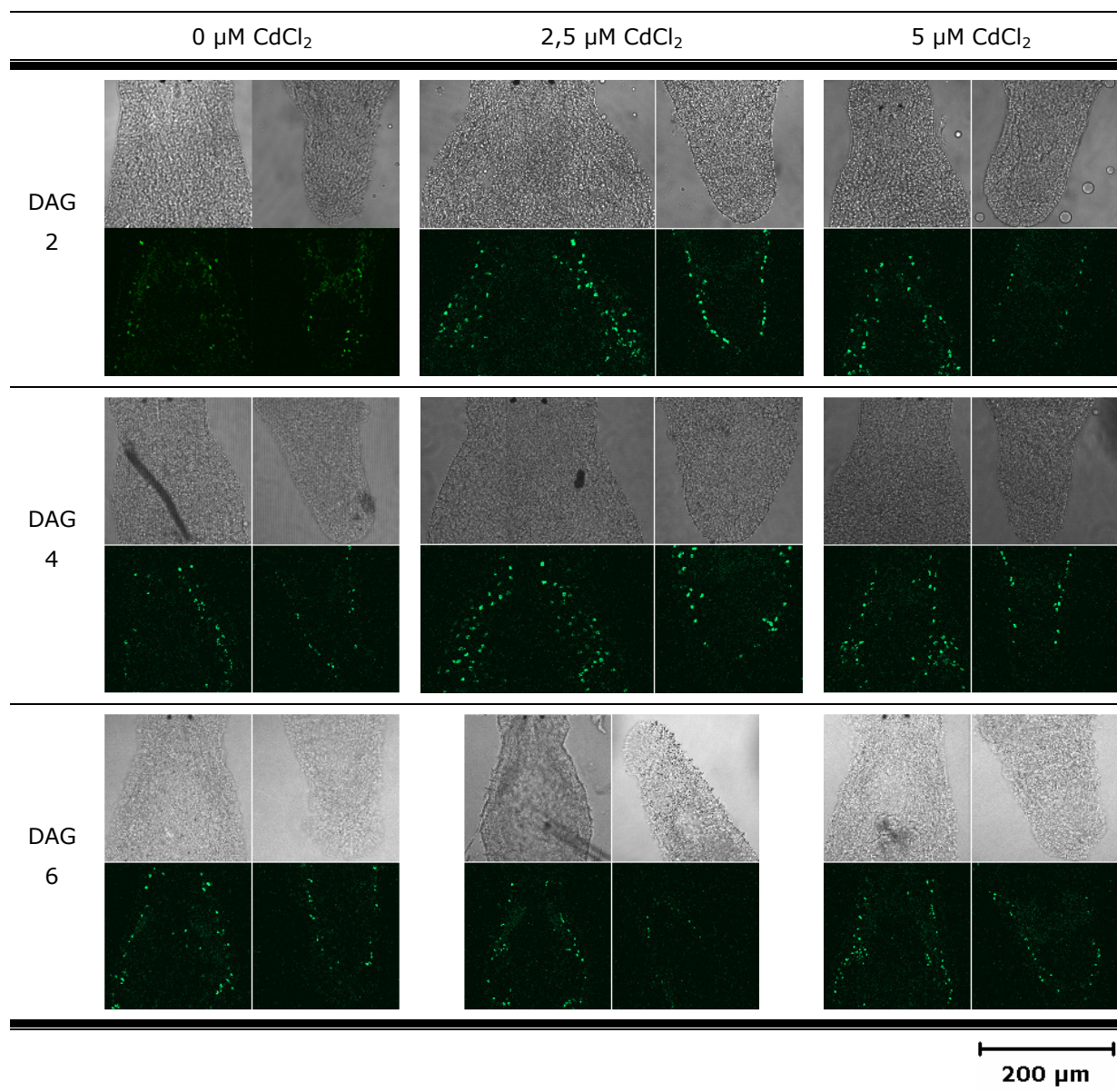
Transmissiebeeld (PlanNeoFluar 10x objectief) en drie fluorescentiebeelden (PlanNeoFluar 40x oil objectief) genomen op verschillende niveaus uit de z-stack van **A.** een zwakke BrdU-labeling waar de rhabdieten (r) een sterk achtergrondsignaal veroorzaken **B.** een goede BrdU-labeling waar de rhabdieten (r) een achtergrondsignaal veroorzaken.

Tot slot zijn er wormen waar naast kleuring van de delende neoblasten eveneens een sterke kleuring optreedt van de staafvormige rhabdieten. Dit kan gebeuren bij wormen waar de neoblasten een zwak fluorescent signaal uitzenden (Figuur 10a). De rhabdieten zijn in zulke preparaten duidelijk zichtbaar als (meestal) langwerpige structuren. Doordat het verschil in intensiteit tussen de neoblasten en de rhabdieten klein is zijn ze vaak moeilijk te onderscheiden van elkaar. Rhabdieten kunnen echter ook fel oplichten in preparaten waar de neoblasten wel een goede kleuring vertonen. Uit figuur 10b blijkt dat dit type van preparaat moeilijk te illustreren is omwille van het feit dat rhabdieten pas duidelijk worden als het preparaat ook in de z-as kan doorlopen worden. Het verschil tussen neoblasten en rhabdieten is in dit type beeld echter wel duidelijk doordat de intensiteit van het signaal van de neoblasten deze van de rhabdieten overstijgt.

2.1.2 Distributiepatroon van de delende neoblasten

Ondanks het feit dat een BrdU-kleuring niet altijd even goed lukt, komt wel steeds hetzelfde distributiepatroon van delende neoblasten terug binnen de verschillende testgroepen (Tabel 1). De delende neoblasten vormen twee laterale banden met uitzondering van enkele neoblasten die zich in het midden van de worm bevinden.

Tabel 1: Distributiepatroon van delende neoblasten bij confocale microscoopbeelden van de verschillende testgroepen



2.2 Kwantitatieve analyse

Om een mogelijk effect van cadmium op het aantal delende neoblasten in *M. lignano* op te sporen is een kwantitatieve studie nodig. Het aantal delende neoblasten is met een beeldverwerkingsprogramma zoals bijvoorbeeld ImageJ moeilijk exact te bepalen. Storende signalen of slecht gelabelde cellen kunnen immers verkeerd geïnterpreteerd worden. In eerste instantie is het van belang om een standaard protocol vast te leggen waarbij de geselecteerde regio's zodanig worden getransformeerd waardoor kwantitatieve analyse van fluorescente neoblasten mogelijk wordt. Daarna is het van belang om deze kwantitatieve analyse kritisch te bekijken en te verwerken opdat alle gelabelde cellen onderscheiden kunnen worden van achtergrondsignalen.

2.2.1 Optimalisatie van het standaardprotocol voor de beeldanalyse

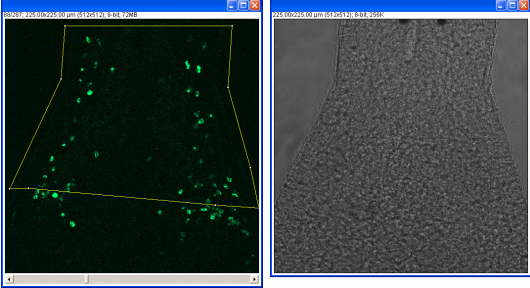
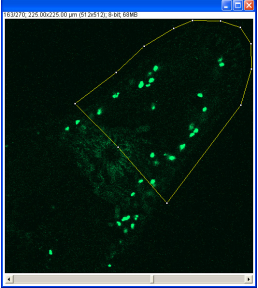
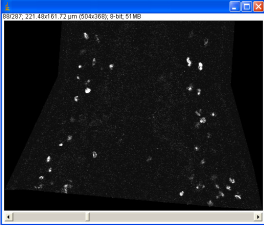
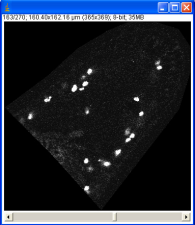
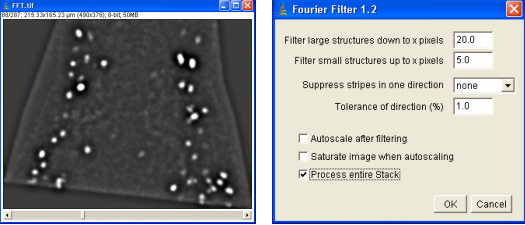
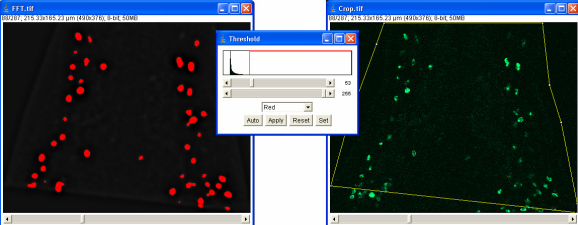
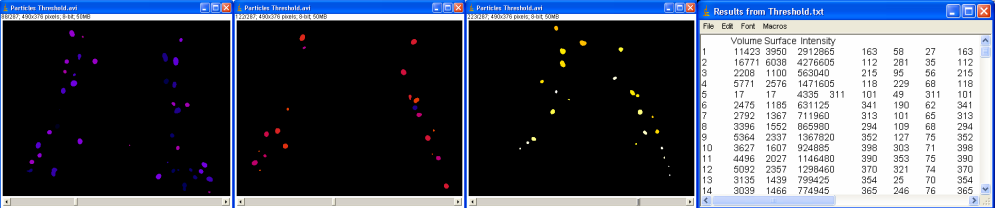
Het standaardprotocol voor ImageJ dat werd uitgewerkt bevat verschillende stappen, die weergegeven worden in tabel 2. Eerst en vooral worden de gebieden afgelijnd die men wenst te meten. In de kopstreek wordt een gebied afgelijnd dat net achter de ogen start en loopt tot aan de voorrand van de testes. Op de z-stacks (zie materialen en methoden, paragraaf 4.1) kan men de ogen niet waarnemen, maar de fluorescente beelden kunnen vergeleken worden met het corresponderende transmissiebeeld om zo de exacte positie van de ogen op de fluorescente beelden te kunnen bepalen. Verder wordt de z-stack doorlopen om na te gaan waar de testes zich bevinden. Deze worden vooraan afgelijnd door neoblasten, wat in de fluorescentiebeelden duidelijk zichtbaar is als een boog van gekleurde neoblasten. Ter hoogte van de het staartuiteinde wordt er gekeken op de fluorescentiebeelden waar de vrouwelijke gonoporus zich bevindt. Het gebied dat zich hieronder bevindt wordt gebruikt als tweede selectiegebied.

Aangezien de beelden nu gereduceerd zijn wordt er een eerste correctie uitgevoerd, de fourier transformatie. Hiervoor wordt eerst het contrast van de beelden verhoogt en worden de contrastenverschillen enkele malen uitgevlakt. Het doel van de fourier transformatie is om fijner detail, minder clustering en toch genoeg scherpte in het beeld te creëren tegen een egale achtergrond.

Vervolgens wordt een tweede correctie uitgevoerd. Hierbij wordt de threshold zodanig aangepast opdat enkel de neoblasten meegenomen worden en niet de achtergrond. Na het toepassen van dit threshold zal het figuur omgezet worden naar een binair (0,1 dan wel 0,255) beeld. De threshold gaat binaire gegevens vanaf een bepaalde drempel waarde (tussen 0,1 en 0,255) pixels kleiner dan deze waarde niet weergeven.

Op basis van het bekomen binaire beeld zal er een 3D object counting uitgevoerd kunnen worden. Deze ImageJ plugin zal de binaire z-stack analyseren en in tabelvorm weergeven. Er wordt een resultaatbeeld gevormd dat de verschillende clusters aanwezig op verschillende niveau's in de z-stack, aankleurt: dwz een gesuperponeerde look-up-table (LUT) color ramp : voorbeeld bodem slice donkerblauw, bovenste optische coupe licht geel)..

Tabel 2: De verschillende stappen van het uitgewerkte standaardprotocol voor de beeldanalyse van met BrdU gekleurde stamcellen in M.lignano met behulp van ImageJ.

Stap	Uitgevoerde stappen met visuele weergave	
Selectie	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>Selectiegebied hoofd</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>Selectiegebied Staart</p>  </div> </div>	
Open/File	<div style="display: flex; justify-content: space-around;">   </div> <p>Image/Crop → Image/Type/8-bit → Edit/Clear Outside → Edit/Invert → Unselect ROI → Invert</p>	
Fourier Transformatie	 <p>Process/Enhance Contrast → 4x Process/Smooth → Plugins/Filters/FFT</p>	
Threshold	 <p>Image/Adjust/Threshold → Apply</p>	
3D Object Counter	 <p>Plugins/Stacks/3D Object Counter</p>	

2.2.2 Optimalisatie van de thresholdkeuze

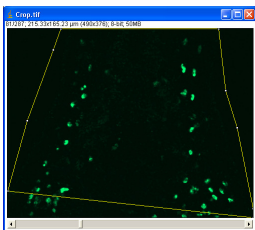
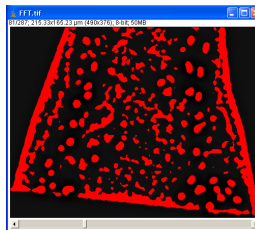
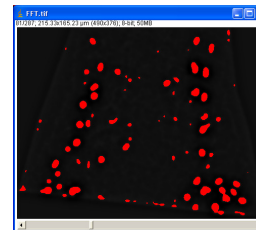
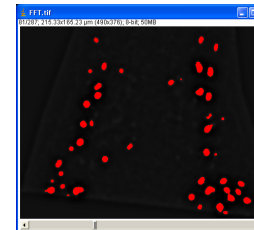
Bij het kiezen van de threshold moet er rekening gehouden met verschillende factoren. Hoe lager men de thresholdwaarde ingesteld wordt, hoe meer achtergrondsignalen oplichten. Het omgekeerde is echter ook waar, hoe hoger de thresholdwaarde ingesteld wordt, hoe meer gelabelde neoblasten neoblasten eruit gefilterd worden en op het resulterend beeld verdwenen zijn. Het kiezen van een juiste thresholdwaarde is dus van cruciaal belang waarbij zoveel mogelijk achtergrondkleuring moet verdwijnen zonder dat er al te veel neoblasten mee weg te vegen. Doordat een kleuring niet altijd even goed gelukt is, blijkt het kiezen van een optimale threshold niet altijd even eenvoudig. In Tabel 3 wordt een overzicht gegeven van de 6 verschillende types van kleuringen en de hierbij horende criteria voor het bepalen van een goede threshold.

Tabel 3: Criteria voor het bepalen van de threshold bij verschillende types BrdU-kleuringen

Type BrdU-kleuring		Criteria bij de keuze van de threshold
Neoblasten	Rhabdieten	
/	/	Niet gelukte kleuringen werden niet verder gebruikt in het experiment
+	/	De thresholdwaarde wordt gekozen wanneer de ruis verdwijnt
+ en -	/	
-	/	
+	+	De intensiteit van het signaal dat de delende neoblasten uitzenden overstijgt die van de achtergrondkleuring. De thresholdwaarde wordt bepaald wanneer alle rhabdieten verdwijnen
-	+	De lage intensiteit van het signaal dat de neoblasten uitzenden ligt zo dicht bij de hoge intensiteit van het signaal dat de rhabdieten uitzenden, waardoor de keuze van een geschikte threshold moeilijk wordt
+ = Sterk signaal - = Zwak signaal / = Geen signaal/verwaarloosbaar		

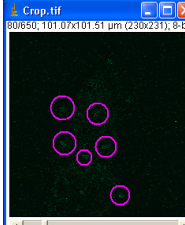
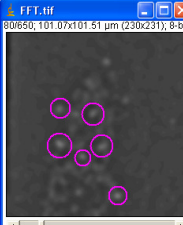
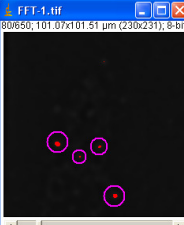
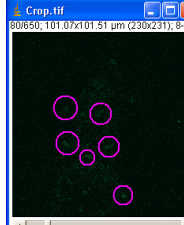
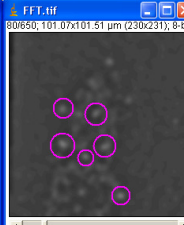

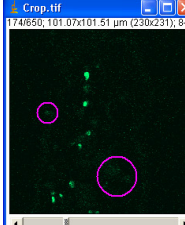
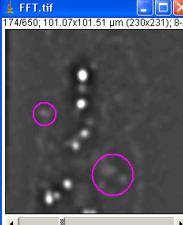
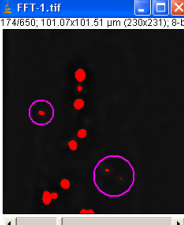
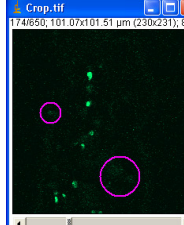
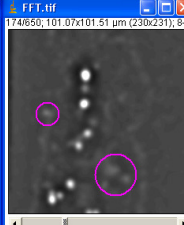
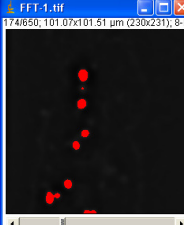
Bij de kleuringen waar de rhabdieten geen signaal geven is het kiezen van de threshold vrij simpel (Tabel 4). De enige elementen die een significant signaal geven zijn de gelabelde delende neoblasten. De achtergrondruis (tekent de worm af tegen de achtergrond) die altijd aanwezig is zal bij te lage thresholds nog oplichten, maar vanaf een zekere thresholdwaarde zal deze volledig verdwijnen. Tevens zijn de delende neoblasten bij deze waarde de enige elementen die nog een signaal zullen opleveren.

Tabel 4: Voorbeeld voor het bepalen van de threshold in ImageJ bij wormen waar enkel de delende neoblasten gekleurd zijn

Fluorescentie	Threshold 17	Threshold 22	Threshold 27
			
	Zeer veel achtergrondkleuring	Veel achtergrondkleuring	Geen achtergrondkleuring

Bij de preparaten waar naast delende neoblasten eveneens rhabdieten gekleurd zijn, wordt het bepalen van de threshold moeilijker afhankelijk van de intensiteit waarmee de neoblasten gekleurd zijn. Wanneer de delende neoblasten sterk oplichten is het bepalen van de threshold relatief eenvoudig (Tabel 5). De intensiteit waarmee de rhabdieten oplichten is immers klein genoeg vergeleken met deze waarmee de delende neoblasten oplichten. Daarom wordt de threshold zodanig gekozen dat alle achtergrondsignalen en rhabdieten verdwenen zijn en enkel de neoblasten nog oplichten.

Tabel 5: Voorbeeld voor het bepalen van de threshold in ImageJ bij wormen waarvan zowel rhabdieten als delende neoblasten sterk gekleurd zijn

Threshold = 25			Threshold = 30		
Fluorescentie	Fourier	Threshold	Fluorescentie	Fourier	Threshold
					
					

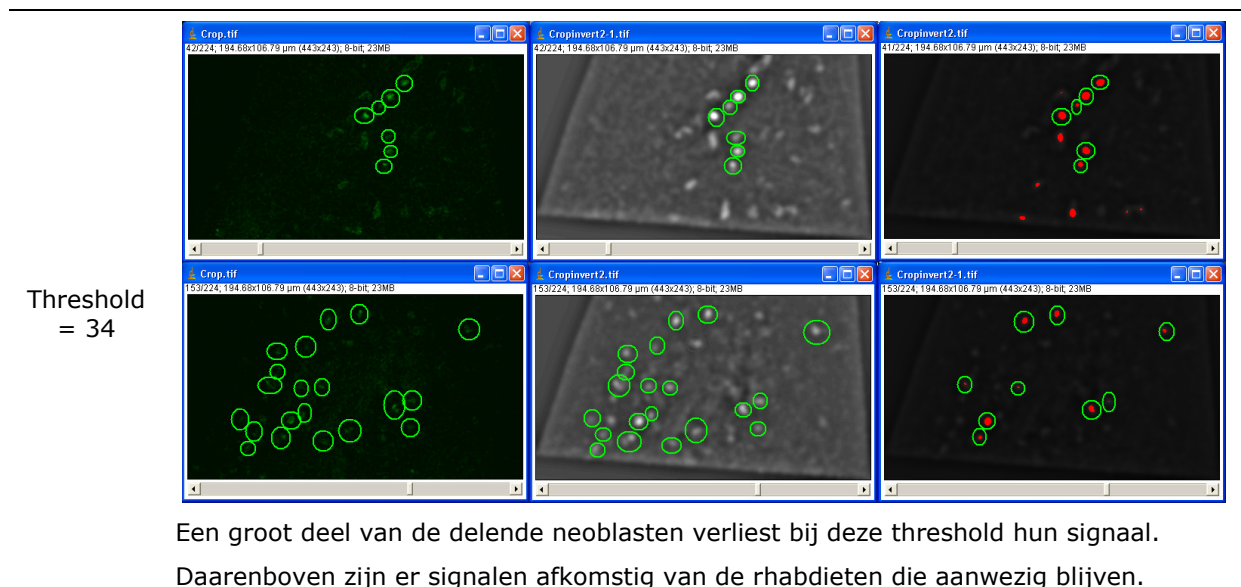
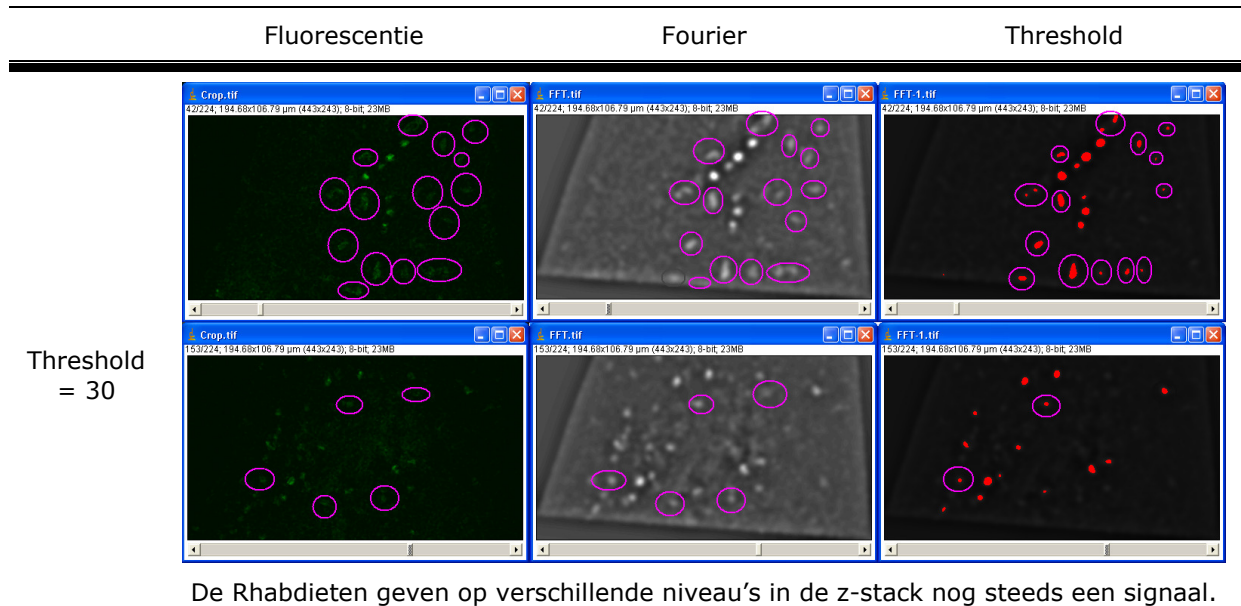
De Rhabdieten geven op verschillende niveau's in de z-stack nog steeds een signaal

De Rhabdieten geven op geen enkel niveau in de z-stack nog een signaal. Enkel de delende neoblasten geven nog een signaal.

 = Achtergrondkleuring

Bij de preparaten waar naast zwak gekleurde delende neoblasten eveneens de rhabdieten gekleurd zijn, wordt het bepalen van de threshold moeilijker (Tabel 6). Het verschil in intensiteit tussen de delende neoblasten en de rhabdieten is zo klein, dat ze soms niet van elkaar te onderscheiden zijn. Bij een te lage threshold gaan er te veel rhabdieten nog een signaal geven terwijl bij een te hoge threshold het signaal van enkele neoblasten kan verdwijnen, terwijl sommige rhabdieten een signaal blijven geven.

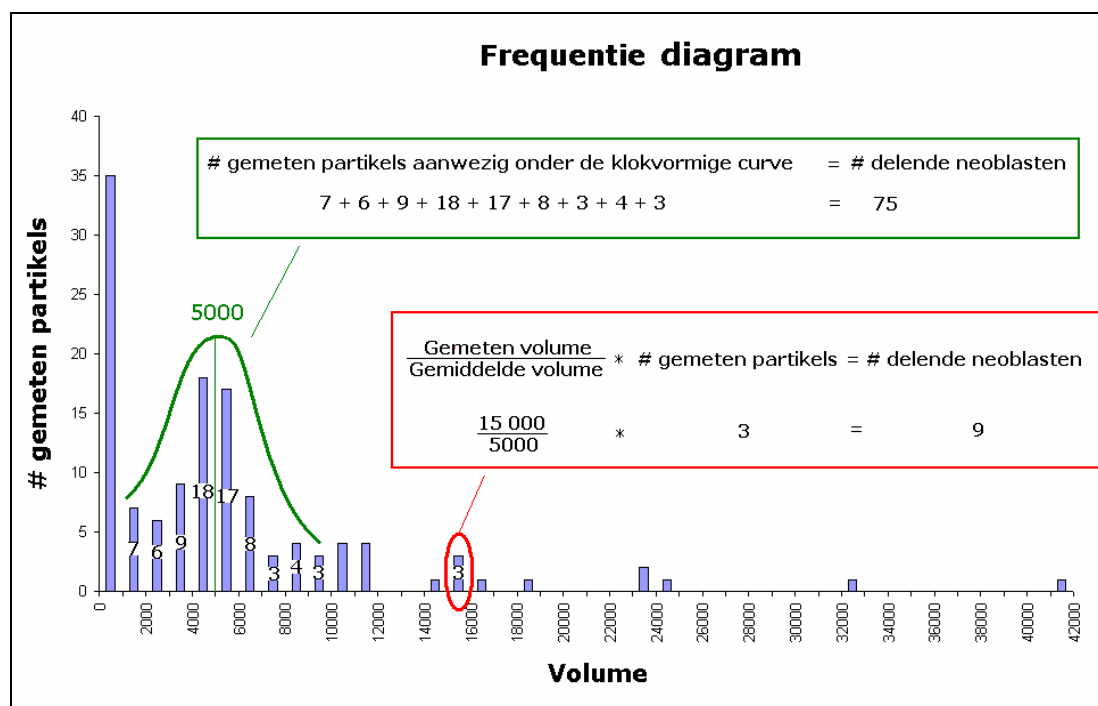
Tabel 6: Voorbeeld voor het bepalen van de threshold in ImageJ bij wormen met zwak gelabelde neoblasten en sterk gekleurde rhabdieten



 = Achtergrondkleuring  = Delende neoblasten

2.2.3 Procedure voor het tellen van het aantal partikels

Wanneer men de threshold geoptimaliseerd heeft, wordt er een 3D Object Counter uitgevoerd. Deze geeft een lijst weer van alle partikels die overgebleven zijn in het thresholdbeeld. In deze lijst worden voor elk van de getelde partikels een aantal parameters berekend zoals volume, oppervlakte en intensiteit. Op basis van deze gegevens kan men een voor elke kleuring een frequentiediagram opstellen met betrekking tot het volume van de verschillende partikels. Deze volumes schetsen echter geen beeld van de ware volumes van de delende neoblasten maar zijn echter een weergave van de threshold. Voor het opstellen van een frequentiediagram worden eerst de volumes ingedeeld in groepen waarvoor standaard een interval van 1000 pixels wordt gebruikt. Op basis hiervan wordt er een frequentiediagram opgesteld waarin de volumes van alle gemeten clusters worden verdeeld over deze intervallen. Nadat alle resultaten uitgezet zijn in zulke frequentiediagrammen kunnen er twee types histogrammen waargenomen worden (Figuur 11 en Figuur 12).



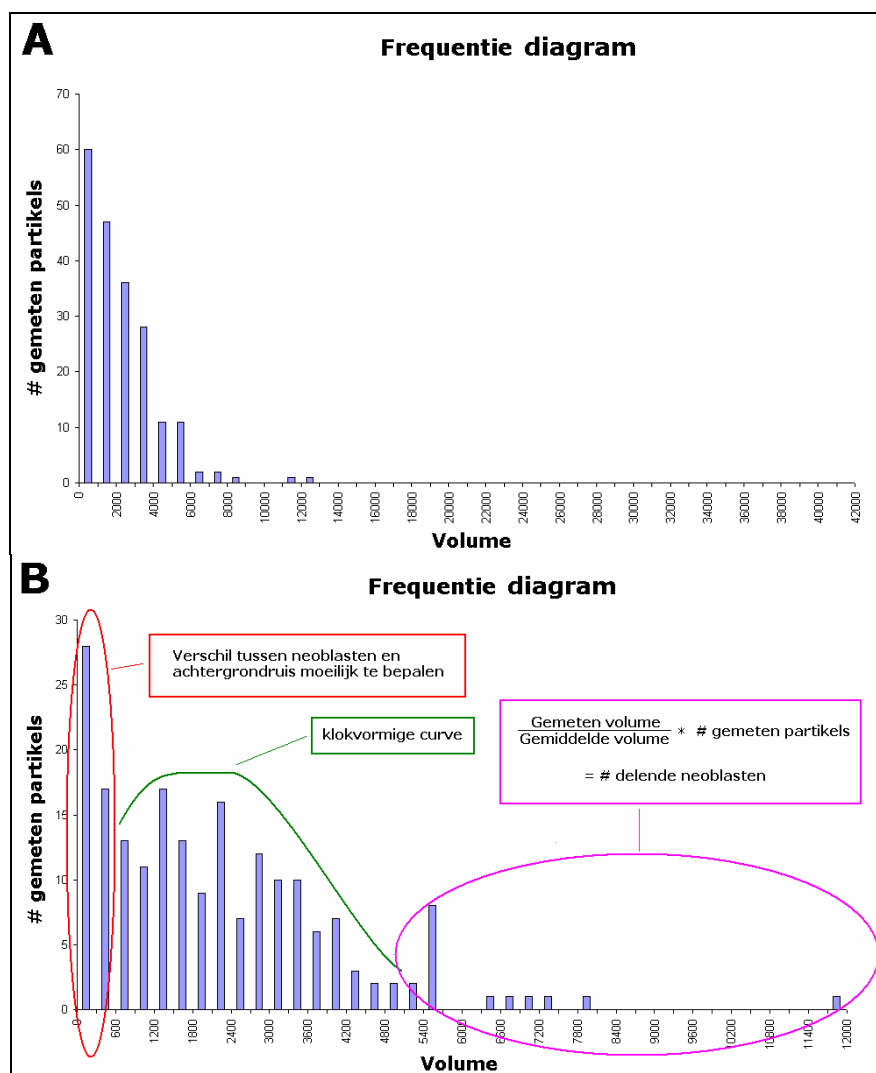
Figuur 11: Voorbeeld van een frequentiediagram van een preparaat waarvan de intensiteit van de delende neoblasten veel sterker is dan deze van de achtergrondkleuring

De x-as is ingedeeld in intervallen van 1000 pixels. Op de y-as wordt het aantal gemeten partikels weergegeven die binnen deze intervallen terug te vinden zijn. De groene kader geef de formule weer voor het tellen van het effectieve aantal delende neoblasten die onder een klokvormige curve vallen. In de rode kader wordt de formule weergegeven voor het berekenen van het effectieve aantal delende neoblasten van partikels waarvan het gemeten volume hoger is dan deze van de klokvormige curve.

Het eerste patroon komt min of meer terug bij alle wormen waar de intensiteit van de delende neoblasten deze van de achtergrondkleuring overtreft (Figuur 11). Door het toepassen van de threshold is bij deze preparaten het grootste deel van de achtergrondkleuring reeds weggefilterd, waardoor het merendeel van de getelde partikels, delende neoblasten zijn. Binnen de frequentiediagrammen afkomstig van deze preparaten is een klokvormige curve aanwezig waar de

piekwaarden het gemiddelde volume van een partikel binnen de worm in kwestie weergeeft. Deze ligt meestal rond de 5000 pixels. Naast deze klokvormige curve is er altijd een piek aanwezig met volumes kleiner dan 1000 afkomstig van achtergebleven achtergrondsignalen. Tot slot zijn er meestal volumes aanwezig die buiten de klokvormige curve vallen. Het grote volume van zulke partikels is te verklaren doordat de neoblasten zo dicht tegen mekaar liggen waardoor de threshold ze als één groot partikel beschouwt.

Voor dit type van frequentiediagram wordt het aantal delende neoblasten geteld door het aantal partikels onder de normaal verdeling éénmalig te tellen. Daarnaast wordt het aantal delende neoblasten binnen partikels waarvan het volume hoger is dan die van de klokvormige curve, berekend volgens de formule weergegeven in de rode kader in figuur 10. Het resultaat van al deze metingen wordt opgeteld om op die manier een schatting te krijgen van het effectieve totale aantal delende neoblasten binnen een preparaat.



Figuur 12: Voorbeeld van een frequentiediagram van een preparaat waarvan de intensiteit van de delende neoblasten nauwelijks verschilt met deze van de achtergrondkleuring

A. De x-as is ingedeeld in intervallen van 1000 pixels. Op de y-as wordt het aantal gemeten partikels weergegeven die binnen deze intervallen terug te vinden zijn **B.** De x-as is ingedeeld in intervallen van 300 pixels. Op de y-as wordt het aantal gemeten partikels weergegeven die binnen deze intervallen terug te vinden zijn

Het tweede patron komt voor bij wormen waar het verschil in intensiteit van de delende neoblasten klein is met die van de achtergrondkleuring (voornamelijk rhabdieten) (Figuur 12). Bij te grote intervalwaarden van het volume is er geen klokvormige curve aanwezig in het frequentiediagram (Figuur 12a). Dit is logisch omdat de intensiteit van de neoblasten zo laag is dat ze tegen de waarden van de achtergrondkleuring aanleunen. In zulk geval is een vernauwing van de intervalwaarde van het volume nodig (Figuur 12b). Op deze manier kan men min of meer een klokvormige curve beschouwen waarvan het eerste segment aangevuld wordt door achtergrondkleuring. Het tellen van het effectieve aantal delende neoblasten begint bij het tellen van het aantal partikels die behoren tot het tweede segment van de klokvormige curve. Verder worden de waarden buiten de klokvormige curve verwerkt met behulp van de formule weergegeven in de parse kader in Figuur 12b. Over het eerste segment van de klokvormige curve kan men geen telling uitvoeren omdat het verschil met de achtergrondkleuring te klein is.

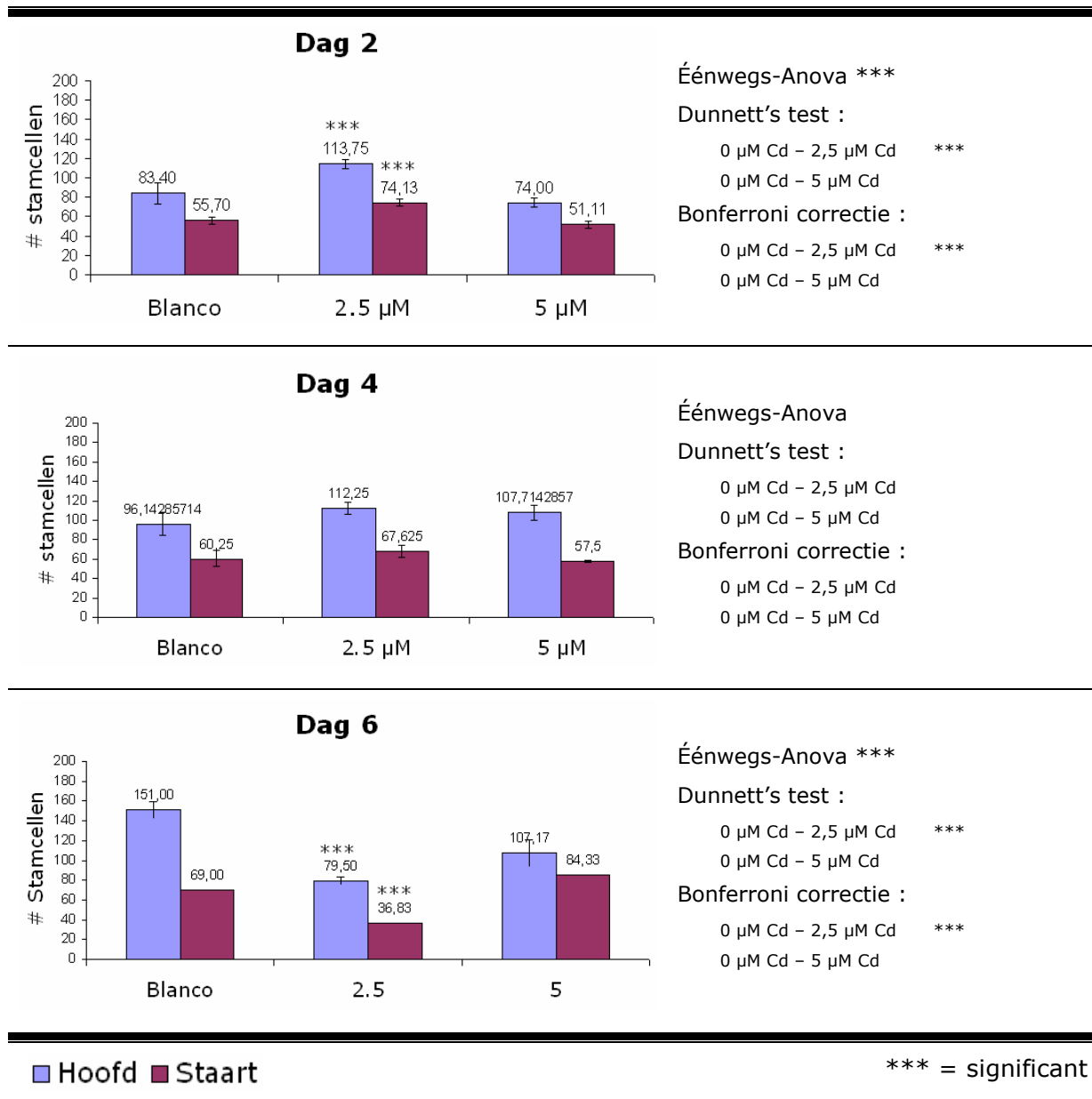
2.3 Statistische analyse

Na het verwerken van hoofd- en staartbeelden van de verschillende testgroepen met behulp van ImageJ, kunnen er diagrammen uitgezet worden met betrekking tot het aantal getelde delende stamcellen.

Uit de diagrammen weergegeven in tabel 7 kan men afleiden dat het aantal delende neoblasten voor de groep die blootgesteld werd aan 2,5 μM Cd zowel in hoofd- en staartgedeelte na twee dagen blootstelling significant toegenomen is ten opzichte van de blancogroep. Na 4 dagen blootstelling is er geen significant verschil waar te nemen in het aantal delende neoblasten ten opzichte van de blancogroep. Na 6 dagen blootstelling blijkt het aantal delende neoblasten significant gedaald te zijn ten opzichte van de blancogroep. Voor de groep die blootgesteld werd aan 5 μM Cd zijn er nergens significante verschillen waar te nemen in het aantal delende neoblasten ten opzichte van de blancogroep.

Tabel 7: Aantal getelde stamcellen voor de blancogroep (0 μM Cd), de groep blootgesteld aan 2,5 μM Cd en de groep blootgesteld aan 5 μM Cd uitgezet per blootstellingsperiode (2 dagen, 4 dagen, 6 dagen) en per regio (hoofd/staart). Hiervoor is de statistische significantie weergegeven op basis van een significantieniveau van 0,05.

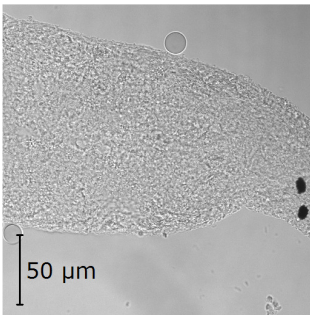
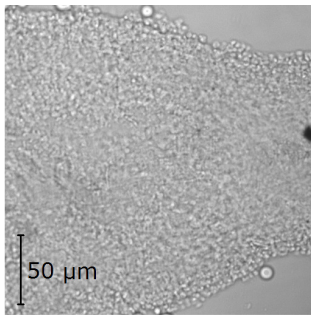
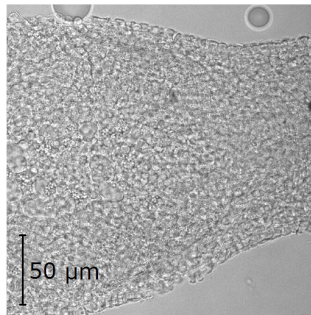
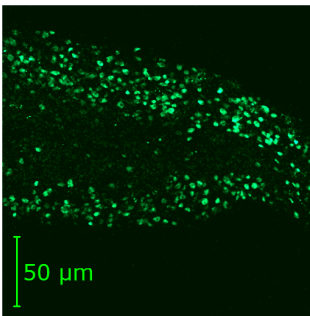
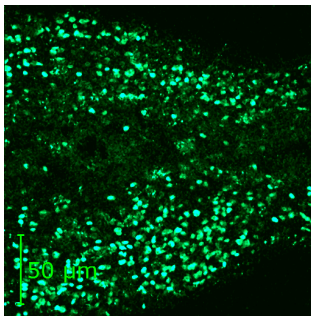
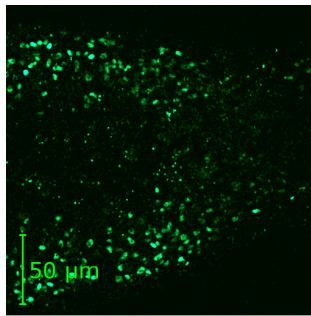
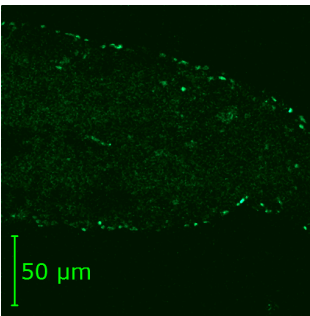
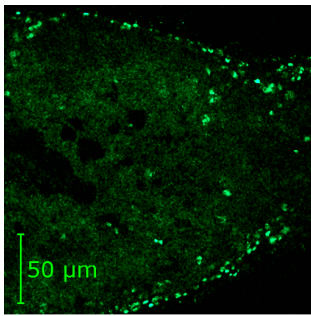
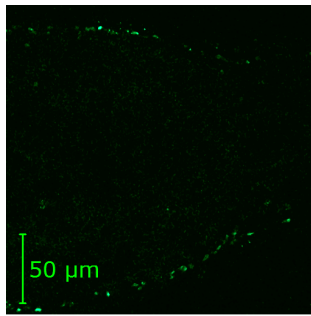
Diagram voor de verdeling van het aantal neoblasten

 p -waarden bij $\alpha = 0,05$ 

3 Migratie-experiment

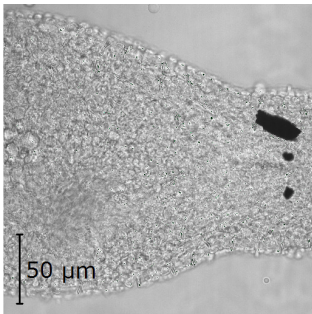
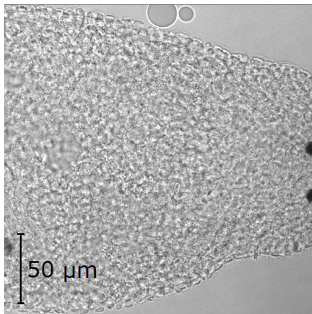
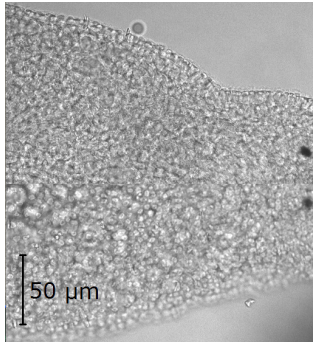
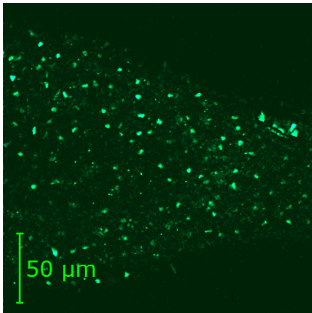
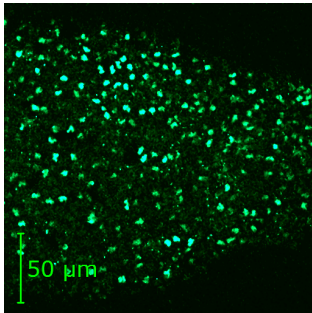
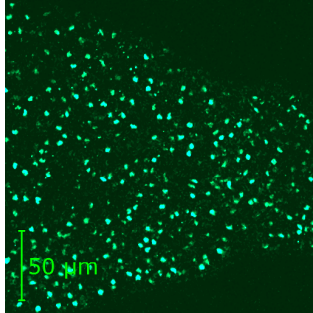
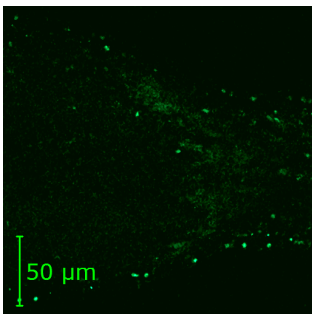
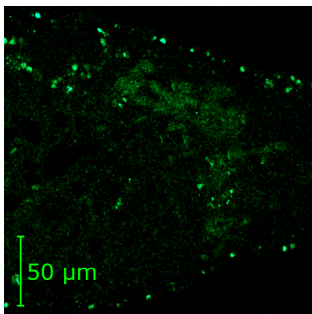
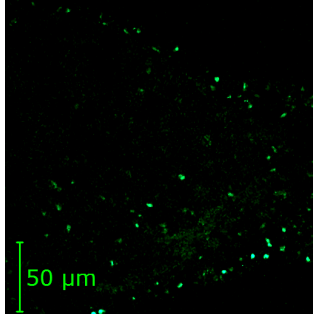
Na 1 dag en 3 dagen blootstelling aan BrdU kan men voor de verschillende testgroepen nagaan naar waar de neoblasten gemigreerd zijn, en of ze al dan niet gedifferentieerd zijn. In tabel 8 en in tabel 9 worden voorbeelden weergegeven van confocale microscoopbeelden. Hierop zijn beelden van gemigreerde/gedifferentieerde neoblasten op het niveau van de neoblastpopulatie te zien. Bovendien worden er beelden weergegeven van deze neoblasten op het niveau van de epidermis. Voor het bekijken van deze beelden kan er het best een 3D-projectie gemaakt worden van de z-stacks om een beeld te kunnen krijgen van de distributie. Op de beelden weergegeven in tabel 8 en tabel 9 kan men dit niet goed waarnemen omdat dit slechts 2D-projecties zijn ter hoogte van twee verschillende niveaus. Wat men uit deze beelden wel min of meer kan vaststellen is dat de kleuring van de groep blootgesteld aan 5 μM CdCl_2 gedurende 1 dag minder goed gelukt is, en bij de bespreking van de resultaten buiten beschouwing wordt gelaten.

Tabel 8: Vergelijking tussen de migratie en differentiatie van delende neoblasten (confocale microscoopbeelden) tussen de verschillende testgroepen.

1 dag blootstelling	0 μM CdCl_2 (blanco)	2,5 μM CdCl_2	5 μM CdCl_2
Transmissiebeeld			
Beeld genomen op het niveau van de neoblasten			
Beeld genomen op het niveau van de epidermis			

Uit de confocale beelden in tabel 8 kan men min of meer concluderen dat het aantal recent gedeelde neoblasten toegenomen is na één dag blootstelling aan 2,5 μM cadmium. Wat differentiatie betreft kan er niet veel besloten worden omdat er te veel cellen aangekleurd zijn. Uit de beelden genomen op het niveau van de epidermis kan er echter wel een aflijning van cellen waargenomen worden ter hoogte van de epidermis. Dit zijn waarschijnlijk neoblasten die gedifferentieerd zijn tot epidermis cellen.

Tabel 9: Vergelijking tussen de migratie en differentiatie van delende neoblasten (confocale microscoopbeelden) tussen de verschillende testgroepen.

3 dagen blootstelling	0 μM CdCl_2 (blanco)	2,5 μM CdCl_2	5 μM CdCl_2
Transmissie			
Neoblasten (migratie)			
Epidermiscellen (differentiatie)			

Uit de confocale beelden in tabel 9 kan men eveneens concluderen dat het aantal gedeelde en gemigreerde neoblasten toegenomen is na 1 dag en 3 dagen blootstelling aan 2,5 μM CdCl_2 en 5 μM CdCl_2 . Tussen de blootstellingsgroepen is er niet echt een verschil waar te nemen. Wat differentiatie betreft kan er niet veel besloten worden omdat er te veel cellen gekleurd zijn. Maar op de beelden ter hoogte van de epidermis lijkt het toch alsof de neoblasten mogelijk gedifferentieerd zijn to epidermis cellen.

IV DISCUSSIE

In deze verhandeling werd het effect nagegaan dat blootstelling aan cadmium heeft op de neoblastpopulatie bij *M. lignano*. Hiervoor werd eerst nagegaan welke concentraties van cadmium sublethaal zijn voor deze worm aan de hand van een LC50-test. Vervolgens werden er naast een blancogroep, twee groepen blootgesteld aan respectievelijk 2,5 μM cadmium en 5 μM cadmium. Enerzijds werd er door een BrdU pulse uit te voeren na een blootstelling aan cadmium van respectievelijk 2, 4 en 6 dagen (direct gevolgd door labeling en observatie) nagegaan welke effecten cadmium heeft op het distributiepatroon en het aantal delende neoblasten.

Om na te gaan welke effecten cadmium heeft op de migratie en differentiatie van delende neoblasten werden de wormen tijdens de volledige blootstellingsperiode korstondig blootgesteld aan BrdU en op verschillende tijdstippen (na 1 en 3 dagen van blootstelling) gelabeld en geobserveerd.

1 LC50-waarde voor cadmium bij *Macrostomum lignano*

De LC50-waarde voor cadmium bij *M. lignano* na 5 dagen blootstelling is gelijk aan 51 μM . Dit komt erop neer dat na 5 dagen bij deze concentratie de helft van de wormen zal gestorven zijn. Concentraties hoger dan deze waarde zijn extreem dodelijk waardoor het bestuderen van de effecten van cadmium op de neoblastpopulatie moeilijk wordt, aangezien het merendeel van de blootgestelde organismen sterft. Daarom wordt er in deze studie geopteerd om de effecten te bestuderen die sublethale (en meer realistischere) concentraties van cadmium kunnen hebben op de neoblastpopulatie

2 Opstarten van de testculturen

Het doel van het opstarten van testculturen is het bekomen van een aantal wormen van dezelfde leeftijd, wat belangrijk is om de variatie als gevolg van een verschil in leeftijd uit te schakelen. In de praktijk bleek echter dat het bekomen van het gewenste aantal dieren soms langer duurde dan verwacht. De reden hiervoor is dat de adulte wormen waarmee de testculturen werden opgestart niet genoeg eitjes legden. Er moest dus een groter aantal beest gekweekt worden om genoeg dieren te hebben voor een experiment. Mogelijke verklaringen hiervoor kunnen zijn dat de beesten onder stress stonden omwille van het feit dat ze te veel overgezet werden. Anderzijds zou het kunnen dat ze nog last ondervinden van de wasstappen die men heeft toegepast voor het verwijderen van de parasiet.

3 BrdU-labeling

Een BrdU-kleuring uitgevoerd op *M. lignano* gebeurt niet altijd even efficiënt. Tijdens de procedure kunnen er verschillende factoren meespelen die al dan niet een effect kunnen uitoefenen op het eindresultaat. Zo moeten de wormen gestrekt worden om achteraf een zo optimaal mogelijk beeld te verkrijgen. Dit strekken gebeurt met behulp van MgCl_2 , wat bij een te lange blootstelling op zich ook toxisch kan zijn. Tijdens de studie werd vastgesteld dat magnesiumchloride na een tijd minder goed werkte, waardoor de wormen zelfs na lange blootstelling niet volledig gestrekt waren. Een mogelijke oplossing is ervoor zorgen dat de magnesiumchloride oplossing tijdig ververscht wordt.

Voor fixatie met paraformaldehyde bleek het belangrijk te zijn dat de paraformaldehyde goed opgelost was en niet in vlokken voorkwam. Dit kan verzekerd worden door de oplossing aan te zuren opdat het paraformaldehyde opgelost wordt. Voor gebruik moet de oplossing eerst terug op pH 7 worden gebracht.

De meest cruciale fase tijdens het uitvoeren van het BrdU-protocol is de behandeling met proteïnase K om de specimens voldoende permeabel te maken. Tijdens deze behandeling worden de specimens permanent visueel gevolgd om vast te stellen wanneer de epidermis voldoende gedegradieerd is. De efficiëntie waarmee de proteïnase K de epidermis afbreekt varieert van individu tot individu.

Voor de denaturatie van het dubbelstrengig DNA met HCl is het belangrijk dat de verschillende concentraties HCl waaraan de wormen worden blootgesteld bij de juiste temperatuur toegevoegd worden. Denaturatie van het DNA gebeurt enkel optimaal wanneer de 0.1 N HCl op ijs en de 2N HCl bij 37.5° C wordt toegediend.

Tot slot moet er bij de incubatie met zowel primaire als secundaire antilichamen rekening gehouden met het feit dat antilichamen na verloop van tijd hun specifieke werking verliezen. Werken met antilichamen die al een tijdje in gebruik zijn kan dus een slechte of mislukte kleuringen opleveren.

4 Distributie experiment

4.1 Visuele analyse

Tijdens het distributie experiment is gebleken dat er wormen zijn waar de BrdU-kleuring niet optimaal gebeurd is. Wanneer een kleuring bij alle wormen binnen eenzelfde conditie minder helder is, blijft het essentieel om deze preparaten verder te bestuderen. Wanneer dit niet gebeurd en men ervoor zou opteren om de BrdU-labeling opnieuw uit te voeren, dan moet in feite het volledige experiment opnieuw herhaald worden. Dit soort experiment is echter zeer arbeidsintensief, en zowel de kleuringen als de confocale metingen en de beeldverwerking nemen veel tijd in beslag. Op basis van deze problemen kan er geconcludeerd worden dat wanneer een BrdU-labeling minder goed gelukt is, men in geval van tijdsnood geen andere oplossing heeft dan deze toch op te nemen in het resultaat. Doordat de BrdU-kleuring men toch een lichte kleuring kan waarnemen, is het bij zulke beelden een kwestie van deze kritischer te analyseren.

Wanneer de beelden van de verschillende blootstellingsgroepen (0 μM CdCl₂, 2.5 μM CdCl₂ en 5 μM CdCl₂) over de verschillende blootstellingsperiodes (2, 4 en 6 dagen) vergeleken worden met elkaar keert hetzelfde patroon van delende neoblasten in zowel hoofd- als staartbeelden terug. Deze bevinden zich voornamelijk in twee laterale banden met uitzondering van een aantal die zich in het midden bevinden. Op basis van dit patroon kan men spreken over mesodermale neoblasten (twee laterale banden) en gastrodermale neoblasten (cellen die zich in het midden bevinden). Aangezien dit patroon voorkomt bij wormen die niet blootgesteld zijn aan cadmium (22) kan men stellen dat cadmium bij een blootstellingsperiode van 6 dagen tijd en blootstelling aan cadmium bij concentraties van 2,5 μM en 5 μM CdCl₂ geen effect heeft op het distributiepatroon van delende neoblasten.

4.2 Optimalisatie van de beeldverwerking

Het kwantificeren van het aantal gelabelde neoblasten heeft in de praktijk enkele beperkingen. In verschillende studies werd het aantal gelabelde neoblasten met de hand geteld (22, 37). Deze methode blijkt echter enorm arbeidsintensief en moeilijk te zijn, en is niet altijd even accuraat. Daarnaast kan men de neoblasten ook analyseren met behulp van computerprogramma's. Deze methode is sneller maar kent een foutenmarge die waarschijnlijk groter is dan deze bij het handmatig tellen. Daarom werd er voor dit experiment een beeldverwerkingsproces uitgewerkt waarbij men de foutenmarge zo laag mogelijk probeert te houden, en die bovendien relatief snel kan uitgevoerd worden. Voor het optimaliseren van het beeldverwerkingsproces dat in deze studie werd uitgewerkt werd er rekening gehouden met verschillende parameters.

Ten eerste is het tellen van het aantal delende neoblasten in een volledige worm moeilijk om twee redenen. Ten eerste kan de worm niet volledig waargenomen worden bij een vergroting van 40x, wat de ideale vergroting is om neoblasten te visualiseren. Ten tweede kan in het gebied van de testes het aantal neoblasten moeilijk worden omdat er gewoonweg te veel zijn om te tellen. Daarom worden voor de tellingen enkel lichaamsregio's buiten de testes geteld, wat bovendien leidt tot een reductie in het aantal metingen die dienen gemaakt te worden. Duidelijke zichtbare herkenningspunten zijn de ogen, de testes en de vrouwelijke gonoporus. Daarom werd een eerste regio bepaald tussen de ogen en de testes, terwijl de tweede regio het staarteinde tot aan de vrouwelijke gonoporus bevat. Het selecteren van specifieke regio's voor het analyseren van de neoblastpopulatie komt in andere studies ook terug (22, 37).

Een tweede probleem dat zich voordoet is de variatie in kleuring die beelden kunnen vertonen. Het gevolg hiervan is dat voor elk beeld moet nagegaan worden welke threshold optimaal is en hoe het effectief aantal delende neoblasten met behulp van de frequentiediagrammen die de volumes van de neoblasten weergeeft dient geteld te worden. Beide stappen werden voor elke worm handmatig uitgevoerd. Hierbij moet er goed gekeken worden naar het typische verdelingspatroon van het volume van de neoblasten dat telkens in elk frequentiediagram terugkomt. Op basis hiervan kan men op objectieve manier de neoblasten onderscheiden van achtergrondsignalen.

Voor de wormen waarvan de intensiteit van de kleuring van de delende neoblasten veel sterker is dan de intensiteit van de achtergrondkleuring zijn deze stappen eenvoudig uit te voeren. Het kiezen van een geschikte thresholdwaarde is in dit geval slechts een kwestie van de grens te vinden waar de delende neoblasten gescheiden worden van de meeste achtergrondsignalen. Het frequentiediagram dat bij zulke kleuringen opgesteld kan worden vertoont altijd een klokvormige curve, een piekwaarde van lage volumes (ruis) en volumes die groter zijn dan deze die onder de klokvormige curve vallen. Van de waarden die onder de klokvormige curve of erboven liggen kan men vrij accuraat zeggen dat dit het effectief aantal delende neoblasten voorstelt. De piekwaarde met volumes lager dan 1000 pixels zijn achtergrondsignalen of grenspunten van delende neoblasten die als afzonderlijke pixels worden geteld.

Wanneer delende neoblasten een kleurintensiteit hebben die ongeveer gelijk ligt met de intensiteit van de achtergrondkleuring, is het veel moeilijker om de verschillende variabelen in de beeldverwerkingsanalyse vast te leggen. De meest aangewezen procedure bestaat erin het thresholdbeeld nauwkeurig te vergelijken met het fluorescentiebeeld, om na te gaan bij welke threshold de achtergrondkleuring zoveel mogelijk weggefilterd wordt. Hierbij moet er natuurlijk wel

voor gezorgd worden dat de threshold niet te hoog wordt bepaald, wat zou leiden tot het verdwijnen van delende neoblasten op het binaire beeld van de threshold. Het probleem is echter dat sommige achtergrondkleuring een hogere intensiteit heeft dan de neoblasten, wat duidelijk tot uiting komt in de frequentietabel. Bij het type kleuring dat hier gebruikt werd, vertonen frequentietabellen met een volume-interval van 1000 pixels immers geen scheiding tussen neoblasten (klokvormige curve) en achtergrondkleuring (piekwaarde bij volumes kleiner dan 1000 pixels). Bij deze tabellen ontbreekt dus een zichtbare grens tussen het volume van delende neoblasten en deze van de achtergrondkleuring. Dit probleem kan opgelost worden door het volume-interval te verkleinen tot (bijvoorbeeld) 300 pixels. Hierdoor ontstaat er een onvolledige klokvormige curve, maar is er wel een duidelijke piek aanwezig bij extreem lage volumes (achtergrondkleuring) en een piek die het hoogste punt van de klokvormige curve vormt (gemiddelde volume van de delende neoblasten). Daarnaast zijn er eveneens de waarden die hoger liggen dan de maximumwaarde onder de klokvormige curve, die neoblasten voorstellen die samengeteld werden als één partikel doordat ze elkaar raken (figuur 12b). Bij het kwantificeren van het aantal delende neoblasten bij slecht gekleurde preparaten moet er dus rekening gehouden worden met een klein aantal delende neoblasten die samen met de achtergrondkleuring de eerste piekwaarde bij extreem lage volumes vormen. Dit zijn de neoblasten waarvan men bij het bepalen van de threshold reeds kon zien dat de intensiteit van hun signaal lager lag dan bepaalde achtergrondkleuring.

4.3 kwantitatieve en statistische analyse

Cadmiumstress werd reeds onderzocht bij de platworm *Polycelis felina*, waar men een algemene daling in het aantal delende neoblasten vaststelde bij blootstelling aan concentraties van respectievelijk 100 μM , 10 μM en 1 μM cadmium (37). In deze studies werd echter het effect van cadmium op regenererende wormen bestudeerd, en niet op intacte individuen. Naast het effect van cadmium werd dus eveneens het effect van regeneratie in acht genomen. Dit soort onderzoek werd op dezelfde worm eveneens uitgevoerd voor andere zware metalen, zoals mangaan en chroom en kwik (38, 39, 40) waaruit eveneens bleek dat de mitotische activiteit van de neoblasten geïnhibeerd werd. In een andere studie waarbij het effect van uithongeringsstress op het neoblastsysteem in *M. lignano* werd bestudeerd, kwam men tot de conclusie dat de mitotische activiteit onder invloed van dit type stress gedaald was (21). Deze studies tonen aan dat wormen onder stress een gedaalde mitotische activiteit van het neoblastsysteem vertonen.

Voor het distributie experiment in deze studie werden de wormen kortstondig (30 minuten) blootgesteld aan BrdU. Enkel de neoblasten die zich in de S-fase bevinden zullen BrdU incorporeren in hun DNA. Een gevolg hiervan is dat tijdens het distributie experiment in feite enkel een verdeling wordt gegeven van het aantal delende neoblasten en niet van het totale aantal neoblasten gedurende de blootstelling aan cadmium over verschillende dagen.

Wormen die blootgesteld werden aan 2,5 μM cadmium gedurende 2 dagen bevatten ten opzichte van een controlegroep een significant groter aantal delende neoblasten. Deze stijging in het aantal delende neoblasten binnen de 2,5 μM cadmium blootstellinggroep verminderd echter na 4 dagen blootstelling, waardoor er geen statistische verschil meer is tussen blanco groep en de groep die vier dagen werd blootgesteld aan 2,5 μM cadmium. Na 6 dagen blootstelling aan 2,5 μM cadmium is het aantal delende stamcellen significant gedaald. Een mogelijke verklaring hiervoor kan zijn dat

cadmium na 2 dagen de worm begint aan te tasten waardoor deze meer energie gaat gebruiken voor het herstel van de opgelopen schade. Vermits herstel enkel kan gebeuren door de neoblasten, zal het aantal delingen van neoblasten dan ook moeten stijgen. Na 2 dagen blootstelling is het dus duidelijk dat de worm gaat reageren op cadmium in de omgeving. De daling van het aantal delende neoblasten na 4 dagen blootstelling tot het initiële niveau kan te verklaren zijn doordat cadmium een schadelijk effect begint uit te oefenen. Dit kan enerzijds een neurotoxisch effect zijn. Doordat de neoblasten gestuurd worden vanuit de hersenen via de laterale zenuwstrengen, kan zo'n neurotoxisch effect ertoe leiden dat de delingscapaciteit van de neoblasten terug zal afnemen (22, 37). Anderzijds zou cadmium rechtstreeks een effect kunnen uitoefenen op de neoblasten waardoor hun delingscapaciteit zal afnemen, mogelijk door mitotische schade of chromosomale abnormaliteiten (37). Deze trend zet zich ook verder na 6 dagen blootstelling. Meer nog kan het aantal delende neoblasten gedaald zijn ten opzicht van niet-blootgestelde wormen omdat het effect van cadmium zwaarder begint door te wegen waardoor de delingscapaciteiten van de neoblasten verlaagd zijn.

Wormen die blootgesteld werden aan 5 μM cadmium gedurende respectievelijk 2, 4 en 6 dagen bevatten ten opzichte van een controlegroep statistisch geen verschillend aantal delende neoblasten. Het aantal delende neoblasten blijft constant ondanks de hogere concentratie van cadmium waaraan de wormen worden blootgesteld. Een hypothese hieromtrent kan zijn dat bij een blootstelling aan 5 μM cadmium, het cadmium op andere pathways gaat inwerken die niet rechtstreeks een effect hebben op de mitotische activiteit van neoblasten. Een andere hypothese is dat de effecten van 5 μM cadmium zich voor 2 dagen hebben gemanifesteerd of eventueel pas na 6 dagen zullen plaatsvinden waardoor men geen significante verschillen kan zien. Een laatste hypothese in dit verband is dat de wormen zich afwijkend gaan gedragen. Zo zou het kunnen dat ze, ondanks het feit dat ze ad libitum gevoed worden, de algen niet goed opnemen waardoor de effecten van uithongering beginnen mee te spelen. Deze zorgen er voor dat het aantal delende neoblasten daalt (21). Het is deze daling die misschien een antagonistisch effect kan uitoefenen op het effect dat cadmium heeft op de delingscapaciteit van de neoblasten.

In de toekomst dient bij studies naar de effecten van blootstelling aan cadmium (en andere toxische stoffen) op de delingscapaciteit van neoblasten bij *M. lignano* rekening gehouden te worden met verschillende factoren. Wanneer men gebruik maakt van het beeldverwerkingsprotocol dat in deze studie uitgewerkt werd, kan men op zoek gaan naar een formule die de foutenmarge hierop berekent. Dit kan door de resultaten van deze methode te vergelijken met de resultaten bekomen door middel van handmatige telling om deze manier de foutenmarge te berekenen. Vervolgens kan men het beste werken met meerdere concentraties van cadmium (en andere toxische stoffen). Daarnaast kan men de blootstellingperiodes (met een interval van 24 uur) best uitbreiden of zelfs blootstellingperiodes in veelvoud van 12 uur of minder gebruiken.

5 Migratie experiment

Om na te gaan welk effect cadmium heeft op de migratie en differentiatie van neoblasten in *M. lignano* worden deze gedurende verschillende periodes (1 dag en 3 dagen) tegelijkertijd blootgesteld aan cadmium (0 μM CdCl_2 , 2,5 μM CdCl_2 en 5 μM CdCl_2) en BrdU. Doordat de neoblasten

continue blootgesteld worden aan BrdU zullen alle delende neoblasten over deze periode gekleurd worden. Daarenboven gaan de gekleurde dochtercellen, ontstaan na de eerste gekleurde delingen, na verloop van tijd migreren en differentiëren waardoor de bestemming en het celtype waarin ze veranderd zijn, waargenomen kunnen worden.

Op basis van de bekomen beelden kan men vaststellen dat dit type experiment niet ideaal was voor het nagaan van de migratie en differentiatie van de gedeelde neoblasten. Op de figuren kan men namelijk weinig zeggen over de specifieke celtypes waarin ze gedifferentieerd zijn en over exacte aantallen die gedifferentieerd zijn naar verschillende locaties. Dit komt omdat er teveel cellen werden aangekleurd omwille van de continue kleuring. Wat men echter wel uit de beelden van de verschillende cadmiumgroepen kan afleiden is dat het aantal migrerende/gedifferentieerde cellen zowel na 1 dag als na 3 dagen onder invloed van cadmium vermoedelijk toegenomen is. Tevens zijn er op bepaalde beelden in de z-stack cellen ter hoogte van de epidermis aanwezig, die waarschijnlijk epidermiscellen zijn. De groep die blootgesteld werd aan 5 μM cadmium gedurende 24 uur wordt hierbij wel buiten beschouwing gelaten omdat de kleuring hier niet zo sterk is.

Een nadeel van het experiment dat in deze studie werd uitgevoerd is dat de wormen continu gelabeld werden met BrdU. Dit heeft als gevolg dat er geen kwantitatieve analyse uitgevoerd kan worden op het aantal gemigreerde en gedifferentieerde cellen, omdat tijdens een continu BrdU-labeling alle neoblasten die zich gedurende deze periode gedeeld hebben, aangekleurd worden. Dit levert uiteindelijk beelden op waarop er te veel cellen gekleurd zijn en waarop de meeste cellen tegen mekaar aanliggen waardoor deze nog moeilijk te onderscheiden zijn van elkaar. Dit probleem kan opgelost worden door een *in vitro* experiment te starten waarbij de wormen op mechanische wijze afgebroken worden (maceratie-experiment) (27). Een manier om een kwantitatieve analyse van het aantal migrerende neoblasten te kunnen uitvoeren *in vivo*, is het uitvoeren van een dubbele kleuring. Hierbij kunnen de wormen op verschillende tijdstippen gedurende korte tijd blootgesteld worden aan 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU) en 5-chloro-2'-deoxyuridine (CIdU). Hierdoor worden de delende cellen tijdens deze korte periodes aangekleurd door middel van de verschillende thymidine-analogen. Dit geeft in de tijd echter wel een verdeling weer van hoe deze verschillende populaties (op basis van de kleuring/tijdstip) van delende cellen gemigreerd en gedifferentieerd zijn. Wanneer men deze kleuringen uitvoert op zowel controlestalen als op wormen die blootgesteld worden aan cadmium, kan men het effect van cadmium op de migratie en differentiatie van delende neoblasten in de tijd schetsen. Doordat elke thymidine analogoog met andere fluorescentie gelabeld wordt en doordat de wormen slechts gedurende korte periodes hieraan blootgesteld worden is een kwantitatieve analyse van het aantal gemigreerde neoblasten mogelijk.

REFERENTIELIJST

1. Brusca RC, Brusca GJ. Phylum Platyhelminthes. In: Invertebrates. Sunderland: Massachusetts; 2002. p. 285-318.
2. Nimeth KT et al. (2006) Regeneration in *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes): cellular dynamics in the neoblast stem cell system. *Cell Tissue Res* 327: 637-646
3. Ladurner P et al. (2005) A new model organism among the lower Bilateria and the use of digital microscopy in taxonomy of meiobenthic Platyhelminthes: *Macrostomum lignano*, n.sp. (Rhabditophora, Macrostomorpha). *JZS*. 43(2): 114-126
4. Rieger RM, Tyler S, Smith JPS, Rieger GE. Platyhelminthes: Turbellaria. In: Harrison FW, editor. *Microscopic anatomy of invertebrates: Volume 3 Platyhelminthes and nemertinea*. New York: Wiley-Liss; 1991. p. 7-140.
5. Sanchez Alvarado A (2000) Regeneration in the metazoans: Why does it happen? *Bioessays* 22:578-590
6. Egger B, Ladurner B, Nimeth K, Gschwentner R, Rieger R (2006) The regeneration capacity of the flatworm *Macrostomum lignano* – on repeated regeneration, rejuvenation, and the minimal size needed for regeneration. *Dev Gen Evol* 216: 565-577
7. Poss KD (2000) Roles for fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Dev Biol* 222: 347-358
8. Ramsay K et al. (2004) Damage, autotomy and arm regeneration in starfish caught by towed demersal fishing gears. *Mar Biol* 138: 527-536
9. Carlson MRJ, Bryant SV, Gardiner DM (1998) Expression of *Msx-2* during development, regeneration, and wound healing in axolotl limbs. *J Exp Zoo* 282: 715-723
10. Fausto N, Campbell JS (2003) The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev* 120(1): 117-130
11. Szabad J, Simpson P, Nothiger R (1979) Regeneration and compartments in *Drosophila*. *J Embryol. Exp Morphol* 49: 229-241
12. Shimizu H, Sawada Y, Sugiyama T (1993) Minimum tissue size required for *hydra* regeneration. *Dev Biol* 155(2): 287-296
13. Hoppe WF (1988) Growth, regeneration and predation in three species of large coral reef sponges. *Mar Ecol Prog Ser* 50: 117-125
14. Weisblat DA (2006) Germline regeneration: The worms' turn. *Cur Biol* 16(12): 454-456
15. Su X, Zhang DM, Heuer AH (2004). Tissue regeneration in the shell of the giant queen conch, *Strombus gigas*. *Chem Mater* 16(4): 581-593
16. Bely AE (2006) Distribution of segment regeneration ability in the Annelida. *Int Comp Biol* 46(4): 508-518
17. Sanchez Alvarado A (2004) Regeneration and the need of simpler model organisms. *Biol Sci* 359:759-763
18. Jondelius, URI, Baguna J, Riutort M (2002) The Nemertodermatida are basal bilaterians and not members of the Platyhelminthes. *Zool. Scr.* 31: 201-215
19. Newmark P, Sanchez Alvarado A (2002) Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat Rev Genet* 3: 210-219

19. Egger B, Gschwentner R, Rieger R (2006) Review - Free-living flatworms under the knife: past and present. *Dev Genes Evol* 217: 89-104
20. Ladurner P et al (2000) Spatial Distribution and Differentiation Potential of Stem Cells in Hatchlings and Adults in the Marine Platyhelminth *Macrostomum* sp.: A Bromodeoxyuridine Analysis. *Devel Biol* 226: 231-241
21. Nimeth et al. (2004) Stem cell dynamics during growth, feeding, and starvation in the basal flatworm *Macrostomum* sp. (Platyhelminthes). *Develop Dynam* 230: 91-99
22. Bode et al. (2006) Immunogold-labeled S-phase neoblasts, total neoblast number, their distribution, and evidence for arrested neoblasts in *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Rhabditophora). *Cell Tissue Res* 325: 577-587
23. Peter R (2002) A totipotent proliferative compartment: the unique stem cell strategy of flatworms. In Berger J (ed.): *Cells IV*. Kopp Publ., Ceské Budejovice 31-40
24. Peter R, Ladurner P, Rieger RM (2001) The role of stem cell strategies in coping with environmental stress and choosing between alternative reproductive modes: Turbellaria rely on a single cell type to maintain individual life and propagate species. *Marine Ecology* 22: 35-51
25. Sanchez Alvarado A (2006). Planarian regeneration: its end is its beginning. *Cell* 124: 241-245
26. Rieger R, Legniti A, Ladurner P, Reiter D, Asch E, Salvenmøster W, Schurmann W, Peter R (1999) Ultrastructure of neoblasts in Microturbellaria: significance for understanding stem cells in free living Platyhelminthes. *Invert Reprod Dev* 35: 127-140
27. Peter et al (2004) Review - The significance of stem cells in free-living flatworms: one common source for all cells in the adult. *J Appl Biomed* 2: 21-35
28. Saló E (2006) The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes). *BioEssays* 28: 546-559
29. Best JB, Morita M (1983) Toxic responses of planarians to various waterborne heavy metals. *Adv Environ Sci Tech* 13: 137-54.
30. ATSDR (1999). Toxicological profile for cadmium. Agency for Toxic substances and Disease Registry, Atlanta, GA. URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.html>
31. Nordberg GF, Nordberg M (1987) Different binding forms of cadmium. Implications for distribution and toxicity. *Uoeh. J.* 9:153-64
32. Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Review - Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* 30(11): 1287-1312
33. Hall F, Morita M, Best JB (1986) Neoplastic formation in the Planarian: I. Cocarcinogenesis histopathology. *J. Experiment. Zool.* 240(2): 211-227
34. Best JB, Morita M (1991) Toxicology of planarians. *Hydrobiologia* 227: 375-383
35. Schaeffer DJ (1993) Planarians as a model system for in vivo tumorigenesis studies. *Ecotoxicol. Environ Safety* 25: 1-18
36. Mitra R, Kar S, Aditya AL (2002) Impact of CdCl₂ on biochemical changes in Planaria, *Dugesia bengalensis*. *Ind. J. Exp. Bio.* 41: 921-923
37. Kalafatic M, Kopjar N, Besendorfer V (2004) The impairments of neoblast division in regenerating planarian *Polycelis felina* (Daly.) caused by in vitro treatment with cadmium sulfate. *Toxicol In Vitro* 18: 99-107
38. Kalafatić M, Kopjar N, Besendorfer V (2004) The influence of Mercuric Chloride on Neoblast Division in Regenerating Planarian *Polycelis Felina* (Daly.). *Earth & Environ Sc* 156: 195-210

39. Kalafatic M, Taboršak S (1998) Effects of chromium upon neoblast division in the regenerates of *Polycelis feline*. *Biologia*. 53(3), 321–325
40. Kopjar N, Kalafatic M, Besendorfer V (1997) Mitotic and chromosomal disturbances in the planarian *Polycelis felina* caused by manganese. *Biologia* 52(3), 469–474.

Auteursrechterlijke overeenkomst

Opdat de Universiteit Hasselt uw eindverhandeling wereldwijd kan reproduceren, vertalen en distribueren is uw akkoord voor deze overeenkomst noodzakelijk. Gelieve de tijd te nemen om deze overeenkomst door te nemen, de gevraagde informatie in te vullen (en de overeenkomst te ondertekenen en af te geven).

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Het effect van cadmiumtoxiciteit op stamcellen in M.lignano

Richting: **Master in de biomedische wetenschappen**

Jaar: **2007**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Ik ga akkoord,

Olivier Degheselle

Datum: **19.06.2007**