

## Doel van de Multiplex Immunofluorescentie kleuring

De voorspelling van de afstoting van een nier na transplantatie is cruciaal voor de overlevingskansen van patiënten met een acuut of chronisch nierprobleem. Volgens onderzoek is het mogelijk dat de aanwezigheid van monocyten en macrofagen in getransplanteerde nieren de kans op afstoting kan voorspellen. Met dit onderzoek wil men een protocol opstellen zodat deze monocyten en macrofagen gevisualiseerd kunnen worden. Hierdoor kan men in een volgend onderzoek de eerder gestelde hypothese bevestigen of uitsluiten.

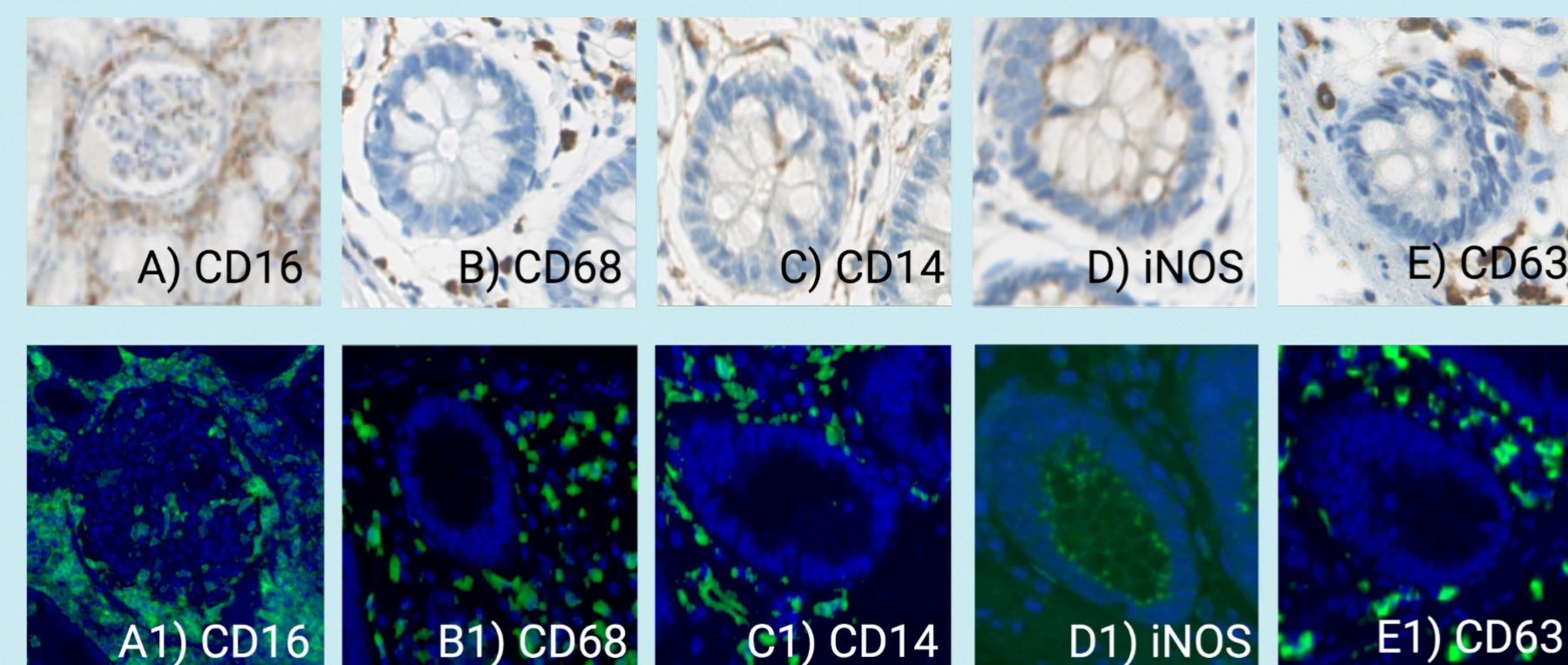
## Materialen en Methoden

Tabel 1: Een overzicht van de gebruikte antilichamen en de belangrijkste eigenschappen.

	Lotnummer	Concentratie (µg/ml)	Verdunning	Clone	Species	Secundair antilichaam
CD14	1535006B	0,13	/	EPR3653	Konijn	HQ Linker
CD16	C1813	200	1/200	KD3	Muis	HQLinker
CD68	F20909	0,40	/	KP-1	Muis	Goat-anti muis HRP
CD163	Vooo2455	0,30	/	MRC-26	Konijn	HQ Linker
iNOS	GRI30175-2	40.000	1/1000	Polykloonaal	Konijn	HQ Linker

Voor de visualisatie van DAB kleuringen werd er gebruik gemaakt van de Nanozoomer 2.0 HT van Hamamatsu op een vergroting van 40x, IF kleuringen werden gescand met de Zeiss Axio - Imager M2 op een vergroting van 20x.

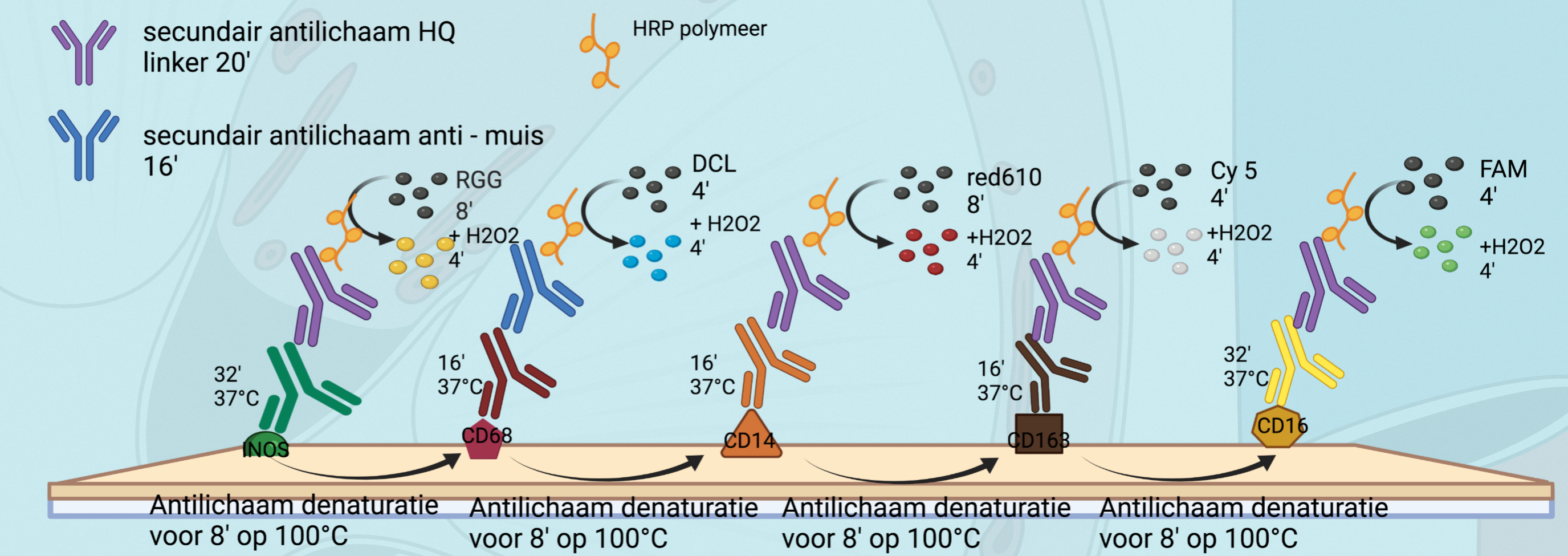
## Optimalisatie van de kleuring



Figuur 1: Een overzicht van de optimalisatie van de kleuring. A) Een glomeruli volgens de DAB - (boven) en FAM- (beneden) methode. B-E) Een sijlbekercel gekleurd volgens de DAB en FAM methode

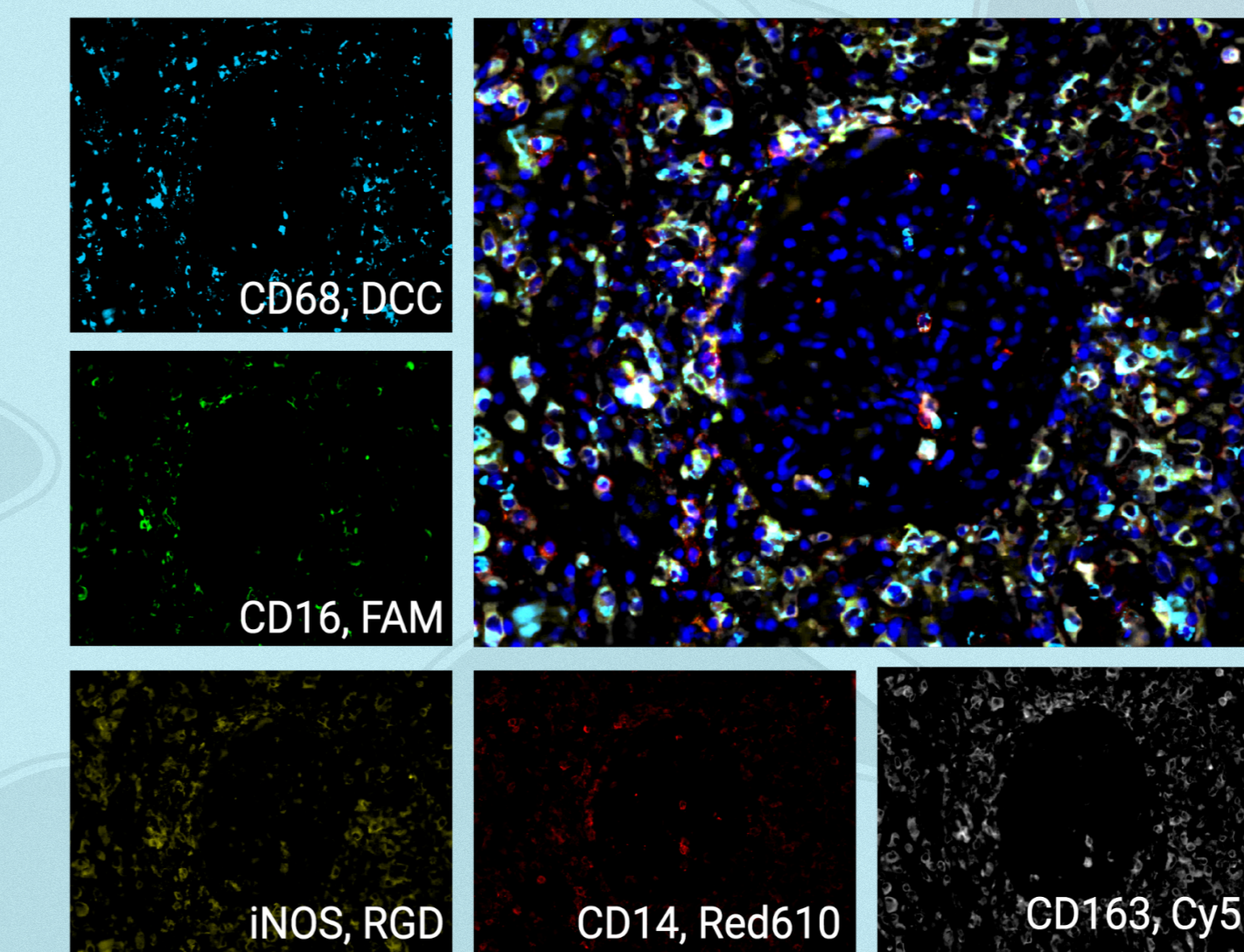
Uit deze afbeeldingen kunnen we zien dat de individuele protocollen voor de antilichamen correct zijn behalve voor iNOS. In afbeelding D2 zien we een te lage intensiteit. Dit wil zeggen dat dit antilichaam sensitiever is. Om er voor te zorgen dat dit antilichaam niet volledige stuk zou gaan zullen we dit als eerste aankleuren in de 5-plex.

## 5-plex immunofluorescentie protocol



Figuur 2: Een overzicht van het 5-plex immunofluorescentie protocol

## Resultaten



Figuur 3: Een overzicht van de 5-plex met afzonderlijke kanalen.

- Gele cellen: M1 macrofagen
- Witte cellen: M2 macrofagen
- Blauwe cellen: M1 en M2 macrofagen
- Groene cellen: CD16 positieve cellen
- Rode cellen: CD14 positieve cellen
- Klassieke monocyten: de cellen die rood aankleuren en niet groen
- Intermediaire en niet-klassieke monocyten: zowel rood als groen

## Discussie

Dit opgestelde protocol kan succesvol de monocyten en macrofagen in de nieren en in andere organen visualiseren. Men kan in de toekomst met dit protocol onderzoeken of de aanwezigheid van monocyten en macrofagen in de getransplanteerde nier een invloed heeft op de afstoting van deze nier. Indien men in de toekomst dit protocol wil uitvoeren met meer reactieve weefsels kan het zijn dat te kleuring te intens wordt. Hiervoor raden we naast een testkleuring een kortere incubatietijd van het fluorochrome aan.