

# De toxiciteit van aspartaam



Leerlingen:  
School:  
Datum:  
Begeleidster:

Guido van de Stolpe & Rein Nijhof  
Gymnasium Beekvliet  
Dinsdag 25 september  
Carine Daemen



# Inhoudsopgave

Pagina	1	Titelpagina
Pagina	2	Inhoudsopgave
Pagina's	3 t/m 9	Inleiding
Pagina	10	Onderzoeksvraag en hypothese
Pagina's	11 t/m 17	Uitvoering
Pagina's	18 t/m 21	Waarnemingen en verwerking
Pagina	22 en 23	Conclusie
Pagina	24	Discussie
Pagina	25	Bronnenlijst
Pagina	26 en 27	Reflectie
Pagina	28	Dankwoord
Pagina	29 t/m 38	Logboek
Pagina	39 t/m 43	Bijlage gebruikte stoffen
Pagina	44 t/m 47	Bijlage cel tellingen

# Inleiding

## Oriëntatie en onderzoekbeschrijving

Een lange tijd geleden heeft Rein een krantenartikel gelezen over de voor- en nadelen van het gebruik van aspartaam. Hierdoor is hij een beetje gaan zoeken op het internet over de mogelijke gevaren van aspartaam. Hij is al langere tijd aan het kijken op verpakkingen van vele producten en ontdekte de grote hoeveelheid producten waarin dit, mogelijk gevaarlijke, stofje wordt gebruikt. Aspartaam zit vooral in light-producten omdat er minder suikers in zitten. Deze light-producten worden daarom door de meeste mensen beschouwd als gezond. Mensen worden namelijk door het eten van light-producten minder dik. Op het internet wordt echter veel gespeculeerd over mogelijke gevaarlijke bijwerkingen van aspartaam. Dus misschien is aspartaam wel helemaal niet gezond. Guido was al enige tijd geïnteresseerd in de werking van toxische stoffen op cellen. Op het internet bestaan honderden theorieën over de toxische werking van aspartaam en we willen graag onderzoeken of aspartaam een toxische werking heeft. We willen onderzoeken of aspartaam net zo onschuldig is als de voedselorganisaties beweren.

## Aspartaam

Aspartaam is een zoetstof die veel wordt gebruikt in light-producten, maar ook gewone, vaak goedkopere, producten bevatten vaak aspartaam. Een aantal voorbeelden van producten met aspartaam staan op de titelpagina[1]. Deze stof is zeer zoet; ongeveer 150-200 keer zoeter dan suiker [2]. Aspartaam kan hierdoor dus in een zeer kleine hoeveelheden gebruikt worden in producten. Aspartaam bevat per gram ongeveer evenveel calorieën als suiker maar omdat er veel minder toegevoegd hoeft te worden om een even zoet product te maken (200 keer minder) bevat het uiteindelijke voedingsmiddel relatief maar heel weinig calorieën. Aspartaam wordt ook veel gebruikt omdat het goedkoper is dan suiker (veel goedkope merken zoals Euroshopper zoeten hun frisdranken standaard met aspartaam en niet met suiker) [3].

Er wordt echter veel gespeculeerd over negatieve effecten van het consumeren van deze zoetstof; zo zou het hersenbeschadiging, hoofdpijn en depressies kunnen veroorzaken [4]. De EFSA (European Food Safety Authority, Europese Autoriteit voor voedselveiligheid) is een agentschap van de Europese Unie. De EU heeft de EFSA een onderzoek naar aspartaam laten verrichten. Uit dit onderzoek bleek dat aspartaam een veilige stof is, aspartaam is toen een officieel goedgekeurd additief met een MAC-waarde van 50 mg/kg lichaamsgewicht [1]. In 2020 worden alle additieven (E nummers) opnieuw onderzocht, maar omdat er zo veel media ophef is ontstaan over aspartaam werd dit onderzoek vooruit geschoven naar 2012. Inmiddels is het onderzoek toch uitgesteld tot mei 2013, een tegenvaller voor ons onderzoek, want dit hadden we graag nog in het verslag willen verwerken [5].

De ophef over de gevaren van aspartaam is o.a. ontstaan na een onderzoek van het Italiaanse Ramazzini Instituut dat aspartaam op ratten testte. Uit het onderzoek bleek dat mannelijke ratten aanzienlijk meer tumoren kregen nadat zij aspartaam in hun voer hadden gekregen. Een ander onderzoek wat voor ophef zorgde was een Deense epidemiologische studie. Hieruit bleek dat vrouwen die dagelijks één glas kunstmatig gezoete frisdrank dronken een grotere kans hadden op een vroegtijdige bevalling [6].

Om de gevaarlijke werking van aspartaam te onderzoeken moeten we eerst weten wat de toxische elementen zijn. Aspartaam wordt in de darmen afgebroken in drie stoffen:

- \* Asparaginezuur
- \* Fenylalanine
- \* Methanol

Asparaginezuur:

Asparagine zuur is een niet-essentieel aminozuur, dit is een precursor van de neurotransmitter aspartaat. Aspartaat stimuleert de NMDA receptoren, deze vangen neurotransmitters op en geven zo de impuls vanuit de voorliggende neuron voor. Deze stof zou samen met fenylalanine het overdrachtsysteem van neuronen in de war kunnen brengen [7].

Fenylalanine:

Fenylalanine is een essentieel aminozuur, wat betekent dat het alleen maar opgenomen kan worden uit het voedsel en niet aangemaakt kan worden door het lichaam. Fenylalanine verhoogt de concentratie van de neurotransmitter norepinephrine (INN) beter bekend als noradrenaline. Door een overvloed van deze neurotransmitter zou het proces bij de synaps van een neuron kunnen veranderen. Als de receptor door de neurotransmitter geactiveerd wordt kan dat invloed hebben op de actiepotentiaal van een neuron. Hierdoor zou het systeem ontregeld worden en zouden er steeds vaker problemen kunnen ontstaan bij het doorgeven van informatie [8].

Methanol:

Methanol is zelf waarschijnlijk niet gevaarlijk voor de cellen maar zijn afbraakproducten wel. Methanol wordt na 20 uur omgezet in formaldehyde en daarna meteen weer omgezet tot mierenzuur in de lever. Het enzym dat hiervoor verantwoordelijk is, is alcohol dehydrogenase. Dit enzym zet eigenlijk liever ethanol in azijnzuur om dan methanol om in mierenzuur (Affiniteit is 20 keer groter). Als er echter geen ethanol aanwezig is gaat het enzym methanol omzetten in mierenzuur. Mensen met een methanol vergiftiging krijgen daarom ook vaak ethanol toegedient om ervoor te zorgen dat er geen methanol wordt omgezet tot mierenzuur. Mierenzuur staat bekend als een giftige en zeer corrosieve stof en wij denken dat dit grote schade kan toebrengen aan cellen. Men zegt dat de hoeveelheden methanol die door aspartaam in het lichaam komen heel klein zijn in vergelijking met andere bronnen van methanol. Het is echter zo dat aspartaam de enige bron is die alléén methanol voort brengt. Elke andere bron van methanol brengt ook ethanol voort (bijv. Alcoholische dranken, vruchtensappen, enz.). Wij gaan er bij ons onderzoek van uit dat de proefpersoon een ethanol vrij dieet volgt en dat dus alle methanol wordt omgezet in mierenzuur [9].

## Het onderzoek

Wij willen dus gaan onderzoeken of aspartaam gevaarlijk is. Dit onderzoek gaan wij verrichten in een celkweek laboratorium. Dit laboratorium is een onderdeel van Philips Research en bevindt zich op de High Tech Campus in Eindhoven. Hier worden wij geholpen door Research Fellow Anja van de Stolpe. Zij kan ons begeleiden met het werk in het laboratorium en weet welke mogelijkheden er zijn voor ons onderzoek. Wij hebben te horen

gekregen dat wij de neurotoxische werking van aspartaam niet kunnen testen. Dit komt omdat de benodigdheden hiervoor niet te krijgen waren. Omdat fenylalanine en asparaginezuur alleen interessante stoffen zijn om op neuronen te testen focussen we ons op methanol. Voor dit onderzoek hebben we beschikking over verschillende cellijnen (menselijke doorgekweekte levende cellen). We gaan dus de invloed van methanol testen op het functioneren van deze cellen. Welke cellen we gebruiken en waarom wordt later uitgelegd.

## Concentraties methanol en mierenzuur

*Berekening hoeveelheid Aspartaam per blikje*

Hier geven wij een uitleg over hoe wij de concentraties methanol bepalen die wij gaan gebruiken bij de testen op de cellen. Hierbij gaan we even uit van blikjes Coca Cola Light/Zero:

Op de officiële Coca Cola site [10] staan de volgende massa's Aspartaam:

- Coca Cola Zero

Aanvullende informatie per 100 ml	
Kalium	1 mg
Cafeïne	9,6 mg
Acesulfaam-K	4,4 mg
Aspartaam	39 mg

- Coca Cola Light

Aanvullende informatie per 100 ml	
Kalium	3,2 mg
Cafeïne	12,8 mg
Acesulfaam-K	16 mg
Aspartaam	24 mg

Wij gaan uit van het de hoogste concentratie Aspartaam en kiezen dus voor Coca Cola Zero deze bevat per blikje (0,33L)  $128,7 \times 10^{-3}$  gram Aspartaam

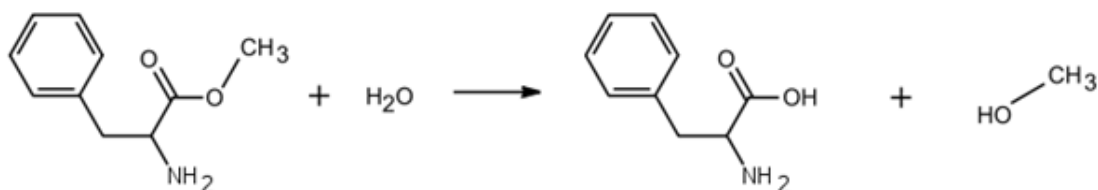
De molecuul formule van Aspartaam is  $C_{14}H_{18}N_2O_5$ .

De molaire massa is dan  $(14 \cdot 12,01 + 18 \cdot 1,008 + 2 \cdot 14,01 + 5 \cdot 16,00) = 294,304 \text{ g mol}^{-1}$  [11]

<b>Gram</b>	294,304	$128,7 \times 10^{-3}$
<b>Mol</b>	1	?

Dus  $128,7 \times 10^{-3} / 294,304 = 4,373 \times 10^{-4}$  mol Aspartaam in een blikje coca cola zero (0,33L).

*Berekening concentratie methanol in het bloed bij variërend aantal blikjes Coca Cola Zero*



Structuurformule van de afsplitsing van een methanol aan aspartaam (waar de asparaginezuur groep al is afgesplitst).

De afsplitsing van methanol is een vorm van hydrolyse, er is namelijk een splitsing van een chemische binding onder opname van water. Bij de afbraak van Aspartaam is de molverhouding Aspartaam : methanol gelijk aan 1:1

Dus als er  $4,373 \times 10^{-4}$  mol Aspartaam in ons lichaam komt er na afbraak ook  $4,373 \times 10^{-4}$  mol methanol in ons lichaam voor.

De  $T_{1/2}$  voor methanol (dit is de tijd waarvoor de helft van alle methanol is opgenomen door het lichaam) is 5 min. En de  $T_{max}$  (dit is de maximale tijd waarvoor alle methanol in het lichaam is opgenomen) is 30-60 min. Net als het bekendere alcohol (ethanol) wordt methanol wordt dus vrijwel meteen volledig opgenomen en verspreid door het hele lichaam. [12]

Het verdelingsvolume (Vd) van methanol bij orale inname is 0,6-0,8l/kg bij methanol, dit betekent dat alle methanol wordt verdeelt over 0,6 tot 0,8 liter bij elke kilo lichaamsgewicht. Hoe groter dus je lichaamsgewicht hoe groter het volume waarin methanol wordt opgelost, en hoe kleiner de concentratie dus zal zijn. [12]

Voor ons onderzoek nemen we een aantal verschillende gemiddelde lichaamsgewichten die corresponderen met verschillende consumenten van frisdranken die Aspartaam bevatten.

Voorbeeld berekeningen:

6 jaar gemiddeld gewicht van 21 kg het methanol verdeelt zich over 0,6 tot 0,8 liter.

$21 \times 0,6 = 12,6$  L

$21 \times 0,8 = 16,8$  L

Het verdelingsvolume is dus 12,6-16,8 L

- Kinderen: [13]

<b>Leeftijd:</b>	<b>Geslacht:</b>	<b>Gemiddeld gewicht (kg):</b>	<b>Verdelingsvolume (L):</b>
<b>6 jaar</b>	m/v	21	12,6-16,8
<b>10 jaar</b>	m/v	32	19,2-25,6

- Pubers en volwassenen: [13]

<b>Leeftijd:</b>	<b>Geslacht:</b>	<b>Gemiddeld gewicht (kg):</b>	<b>Verdelingsvolume (L):</b>
<b>16 jaar</b>	v	53	31,8-42,4

<b>20 jaar</b>	v	59	35,4-47,2
<b>16 jaar</b>	m	61	36,6-48,8
<b>20 jaar</b>	m	73	43,8-58,4

We gaan in ons onderzoek uit van de hoogst mogelijke concentratie Aspartaam, en daarom gebruiken we het kleinst mogelijke volume waarin de methanol opgelost wordt.

Nu berekenen we wat de concentratie methanol is bij verschillende consumenten die verschillende hoeveelheden frisdrank hebben gedronken.

Concentraties methanol:

Voorbeeld berekeningen:

6 jarig kind heeft een verdelingsvolume van 12,6-16,8 L (we werken met 12,6 L) in één blikje cola zit  $4,373 \times 10^{-4}$  mol methanol.

De molariteit is  $\frac{\text{het aantal mol}}{\text{het aantal liters}}$  dus in dit geval  $\frac{4,373 \times 10^{-4}}{12,6} = 3,4 \times 10^{-5}$

<b>Geslacht &amp; Leeftijd:</b>	<b>M/V (6)</b>	<b>M/V (10)</b>	<b>V (16)</b>	<b>V (20)</b>	<b>M (16)</b>	<b>M (20)</b>
<b>Verdelingsvolume (L):</b>	<b>12,6</b>	<b>19,2</b>	<b>31,8</b>	<b>35,4</b>	<b>36,6</b>	<b>43,8</b>
<b>Concentratie na 1 blikje (0,33L): (M)</b>	$3,47 \times 10^{-5}$	$2,28 \times 10^{-5}$	$1,38 \times 10^{-5}$	$1,24 \times 10^{-5}$	$1,19 \times 10^{-5}$	$9,98 \times 10^{-6}$
<b>Concentratie na 2 blikjes (0,33L): (M)</b>	$6,94 \times 10^{-5}$	$4,56 \times 10^{-5}$	$2,75 \times 10^{-5}$	$2,47 \times 10^{-5}$	$2,39 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-5}$
<b>Concentratie na 3 blikjes (0,33L): (M)</b>	$1,04 \times 10^{-4}$	$6,83 \times 10^{-5}$	$4,13 \times 10^{-5}$	$3,71 \times 10^{-5}$	$3,58 \times 10^{-5}$	$3,00 \times 10^{-5}$
<b>Concentratie na 5 blikjes (0,33L): (M)</b>	$1,74 \times 10^{-4}$	$1,14 \times 10^{-4}$	$6,88 \times 10^{-5}$	$6,18 \times 10^{-5}$	$5,97 \times 10^{-5}$	$4,99 \times 10^{-5}$
<b>Concentratie na 10 blikjes (0,33L): (M)</b>	$3,47 \times 10^{-4}$	$2,28 \times 10^{-4}$	$1,38 \times 10^{-4}$	$1,24 \times 10^{-4}$	$1,19 \times 10^{-4}$	$9,98 \times 10^{-5}$
<b>Concentratie na 15 blikjes (0,33L): (M)</b>	$5,21 \times 10^{-4}$	$3,42 \times 10^{-4}$	$2,06 \times 10^{-4}$	$1,85 \times 10^{-4}$	$1,79 \times 10^{-4}$	$1,50 \times 10^{-4}$
<b>Concentratie na 20 blikjes (0,33L): (M)</b>	$6,94 \times 10^{-4}$	$4,56 \times 10^{-4}$	$2,75 \times 10^{-4}$	$2,47 \times 10^{-4}$	$2,39 \times 10^{-4}$	$2,00 \times 10^{-4}$
<b>Concentratie na 30 blikjes (0,33L): (M)</b>	$1,04 \times 10^{-3}$	$6,83 \times 10^{-4}$	$4,13 \times 10^{-4}$	$3,71 \times 10^{-4}$	$3,58 \times 10^{-4}$	$3,00 \times 10^{-4}$
<b>Concentratie na 50 blikjes (0,33L): (M)</b>	$1,74 \times 10^{-3}$	$1,14 \times 10^{-3}$	$6,88 \times 10^{-4}$	$6,18 \times 10^{-4}$	$5,97 \times 10^{-4}$	$4,99 \times 10^{-4}$

(M)						
-----	--	--	--	--	--	--

### *Toe te voegen concentraties methanol*

Deze concentraties zijn overal in het lichaam gelijk, dus zijn ook gelijk aan de concentratie in het bloed. En deze concentraties komen in aanraking met de endotheel cellen. Wij laten de endotheel cellen dus in aanraking komen met de volgende concentraties (die we aan de hand van de tabel gekozen hebben):

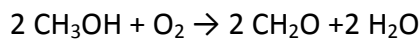
1. 0 M
2.  $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
3.  $5,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
4.  $1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
5.  $5,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
6.  $1,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
7.  $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

We voegen 0M toe als negatieve controle, we voegen dan dus alleen de stof toe waarin methanol is opgelost.

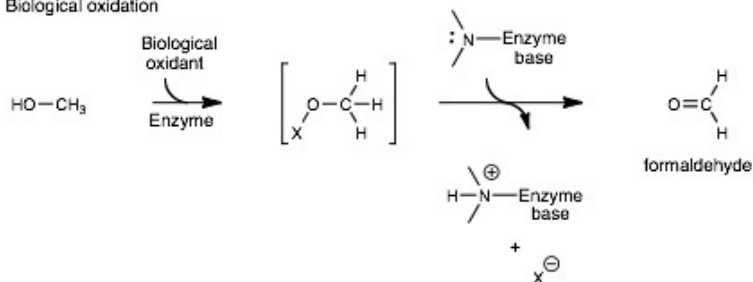
### *Toe te voegen concentraties mierenzuur*

90% van de methanol wordt omgezet in mierenzuur na 20 uur. Wij gebruiken bij het toevoegen van mierenzuur dezelfde concentraties en verwaarlozen de 10 procent methanol die niet wordt omgezet en via de nieren het lichaam verlaat. De reactie van methanol naar mierenzuur verloopt als volgt:

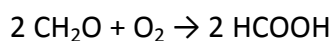
Mierenzuur wordt omgezet naar formaldehyde, deze reactie is een oxidatie reactie en verloopt onder invloed van het enzym alcohol dehydrogenase.



Biological oxidation



Formaldehyde wordt omgezet naar mierenzuur, deze reactie is oxidatie reactie en verloopt onder invloed van het enzym formaldehyde dehydrogenase.





### *Te gebruiken cellen*

We gebruiken de volgende cellen:

- Darmwand cellen, hierbij voegen we methanol toe, omdat de methanol daar nog niet is omgezet in mierenzuur (dit gebeurt pas in de lever).
- Epitheel cellen, hierbij voegen we mierenzuur toe, omdat epitheel cellen een aantal organen bekleden. Als het goed is komt mierenzuur hiermee in aanraking omdat het een klein molecuul is en gemakkelijk door het lichaam diffundeert.
- Endotheel cellen, hierbij voegen we mierenzuur toe, omdat endotheel cellen vooral te vinden zijn in bloedvaten en daar komt het mierenzuur na de lever mee in aanraking.

## Onderzoeksvraag

Vanaf hoeveel blikjes coca cola zero wordt aspartaam gevaarlijk voor de mens?

- Bij welke concentratie aspartaam in het lichaam sterven er darmwand cellen af door toedoen van methanol (afkomstig van aspartaam)?
- Bij welke concentratie aspartaam in het lichaam sterven er epitheel en endotheel cellen af door toedoen van mierenzuur (afkomstig van methanol, afkomstig van aspartaam)

## Hypothese

Wij veronderstellen dat de concentratie aspartaam gevaarlijk wordt bij pas een onrealistisch hoog aantal blikjes Coca Cola Zero. Wij veronderstellen dus dat de concentratie aspartaam bij normaal gebruik niet gevaarlijk is. Een onrealistisch hoge concentratie is wel gevaarlijk. Wij veronderstellen dat dit komt door het mierenzuur. Methanol is op zichzelf namelijk niet zo gevaarlijk en we denken dat de darmwand cellen het grotendeels zullen overleven. Het mierenzuur wat een metaboliet is van methanol achten wij wel gevaarlijk. Mierenzuur staat namelijk bekend als een zeer corrosieve giftige stof. Wij veronderstellen dat mierenzuur grote schade kan aanbrengen op de epitheel en endotheel cellen bij relatief kleine concentraties. Wij gaan hier van uit van een persoon met een alcoholvrij dieet. Dit is nodig voor de omzetting van methanol naar mierenzuur (meer hierover zie inleiding). Wij veronderstellen

# Uitvoering

## Algemene uitleg

Er zijn 2 basale handelingen die je goed onder de knie moet krijgen voor ons labwerk. Dat is het cellen doorzetten en het cellen tellen.

De cellen krijgen we altijd aangeleverd in een zogenaamde kweekfles en moeten we dan in een wellplaat zetten om daaraan uiteindelijk de verschillende concentraties toe te voegen. We willen dat in elke well hetzelfde aantal cellen zit, daarom tellen we de cellen van tevoren en voegen aan elke well dezelfde hoeveelheid oplossing met cellen toe. We willen natuurlijk weten wat er met de cellen gebeurt na toevoeging van onze verschillende concentraties. En daarom gaan we de cellen naderhand weer tellen.

Omdat de handelingen cellen doorzetten en cellen tellen echt twee afzonderlijke delen zijn hebben wij twee protocollen gemaakt. In deze protocollen hebben wij duidelijk beschreven hoe en waarom wij alle handelingen uitvoeren. Omdat veel handelingen en zaken voor veel mensen misschien niet duidelijk zijn hebben wij voor beide protocollen een kleine inleiding geven zodat alles goed te volgen is.

## Protocol cellen doorzetten

### Inleiding

De cellen krijgen we allemaal aangeleverd in een kweekfles (zie figuur 1) dit is een fles met een behandelde bodem waar cellen aan kunnen hechten. De dop van de kweekfles is zo gemaakt dat deze alleen steriele lucht naar binnen laat en ook weer naar buiten laat. Dit is essentieel voor de cellen, deze hebben namelijk zuurstof nodig maar mogen niet besmet raken met onsteriele lucht. De cellen hechten dus aan de speciaal behandelde plastic bodem van de fles. In de kweekfles zit een bepaalde hoeveelheid medium (zie figuur 2). Dit medium is een vloeistof die samengesteld is uit voedingsstoffen voor de cellen en een PH-indicator. Wanneer de PH te hoog wordt de kleurt het medium geel door de indicator, deze PH verhoging betekent dat de cellen de hele kweekfles hebben gevuld. Dit komt omdat er energie nodig is om de cellen te laten delen en bij de verbranding van glucose, wat nodig is om aan energie te komen, komen zuren (dus metaboliëten van glucose) vrij. Op dat moment zijn de cellen confluent (dit betekent dat de gehele bodem gevuld is met cellen). De cellen moeten dan gesplitst worden, en overgezet in twee of meerdere kweekflessen omdat er niet genoeg ruimte en voedingsstoffen meer zijn in de eigen kweekfles. Dit proces noemt men "doorzetten". Als men een experiment met de cellen wil gaan doen worden de cellen ook doorgezet in een zogenaamde wellplaat (zie figuur 7). In de wellplaat zitten bijvoorbeeld 12 wells naast elkaar en kunnen makkelijke stoffen worden toegevoegd aan verschillende Wells met identieke hoeveelheid cellen zodat die goed met elkaar vergeleken kunnen worden en makkelijk te zien zijn onder de microscoop. Bij het doorzetten wordt eerst het medium afgezogen. De cellen blijven uiteraard zitten aan de wand. Vervolgens wordt alles gespoeld met een buffer (PBS) om het medium volledig te verwijderen. Hierna wordt trypsine (in oplossing) (zie figuur 3) toegevoegd, dit enzym zorgt ervoor dat alle cellen los komen van de bodem van de kweekfles (dit is heel duidelijk te zien in figuur 4. Je ziet de cellen naar beneden glijden.). Vervolgens wordt er weer medium toegevoegd en wordt de trypsine onwerkzaam. Hierdoor gaan de cellen zich weer hechten aan de bodem. Dit duurt echter wel een uur of zes (afhankelijk van celtype) en er is dus meer dan genoeg tijd om de cellen over te zetten in de nieuwe kweekflessen. De cellen en het medium worden dan samen opgepipeteerd en in de nieuwe kweekfles(sen) of in de welletjes van de wellplaat gedaan.

### Uitvoering

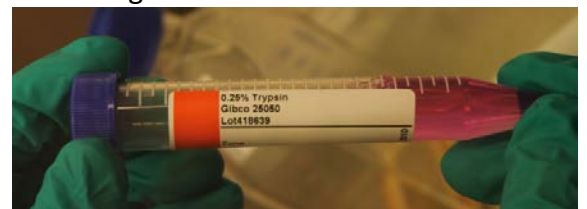
Benodigheden:



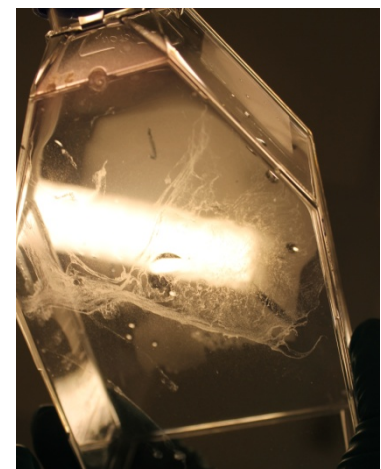
Figuur 1 - Kweekfles



Figuur 1 - Medium



Figuur 3 - Trypsine



Figuur 4 - Losgekomen cellen

- Door te zetten cellen in kweekfles
- Steriele kast (zie figuur 5)
- Schone kweekflessen (model T75 zie afbeelding)
- Een voorraad medium op temperatuur van de stoof (zie figuur 6) waarin de cellen staan ( $\pm 37^{\circ}\text{C}$ )
- Een voorraad buffer op temperatuur van de stoof waarin de cellen staan ( $\pm 37^{\circ}\text{C}$ )
- Een voorraad trypsine op temperatuur van de stoof waarin de cellen staan ( $\pm 37^{\circ}\text{C}$ )
- Elektrisch pipet
- Beschermende kleding (handschoenen, labjas)

**!!Je zorgt dat je bij het betreden van het lab altijd beschermende kleding draagt. !!  
(voor je eigen bescherming, handschoenen hoeven niet steriel te blijven)**

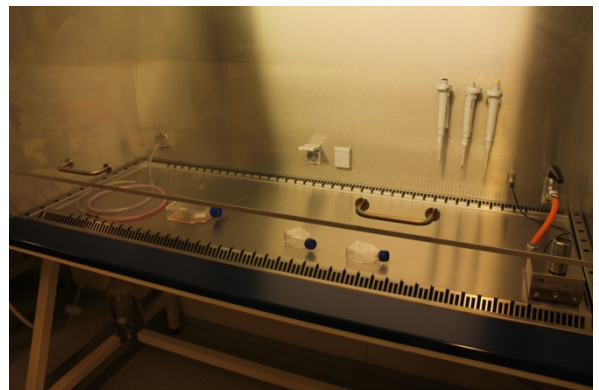
Dit protocol wordt uitgevoerd op het moment dat de cellen confluent zijn en het medium dus geel is gekleurd.

Werkwijze:

- Zet de steriele kast aan zodat hij gebruiksklaar is en zet de nieuwe kweekflessen, medium, buffer, trypsine, pipet en de door te zetten kweekfles ook hierin zodat je niks meer hoeft te pakken.
- Zuig het medium af (de zuiger staat

standaard in de steriele kast), zorg hierbij dat je de laag met cellen niet raakt.

- Spoel de kweekfles met de door te zetten cellen om met de buffer (zorg dat je het hele oppervlak van de cellen hiermee in aanraking laat komen). Zuig deze vervolgens weer af en herhaal deze procedure nog één keer.
- Voeg 1ml trypsine oplossing toe en laat dit een bepaalde tijd staan (steeds voor alle kweekflessen dezelfde tijd  $\pm 4$  minuten). Tik een beetje tegen de achterkant van de kweekfles zodat je kan zien of de cellen goed loskomen.
- Voeg een bepaalde hoeveelheid medium (afhankelijk van het aantal flessen waarin doorgezet moet worden) toe aan de door te zetten cellen in de kweekfles. Pipetteer een beetje van het mengsel van cellen en medium op en spuit het weer terug. Doe dit een aantal keer om alle cellen goed mee te krijgen bij het doorzetten en om eventuele samengeklonterde cellen uit elkaar te krijgen.
- (wanneer je doorzet in een kweekfles) Pipetteer een hoeveelheid door te zetten cellen (afhankelijk van de grote van de kweekfles) en het medium en zet deze over in de nieuwe kweekfles. Je zet meestal door in een bepaalde verdunning, 1:3 of 1:5 bijvoorbeeld.
- (wanneer je doorzet in een nieuwe wellplaat) Tel het aantal cellen en bereken hoeveel mL er in een welletje moet komen. In een welletje van een 12-wellplaat



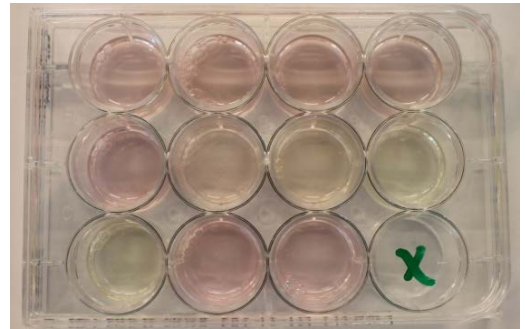
Figuur 5 - Steriele kast



Figuur 6 - Stoof

moeten 100.000 cellen komen en in welletje van een 24-wellplaat moeten 50.000 cellen komen. Pipeteer de berekende hoeveelheid cellen in de welletjes.

- Zet de cellen weer terug in de stoof. Zet de kweekfles plat neer zodat de cellen zich op de bodem van de kweekfles kunnen gaan hechten.



Figuur 7 - 12-wellplaat

## Protocol cellen tellen

### Inleiding

Wij tellen de cellen met een microscoop. Dit doen we opdat we de concentratie van zowel levende als dode cellen in een oplossing te weten komen. Het is natuurlijk onmogelijk om elke cel apart te tellen. Daarom bekijken we steeds slechts een klein deel van het totaal onder de microscoop. Omdat we niet alle cellen tellen maar een deel, gebruiken wij een formule om het totale aantal cellen te berekenen (hierover later meer). Om de dode cellen goed te kunnen



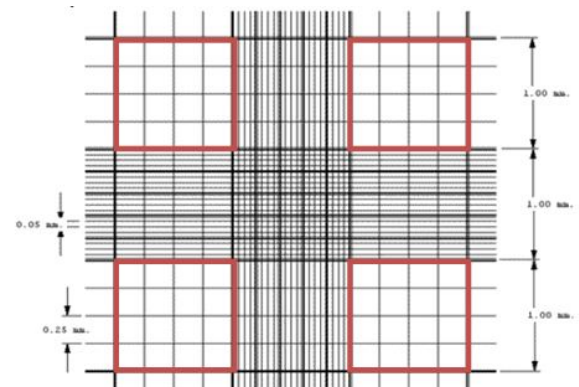
Figuur 2 Telplaatje

zien voegen wij nog de kleurstof trypaan blauw (zie figuur 1) toe, deze kleurstof kleurt alle dode cellen blauw. Het telplaatje (zie figuur 2) waar de cellen op komen te liggen heeft twee bepaalde rasters (zie figuur 3). Één raster



Figuur 1 - Trypaan blauw

bevat 9 grote hokken van ieder 16 kleine hokjes. Tussen deze kleine hokjes zit nog een kleine tussenruimte (niet zichtbaar op figuur 3 wel op figuur 4). We tellen de cellen uit de vier grote rood omstreepte hokken (zie figuur 3) van de telplaat (64 kleine hokjes). Er liggen natuurlijk ook cellen op



Figuur 3 -Één raster op het Telplaatje

de rand van de kleine hokjes en alleen de cellen die links en boven op de rand liggen tellen we. De cellen op de onderste rand en de rechter rand dus niet. In figuur 4 is dit duidelijk te zien, de rode cellen worden steeds geteld en de zwarte dus niet.

Met de volgende formule kan je dan het aantal cellen per ml bepalen:

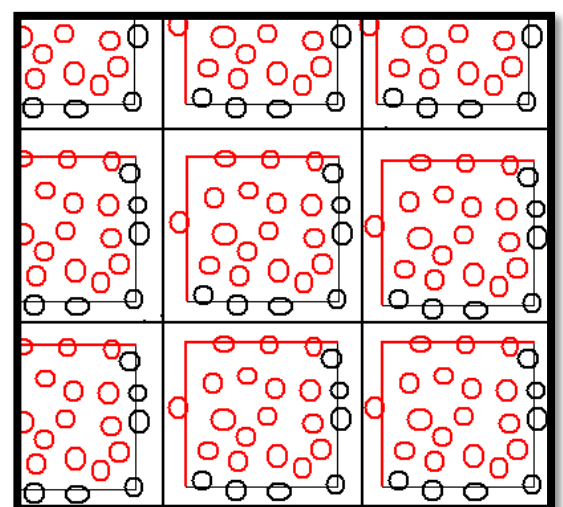
$$\frac{(\# \text{ cells} * 1000 * \text{dilution factor})}{(0,2 * 0,2 * 0,1) \text{ mm}^3 * 64 \text{ big blocks}}$$

Dit is dezelfde formule maar dan anders geschreven

$$= \# \text{ cells} * 3906,25 * \text{dilution factor} = \text{cellen/mL}$$

$$\frac{\begin{matrix} 1 & 2 & 3 \\ | & | & | \\ (\# \text{ cells} * 1000 * \text{dilution factor}) \end{matrix}}{\begin{matrix} | & | \\ (0,2 * 0,2 * 0,1) \text{ mm}^3 * 64 \text{ big blocks} \end{matrix}} = \begin{matrix} 4 & 5 \end{matrix}$$

1. Aantal getelde cellen.
2. Je vermenigvuldigt met 1000 om het aantal cellen



Figuur 4 - Kleine hokken

- per ml te krijgen en niet per  $\text{mm}^3$ .
3. De dilution factor is de verdunning van kleurstof en oplossing (bijvoorbeeld 1 deel kleurstof 1 deel oplossing de factor is dan 2).
  4. Dit is het volume van een klein hokje.
  5. Dit is het aantal kleine hokjes.

## Uitvoering

### Benodigdheden

- Te tellen cellen in kweekfles
- Steriele kast
- Een voorraad buffer op temperatuur van de stoof waarin de cellen staan ( $\pm 37^\circ\text{C}$ )
- Een voorraad tripsine op temperatuur van de stoof waarin de cellen staan ( $\pm 37^\circ\text{C}$ )
- Elektrisch pipet
- Microliterpipet
- Beschermende kleding (handschoenen, labjas)
- Trypaan blauw
- Epjes (soort hele kleine reageerbuis)
- Afsluitbare buizen
- Telplaatje
- Microscoop
- Teller
- Rekenmachine
- Pen en papier

**!! Je zorgt dat je bij het betreden van het lab altijd beschermende kleding draagt. !!  
(voor je eigen bescherming, handschoenen hoeven niet steriel te blijven)**

- Zuig het medium af (zuiger zit standaard in de steriele kast) zorg hierbij dat je de laag met cellen niet raakt.
- Spoel de kweekfles met de door te zetten cellen om met een paar ml buffer (zorg dat je het hele oppervlak van de bodem (de cellen) in aanraking laat komen). Zuig deze vervolgens weer af. Herhaal deze procedure nog één keer.
- Voeg 1 ml trypsine oplossing toe en laat dit een bepaalde tijd staan (steeds voor alle kweekflessen dezelfde tijd  $\pm 4$  minuten). Tik een beetje tegen de achterkant van de kweekfles aan zodat je kan zien dat of de cellen goed loskomen.
- Voeg bij de kweekfles 1 mL medium.
- Pipetteer een beetje op en spuit het weer terug. Doe dit een aantal keer om alle cellen goed mee te krijgen bij het doorzetten en dat eventueel grote klopjes cellen nog uiteenvallen.
- Pipetteer deze oplossing in een buisje.
- Pipetteer vervolgens 100 microliter hieruit in een epje.
- Voeg hierbij 100 microliter blauwe kleurstof. Kwispel het epje zodat de cellen goed verdeeld zijn en niet op de bodem gaan zitten. Noteer de dilution factor (in dit geval 2 want de verhouding is 1:1).
- Pipetteer 11 microliter op het bovenste telraster onder het glaasje doe dit vervolgens ook bij het onderste telraster.



- Zet het telplaatje onder de microscoop. Tel de cellen in de vier buitenste hokken (zie figuur 2) van het telplaatje m.b.v. een teller. Tel ook de cellen die links en boven op de rand van de kleine hokjes liggen (we tellen de cellen op de onder rand en de rechter rand dus niet, zie figuur 3).
- Vul de formule in en reken dan de concentratie cellen uit. Noteer deze.
- Herhaal de vorige 5 stappen nog een keer om betrouwbare resultaten te krijgen. Bij het herhalen kan je steeds uit je epje nieuwe cellen pipetteren om vervolgens opnieuw te gaan tellen. Zorg er wel voor dat je het epje kwispelt zodat de cellen goed verdeeld zijn en niet op de bodem gaan zitten.

Je kan natuurlijk op precies dezelfde manier cellen gaan tellen vanuit een wellplaat. Hierbij moet je echter wel noteren hoeveel vloeistof (medium en trypsine) je hebt toegevoegd. Neem het liefst bij alle wellatjes dezelfde hoeveelheid vloeistof. Want als je immers meer vloeistof toevoegd is de concentratie cellen lager.

#### Schoonmaken telplaatje

- Schroef het dekglasje van het telplaatje.
- Bevochtig een doekje met een propan-2-ol oplossing.
- Veeg hiermee de cellen en kleurstof van zowel het dekglasje en het telkamer zelf.
- Bevestig het dekglasje weer op het telplaatje.

## Waarnemingen en verwerking

We hebben ervoor gekozen alleen de grafieken bij de waarnemingen en verwerking te zetten. De grafieken komen namelijk voort uit de gevonden waardes en die zouden dan alleen maar overbodig zijn (de waardes zijn wel te vinden in de bijlage).

Een duidelijk overzicht van de week:

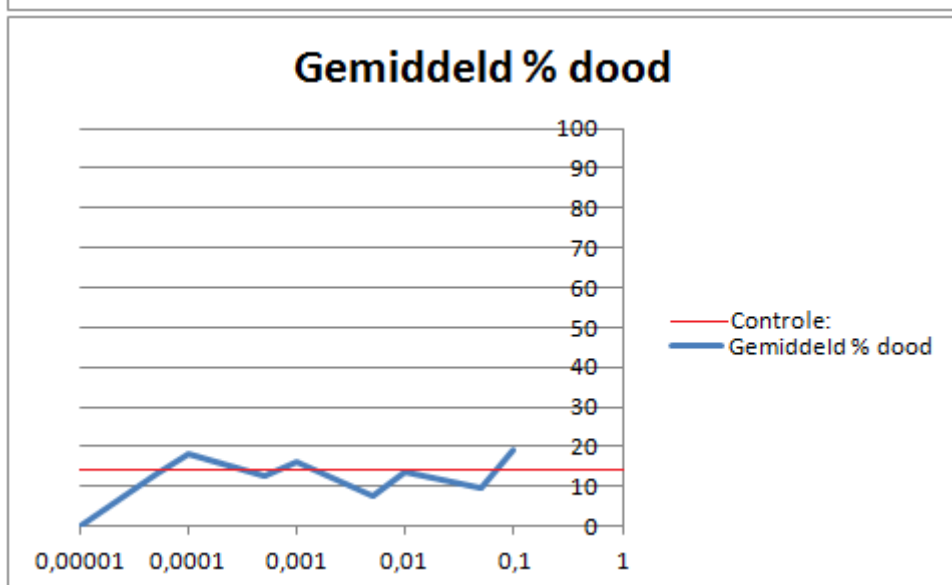
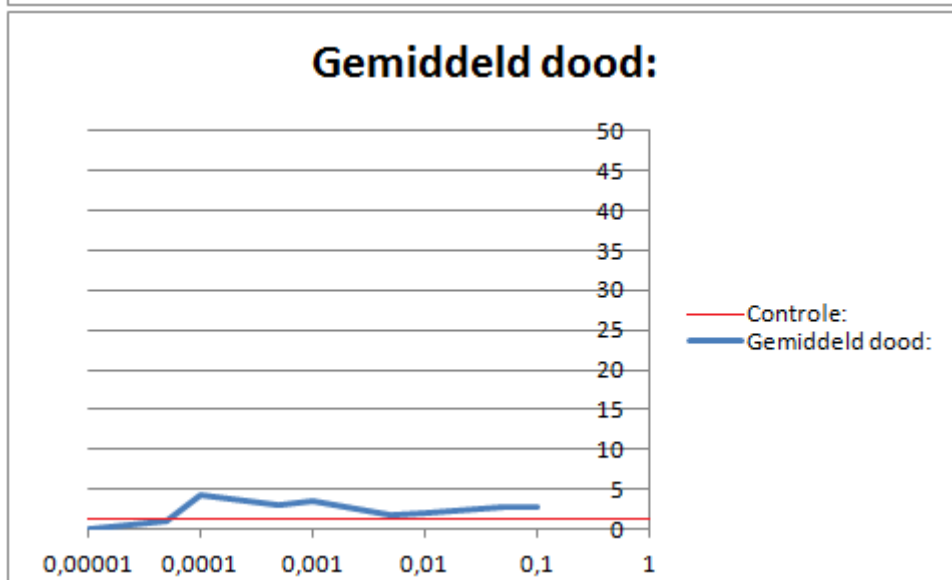
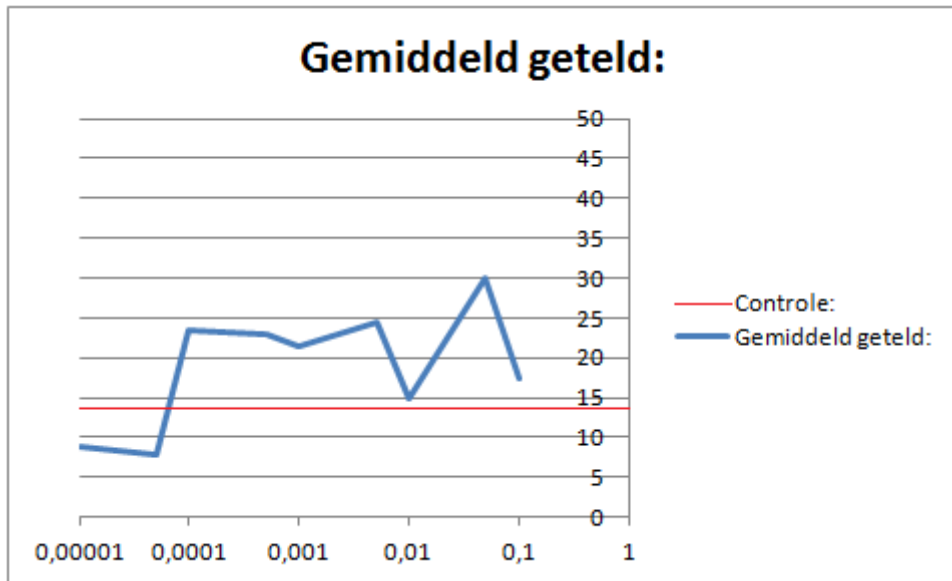
	Endotheel ECFC	Darmwand CaCo-2	Epitheel SKBR-3
<b>3 december</b>	Doorgezet in kleine kweekfles	Doorgezet in 12-wellplaat	-
<b>4 december</b>	-	De 12-wellplaat voorzien van de methanolconcentraties	Doorgezet in twee 12-wellplaten
<b>5 december</b>	Doorgezet in 24-wellplaat	Medium met concentraties methanol ververst	De twee 12-wellplaten voorzien van mierenzuur concentraties
<b>6 december</b>	De 24-well plaat voorzien van mierenzuur concentraties	Cellen geteld	Medium met concentraties mierenzuur ververst
<b>7 december</b>	Cellen geteld	-	Cellen geteld

### De Grafieken

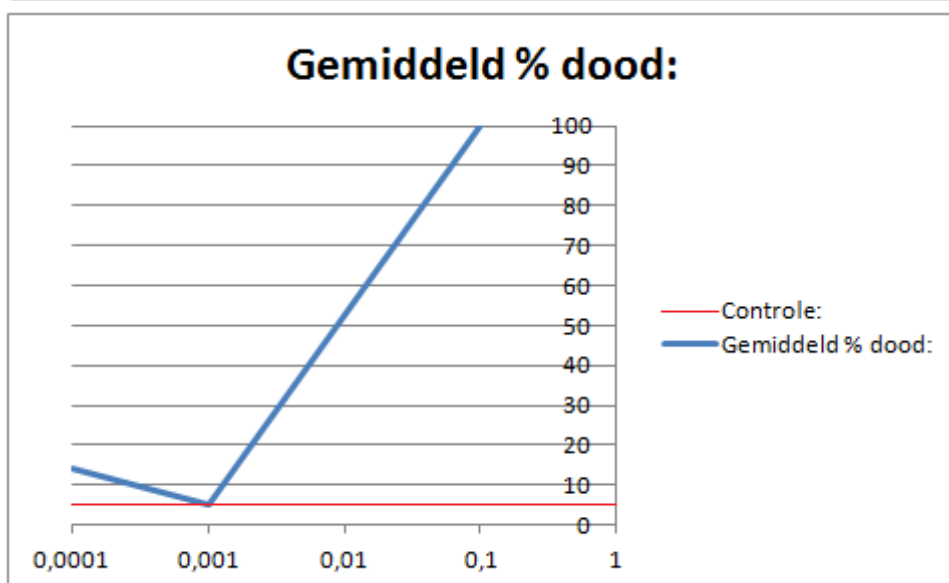
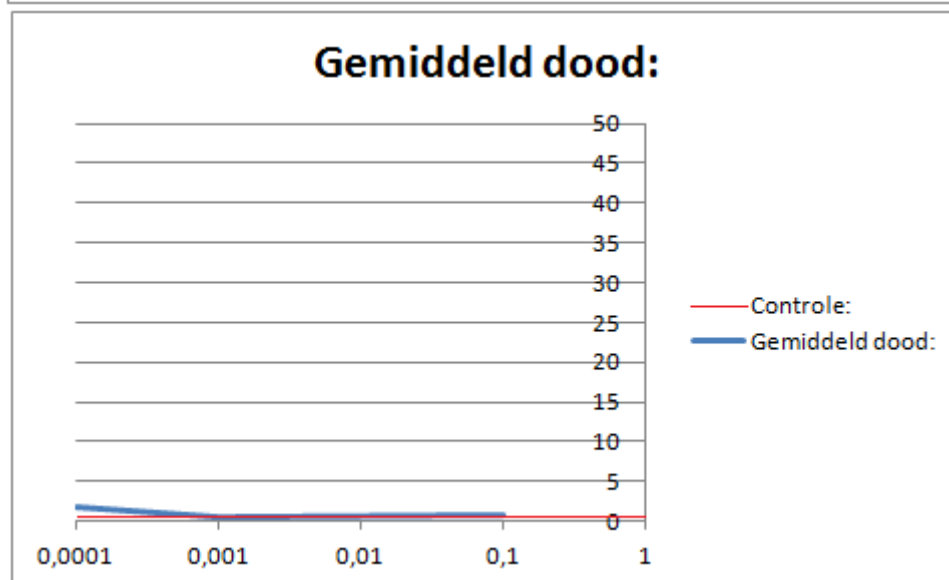
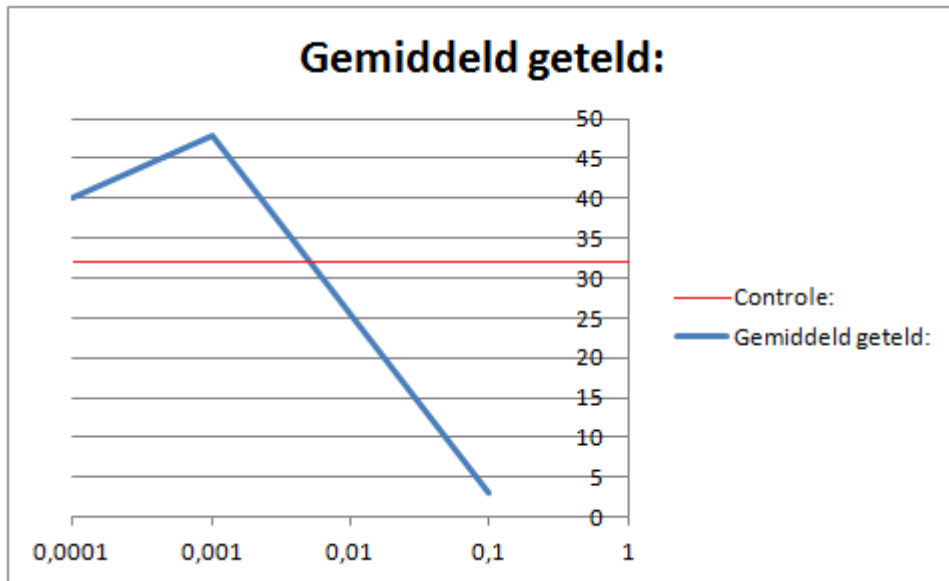
Om de grafieken goed te begrijpen zijn een aantal zaken belangrijk:

- Elke well van een experiment werd op de eerste dag gevuld met evenveel cellen. In de grafiek is af te lezen hoeveel cellen er nog over zijn na het experiment en hoeveel dode cellen we hebben gevonden. De laatste grafiek geeft het percentage dode cellen aan.
- Op de y-as wordt het gemiddelde aantal getelde cellen weergegeven of het percentage dode cellen na het experiment.
- Op de x-as worden de concentraties weergegeven (in M). De x-as van de grafieken maakt gebruik van een logaritmische schaal, opdat ook de kleinere concentraties goed weergegeven kunnen worden.
- De rode lijn geeft de gemiddelde waarde van de controleproeven aan (0M)

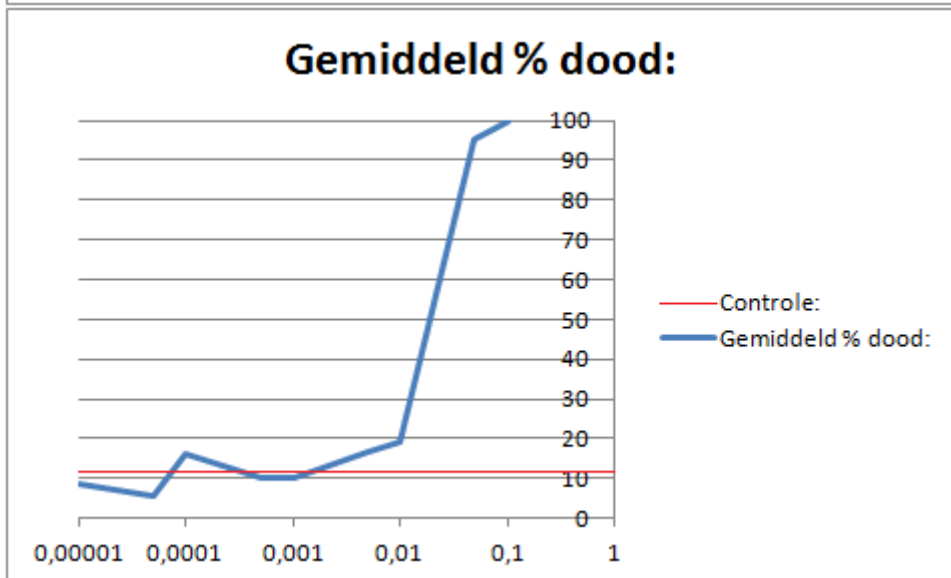
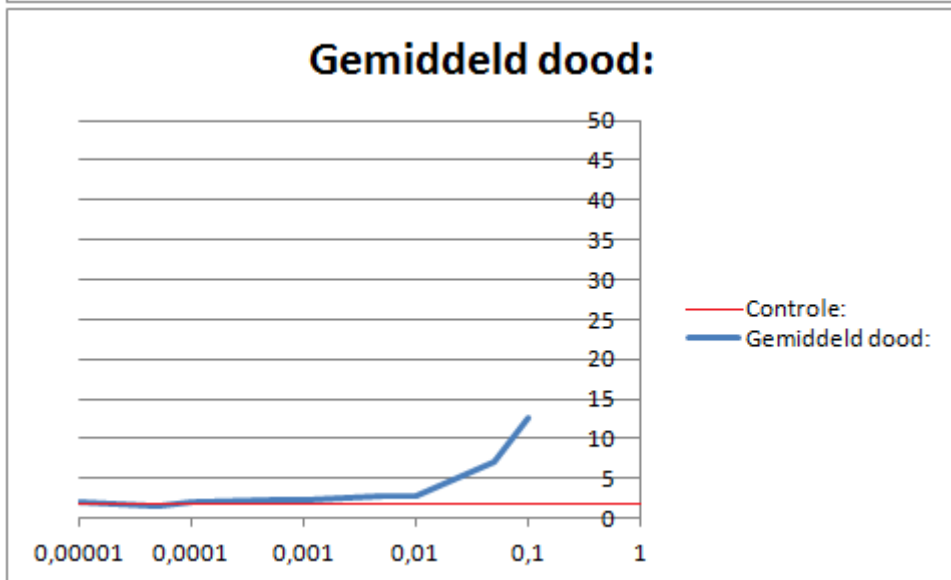
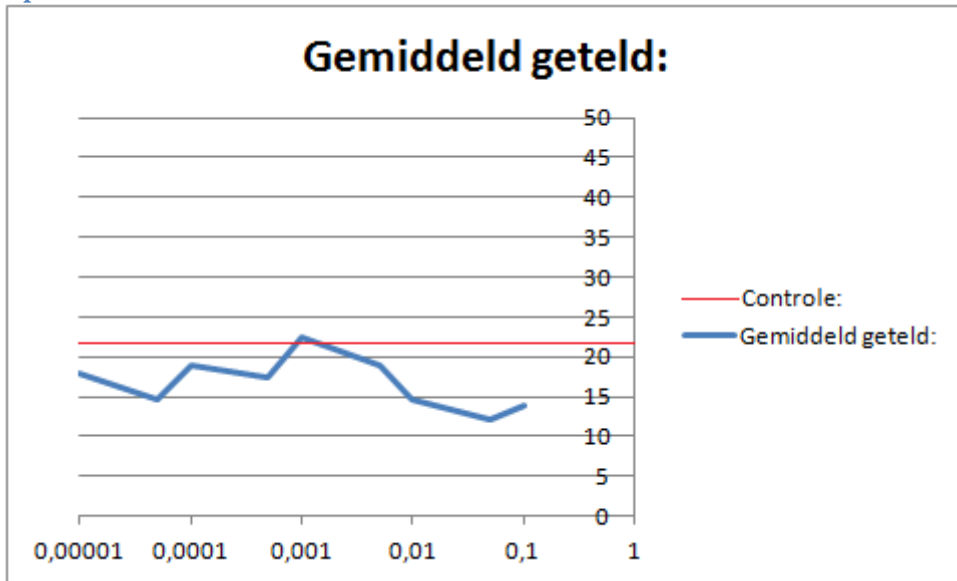
## Darmwand CaCo-2 cellen onder invloed van methanol



## Endotheel ECFC cellen onder invloed van mierenzuur



## Epitheel SKBR-3 cellen onder invloed van mierenzuur



# Conclusie

Uit onze metingen hebben we het volgende afgeleid:

De cellen die in aanraking met methanol zijn gekomen, dit waren darmwand cellen, zijn niet aangetast volgens onze metingen. Dit hadden we al verwacht want de schadelijke stof bij methanolvergiftiging is niet methanol maar mierenzuur. En het blijkt dus dat methanol in ons experiment geen invloed had op het percentage gestorven cellen. We kunnen hier echter geen betrouwbaar oordeel over vellen, omdat onze metingen met methanol veel minder nauwkeurig waren dan onze andere metingen (zie discussie).

De cellen die in aanraking zijn gekomen met mierenzuur stierven wel (zie grafieken). Deze cellen zijn op te delen in twee verschillende cellijnen (soorten):

- Epitheel cellen  
Bij het dagelijks toevoegen van concentraties mierenzuur (2 dagen lang) zagen we dat veel cellen stierven. Bij lage concentraties was er geen verschil te zien in vergelijking met de controle proeven. Maar vanaf 0,001M mierenzuur was er het volgende te zien:
  - Het aantal dode cellen nam snel toe
  - Het percentage dode cellen nam snel toe
  - Het aantal getelde cellen nam af

Bij hogere concentraties stierven er meer cellen, ook waren er minder in totaal wat duidt op een vermindering van de celgroei. Hieruit kunnen we concluderen dat mierenzuur een schadelijke werking heeft op menselijke cellen vanaf een concentratie van 0,001M mierenzuur. Dit is omgerekend ongeveer 30 blikjes Coca cola zero voor een kind van 6 jaar oud. Dit klinkt misschien als erg veel maar let hierbij op dat aspartaam ook uit andere voedingsbronnen kan komen (zo'n 6000 producten). Verder is het opmerkelijk dat de cellen af beginnen te sterven bij deze concentraties (al na 2 dagen). Waarschijnlijk zijn er al eerder verschillen te merken in het gedrag van de cellen. Het kan dus goed zijn dat aspartaam bij lagere concentraties ook al schadelijk is voor de mens.

- Endotheel cellen  
Bij het dagelijks toevoegen van concentraties mierenzuur (1 dag lang) zagen we dat bij een hoge concentratie alle cellen stierven. Bij lage concentraties was er geen verschil te zien in vergelijking met de controle proef. We hebben bij deze cellen maar weinig testen kunnen doen dus de verfijndheid van de metingen is niet hoog. We hebben het volgende resultaat waargenomen:
  - Het percentage dode cellen steeg enorm bij de hoogste concentratie
  - Het percentage getelde cellen nam af. Het aantal nam zelfs zo sterk af dat het aantal gemiddeld getelde cellen onder de controle waarde komt. Dit is

kunnen we verklaren. Een deel van de dode cellen laat zich namelijk los van de bodem (van de welletjes) en gaan op het medium drijven. Als wij het medium verversen of verwijderen om de cellen te gaan tellen dan zuigen wij een deel van de dode cellen af. Deze kunnen wij dus niet meer tellen. Daarbij zijn deze endotheel cellen geen kankercellen en groeien daardoor een stuk minder hard dan de epitheel en de darmwand cellen, wat wel kankercellen zijn. Hierdoor zijn er ook minder cellen te tellen.

We kunnen uit deze metingen alleen niet goed concluderen dat het mierenzuur dezelfde werking had op deze cellen als op de epitheel cellen bij lagere concentraties. Maar de metingen die we hebben gedaan wijzen hier wel op.

Als we deze resultaten samennemen zien we wel degelijk een trend. De gevaarlijke concentraties zijn nog niet realistisch maar komen daar wel in de buurt van de concentraties bij dagelijks gebruik. Ook hebben we niet op lange termijn kunnen testen dus we kunnen niks zeggen over de effecten die mierenzuur heeft na een jaar dagelijks gebruik van aspartaamhoudende producten.

## Discussie

De nauwkeurigheid van onze metingen verschilt per experiment. Dit komt doordat de door ons gebruikte telmethode voor sommige cellijnen beter werkt dan bij anderen. In deze discussie behandelen we de verschillende experimenten apart.

### Werking van methanol op CaCo-2 (darmwand) cellen.

De CaCo-2 cellijn is een cellijn die is ontstaan uit darmkanker cellen. Bijna alle huidige cellijnen bestaan uit kankercellen omdat deze ongeremd delen en dus makkelijk te kweken zijn zonder dat de structuur en functie van de cellen verandert. Dit kan soms wel voor enige problemen zorgen: Net zoals in het lichaam gaan de cellen soms tumoren (klompjes van opgehoopte cellen) vormen. Hierdoor verdelen de cellen zich niet gelijk over een bepaald volume en kunnen de cellen dus minder goed geteld worden. Dit gebeurt vaak bij deze cellijn en daarom zijn onze metingen van niet erg nauwkeurig. Toch komt er het door ons verwachte resultaat uit.

### Werking van mierenzuur op SKBR-3(epitheel) cellen.

De SKBR-3 is ook een kankercellijn, maar deze heeft een veel rustigere groei en verdeelt zich mooier over het bakje. Hierdoor zijn de metingen die we met deze cellijn hebben gedaan zeer nauwkeurig en betrouwbaar, mede omdat we de meting in volledige duplo hebben uitgevoerd. De methode die we gebruiken hebben is eigenlijk niet te verbeteren voor deze cellijn en heeft ook mooie resultaten geleverd.

### Werking van mierenzuur op ECFC (endotheel) cellen.

Deze cellijn is ontstaan uit cellen van levende patiënten en is geen kankercellijn. Dit heeft als voordeel dat de cellen zich meer gedragen als lichaamscellen, maar zijn wel moeilijker te kweken en kunnen maar een aantal keer worden doorgezet. De proeven die we op deze cellen hebben gedaan hebben zijn goed gelukt, maar we hadden niet erg veel testmogelijkheden tot onze beschikking (door moeilijk te kweken cellen). Hierdoor kunnen we niet stellen dat onze metingen betrouwbaar zijn omdat we geen duplo proef hebben gedaan. Als je deze metingen echter samenneemt met de resultaten van de SKBR-3 cellen kunnen we deze metingen als een uitbreiding daarop beschouwen die onze een wijder beeld geeft van werking van mierenzuur op menselijke cellen.

Over het algemeen zijn we zeer tevreden over onze meetresultaten en de betrouwbaarheid van dezen. Onze begeleiders vanuit Philips Research waren zeer verrast dat we na slechts een week in het lab al resultaten konden presenteren en we zijn trots dat dit ons gelukt is.



# Bronnenlijst

Bronnen gebruikt door het hele verslag:

Kennis en vaardigheden van Research Fellow Anja van de Stolpe

Kennis en vaardigheden van begeleidster op de HTC Christa Dam

Kennis en vaardigheden van TU studente Marjolein van Breugel

Door ons zelf opgedane informatie die we gaande weg vergaard hebben.

- Bron: [1] <http://www.aspartaam.nl/info/producten.php>
- Bron: [2] <http://www.food-info.net/nl/sweet/aspartame.htm>
- Bron: [3] <http://aandekeukentafel.com/nieuws/?p=43>
- Bron: [4] <https://forum.www.trosradar.nl/viewtopic.php?f=97&t=90406>  
<http://www.aspartaam.nl/artikelen/tabel2.html>
- Bron: [5] <http://www.aspartaam.nl/artikelen/efsa-documenten.html>  
<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/additives.htm>  
<http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/aspartame.htm>  
<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/120807a.htm>
- Bron: [6] <http://evmi.nl/voeding-gezondheid/efsa-standpunt-aspartaam-eind-februari/>
- Bron: [7] <http://nl.wikipedia.org/wiki/Asparaginezuur>  
<http://nl.wikipedia.org/wiki/Aspartaat>
- Bron: [8] <http://nl.wikipedia.org/wiki/Fenylalanine>  
<http://nl.wikipedia.org/wiki/Noradrenaline>
- Bron: [9] <http://nl.wikipedia.org/wiki/Methanol>  
<http://www.toxicologie.org/monografieen/frametox.asp?ID=33>  
<http://nl.wikipedia.org/wiki/Mierenzuur>  
[http://nl.wikipedia.org/wiki/Alcohol\\_dehydrogenase](http://nl.wikipedia.org/wiki/Alcohol_dehydrogenase)
- Bron: [10] [http://www.cocacolanederland.nl/Merken/Coca-Cola\\_light.aspx](http://www.cocacolanederland.nl/Merken/Coca-Cola_light.aspx)
- Bron: [11] BINAS tabel 99
- Bron: [12] <http://www.toxicologie.org/monografieen/frametox.asp?ID=33>
- Bron: [13] <http://www.buzzle.com/articles/average-child-weight-by-age.html>
- Bron: [14] <http://www.toxicologie.org/monografieen/frametox.asp?ID=33>

# Reflectie

## Reflectie van Guido

### *Samenwerking:*

Ik vond dat de samenwerking goed. Ten eerste was er altijd een goede en een gezellige sfeer. Ook zijn we geen van beiden bang geweest om vragen te stellen, aan elkaar of aan buitenstanders. Er is altijd de volledige vrijheid geweest om te zeggen wat je denkt. Ik ben zelf best lui en ik ben vaak gestimuleerd om te werken door Rein. De samenwerking in het lab was goed, ook bij cruciale handelingen die we samen moesten doen

### *Planning en timing:*

Rein heeft altijd gezorgd voor een goede planning en de naleving daarvan. We zijn geen enkele keer in tijdnood gekomen, dit komt vooral omdat we al vroeg heel veel vooronderzoek gedaan hadden waardoor we dit grote project aankonden.

### *Diepgang:*

Tijdens on project hebben we een enorme diepgang bereikt op het gebied van celbiologie.. We hebben ervaren hoe het is om in een lab te werken met de meest geavanceerde apparatuur tot onze beschikking. Ook in die situatie hebben we onze eigen kennis moeten gebruiken om nieuwe problemen op te lossen (zoals molberekeningen doen, verdunningen maken enz.) en hebben daardoor ons eigen vernuft weer aangescherpt.

## Reflectie van Rein

### *Samenwerking:*

Ik vind zelf dat we in het profielwerkstuk heel goed hebben samengewerkt. We hebben duidelijke afspraken gemaakt over wie wat deed en wanneer het af moest zijn. Guido begrijpt sommige dingen net iets sneller en ik kon altijd mijn vragen stellen en kreeg een duidelijk antwoord, Guido was altijd heel geduldig. We hebben toch wel samen heel veel tijd doorgebracht en zijn gelukkig nooit in vervelende situaties met elkaar gekomen. In tegendeel we hadden zelfs af en toe na uren cellen te hebben geteld dat de meligheid toesloeg en we soms niet meer bij kwamen van het lachen. Kortom samenwerking ging perfect.

### *Planning en timing:*

We hebben met elkaar duidelijke afspraken gemaakt over wie wat nog op een bepaalde tijd afgewerkt moest hebben. Hierdoor hebben we nooit in tijdnood gezeten en is altijd alles goed op tijd afgewerkt.

### *Diepgang:*

Ons profielwerkstuk had in mijn ogen heel veel diepgang. We hebben veel aan onze kennis over scheikunde en biologie gehad maar nog veel meer geleerd. Wij hebben nu toch wel de basisvaardigheden (o.a. volledig steriel werken, cellen doorzetten, cellen tellen) van werken in een lab echt onder de knie. We weten nu echt hoe het werken in een lab eraan toe gaat. We hebben zeer veel ervaring opgedaan bij Philips Research. Ik weet zeker dat als ik ooit nog een practicum krijg (vergelijkbaar met het onze) dat het mij een stuk makkelijker zou afgaan dan anderen. Ons complete onderzoek wordt zelfs bij Philips in de database opgenomen (dat wij als wij eventueel nog ooit gaan solliciteren bij een Philips Research dat we daar al een puntje extra hebben).

# Dankwoord

In dit dankwoord willen wij uiteraard iedereen bedanken die een bijdrage heeft geleverd aan de tot standkoming van dit profielwerkstuk.

Zonder jullie bijdrage was ons onderzoek nooit mogelijk geweest.

Anja van de Stolpe, bedankt voor jou continue begeleiding die je ons gaf. Fijn dat je altijd zo intensief met ons meedacht en ons daarmee heel erg hielp. Altijd iemand om even op terug te vallen als we iets niet helemaal meer snaptten, erg fijn was dat. Tevens ook heel erg bedankt voor de vele keren dat wij mee mochten rijden naar Eindhoven.

Christa Dam, bedankt voor jou grote hulp tijdens ons onderzoek. Dankzij jou hebben we veel geleerd over het doorzetten van cellen en konden we altijd aan de slag omdat alle stoffen voor ons aanwezig waren.

Studente Marjolein van Breugel, bedankt voor jou hulp in het laboratorium. Fijn dat je ons zoveel leerde over het tellen van cellen. En als we iets niet wisten te vinden omdat we het laboratorium niet helemaal kende hielp jij ons.

Mevrouw Daemen, bedankt voor uw handige kritiek en uw nuchtere kijk op ons werk. Hier hebben we ook veel aan gehad.

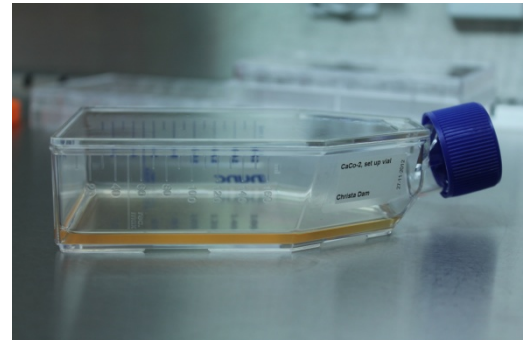




# Verslag van 3 december en plan voor 4 december

## Verslag van 3 december

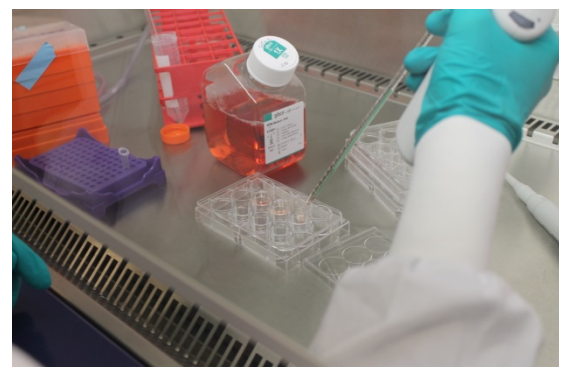
- We begonnen met kijken naar de endotheel en darmcellen die wij tot onze beschikking hebben. De darm(kanker)cellen (ook wel CaCo-2, zie figuur 1) zagen er erg goed uit en waren confluent. De endotheel cellen zijn geen kankercellen maar gewone endotheelcellen. De endotheel cellen kwamen van de TU delft deze hebben de reis niet erg goed overleefd en de cellen zagen er niet zo goed uit. Dit is erg jammer want zeer waarschijnlijk kunnen we nu dus geen experimenten doen met deze endotheelcellen. Toch hebben wij deze cellen nog een keer doorgezeten in de hoop dat ze nog zouden groeien en dus wel bruikbaar worden voor ons experiment (zie bijlage 2 cellen doorzetten). Als het nu niet gaat gaan we waarschijnlijk op een ander moment werken met de endotheel cellen.



Figuur 1 - CaCo-2 cellen

- We zijn de CaCo-2 cellen gaan tellen (zie bijlage 3 cellen tellen). Hieruit hebben wij het aantal cellen per mL berekend:  
1e telkamer had (in de 4 grote hokken): 62 cellen  
De verhouding medium:cellen is 1:1 dus de dilution factor is 2  
Als we deze formule invullen vinden we het volgende:  
 $\# \text{ cells} * 3906,25 * \text{dilution factor} = \text{cellen/mL}$   
 $62 * 3906,25 * 2 = 484.375 \text{ cellen/mL}$   
2e telkamer had (in de 4 grote hokken): 58 cellen  
De verhouding medium:cellen is 1:1 dus de dilution factor is 2  
Als we deze formule invullen vinden we het volgende:  
 $\# \text{ cells} * 3906,25 * \text{dilution factor} = \text{cellen/mL}$   
 $58 * 3906,25 * 2 = 453.125 \text{ cellen/mL}$   
Gemiddeld zijn dit zo'n 468.750 cellen/mL dit komt niet op een significante waarde van 470.000 cellen/mL  
In een welletje in een 12-welplaat gaan 100.000 cellen.  
Dit betekend dat er  $\frac{100.000}{470.000} = 0,21 \text{ mL} = 210 \mu\text{L}$  per welletje toegevoegd moet worden.

- We hebben de CaCo-2 cellen tijdelijk in een 50mL buis gedaan. Er bleek echter in de "lege kweekfles" nog cellen achter te blijven deze zijn niet goed losgekomen. We hebben daarom deze kweekfles nog gevuld met medium en weer in de stoof gezet. Zodat we hiermee nog verder mee zouden kunnen werken als dat nodig is.
- We hebben elk welletje gevuld met 1 mL medium. We hebben de CaCo-2 cellen uit de 50 mL buis in de welletjes gedaan per welletje 210  $\mu\text{L}$  (zie figuur 2).

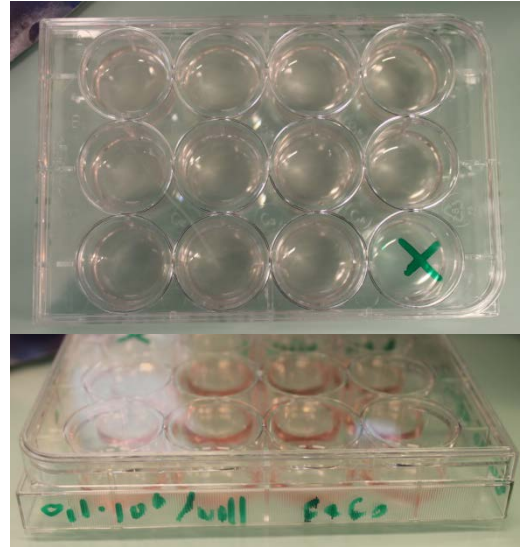


Figuur 2 - welletjes vullen met medium

Wij konden met onze hoeveelheid cellen helaas maar 11 welletjes vullen (zie figuur 3) deze hebben wij weer in de stoof gezet om morgen weer in mee verder te gaan werken.

In het kort:

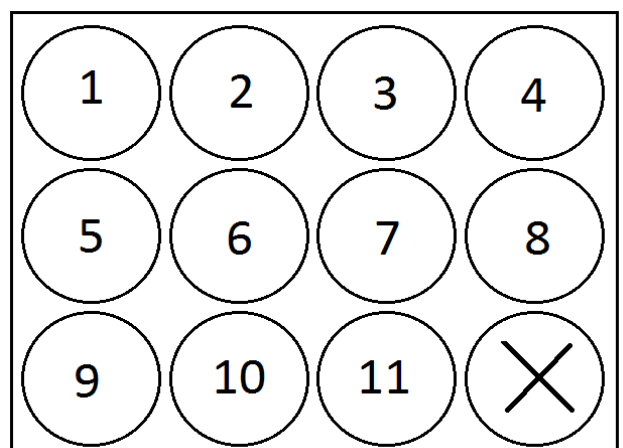
- We hebben de endotheel cellen doorgezet in een kleine kweekfles deze hebben we weer in de stoof gezet.
- We hebben de CaCo-2 cellen geteld en vervolgens berekend hoeveel mL CaCo-2 cellen er per welletje moest komen.
- De "lege kweekfles" met darmcellen bleek niet helemaal leeg te zijn dus hebben wij deze voor de zekerheid nog aangevuld met medium en weer in de stoof gezet.
- We hebben hierna de CaCo-2 cellen doorgezet in een 12-welplaat (in slechts 11 wellletjes) en weer in de stoof gezet.



Figuur 3 - De 12 - welplaat met de CaCo-2 cellen

## Plan voor 4 december

1. We beginnen de dag door te kijken of de CaCo-2 (darmwandcellen) goed gehecht zijn aan de aan de 12 well plaat. Op dit moment zitten er in elk van de 11 wellen 100.000 cellen in een vloeistof van medium (1,21mL per well). Misschien zullen deze cellen nog delen, maar dat zal bij elke well op ongeveer dezelfde snelheid gebeuren, want de hoeveelheid cellen en het milieu waarin ze zich bevinden is voor elke well gelijk.
2. Daarna gaan we berekenen hoe we de juiste concentraties methanol kunnen maken. Hieronder nog eens de benodigde concentraties methanol:
  - $1,0 \cdot 10^{-5}$
  - $5,0 \cdot 10^{-5}$
  - $1,0 \cdot 10^{-4}$
  - $5,0 \cdot 10^{-4}$
  - $1,0 \cdot 10^{-3}$
  - $5,0 \cdot 10^{-3}$
3. Daarna maken we deze concentraties (hierbij lossen we op in medium).
  - Vul epjes met 5 mL medium.
  - Voeg juiste hoeveelheid methanol oplossing toe tot de juiste concentratie bereikt is.
  - Label de verschillende concentraties met stift.
4. Dan voegen we de methanoloplossing toe aan de CaCo-2 cellen.
  - Zuig het medium (1,21mL) af met zuiger.
  - Pipetteer 1mL van methanoloplossing in medium.
  -



Figuur 2 - 12-welplaat met concentraties



- Voeg de juiste concentratie aan de juiste well toe (zie figuur 4)
- 1.  $1,0 \cdot 10^{-5}$  M methanol -----
- 2.  $5,0 \cdot 10^{-5}$  M methanol
- 3.  $1,0 \cdot 10^{-4}$  M methanol                      Realistische waarden
- 4.  $5,0 \cdot 10^{-4}$  M methanol
- 5.  $1,0 \cdot 10^{-3}$  M methanol
- 6.  $5,0 \cdot 10^{-3}$  M methanol-----
- 7. 0,01 M methanol -----
- 8. 0,05 M methanol
- 9. 0,1 M methanol                                      Controle waarden
- 10. 0 M (puur medium)
- 11. 0 M (puur medium)-----
- 12. geen cellen
- Zet de cellen weer terug in de stoof
- 5. Daarna bekijken we hoe de endotheelcellen er aan toe zijn onder de microscoop, als ze confluent zijn kunnen we ze doorzetten en een deel op nieuwe 12 well plaatjes zetten.
- 6. Uiteindelijk herhalen we de handeling van maandag door weer CaCo-2 cellen te tellen(volgens bijlage 3 cellen tellen) en op een twaalf well plaatje te zetten. De cellen zijn nodig voor onze duplo proef.

# Verslag van 4 december en plan voor 5 december

## Verslag 4 december

- We hebben gekeken naar de endotheelcellen die er gisteren niet goed uitzagen. Vandaag zagen ze er gelukkig een stuk beter uit. Hopelijk kunnen we er deze week nog mee gaan werken. We hebben deze cellen ook nog nieuw medium gegeven.
- De CaCo-2 cellen uit de kweekfles zagen er zeer goed uit (zie figuur 1).
- Hierna zijn we de concentraties methanol gaan

maken, dit deden we als volgt:

We hadden beschikking tot een flesje 100% methanol (zie figuur 2).

De molaire massa van methanol is  $(1 \times 12 + 4 \times 1 + 1 \times 16)$  32g/mol

$$\frac{100}{32} = 3,125 \text{ mol/100g}$$

De dichtheid van methanol is 0,79 g/mL

$$\frac{1}{0,79} = 0,1266 \text{ mL/g}$$

$3,125 / 0,1266 = 24,7\text{M}$  dit is dus de molariteit van deze methanol

Vanuit deze molariteit zijn we gaan rekenen:

1.  $1,0 \times 10^{-5}\text{M}$
2.  $5,0 \times 10^{-5}\text{M}$
3.  $1,0 \times 10^{-4}\text{M}$
4.  $5,0 \times 10^{-4}\text{M}$
5.  $1,0 \times 10^{-3}\text{M}$
6.  $5,0 \times 10^{-3}\text{M}$
7. 0,01 M
8. 0,05 M
9. 0,1M
10. Alleen medium
11. Alleen medium
12. Geen cellen

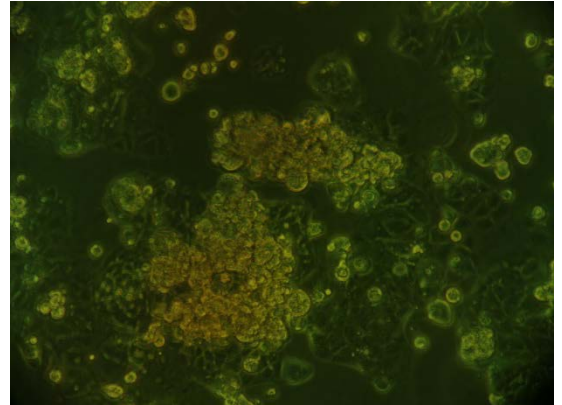
Hiermee kunnen we dus 11 welltjes vullen (zie figuur 3)

We zullen een voorbeeld berekening geven maar niet alle berekeningen dit wordt namelijk te veel voor in het verslag.

Voorbeeldberekening voor de 0,1M concentratie:

$$\frac{24,7}{0,1} = 247 \text{ de verdunning is 247 keer dit betekend een verhouding van:}$$

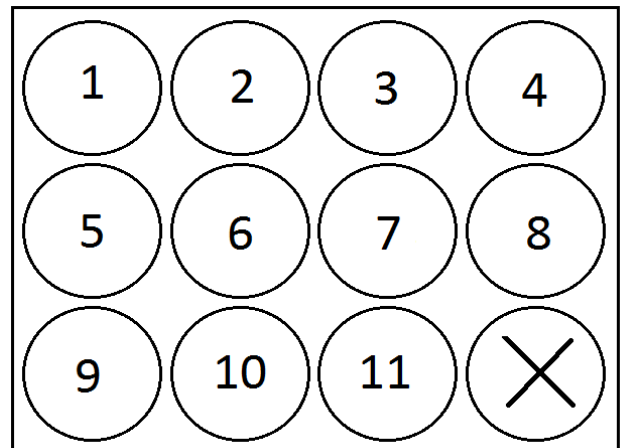
Methanol : Medium



Figuur 1 - CaCo-2 cellen



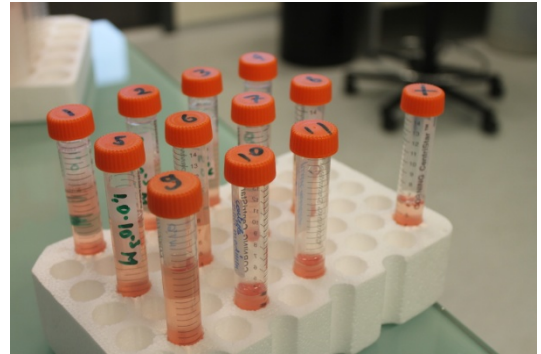
Figuur 2 - Methanol 100%



Figuur 3 - 12-wellplaat

1 : 246  
 ? : 10mL (We willen bij elke concentratie 10ml medium gebruiken)  
 0,04mL : 10mL ( $\frac{10}{246} = 0,04\text{mL}$ )  
 40μL : 10mL

Wij hebben dus 11 reageerbuizen genummerd en de concentratie erop geschreven. Deze buizen hebben steeds gevuld met 10mL medium en een bepaalde hoeveelheid methanol. (zie figuur 4). Om uiteindelijk al de concentraties te kunnen maken hebben we nog een keer (om nauwkeurige metingen te krijgen) twee tussen oplossingen methanol gemaakt.



Figuur 4 - Buizen met methanol oplossing CaCo-2 cellen die we gisteren al hadden gemaakt.

Vervolgens hebben wij een deel van deze concentraties toegevoegd aan de 12-wellplaat met

hadden gemaakt.

- We kregen vandaag te horen dat we ook nog beschikking hebben over epitheelcellen (KBR-3 cellen). Deze cellen hebben wij geteld en doorgezet. Het aantal cellen bleek genoeg te zijn voor drie 12-wellplaten. Deze hebben wij dus klaargemaakt.

In het kort:

We hebben de endotheelcellen bekeken en het medium van deze cellen verversst. De endotheelcellen zagen er een stuk beter uit.

- We hebben de CaCo-2 cellen bekeken deze zagen er erg goed uit.
- We hebben de verschillende concentraties methanol gemaakt. En de 12-wellplaat met CaCo-2 cellen (die we gisteren hadden gemaakt) gevuld met deze concentraties.
- We hebben de epitheelcellen doorgezet in twee 12-wellplaten.

## Plan voor 5 december

1. Eerst controleren we onze CaCo-2 cellen waarbij we de concentratie methanol al hebben toegevoegd. (we tellen nog niet).
2. We bekijken of de epitheel cellen zijn gehecht aan de 12 well platen (doorgezet op 4 december). Er zijn 3 platen die we moeten controleren
3. Dan gaan we de concentraties mierenzuur maken om op de epitheelcellen los te laten. Deze concentraties maken we in het medium net als de concentraties methanol
4. Nu gaan we de caco-2 cellen tellen, daarbij noteren we de tijd wanneer we beginnen. Belangrijk is dat we alle cellen tellen en ook nog een keer alleen de dode (blauwgekleurd) zo testen we op reproduction en viability. Tellen volgens telprotocol, elke well tellen.
5. We verversen het medium van de Caco-2 cellen door medium met methanol-oplossing (standaard concentraties). We voegen dus methanol toe.
6. We verversen het medium van de epitheelcellen (alle 3 de platen) door medium met mierenzuur-oplossing (standaard concentraties).

# Verslag 5 december en plan voor 6 december

## Verslag 5 december

- We hebben vandaag eerst alle cellen bekeken. De endotheelcellen zagen er goed genoeg uit om door te zetten. De rest zag er ook prima uit zoals verwacht.
- We hebben aan de 12-wellplaat met de CaCo-2 cellen (die we 3 december hadden gemaakt en 4 december hadden gevuld met de methanol concentraties) weer voorzien van nieuwe methanol concentraties.
- Met de bijna pure mierenzuur mochten wij niet werken maar met een verdunning daarvan wel. Dus maakte Anja (de moeder van Guido) eerst een verdunning voor ons in de zuurkast. Mierenzuur is natuurlijk zuur en in het medium zit een PH-indicator dus we konden gelijk goed zien aan de verdunning dat de kleur gelijk geel werd (zie figuur 1 en 2). We hebben hierna uit de verdunning de concentraties mierenzuur gemaakt (rekenwerk voorbeelden zie verslag 4 december). Van deze verschillende concentraties kunnen wij weer heel mooi de verschillende PH-waardes zien door de PH-indicator (zie figuur 3).
- We hebben de concentraties mierenzuur bij twee 12-wellplaten met KBR-3 cellen (gemaakt 4 december) toegevoegd (zie figuur 4). En bij de laatste plaat hebben wij zowel de methanol als de mierenzuur concentraties (verhouding 1:1) toegevoegd. Dit betekent dat hier de concentraties de volgende zijn:

	Methanol	Mierenzuur
1.	$0,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$	$0,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$
2.	$2,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$	$2,5 \cdot 10^{-5} \text{M}$
3.	$0,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$	$0,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$
4.	$2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$	$2,5 \cdot 10^{-4} \text{M}$
5.	$0,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$0,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$
6.	$2,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$	$2,5 \cdot 10^{-3} \text{M}$
7.	$0,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$	$0,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$
8.	$2,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$	$2,5 \cdot 10^{-2} \text{M}$
9.	0,05 M	0,05 M
10.	Alleen medium	Alleen medium
11.	Alleen medium	Alleen medium

- De endotheelcellen geteld (zie bijlage 3 cellen tellen). Het waren er maar 200.000/mL. We hebben deze 1:5 doorgezet in een kweekfles de rest in een 24-wellplaat (we deden dit in een 24-wellplaat omdat deze welltjes kleiner zijn maar voor 50.000 cellen). Met de cellen konden we slechts 4 welltjes vullen.

In het kort:

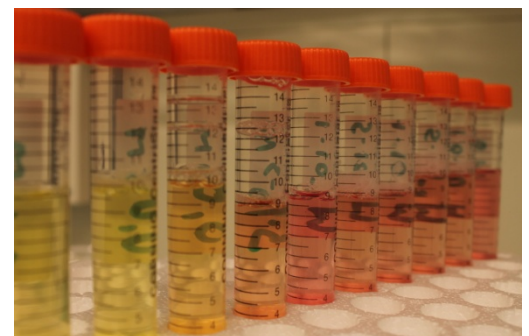
- We hebben vandaag eerst alle cellen bekeken. De



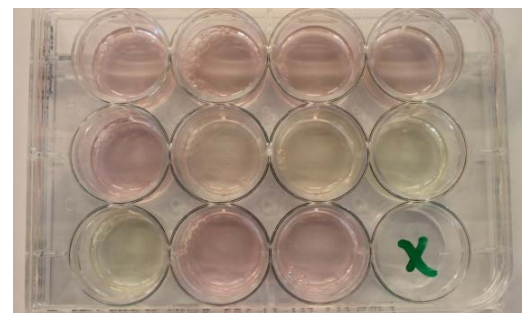
Figuur 1 - Verdunning mierenzuur



Figuur 2 - Verdunning mierenzuur en puur medium



Figuur 3 - De verschillende concentraties mierenzuur



Figuur 3 - De KBR-3 cellen met de concentraties mierenzuur

endothelcellen zagen er goed genoeg uit om door te zetten.

- We hebben aan de 12-wellplaat met de CaCo-2 cellen (die we 3 december hadden gemaakt en 4 december hadden gevuld met de methanol concentraties) weer voorzien van nieuwe methanol concentraties.
- We hebben de concentraties mierenzuur gemaakt.
- We hebben de concentraties mierenzuur bij twee 12-wellplaten met KBR-3 cellen (gemaakt 4 december) toegevoegd. En bij de laatste plaat hebben wij zowel de methanol als de mierenzuur concentraties (verhouding 1:1) toegevoegd.
- De endothelcellen geteld (zie bijlage 3 cellen tellen). Het waren er slechts 200.000cellen/mL. We hebben deze 1:5 doorgezet in een kweekfles de rest in een 24-wellplaat in slecht 4 wellletjes.

### Plan voor 6 december

- Wellplaat CaCo-2 cellen gemaakt 3 december tellen.
- Nieuwe concentraties mierenzuur toevoegen aan de SKBR-3
- Nieuwe concentraties mierenzuur aan de endothel cellen toevoegen

### Plan voor 7 december

- SKBR-3 cellen tellen.
- CaCo-2 cellen tellen
- Endothel cellen tellen

# Verslag 5&6 december

---

Donderdag hebben we de CaCo-2 cellen geteld, de endotheel en de SKBR-3 cellen voorzien van nieuwe concentraties.

Vrijdag hebben we alle cellen die nog moesten worden geteld geteld.

Een duidelijk overzicht van de week:

	Endotheel	Darmwand CaCo-2		Epitheel SKBR-3	
3 december	Doorgezet in kleine kweekfles	Doorgezet in 12-wellplaat		-	
4 december	-	De 12-wellplaat gevuld met de methanolconcentraties		Doorgezet in twee 12-wellplaten	
5 december	Doorgezet in 24-wellplaat	Nieuwe concentraties methanol toegevoegd		Twee 12-wellplaten voorzien van mierenzuur concentraties	
6 december	Gevuld met concentraties mierenzuur	Cellen geteld		Nieuwe concentraties mierenzuur toegevoegd	
7 december	Cellen geteld	-		Cellen geteld	

## Bijlage gebruikte stoffen

*Medium:*

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
<b>Amino Acids</b>			
Glycine	75	10	0.133
L-Arginine hydrochloride	211	240	1.14
L-Asparagine	132	50	0.379
L-Aspartic acid	133	20	0.15
L-Cystine	240	50	0.208
L-Glutamic Acid	147	20	0.136
L-Glutamine	146	300	2.05
L-Histidine	155	15	0.0968
L-Hydroxyproline	131	20	0.153
L-Isoleucine	131	50	0.382
L-Leucine	131	50	0.382
L-Lysine hydrochloride	183	40	0.219
L-Methionine	149	15	0.101
L-Phenylalanine	165	15	0.0909
L-Proline	115	20	0.174
L-Serine	105	30	0.286
L-Threonine	119	20	0.168
L-Tryptophan	204	5	0.0245
L-Tyrosine	181	20	0.11



L-Valine	117	20	0.171
<b>Vitamins</b>			
Biotin	244	0.2	0.00082
Choline chloride	140	3	0.0214
D-Calcium pantothenate	477	0.25	0.000524
Folic Acid	441	1	0.00227
Niacinamide	122	1	0.0082
Para-Aminobenzoic Acid	137	1	0.0073
Pyridoxine hydrochloride	206	1	0.00485
Riboflavin	376	0.2	0.000532
Thiamine hydrochloride	337	1	0.00297
Vitamin B12	1355	0.005	0.0000037
i-Inositol	180	35	0.194
<b>Inorganic Salts</b>			
Calcium nitrate (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O)	236	100	0.424
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	246	100	0.407
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.33
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84	2000	23.81
Sodium Chloride (NaCl)	58	6000	103.45
Sodium Phosphate dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) anhydrous	142	800	5.63
<b>Other Components</b>			
D-Glucose (Dextrose)	180	2000	11.11
Glutathione (reduced)	307	1	0.00326
Phenol Red	376.4	5	0.0133



## Reference:

1. Moore, G.E., Gerner, R.E. and Franklin, H.A. (1967) J.A.M.A., 199:519.
2. Mossinger, J. (1991) Parasitol., 103:85 (Nematodes, Litomosoides carinii).

## Veiligheidskaart:

[https://tools.invitrogen.com/content/sfs/msds/2008/21875034\\_MTR-EUIV\\_BD.pdf](https://tools.invitrogen.com/content/sfs/msds/2008/21875034_MTR-EUIV_BD.pdf)

## Bronnen:

- <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/21875034#>
- [http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media\\_formulation.187.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.187.html)
- [https://tools.invitrogen.com/content/sfs/msds/2008/21875034\\_MTR-EUIV\\_BD.pdf](https://tools.invitrogen.com/content/sfs/msds/2008/21875034_MTR-EUIV_BD.pdf)

## Buffer

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
<b>Inorganic Salts</b>			
Potassium Chloride (KCl)	75	200	2.67
Potassium Phosphate monobasic (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	136	200	1.47
Sodium Chloride (NaCl)	58	8000	137.93
Sodium Phosphate dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	268	2160	8.06



## Reference:

1. Dulbecco, R. and Vogt, M., (1954) Plaque formation and isolation of pure lines with Poliomyelitis viruses. J. Exp. Med., 98:167.

## Veiligheidskaart:

Niet beschikbaar

## Bronnen:

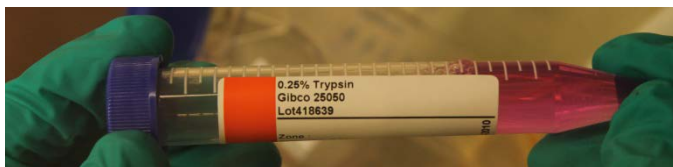
- <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/14190144>

## Trypsine

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
<b>Inorganic Salts</b>			
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.33
Potassium Phosphate monobasic (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	136	60	0.441
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84	350	4.17
Sodium Chloride (NaCl)	58	8000	137.93
Sodium Phosphate dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	268	90	0.336
<b>Other Components</b>			
D-Glucose (Dextrose)	180	1000	5.56
Phenol Red	398	10	0.0251
Sodium EDTA (Na <sub>2</sub> -EDTA)	416.2	380	0.913
Trypsin	23800	2500	0.105

Veiligheidskaart:

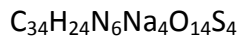
Niet beschikbaar



Bronnen:

- [http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media\\_formulation.298.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Product-Technical-Resources/media_formulation.298.html)
- <https://products.invitrogen.com/ivgn/product/25200056?ICID=search-product#>

## Trypaan blauw



Veiligheidskaart:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=NL&language=nl&productNumber=T8154&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Ft8154%3Flang%3Den>

Bronnen:

- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t8154?lang=en&region=NL>
- <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=NL&language=nl&productNumber=T8154&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Ft8154%3Flang%3Den>



## Bijlage cel tellingen

Endotheel cellen (1 dag mierenzuur)

Concentraties:	0,0E+00	--	-	1,0E-04	-	1,0E-03	-	-
Getelde cellen:	6	--	-	10	-	18	-	-
	7	--	-	15	-	15	-	-
	8	--	-	8	-	8	-	-
	11	--	-	7	-	7	-	-
Dode cellen:	0	--	-	3	-	1	-	-
	0	--	-	4	-	0	-	-
	1	--	-	0	-	0	-	-
	1	--	-	0	-	1	-	-
% dood:	0,0	--	-	30,0	-	5,6	-	-
	0,0	--	-	26,7	-	0,0	-	-
	12,5	--	-	0,0	-	0,0	-	-
	9,1	--	-	0,0	-	14,3	-	-
Gemiddeld geteld:	32,0	--	-	40,0	-	48,0	-	-
Gemiddeld dood:	0,5	--	-	1,8	-	0,5	-	-
Gemiddeld % dood:	5,397727	--	-	14,16667	-	4,960317	-	-
Concentraties:	0,0E+00	1,0E-04	1,0E-03	1,0E-01				
Gemiddeld geteld:	32,0	40,0	48,0	3,0				
Gemiddeld dood:	0,5	1,8	0,5	0,8				
Gemiddeld % dood:	5,4	14,2	5,0	100,0				

Caco-2 cellen (2 dagen methanol)  
1<sup>e</sup> wellplaat

Concentraties:	0,0E+00	0,0E+00	1,0E-05	5,0E-05	1,0E-04	5,0E-04	1,0E-03	5,0E-03
Getelde cellen:	8	12	11	9	23	25	19	28
	17	6	6	8	23	19	23	31
	27	14	10	8	22	28	20	21
	16	13	8	6	26	20	24	18
Dode cellen:	2	2	0	1	8	2	4	3
	0	2	0	2	4	2	4	1
	3	1	0	0	1	5	2	1
	2	1	0	1	4	3	4	2
% dood:	25,0	16,7	0,0	11,1	34,8	8,0	21,1	10,7
	0,0	33,3	0,0	25,0	17,4	10,5	17,4	3,2
	11,1	7,1	0,0	0,0	4,5	17,9	10,0	4,8
	12,5	7,7	0,0	16,7	15,4	15,0	16,7	11,1
Gemiddeld geteld:	18,5	13,5	6,8	6,3	19,0	19,5	22,0	25,0
Gemiddeld dood:	1,8	1,5	0,0	1,0	4,3	3,0	3,5	1,8
Gemiddeld % dood:	12,2	16,2	0,0	13,2	18,0	12,8	16,3	7,5

SKBR-3 Cellen (2 dagen mierenzuur)  
1<sup>e</sup> wellplaat

Concentraties:	0,0E+00	0,0E+00	1,0E-05	5,0E-05	1,0E-04	5,0E-04	1,0E-03	5,0E-03
Getelde cellen:	36	24	27	23	46	24	32	44
	39	40	32	17	34	26	45	23
	38	38	27	33	21	26	31	27
	52	40	34	20	27	24	29	35
Dode cellen:	1	3	3	3	7	3	6	7
	3	4	2	1	3	3	4	3
	2	4	3	3	5	3	2	5
	4	5	2	3	2	3	4	5
% dood:	2,8	12,5	11,1	13,0	15,2	12,5	18,8	15,9
	7,7	10,0	6,3	5,9	8,8	11,5	8,9	13,0
	5,3	10,5	11,1	9,1	23,8	11,5	6,5	18,5
	7,7	12,5	5,9	15,0	7,4	12,5	13,8	14,3
Gemiddeld geteld:	41,3	35,5	30,0	23,3	32,0	25,0	34,3	32,3
Gemiddeld dood:	2,5	4,0	2,5	2,5	4,3	3,0	4,0	5,0
Gemiddeld % dood:	5,9	11,4	8,6	10,8	13,8	12,0	12,0	15,4

2<sup>e</sup> wellplaat

Concentraties:	0,0E+00	0,0E+00	1,0E-05	5,0E-05	1,0E-04	5,0E-04	1,0E-03	5,0E-03
Getelde cellen:	3	5	9	4	4	16	9	7
	5	6	9	8	4	10	18	5
	8	4	3	5	6	8	8	5
	7	1	2	8	9	6	7	6
Dode cellen:	1	1	1	0	1	1	1	1
	0	1	2	0	1	1	4	1
	0	1	0	0	0	0	0	1
	1	0	0	0	2	1	0	1
Percentage dood:	33,3	20,0	11,1	0,0	25,0	6,3	11,1	14,3
	0,0	16,7	22,2	0,0	25,0	10,0	22,2	20,0
	0,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0
	14,3	0,0	0,0	0,0	22,2	16,7	0,0	16,7
Gemiddeld geteld:	5,8	4,0	5,8	6,3	5,8	10,0	10,5	5,8
Gemiddeld dood:	0,5	0,8	0,8	0,0	1,0	0,8	1,3	1,0
Gemiddeld % dood:	11,9	15,4	8,3	0,0	18,1	8,2	8,3	17,7
Concentraties:		0,0E+00	1,0E-05	5,0E-05	1,0E-04	5,0E-04	1,0E-03	5,0E-03
Gemiddeld geteld:		21,6	17,9	14,8	18,9	17,5	22,4	19,0
Gemiddeld dood:		1,9	2,0	1,4	1,9	2,3	2,3	2,8
Gemiddeld % dood:		11,1	8,5	5,4	15,9	10,1	10,2	16,6