

Invloed van pre-analytische variabelen op de kwaliteit van varkensweefsel via RNA en weefselmorfologie

Bes Julie
Decleir Esther
Ladjal Violette

Academiejaar 2019-2020

Biomedische laboratoriumtechnologie

Medische laboratoriumtechnologie

Promotors: Sarah Baetens

Maike Van Hout

Co-promotor: Rita Verhelst

Vesalius gaat voor duurzaamheid



Recto verso op duurzaam papier
www.hogent.be/ecocampus

Deze bachelorproef is gemaakt door Julie Bes, Esther Decler en Violette Ladjal, studenten aan de Hogeschool Gent, ter voltooiing van de bacheloropleiding biomedische laboratoriumtechnologie. De standpunten die in deze bachelorproef zijn verwoord, zijn louter het persoonlijke standpunt van de individuele auteur en reflecteren niet noodzakelijkerwijs de mening, het officiële standpunt of het beleid van de Hogeschool Gent.

WOORD VOORAF

Voor u ligt de bachelorproef 'Invloed van pre-analytische variabelen op de kwaliteit van varkensweefsel via RNA en weefselmorfologie.' Het onderzoek werd uitgevoerd in het Bioresource Center Ghent. Deze bachelorproef is geschreven in het kader van ons afstuderen aan de opleiding Biomedische Laboratoriumtechnologie aan de Hogeschool Gent en in opdracht van de stageplaats. Van 10 februari 2020 tot en met 12 juni 2020 hebben we gewerkt aan deze pilootstudie.

Graag zouden wij onze promotoren Sarah Baetens en Maaïke Van Hout van harte willen bedanken voor de aangename begeleiding en ondersteuning over het gehele traject. Te allen tijde hebben zij ons gesteund en advies gegeven waar nodig. Ook de rest van het team verdient een hartelijke dankjewel. Zij waren voortdurend bereid om ons te helpen en te steunen waar nodig. Hun deur stond altijd open in eender welke situatie. De aanmoedigingen gedurende de hele periode hebben er mee voor gezorgd dat we het uiteindelijke doel konden bereiken.

Onze co-promotor Rita Verhelst verdient ook een speciale bedanking voor de begeleiding van school uit. De wijsheid en motiverende woorden hebben ons geholpen deze bachelorproef tot een goed einde te brengen.

Alsook willen we heel graag het ORSI Academy bedanken voor het ter beschikking stellen van de varkens. Zonder Julien, Josephine en Barbara kon de educatieve studie niet worden uitgevoerd.

Ten slotte willen we binnen ons eigen team elkaar bedanken voor de fijne samenwerking. Ieder van ons heeft met enorm veel plezier aan dit onderzoek geschreven. Voor de start van dit onderzoek hadden we nog nooit van een biobank en hun doelstellingen gehoord. Tijdens het schrijven van deze bachelorproef hebben we veel bijgeleerd en een duidelijk inzicht gekregen over de moleculaire achtergrond en de verschillende methoden die in deze pilootstudie aan bod komen. Daarnaast zijn we ook tevreden over alle nieuwe technieken die we hebben aangeleerd. Kortom deze bachelorproef is voor ons een heel leerrijke ervaring geweest!

We wensen u veel leesplezier toe.

Julie Bes, Esther Declair en Violette Ladjal

Gent, 13 juni 2020

INHOUDSOPGAVE

1	Inleiding	12
1.1	Translationeel onderzoek en de functie van een biobank.....	12
1.1.1	Wat is translationeel onderzoek	12
1.1.2	Wat is een biobank.....	12
1.1.3	Soorten biobanken	13
1.1.4	Standaardisatie in biobanken	14
1.1.5	Belang van kwaliteit van samples in de biobank	14
1.2	Stageplaats: Bioresource center Ghent	15
1.3	Pre-analytische variabelen (PAV).....	16
1.3.1	Biologische factoren	17
1.3.2	Technische factoren.....	17
1.4	Kwaliteitsevaluatie van MLM.....	22
1.4.1	RNA-extractie	22
1.4.2	Concentratie en optische dichtheid (OD) ratio.....	22
1.4.3	RNA Integrity Number (RIN)	24
1.4.4	Histologische beoordeling	26
1.5	Onderzoeksopdracht.....	28
1.5.1	Invloed van pre-analytische variabelen op de weefselkwaliteit	28
1.5.2	Herhaalde vriescycli.....	29
2	Materialen en methoden	31
2.1	Prelevatie van dierlijk weefsel	31
2.2	Pre-analytische variabelen (PAV)	31
2.2.1	PAV 1: Weefselgrootte	31
2.2.2	PAV 2: Tijd tussen prelevatie en invriezen	32
2.2.3	PAV 3: Invriesmethoden.....	32
2.2.4	PAV 4: Herhaalde vries- en dooicycli	34
2.3	Verwerking van dierlijk weefsel	35
2.3.1	Manuele RNA-extractie met TRI Reagent®	35
2.3.2	Cryocoupes snijden, kleuren, en inscannen	38
2.4	Analyse kwaliteitscontrole.....	38
2.4.1	Concentratie en OD ratio	38

2.4.2	RIN-score	39
2.4.3	Vriesartefacten coupes.....	40
2.5	Dataverwerking resultaten.....	42
2.5.1	Grafische analyse.....	42
2.5.2	Statistische analyse.....	42
3	Resultaten	43
3.1	Resultaten kwaliteitscontrole (longweefsel)	43
3.1.1	Moleculaire analyse	43
3.1.2	Histologische analyse.....	49
3.2	Resultaten kwaliteitscontrole (leverweefsel)	49
3.2.1	Moleculaire analyse	49
3.2.2	Histologische analyse.....	55
4	Discussie.....	58
4.1	Moleculaire analyse	58
4.1.1	PAV 1: Weefselgrootte	58
4.1.2	PAV 2: Invriestijdstippen	59
4.1.3	PAV 3: Invriesmethoden.....	61
4.1.4	PAV 4: Invries- en ontdooicycli.....	62
4.2	Histologische analyse.....	63
4.2.1	PAV 1: Weefselgrootte	63
4.2.2	PAV 2: Invriestijdstippen	64
4.2.3	PAV 3: Invriesmethoden.....	64
4.2.4	PAV 4: Invries- en ontdooicycli.....	64
5	Besluit	66
	Bibliografie	67

AFKORTINGEN

A.d.h.v.	Aan de hand van
BVT	<i>Belgian Virtual Tumorbank</i>
CTF	<i>Children's Tumor Foundation</i>
DIN	DNA Integrity Number
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Deoxyribonucleïnezuur
ECM	Extracellulaire Matrix
EDTA	Ethyleendiaminetetra-acetaat
FT	<i>Freeze-Thaw</i>
HE	Haematoxyline-Eosine
ICF	<i>Informed Consent Form</i>
ISBER	<i>International Society for Biological and Environmental Repositories</i>
KIT	Koude Ischemie Tijd
KT	Kamertemperatuur
LAF	Laminaire <i>Airflow</i>
M.b.v.	Met Behulp Van
Min	Minuten
MS	<i>Multiple Sclerose</i>
MLM	Menselijk lichaamsmateriaal
mRNA	Messenger Ribonucleïnezuur
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OD	Optische Densiteit
PAV	Pre-Analytische Variabelen
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time PCR</i>
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA	Ribonucleïnezuur
rRNA	Ribosomaal RNA
S	Seconden
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>

SPREC	<i>Standard Preanalytical Code</i>
T.o.v.	Ten opzichte van
tRNA	Transfer RNA
ULT	<i>Ultra Low Temperature</i>
UMC	Universitair Medisch Centrum
UV/VIS	Ultraviolet/ <i>Visible</i>
UZ	Universitair ziekenhuis
WHO	<i>World Health Organization</i>
WIMA	<i>Warm Ischemia-induced Metabolic Activity</i>
WIT	Warme Ischemie Tijd

VERKLARENDE WOORDENLIJST

18S ribosomale RNA-eenheid	Kleine ribosomale subeenheid van eukaryoot rRNA.
28S ribosomale RNA-eenheid	Onderdeel van de grote ribosomale subeenheid van eukaryoot rRNA.
Aliquoteren	Uitverdelen van een hoofdrecipiënt in kleinere aparte hoeveelheden.
Alucup	15 ml aluminium invriespot.
Biologische factoren	Biologische factoren zijn patiënt gerelateerd, waardoor deze moeilijker te controleren zijn.
<i>Brightfield</i>	Bij helderveldmicroscopie wordt een specimen op het draagvlak van de microscoop geplaatst en wordt de lichtbron van de microscoop gericht op een lens/condensor onder het specimen. De condensor bevat meestal ook een diafragma waarmee men de hoeveelheid licht kan regelen. (Microscopemaster, <i>s.d.</i>)
CoolCell™	Invriescontainer waarin 30 cryogene <i>vials</i> traag en gelijkmatig ingevroren kunnen worden. Hierbij zal er per minuut een temperatuurdaling van 1 °C optreden.
<i>Cryovial</i>	Officiële benaming is Cryo.s™. Het is een kleine polypropyleen buis waarin weefsel of vloeistoffen bewaard kunnen worden, en die bestand is tegen extreem lage temperaturen.
Cryopreservatie	Proces dat organellen, cellen, weefsels, etc. preserveert door stalen af te koelen tot zeer lage temperaturen.
Data biobank	Alle medische informatie en persoonlijke gegevens verkregen van de donor.
Downstream	Elke analyse die wordt uitgevoerd na een bepaalde stap bv. RT-PCR na extractie van DNA.
Experimentele bias	Systematische fout gemaakt tijdens onderzoek.

Fundamenteel onderzoek	Het fundamenteel onderzoek houdt zich bezig met de basismechanismen, zoals de werking van een cel.
Heat map	Een visualisatietechniek waarbij aan de hand van (a.d.h.v.) een kleurenschaal achterhaald kan worden hoe de data verdeeld is.
Interfererende factoren	Interfererende factoren zijn proces gerelateerde onderdelen, waarbij fouten kunnen optreden tijdens de staalafname, transport, verwerking en bewaring.
Isopentaaan	Isopentaaan of 2-methylbutaan is 1 van de 3 isomeren van pentaaan. Het is een gevaarlijke substantie dat met uiterste voorzichtigheid behandeld moet worden. Het kookpunt ligt bij kamertemperatuur, waardoor men isopentaaan bij koude temperaturen moet bewaren.
Klinisch onderzoek	Het klinisch onderzoek focust zich op de patiënt waarbij diagnose, behandeling en preventie centraal staat.
Koolzuursneeuw	Een andere benaming is droogijs. Het is de vaste vorm van CO ₂ . Droogijs wordt vaak gebruikt om componenten bij zeer lage temperaturen te bewaren (-80°C).
Kristallisatie	Het proces kristallisatie, gevolgd door kristalgroei, verandert de chaotische moleculaire organisatie van water in vloeibare toestand naar een geordende groepering (ijs). Het gaat hier om schadelijk hexagonale structuren van ijs, die effectief schade berokkenen aan de cel.
Nucleasen	Enzymen die nucleïne-zuren degraderen door het splitsen van fosfodiësterbindingen tussen de monomeren.
OD ratio	Deze ratio geeft de zuiverheid weer van DNA of RNA, en is de verhouding van de absorbanties bij 260 nm en 280 nm.
P-waarde	Het is een statistische maat en wordt gebruikt voor het testen van hypothesen. In klinische studies gebruikt men de p-waarde om aan te duiden indien

een waargenomen resultaat significant is of niet. (Europese patiëntenacademie, 2015)

De algemene norm is een p-waarde $<0,05$, waarbij de kans op toeval kleiner is dan 5%. Dit komt op hetzelfde neer als zeggen dat men 95% zeker is dat het resultaat wel degelijk bekomen is door de oorzaak die men heeft vooropgesteld. (Transcendente Meditatie, *s.d.*)

Postmortaal	Na de dood plaatshebbend.
RIN-score	RNA <i>Integrity Number</i> is een classificatiesysteem dat de kwaliteit van het totaal RNA weergeeft. Het is gebaseerd op een nummeringssysteem van 1 tot 10, waarbij 10 wijst op intact RNA en 1 op gedegradieerd RNA.
RNAlater™	Het is een waterig, niet-toxisch staalopslag reagens dat weefsels snel doordringt om cellulair RNA te stabiliseren en te beschermen. Het minimaliseert de noodzaak om weefselstalen onmiddellijk te verwerken of in vloeibare stikstof in te vriezen.
Significant	Niet op toeval berust, dus betekenisvol.
Trend	Verband tussen data of resultaten.
TRI Reagent®	Het is een mengsel van guanidine thiocynaat en fenol in monofase oplossing, nodig om RNA, DNA of eiwitten te isoleren.
UV/VIS spectrofotometrie	Techniek om de concentratie van een staal te bepalen door de absorptie van ultraviolet (UV) licht of zichtbaar (VIS) licht te meten.
Vitrificatie	Als de temperatuur zakt onder de glas transitie temperatuur, ontstaat er amorf ijs. Hierbij blijven de moleculen in een chaotische organisatie, maar de fysische eigenschappen leunen aan tegen de vaste fase van water. De moleculen komen vast te zitten op hun plaats. Er wordt een verglaasde toestand bekomen. Deze vorm wordt glas genoemd, het proces hiervan heet vitrificatie.

ABSTRACT

Sleutelwoorden: Pre-analytische variabelen (PAV), RNA en RIN, weefselmorfologie, kwaliteitsevaluatie, dierlijk weefsel.

Een biobank is verantwoordelijk voor de collectering, verwerking, bewaring en verdeling van biologisch materiaal met bijhorende data naar onderzoekscentra. Biobanken vormen een belangrijk intermediair bij translationeel onderzoek. Hierbij houdt men zich bezig met de vertaling van fundamenteel wetenschappelijk onderzoek naar klinisch onderzoek.

Deze bachelorproef heeft 2 hoofddoelen. Enerzijds worden verschillende pre-analytische variabelen onderzocht, die mogelijks een invloed kunnen hebben op de kwaliteit van lever- en longweefsel. Het betreft 3 variabelen, namelijk de weefselgrootte, invriestijd en invriesmethode. Anderzijds wordt via de herhaalde ontdooi- en vriescycli de degradatie in functie van de tijd voor zowel long- als leverweefsel onderzocht en opgevolgd gedurende 10 weken.

Het nagaan van de weefselkwaliteit bij beide onderzoeken gebeurt experimenteel via een moleculaire bepaling van de OD ratio en RIN-score, en een histologische beoordeling van cryocoupees.

Invriezen in een *cryovial* bij een kortere koude ischemietijd (KIT) blijkt voor beide weefsels de beste RNA-kwaliteit op te leveren. Bij de verschillende invriesmethoden is er echter geen opvallende trend waarneembaar. Er werd geen significant verschil gevonden tussen de verscheidene condities. RNA blijft zijn stabiliteit behouden, ongeacht de gebruikte methode. Bij de resultaten van de herhaalde ontdooi- en vriescycli geven de baseline en de eerste cyclus de hoogste RNA-concentraties. Verder is er geen opvallend verschil merkbaar tussen de verschillende cycli.

Uit de bekomen morfologische scores bij het leverweefsel kan men concluderen dat zowel een kleinere weefselgrootte als een kortere KIT zullen leiden tot een betere morfologie. Weefsel invriezen in vloeibare stikstof met isopentanaan zorgt voor een minimale hoeveelheid aan vriesartefacten.

Algemeen kunnen we uit dit onderzoek besluiten dat een kleinere weefselgrootte bij een zo kort mogelijke koude ischemietijd de beste RNA-kwaliteit oplevert. Daarnaast blijkt vloeibare stikstof in combinatie met isopentanaan het best de histologische kwaliteit te waarborgen. Uit de bekomen OD ratio's blijkt dat bij alle PAV zuiver RNA wordt verkregen. Echter werd bij alle onderdelen slechts een minimale hoeveelheid data verkregen. Omwille van deze reden is het aangeraden om verder onderzoek uit te voeren. Alsook is het aanbevolen additionele condities te onderzoeken, zoals andere tijdstippen, groottes etc. om de reproduceerbaarheid na te gaan.

1 Inleiding

1.1 *Translationeel onderzoek en de functie van een biobank*

1.1.1 Wat is translationeel onderzoek

Translationeel onderzoek is de vertaling van fundamenteel wetenschappelijk onderzoek naar klinisch onderzoek en vice versa. Translationeel onderzoek wordt onderverdeeld in verschillende fasen. De eerste fase omvat de overdracht van nieuwe inzichten in ziektemechanismen en de ontwikkeling van medicatie, methoden en/of toestellen die geschikt zijn voor humaan gebruik. Het tweede deel bestaat uit het testen van medicatie bij proefpersonen. De laatste fase omvat de overdracht van die resultaten naar de klinische zorgstandaard en de besluitvorming op vlak van gezondheid voor de patiënt. Voor deze studies zijn hoogwaardige biologische stalen vereist, waardoor de experimentele bias daalt en de waarde van klinische onderzoeksresultaten stijgt. Een biobank voldoet aan deze vraag door de beschikbaarheid van goed gedocumenteerde, epidemiologische-, klinische- en biologische stalen met hun bijhorende gegevens. (Vora & Thacker, 2015) (van Geest, 2013)

1.1.2 Wat is een biobank

Een biobank wordt als volgt gedefinieerd door de **ISO20387:2018**: "Een biobank is een juridische instelling die gericht is op het verwerven en opslaan, samen met enkele of alle activiteiten met betrekking tot verzameling, bereiding, conservering, testen, analyseren en verspreiden van gedefinieerd biologisch materiaal, evenals gerelateerde informatie en gegevens." Een biobank is dus verantwoordelijk voor het collecteren, bewaren, verwerken en verdelen van biologisch materiaal en bijhorende data naar onderzoekscentra. Wetenschappers zijn in staat om de oorzaken, gevolgen, preventie, etc. van aandoeningen te achterhalen met behulp van (m.b.v.) dit materiaal. Typisch gaat het om menselijke stalen, zoals weefsel, bloed, lichaamsvloeistoffen, enz. Het Bioresource center Ghent zal later verder besproken worden bij 1.2. (ISO, 2018) (Vora & Thacker, 2015) (Harati et al., 2018)

Biobanken die niet kwaliteitsvol werken volgens deze richtlijnen lopen het gevaar dat, ondanks een goed onderbouwd experiment, slechte resultaten worden bekomen. Afhankelijk van de studieplannen, wordt bepaald hoe de verzameling en verwerking van stalen gebeurt. Door bereiding van meerdere aliquots uit de stalen krijgt men een betere benutting van de biologische stalen voor zowel klinische- als onderzoeksdoeleinden. (Peakman & Elliott, 2010) (Vora & Thacker, 2015) (Harati et al., 2018)

1.1.3 Soorten biobanken

Er bestaan verschillende soorten biobanken, waarvan een kort overzicht wordt gegeven in onderstaande Tabel I:

Tabel I: Overzicht van de verschillende soorten biobanken.

Soort	Uitleg en voorbeeld(en)
Ziektegericht	Verzamelen pathologische stalen en bijhorende informatie van patiënten die lijden aan een specifieke ziekte. De biobank van het universitair medisch centrum (UMC) Utrecht maakt het mogelijk om onderzoek te verrichten naar genetische kenmerken van tumoren. (Vora & Thacker, 2015) (UMC Utrecht, 2017)
Populatie	Verzamelen stalen van vrijwilligers. Er kan een prospectieve <i>follow-up</i> voor gezondheid gerelateerde parameters gebeuren. De onderzoekers in het <i>Mayo Clinic Umbilical cord blood</i> biobank screenen bijvoorbeeld het navelstrengbloed van pasgeborenen voor transplantatie- en stamceldoeleinden. (Mayo clinic, 2019) (Vora & Thacker, 2015)
Genetisch	Stelt de wetenschappers in staat om op genetische niveau verder onderzoek te verrichten naar bv. Multiple sclerose, diabetes... De United Kingdom (UK) biobank verzamelt bloed-, urine- en speekselstalen en voeren genotypering uit bij alle vrijwilligers die lichaamsmateriaal doneren. (Kinkorová, 2015) (UK Biobank, 2019) (Smith & Aufox, 2013)
Weefsel	De <i>Children's Tumor Foundation human tissue</i> biobank bewaart allerlei tumorweefsel afkomstig van kinderen. De tumorbiobank van het universitair ziekenhuis Gent (UZ Gent) behoort ook tot deze categorie. (Kinkorová, 2015) (Children's tumor foundation, s.d.)
Commercieel	Het hoofddoel is het ontwikkelen van controles, diagnostische testen..., met als doel winst te maken. Een voorbeeld is <i>SeraCare Life Sciences Inc.</i> (Anderlik, 2003)
Virtueel	Elektronische centrale database van biologisch materiaal en bijhorende data, ongeacht de opslaglocatie. Een voorbeeld is <i>The Belgian Virtual Tumourbank</i> (BVT). (Kinkorová, 2015) (Belgian cancer registry, 2009)

1.1.4 Standaardisatie in biobanken

Data en biologische stalen worden verzameld onder verscheidene omstandigheden, volgens verschillende normen en voor uiteenlopende doeleinden. Sommige biobanken (zoals het Bioresource center Ghent) hanteren een zeer gecentraliseerde aanpak voor het verzamelen, verwerken en stockeren van menselijk lichaamsmateriaal (MLM). De stalen worden op de collecteerplaats (zoals een bloedafnamecentrum of een operatiezaal) minimaal verwerkt en worden zo snel mogelijk getransporteerd naar een centrale verwerkings- en opslagfaciliteit. Deze aanpak vraagt een robuuste kwaliteitscontrole, data-integriteit en beveiliging. Later zal uitgelegd worden hoe het Bioresource center Ghent deze kwaliteitscontrole uitvoert (cf. 1.2). Andere biobanken zullen ter plaatse de stalen verzamelen en verwerken. Belangrijk hierbij is dat de verzameling, transport en verwerking uniform blijft. (Peakman & Elliott, 2010)

Het belang van gestandaardiseerd verwerken en opslaan van materiaal is aangetoond door een diagnostisch validatie-experiment bij prostaatkanker. Het verschil in de waargenomen profielen is afhankelijk van het verzamelmoment van het serumstaal (voor of na 1996) en werd niet veroorzaakt door de ziektestatus van de patiënt. Een ander voorbeeld is de bewaartemperatuur van biologische stalen. Een temperatuur van -20°C was tot voor kort de norm voor staalbewaring. Door onderzoek naar standaardisatiemethoden, blijkt bewaring bij -80°C de integriteit van stalen op langere termijn beter te behouden. Het belang van deze standaardisatie wordt verder besproken (cf. 1.1.5). (Peakman & Elliott, 2010) (Coppola et al., 2019)

1.1.5 Belang van kwaliteit van samples in de biobank

De ontwikkeling van *Standard Operating procedures* (SOP) voor biobanken kan de kwaliteit van de stalen verhogen. Deze SOP's zijn opgestelde richtlijnen die gebaseerd zijn op de normen van Europese en internationale organisaties, zoals de *International Society for Biological and Environmental Repositories* (ISBER).

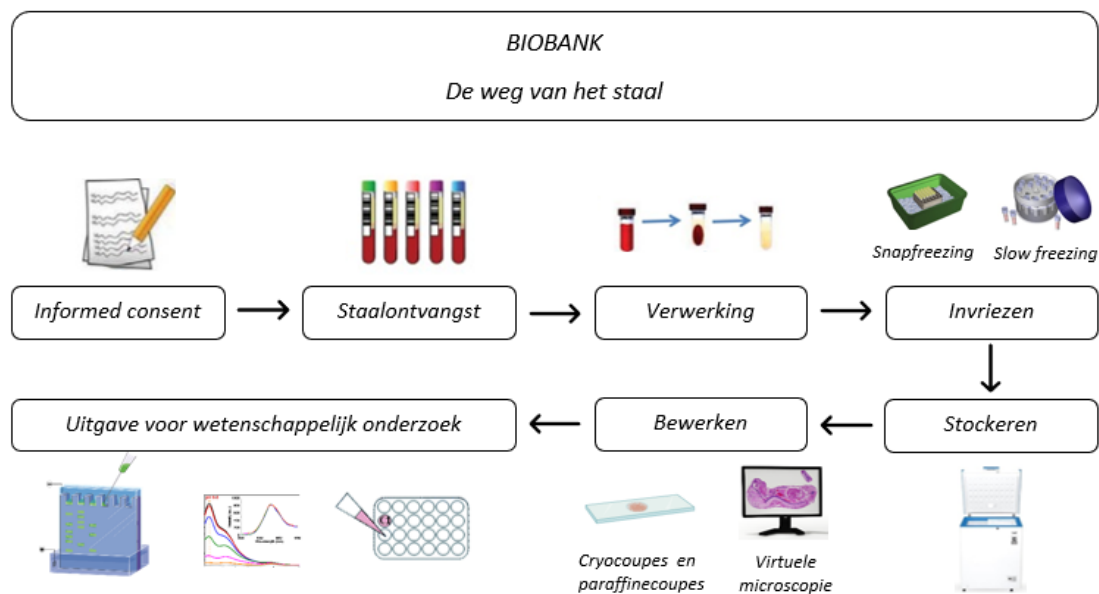
Het standaardiseren van pre-analytische factoren omtrent weefselstalen is noodzakelijk voor verder klinisch- en biomedisch onderzoek (bv. multicentrische studies), kwaliteitscontroles en validaties. De standaardisatie gebeurt aan de hand van een opgestelde code, namelijk *Standard Preanalytical Code* (SPREC). Elk staal is voorzien van een code die overeenkomt met zeven pre-analytische variabelen. Verder bestaat de code uit een reeks van 11 (voor vloeistoffen) of 13 (voor solide weefsels) letters in een specifieke volgorde, gescheiden door 6 koppeltokens (cf. Bijlage 18). SPREC omvat de belangrijkste staal-, collectie-, en verwerkingstypes. Deze code geeft onmiddellijk een beoordeling weer van elke uitgevoerde pre-analytische stap en onder welke strikte kwaliteitsvoorwaarden de stalen worden verwerkt. (Betsou et al., 2010)

1.2 Stageplaats: Bioresource center Ghent

Het Bioresource center Ghent is de centrale biobank van het UZ Gent. Hier wordt MLM, alsook een beperkte hoeveelheid dierlijk materiaal, verwerkt en gestockeerd voor translationeel wetenschappelijk onderzoek. Momenteel worden hier ongeveer 290.000 klinische stalen uit verschillende onderzoeksdomeinen gestockeerd. Deze bestaan uit zowel prospectieve als historische collecties.

Eén van de belangrijkste functies van het Bioresource center Ghent is het operationeel ondersteunen van onderzoekers (cf. Figuur 1). Eerst dient de patiënt toestemming te geven om mee te werken aan de studie.

Er wordt namelijk vereist door de wet van 19 december 2008 (verkrijgen en gebruik van MLM) dat onderzoekers een *informed consent form* (ICF) moeten opstellen. Dit is een document dat de autonomie van de donor respecteert en hiermee toestemming geeft om stalen te doneren. Volgens de huidige richtlijnen moet dit document het studieverloop en de risico's zeer specifiek in goed begrijpbare taal beschrijven. Het koninklijk besluit van 9 januari 2018 handelt uitvoerig over het gebruik van MLM via biobanken. (Hansson, 2008) (Budimir et al., 2011)



Figuur 1: Overzichtsschema van de werking van het Bioresource center Ghent. Een voorstelling van de weg dat een staal in de biobank doorloopt, volgens volgende procedure: *Informed consent*, staalontvangst, staalverwerking, invriezen en stockeren, met tot slot de uitgave voor wetenschappelijk onderzoek.

Na ondertekening van het ICF kan donormateriaal gecollecteerd worden voor opslag in de biobank. Het gaat om een brede waaier aan soorten stalen, zoals bloed (serum, plasma), weefsels, cellijnen, deoxyribonucleïnezuren (DNA), ribonucleïnezuren (RNA), urine enz.

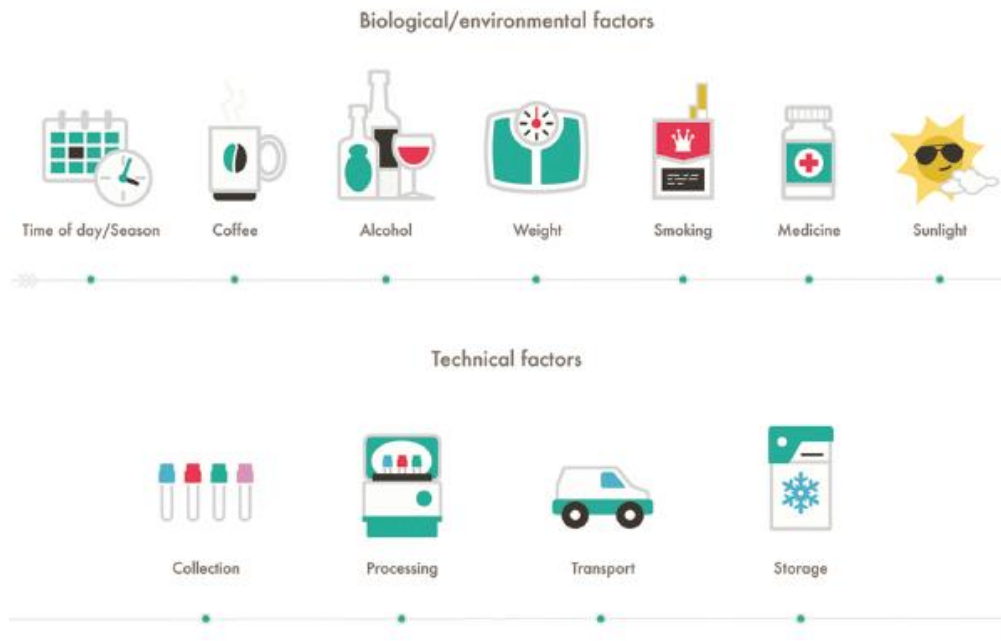
De operationele ondersteuning bestaat uit volgende onderdelen:

- Staalregistratie in een databank aan de hand van een unieke, studiespecifieke code;
- Staalverwerking (bv. lymfocytenisolatie of serumbereiding) en -opslag (kamertemperatuur (KT; 20-22°C) tot -196°C) aan de hand van een *risk managementsysteem*;
 - Dit systeem wijst meerdere locaties toe aan identieke aliquots, waardoor deze niet allemaal in eenzelfde vriezer of stikstofvat worden bewaard. Dit is een veiligheidssysteem als één van de vriezers of stikstofvaten defecten zou vertonen.
- Uitverdeling van vloeibare en solide stalen bij verschillende temperaturen (KT; 0 tot -3°C of 37°C);
- Maken van cryo- en paraffinecoupes voor histologisch onderzoek;
- Inscannen van coupes m.b.v. de virtuele microscoop;
- Kwaliteitscontroles aan de hand van (a.d.h.v.) een nucleïnezurenisolatie (manueel of half-geautomatiseerd) en bijhorende integriteitscontrole via een DNA *Integrity Number* (DIN) of RNA *Integrity Number* (RIN) bepaling. (T'Joen, Phlypo, & Bekaert, 2018)

1.3 Pre-analytische variabelen (PAV)

De pre-analytische fase wijst op alle stappen en processen voorafgaande het uitvoeren van de eigenlijke analyses. Variabiliteit van deze PAV zal een invloed hebben op de resultaten en het verder verloop van *downstream*-analyses. Deze variabelen moeten in de mate van het mogelijke gecontroleerd worden zodat er een minimale variabiliteit ontstaat tussen verschillende stalen in eenzelfde analyse. De kennis over deze variabelen is daarom van fundamenteel belang. (Carraro, Zago, & Plebani, 2012)

Pre-analytische factoren kunnen onderverdeeld worden in biologische- en interfererende factoren. Figuur 2 geeft hiervan een onderverdeling weer. (Ellervik & Vaught, 2015)



Figuur 2: Verschillende soorten pre-analytische variabelen die een invloed kunnen uitoefenen op de analytische resultaten. Deze variabelen kunnen onderverdeeld worden in de biologische (patiënt gerelateerd), interfererende of technische factoren (proces gerelateerd). (Ellervik & Vaught, 2015)

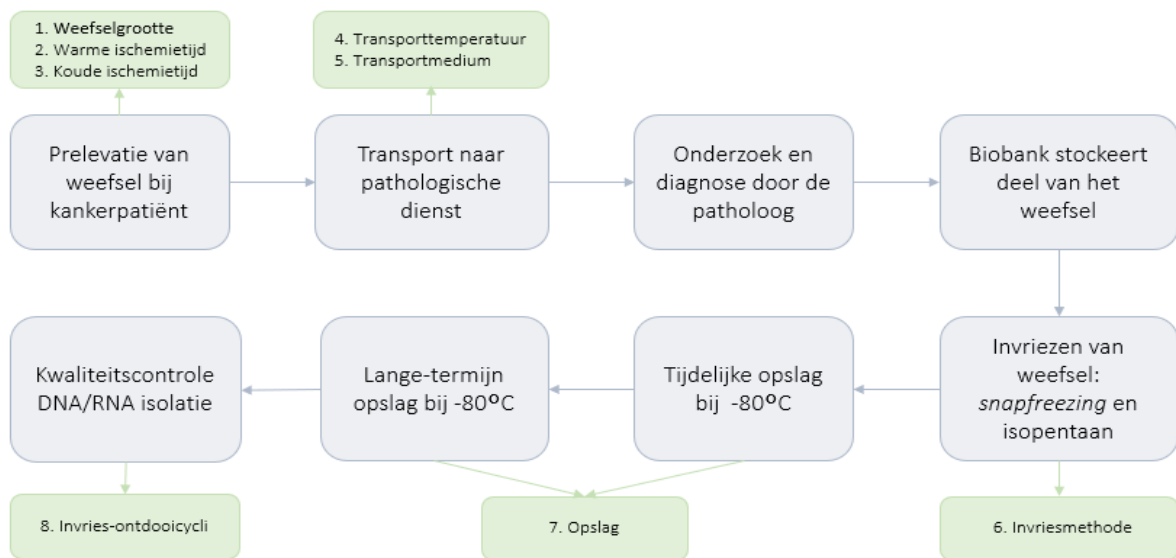
1.3.1 Biologische factoren

Bij de biologische factoren kan een onderscheid gemaakt worden tussen extrinsieke en intrinsieke factoren. Intrinsieke factoren zijn eigen aan de patiënt, waardoor men deze dus niet kan controleren of wijzigen. Hiermee moet men rekening houden tijdens de interpretatie van de resultaten. Voorbeelden hiervan zijn leeftijd, ras, geslacht, zwangerschap et cetera.

Extrinsieke/variabele factoren dient men in acht te nemen tijdens de staalafname. Deze variabelen kan men proberen uitsluiten, maar hierbij is de medewerking van de patiënt vereist. Hierdoor is het cruciaal de patiënt voldoende in te lichten over de vereiste toestand. Het gaat over tijdsgebonden fluctuaties, stress, voeding, fysieke inspanning, medicatie, enz. (Ellervik & Vaught, 2015)

1.3.2 Technische factoren

In een biobank worden verschillende types MLM gestockeerd, waarbij in een tumorbiobank de nadruk ligt op het collecteren en verzamelen van tumoraal weefsel. Een voorbeeld van een mogelijke workflow in een tumorbiobank wordt weergegeven in Figuur 3. Bij ieder onderdeel zijn de bijhorende pre-analytische variabelen weergegeven die de staalkwaliteit kunnen beïnvloeden. (Betsou et al., 2009)



Figuur 3: Voorstelling van de workflow in een tumorbiobank, met bijhorende pre-analytische variabelen die hierop een invloed kunnen uitoefenen. De vernoemde PAV (groene kaders) worden hieronder verder toegelicht.

1.3.2.1 Staalcollectie

Warme ischemietijd (WIT)

De WIT is de periode waarbij het weefsel voor een korte tijd op lichaamstemperatuur ($\pm 37^{\circ}\text{C}$) blijft, omdat de bloedtoevoer naar het weefsel wordt afgeklemd. Deze variabele is zeer moeilijk te controleren, aangezien het afhankelijk is van het verloop van de ingreep en de veiligheid van de patiënt. (Shabihkhani et al., 2014)

Koude ischemietijd (KIT)

Het geïncubeerde weefsel koelt af vooraleer het wordt ingevroren of bewerkt. De tijd tussen weefselafname en invriezen, is de KIT. Deze factor kan, ten gevolge van transport, oplopen tot enkele uren. Hoe korter dit tijdsinterval, hoe optimaler de RNA-kwaliteit zal zijn. Zowel de weefseldegradatie als de kans op artefacten worden dan tot een minimum herleid. (Grizzle, Otali, Sexton, & Atherton, 2016)

Zowel de WIT als de KIT beïnvloeden de celviabiliteit en de moleculaire werking. De KIT beïnvloedt veranderingen in de transcriptie, genen en mRNA. Ook worden proteïneveranderingen gecorreleerd met veranderingen in genen. Uit onderzoek van Ma, Dai, & Kong, 2012 blijkt de warme ischemie-geïnduceerde metabole activiteit (WIMA) te leiden tot veranderingen in het transcriptieniveau van bepaalde genen. Hierdoor stelt dit onderzoek voor om de effecten van zowel de WIT als de WIMA te integreren in biobanken, zodat de kwaliteit van stalen verzekerd kan worden. (Guerrera et al., 2016) (Ma, Dai, & Kong, 2012) (Grizzle, Otali, Sexton, & Atherton, 2016)

1.3.2.2 Staalverwerking

Weefselgrootte

Een orgaan kan in zijn geheel bewaard worden, maar wordt meestal versneden in kleinere stukken. Het versnijden van grote stukken weefsel zorgt ervoor dat het invriesproces versnelt, wat een invloed zal hebben op zowel de moleculaire als histologische kwaliteit. Vries- en dooicycli worden best vermeden, wat in de meeste gevallen gunstig is voor de weefselkwaliteit.

Er zijn ook nadelige effecten verbonden aan het versnijden van weefsel. Bij grotere stukken weefsel komt de kern minder in contact met zuurstof dan het buitenoppervlak. Bij kleine stukken daarentegen, zal de kern meer blootgesteld worden aan zuurstof en kan er schade optreden door oxidatie. Verder bevatten weefsels nucleasen die tijdens het snijden vrij kunnen komen. Deze schadelijke enzymen kunnen nucleïnezuren degraderen.

De weefselgrootte speelt een rol in het vermogen om *downstream* moleculaire analyses uit te voeren. Afhankelijk van het type moleculaire analyse is een bepaalde grootte vereist. (Kap, Oomen, Arshad, de Jong, & Riegman, 2014)

Invriesmethode

Om stalen in te vriezen kan er zowel gebruik worden gemaakt van *snapfreezing* als van *slow freezing*. Bij *slow freezing* zullen de stalen geleidelijk aan afkoelen m.b.v. een *Coolcell*TM, waarbij de temperatuur daalt met 1°C per minuut. Deze invriesmethode verkleint de kans op ijskristalvorming, waardoor celschade tot een minimum wordt herleid. Een nadeel van deze methode is dat deze kan leiden tot een variatie in kwaliteit tussen de kern en het buitenoppervlak van het weefsel. (Thermofisher, *s.d.*) (Neumeister, 2014)

Tijdens *snapfreezing* wordt het weefsel bij een lage temperatuur (tussen -80°C en -196°C) op een korte periode ingevroren. Hierdoor worden de nucleïnezuren in het weefsel goed bewaard, aangezien de vorming van ijskristallen wordt voorkomen. Soms kunnen er zich toch ijskristallen vormen, wat kan leiden tot zoutophoping en celschade. *Snapfreezing* vertraagt de werking van nucleasen en proteasen. Zo zal de integriteit van het materiaal, zoals RNA, DNA en eiwitten, beter bewaard blijven. (Thermofisher, *s.d.*) (Neumeister, 2014)

Deze technieken worden vaak uitgevoerd m.b.v. isopentaan, droogijs of vloeibare stikstof. Isopentaan is een goede cryogeleider, die ervoor zal zorgen dat het weefsel snel en gelijkmatig bevriest. Isopentaan in combinatie met droogijs (-80°C) of vloeibare stikstof (-196°C) wordt algemeen aanvaard als de standaardprocedure. Droogijs is de vaste vorm van koolstofdioxide, die geen vocht nalaat wanneer het smelt. Droogijs is dus ideaal voor het transporteren van weefsel dat koel bewaard moet worden. Vloeibare stikstof vormt een dampscherm wanneer het in contact komt met een hogere temperatuur, waardoor het fungeert als isolator. Hierdoor zal het weefsel langzamer en ongelijk bevroren, wat kan leiden tot barsten van het weefsel.

In combinatie met isopentaaan kan dit voorkomen worden, aangezien isopentaaan de dampvorming verhindert. Omwille van veiligheidsredenen kan er gebruik worden gemaakt van een CryoPod™ Carrier (cf. Bijlage 11). (Steu et al., 2008)(Alpha, s.d.) (Brooks life sciences, s.d.) (Cunical lab products, 2015)

Invries- en ontdooicycli

De tolerantie voor invries- en ontdooicycli is afhankelijk van het weefseltype. Deze cycli hebben in de meeste gevallen geen gunstig effect op de kwaliteit, aangezien ze zullen leiden tot de degradatie van nucleïnezuren. Deze degradatie kan een onvoorspelbare invloed hebben op de genexpressie-analyse. Dit heeft voornamelijk effect op de expressie van *messenger* RNA (mRNA) en de RNA-integriteit. (Guerrera et al., 2016) (Ma, Dai, & Kong, 2012) (Grizzle, Otali, Sexton, & Atherton, 2016) (Klebe et al., 1996)

De mate van degradatie is ook afhankelijk van het aantal vries-dooi cycli. Het onderzoek van Jochumsen haalt aan dat de genetische expressieprofielen niet wijzigen door het weefsel drie keer te onderwerpen aan vries- en dooicycli. De onderzoeksgroep van Botling beweert dat weefsel pas na zes herhaaldelijke vriescycli een minimale RNA afbraak induceert. Een klein aantal cycli, alsook een korte ontdooitijd, zal resulteren in een beperkte afbraak. Een mogelijke oplossing is het bewaren van stalen in kleinere aliquots. (Ji et al., 2017) (Shabihkhani et al., 2014) (Shabihkhani et al., 2014)

1.3.2.3 Staaltransport

Transporttemperatuur

De transporttemperatuur heeft een invloed op de omvang van de metabolische veranderingen in het weefsel en bijgevolg ook de kwaliteit. Hoe hoger de temperatuur, hoe hoger de activiteit van schadelijke enzymen. Stalen die bij 4°C tot -3°C worden getransporteerd, zullen minder histologische en moleculaire degradatie vertonen dan stalen die bij KT of bij lichaamstemperatuur worden verplaatst. (Betsou et al., 2009)

Transportmedium

Tijdens het transport kan weefsel droog of in een medium verplaatst worden. Voorbeelden van een transportmedium zijn RNA/ater™ of een fysiologische zoutoplossing (0,9% (w/v) natriumchloride). Beide oplossingen dringen snel het weefsel binnen en stabiliseren zo het RNA.

Weefsels die droog worden getransporteerd, kunnen artefacten vertonen door uitdroging aan de lucht. Om dit te minimaliseren, kan het weefsel getransporteerd worden in een fysiologische zoutoplossing. Het zout van deze oplossing kan echter diffunderen in het weefsel, en tijdens het invriezen neerslaan. Dit heeft tijdens het versnijden een nadelig effect op de weefselkwaliteit. Het zout kan daarnaast ook de weefselmorfologie beïnvloeden. (Micke et al., 2006) (Kap, Oomen, Arshad, de Jong, & Riegman, 2014)

In eerder onderzoek van Micke et al. werd aangetoond dat er minder morfologische artefacten ontstaan wanneer het weefsel droog wordt getransporteerd. (Micke et al., 2006) (Kap, Oomen, Arshad, de Jong, & Riegman, 2014)

De transporttemperatuur en het transportmedium hebben een invloed op de RNA-integriteit en genexpressie. De studie van Micke et al. toont aan dat RNA ongewijzigd kan blijven tijdens transport, maar dat er wel veranderingen in de genexpressie kunnen plaatsgrijpen. Om een betrouwbare RNA-kwaliteit en genexpressie te garanderen, wordt aangeraden om het weefsel op ijs te transporteren. (Micke et al., 2006)

1.3.2.4 Staalopslag

Opslagtemperatuur

Een biologisch staal kan bewaard worden bij verschillende temperaturen (KT tot -196°C). De opslagtemperatuur is afhankelijk van het type staal, het onderzoek waarvoor het staal wordt ingevroren en het garanderen van een optimale kwaliteit.

Wanneer weefsel wordt gestockeerd voor een langere termijn, zijn ultra lage temperaturen (ULT; tussen -80°C en -150°C) vereist voor een succesvolle bewaring. Bij -20°C grijpt zowel weefselafbraak als ijskristalvorming plaats. Hoe lager de temperatuur, hoe beter de houdbaarheid en de kwaliteit van het weefsel. Bij -80°C kunnen zowel DNA als eiwitten jarenlang bewaard worden met een goede kwaliteit. RNA daarentegen, kan na 5 jaar afbraak vertonen. Weefsel invriezen in een RNA-stabiliserende oplossing, zoals RNA*later*TM, kan hiervoor een oplossing bieden. (Shabihkhani et al., 2014) (Karlsson & Toner, 1996)

De vorming van ijskristallen heeft een grote invloed op de weefselkwaliteit. Deze kristallisatie kan voorkomen worden wanneer de invriestemperatuur lager ligt dan de smeltemperatuur en/of als de koeling heel snel gebeurt. De smeltemperatuur van water ligt rond 0°C , dus men dient bij veel lagere temperaturen in te vriezen.

Om de overleving van nucleïnezuren te bevorderen, worden vaak cryoprotectieve middelen toegevoegd zoals glycerol of dimethylsulfoxide (DMSO). Dergelijke producten beperken de hoeveelheid ijs dat zal worden gevormd in de onbevoren ruimtes tussen de kristallen. DMSO zal de elektrolytconcentratie in de resterende niet-bevoren oplossing in en rond een cel verminderen. Hierdoor worden geen schadelijke concentraties aan zouten bereikt. (Wowk, 2010)

1.4 Kwaliteitsevaluatie van MLM

Een kwaliteitsevaluatie kan zowel via een RNA- als DNA-extractie uitgevoerd worden, gevolgd door een kwantificering en een integriteitscontrole aan de hand van een DIN- of RIN-bepaling. Men kan ook een morfologische analyse van het weefsel uitvoeren aan de hand van weefselcoupes. De evaluatie van DNA wordt niet besproken, aangezien er in deze bachelorproef gefocust wordt op RNA, met de bijhorende RIN-score en weefselmorfologie.

1.4.1 RNA-extractie

De isolatie van RNA start met het lyseren van de cellen, waarbij de celstructuur wordt verstoord om een lysaat te bekomen. Daarnaast worden cellulaire nucleasen, zoals DNase en RNase, geïnactiveerd. Tot slot volgt de scheiding van het gewenste RNA van andere celresten, zoals DNA en proteïnen. RNA kan op verschillende manieren opgezuiverd worden, bijvoorbeeld via kolom gebaseerde extracties, automatische extracties m.b.v. de QIAcube enz. In dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van de manuele methode met TRI Reagent®, een mengsel van guanidine thiocynaat en fenol in monofasische oplossing. Een belangrijke functie van deze stof is de inhibitie van de RNase activiteit.

Een veelvoorkomend extractieproces is die van fenolchloroform, waarbij het RNA wordt geëxtraheerd met fenol/chloroform bij een verlaagde zuurtegraad. Fenol en guanidine thiocynaat denatureren snel de eiwitten, maar remt de RNase-activiteit niet volledig. Dit kan opgelost worden door toevoeging van chloroform, zodat er een zure oplossing ontstaat. In een zure omgeving blijft totaal RNA in de bovenste waterfase van het hele mengsel, terwijl DNA en eiwitten in de tussenfase of lagere organische fase blijven. Na toevoeging van isopropanol zal het RNA precipiteren in een witte neerslag. Zie Figuur 11 voor een visualisatie van de fasescheidingen.

Het geïsoleerde RNA kan verder worden gebruikt voor verschillende *downstream* toepassingen, inclusief *real-time polymerase chain reaction* (RT-PCR), amplificatie voor array-analyses, hybridisatiebepalingen of translatie *in vitro*. De RNA-opbrengst is afhankelijk van een aantal factoren, zoals het staaltype, staalbehandelingen, et cetera (Merck sigma aldrich, *s.d.*) (Shen, 2019) (Chomczynski & Sacchi, 2006) (Tan & Yiap, 2009)

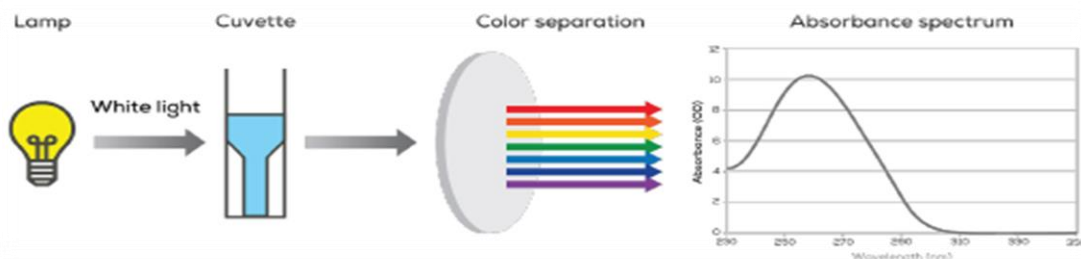
1.4.2 Concentratie en optische dichtheid (OD) ratio

De RNA-concentratie en optische dichtheid (OD) ratio kunnen bepaald worden op basis van het principe van ultraviolet/*visible* (UV/VIS) spectrofotometrie. Wanneer een lichtstraal op een vloeistof wordt gericht, zal deze een deel van het licht absorberen. De absorptie is afhankelijk van de componenten in de vloeistof, de optische weglengte en de concentratie. De relatie tussen deze variabelen wordt weergegeven in de wet van Lambert-Beer (cf. Vergelijking 1).

$$A = \epsilon\lambda * C * l$$

Vergelijking 1: De wet van Lambert-Beer. A = absorptie/extinctie (geen eenheid); $\epsilon\lambda$ = extinctiecoëfficiënt (een constante bij bepaalde golflengte en specifieke stof, $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$); C = concentratie (mol/l); l = optische weglengte/cuvetbreedte (cm) (Perkampus, 2013)

Door deze wet toe te passen, kan de concentratie a.d.h.v. het absorptiespectrum van een staal bepaald worden na het meten van de absorptie (cf. Figuur 4). Het gebruik van een UV/VIS spectrofotometer laat toe de lichtintensiteit voor en na transmissie te meten bij een specifieke golflengte. Uit dit spectrum kan vervolgens de concentratie bepaald worden aan de hand van bovenstaande wet. (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2016) (Perkamentus, 2013)



Figuur 4: Dit schema geeft het principe en de werking van een UV/VIS spectrofotometer weer. Wit licht schijnt door een staal in een cuvet met een vaste optische weglengte. Het staal absorbeert verschillende golflengten van het licht. Het licht wordt door middel van een diffractierooster gescheiden in de afzonderlijke golflengten. Deze worden gedetecteerd en omgezet in een specifiek absorptiespectrum. (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2016)

Nucleïnezuren hebben een absorptiemaximum bij een golflengte van 260 nm. De spectrofotografische aflezing bij deze golflengte is dan ook de meest gebruikelijke methode om nucleïnezuren te detecteren. Op basis van de wet van Lambert-Beer kan de RNA-concentratie berekend worden. RNA heeft een extinctiecoëfficiënt van $0,025 (mg/ml)^{-1}cm^{-1}$. Wanneer een absorptiewaarde van 1,0 gemeten wordt in een cuvet met een weglengte van 1,0 cm, bekomt men een concentratie van 40 ng/ μ l. (ThermoFisher Scientific, s.d.)

$$A = \epsilon\lambda * C_{ref} * l \Leftrightarrow C_{ref} = \frac{A}{\epsilon\lambda * l}$$

$$\Leftrightarrow C_{ref} = \frac{1,0}{0,025 * 1,0} \Leftrightarrow C_{ref} = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Vergelijking 2: Bepaling standaard RNA-concentratie. Op basis van de wet van Lambert-Beer wordt de standaard RNA-concentratie bepaald bij een gemeten absorptiewaarde van 1,0. ($\epsilon\lambda = 0,025 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$; l = 1,0 cm)

Een gemeten absorptiewaarde van 1,0 komt overeen met een RNA-concentratie van 40 ng/ μ l. Aan de hand van de gemeten absorptiewaarde kan de RNA-concentratie bepaald worden a.d.h.v. Vergelijking 3.

$$C = A_{260} * 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Vergelijking 3: Formule om de RNA-concentratie te berekenen a.d.h.v. de gemeten absorptiewaarde.

Zowel eiwitten als nucleïnezuren absorberen UV-licht, maar hebben verschillende absorptiecurves en -pieken. Zoals eerder vermeld hebben nucleïnezuren een absorptiepiek bij 260 nm. Eiwitten daarentegen vertonen een piek bij een golflengte van 280 nm. De zuiverheid van RNA wordt bepaald door de verhouding te nemen tussen de 2 absorptiepieken van 260 nm en 280 nm. Deze verhouding wordt ook de OD ratio genoemd. Wanneer deze een waarde aanneemt van ongeveer 2, wijst dit op zuiver RNA. Afwijkende waarden kunnen duiden op onzuiverheden van eiwitten, fenol of andere aromatische verbindingen. Op basis van de resultaten van de OD ratio wordt een score toegekend voor de kwaliteit van RNA. (Shabihkhani et al., 2014) (Perkampus, 2013) (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2016)

Andere onzuiverheden, zoals ethyleendiaminetetra-acetaat (EDTA), guanidine of koolhydraten absorberen voornamelijk UV-licht bij 230 nm. Ook eiwitten met weinig aromatische aminozuurresiduen vertonen bij dezelfde golflengte een piek. Dit maakt ook de A260/A230 verhouding een waardevolle indicator. Voor een zuiver staal heeft deze verhouding een waarde groter dan 1,8. (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2016) (Shabihkhani et al., 2014)

1.4.3 RNA Integrity Number (RIN)

De beoordeling van de RNA-integriteit a.d.h.v. de RIN-score is een belangrijk criterium om een correct staal te selecteren voor de gekozen analyse.

De meest gebruikelijke manier om de RNA-integriteit te bepalen is de verhouding tussen de 18S en 28S ribosomale RNA-eenheden. Deze ratio geeft een beeld weer omtrent de RNA-degradatie. Wanneer totaal intact RNA via een gelelektroforese geanalyseerd wordt, zullen de 2 ribosomale eenheden als pieken verkregen worden (cf. Figuur 5). Bij gedeeltelijk gedegradateerd RNA zal er een lagere 18S/28S-ratio bekomen worden en zullen de banden minder duidelijk afgelijnd zijn. Naarmate de afbraak vordert, zal de ratio afnemen. Bij volledig gedegradateerd RNA zal er enkel een vervaagde band te zien zijn met een laagmoleculair gewicht. In praktijk wordt RNA met een verhouding van 2 beschouwd als intact RNA van hoge kwaliteit (cf. 1.4.2).

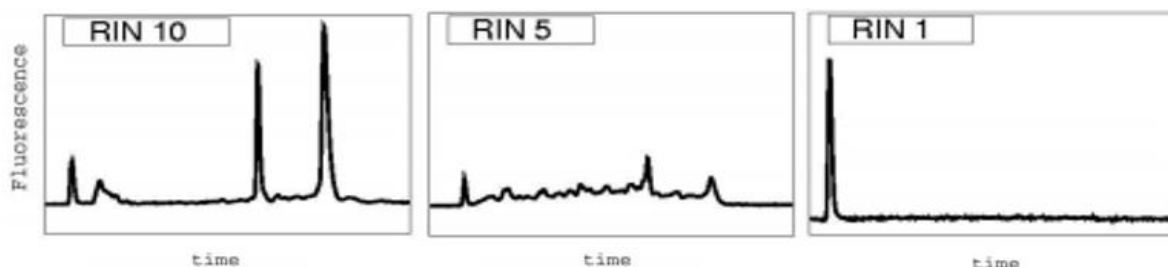
De beoordeling van een elektroforese staal is subjectief, afhankelijk van verschillende parameters en het vertoont een zwakke correlatie met RNA-kwaliteit. Aan de hand van de RIN-score kan de integriteit nauwkeurig en gestandaardiseerd bepaald worden. Men maakt een indeling van de score op een schaal van 1 tot 10, waarbij 1 wijst op volledig gedegradateerd RNA en 10 op intact RNA. Op deze manier wordt de interpretatie van het elektroferogram en de resultaten geautomatiseerd en objectiever. (Grizzle, Otali, Sexton, & Atherton, 2016) (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2016) (Shabihkhani et al., 2014) (Schroeder et al., 2006)

Afhankelijk van de verkregen score kan men bepalen voor welke doeleinden het staal nog gebruikt kan worden. Zo zijn stalen met een hoge RNA-kwaliteit, en dus een RIN-score van 8 of hoger, noodzakelijk om een betrouwbare *Next Generation Sequencing* (NGS) uit te voeren. Nucleïnezuren met een lagere kwaliteit kunnen worden gebruikt voor standaard genexpressie technieken. RNA met een score lager dan 7 kan niet worden gebruikt voor een microarray-analyse. Een score van 5 of hoger is vereist om een correcte qRT-PCR te kunnen uitvoeren en deze stalen zijn ook toepasbaar voor mRNA-analyses. (Shabihkhani et al., 2014) (Guerrera et al., 2016)

Met behulp van de 2100 BioAnalyzer van Agilent en bijhorende kits kan deze score vastgelegd worden. RNA-stalen worden door middel van microchip elektroforese volgens hun molecuulgewicht gescheiden, en vervolgens via laser geïnduceerde fluorescentie gedetecteerd. De software genereert voor ieder staal zowel een elektroferogram, voor een visuele beoordeling, alsook een waarde voor de concentratie en de zuiverheid. Hierbij correleert de gemeten hoeveelheid fluorescentie met de hoeveelheid RNA van een bepaalde grootte. Een kwaliteitsvermindering resulteert in een afname van de signaalintensiteit voor de 18S en 28S ribosomale banden. Achtergrondinformatie omtrent de 2100 BioAnalyzer is te vinden in Bijlage 17.

Door de weergave van de verschillende groottes van de RNA-fragmenten op een elektroferogram, kan de intactheid van het RNA beoordeeld worden. Wanneer een onverwachte piek in een bepaalde regio wordt waargenomen, zal het toestel een foutmelding weergeven. Mogelijke oorzaken hiervan zijn contaminaties met DNA, spookpieken, spikes en golvende baselines.

In Figuur 5 worden elektroferogrammen voorgesteld met bijhorende RIN-scores. In ideale omstandigheden wordt een piek verwacht bij zowel de 18S als 28S ribosomale eenheid, wat resulteert in intact RNA met een RIN-score van 10. Wanneer een verschuiving naar links en vermeerdering van pieken optreedt, wijst dit op een afname van het RNA met een bijhorende lagere RIN-score. (Lightfoot, 2002) (Schroeder et al., 2006) (Micke et al., 2006) (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2016)



Figuur 5: Voorstelling van elektroferogrammen met bijhorende RIN-scores. De RIN-waarden variëren van 10 (intact RNA) naar 1 (gedegradieerd RNA). De geleidelijke afbraak van RNA is te zien door de continue verschuiving van de pieken. Deze verschuiven naar links en wijzen op kleinere RNA-fragmenten. (Schroeder et al., 2006)

1.4.4 Histologische beoordeling

Weefsel wordt eerst macroscopisch beoordeeld (grootte, aantal fragmenten, afwijkingen, kleur enz.), waarna het versneden en verwerkt wordt tot coupes. De microscopische beoordeling gebeurt m.b.v. histologische technieken om een mogelijke pathologie vast te stellen.

1.4.4.1 Cryostaat

Een cryostaat is een gekoelde kamer (tot -30°C) die een microtoom bevat waarmee men ingevroren weefsels tot cryocoupes kan snijden. De kwaliteit van een cryocoupe is minder goed in vergelijking met een paraffinecoupe. Deze paraffine ingebedde weefsels geven een betere resolutie, omdat de secties van paraffinecoupes dunner gesneden kunnen worden. Toch heeft het gebruik van cryocoupes verschillende voordelen:

- Minder tijdrovend door gemakkelijke procedure (geen inbeddingprocedure in paraffine of weefselontdooiing nodig en snel opgeleid personeel);
- Oorspronkelijke kwaliteit van het weefsel blijft behouden;
- Betere preservatie van de nucleïne-zuren. (Novus biologicals, *s.d.*) (Peters, 2011)

1.4.4.2 Coupes kleuren met haematoxyline-eosine (HE)

Ongekleurde coupes zijn transparant en vertonen weinig contrast tussen de verschillende weefselcomponenten. Een HE-kleuring kleurt deze componenten en wordt vaak toegepast wanneer een patholoog naar een biopt van een mogelijke kanker kijkt.

De basische kleurstof haematoxyline heeft zelf geen kleureigenschappen, enkel wanneer het door oxidatie wordt omgezet in haemateïne. De structuur van deze kleurstof vertoont een positief geladen ion, waardoor het zich als een acidofiele kleurstof gedraagt. De zure eosine daarentegen is een basofiele stof die de typische roze kleur veroorzaakt. Weefselstructuren vertonen een verschillende affiniteit voor deze voorgenoemde kleurstoffen. Op basis van deze affiniteit wordt een differentiatie van de weefselstructuren mogelijk (cf. Tabel II). (Giri, 2020)

Tabel II: Kleuring van cel componenten na een HE-kleuring.

Haematoxyline (basisch, paars)	Aankleuring basofiele (zure) structuren: kernen (chromatine), ribosomen, RNA rijk cytoplasmatisch gebied, kraakbeen en calciumneerslag. (Giri, 2020)
Eosine (zuur, rood)	Aankleuring acidofiele (basische) structuren: cytoplasma, extracellulaire matrix (ECM), eiwitten, rode bloedcellen. (Giri, 2020)

1.4.4.3 Coupes scannen met virtuele microscoop

De Panoramic 250 van Sysmex is een virtuele microscoop, die zowel manueel als automatisch tot 250 gekleurde *Brightfield* of fluorescente coupes kan scannen. De Panoramic 250 is ontworpen om invallend en gereflecteerd licht te gebruiken om biologische stalen en weefsels te digitaliseren. Het digitale beeld wordt opgenomen door een continue schuifbeweging van een stroboscooplichtbron in een repetitief ritme. Het laadt en detecteert het staal op de coupe, leest de barcode en scant de coupe bij een constante kwaliteit. De virtuele microscoop kan coupes inscannen op een vergroting van 20x en 40x. (3DHistech, 2018)

1.4.4.4 Vriesartefacten cryocoupes

Het is belangrijk dat een patholoog het onderscheid kan maken tussen een artefact en een pathologisch verschijnsel. Artefacten zijn weefselveranderingen op een microscopisch objectglas die worden veroorzaakt door tal van externe factoren. (Rastogi, 2013)

Hieronder staan enkele voorbeelden vermeld, waardoor artefacten kunnen optreden, en bijgevolg zoveel mogelijk geminimaliseerd dienen te worden:

Tabel III: Soorten artefacten en enkele voorbeelden. (Bindhu, Krishnapillai, Thomas, & Jayanthi, 2013)

Artefacten	Voorbeeld(en)
Biopsie	Compressieartefacten door gebruik van instrumenten zoals een tang, of uitdroging van het weefsel door gebruik van chemicaliën waarmee instrumenten gesteriliseerd worden.
Verwerking	Weefselcontaminatie, door bijvoorbeeld een vuile werkbank, of oprullen van weefselcoupes kan zorgen voor plooiën.
Snijtechniek	Krassen op de coupe door inkepingen in het mes, een bot mes of hard materiaal in het weefsel.
Kleuring	Oude/ongefilterde kleuroplossingen of <i>Corn flake</i> effect (donkere kernen zonder details door het opdrogen van de coupes voor het afdekken).
Afdekking	Luchtbelvorming of kristallisatie en scheuren door het montagemedium.

1.5 Onderzoeksopdracht

1.5.1 Invloed van pre-analytische variabelen op de weefselkwaliteit

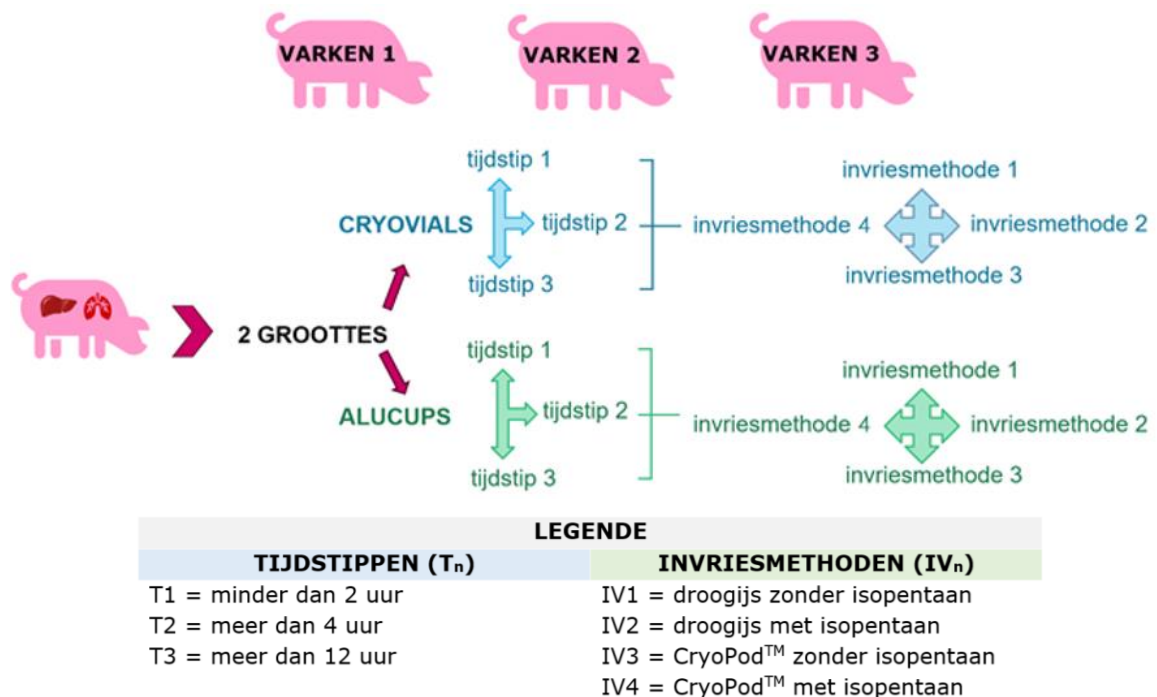
Het doel van deze bachelorproef is om de vriesimpact van verschillende PAV op dierlijk long- en leverweefsel na te gaan. Enerzijds wordt er uitgezocht welke weefselgrootte, invriestijdstip en invriesmethode de beste weefselkwaliteit opleveren a.d.h.v. geëxtraheerd RNA. Anderzijds trachten we te achterhalen of deze PAV al dan niet vriesartefacten veroorzaken via een histologische beoordeling van cryocoupees. Een schematisch overzicht van het stageonderzoek is te vinden bij Figuur 6.

In dit onderzoek wordt er gefocust op een kwaliteitsbeoordeling van RNA en niet van DNA of proteïnen. Dit met als reden dat proteïnen moeilijk te zuiveren zijn in kleine hoeveelheden, zelfs aan de hand van zeer geavanceerde methoden. Verder is RNA in tegenstelling tot DNA minder stabiel, waardoor sneller veranderingen in de kwaliteit zijn waar te nemen.

Het onderzoek wordt uitgevoerd op lever- en longweefsel van drie varkens om voldoende gegevens te verzamelen. De weefsels worden versneden en ingevroren via vier verschillende methoden, in twee groottes en op drie tijdstippen. De tijdstippen zijn terug te vinden in Figuur 6. De groottes, passend in een Cryo.s™ (*cryovial*) en een 15 ml aluminium invriespot (alucup), worden gekozen aangezien deze ontworpen zijn voor de opslag van biologisch materiaal en bestand zijn tegen zeer lage temperaturen tot -196°C. Op basis van de transportveiligheid opteert men voor volgende invriesmethoden (IV):

- IV1: Droogijs zonder isopentaaan
- IV2: Droogijs met isopentaaan
- IV3: CryoPod™ zonder isopentaaan
- IV4: CryoPod™ met isopentaaan

Op alle stukken weefsel wordt een manuele RNA-extractie en RIN-bepaling uitgevoerd m.b.v. de 2100 BioAnalyzer van Agilent. Alsook wordt de OD ratio bepaald via spectrofotometrie. Dit met als doel de concentratie, zuiverheid en kwaliteit te bepalen. Van zowel lever- als longweefsel worden cryocoupees gesneden. De aanwezigheid van vriesartefacten wordt manueel beoordeeld na een HE-kleuring. Na de bekomen resultaten grafisch en statistisch te analyseren, kan besloten worden welke grootte, tijdstip en invriesmethode de meest optimale weefselkwaliteit oplevert.



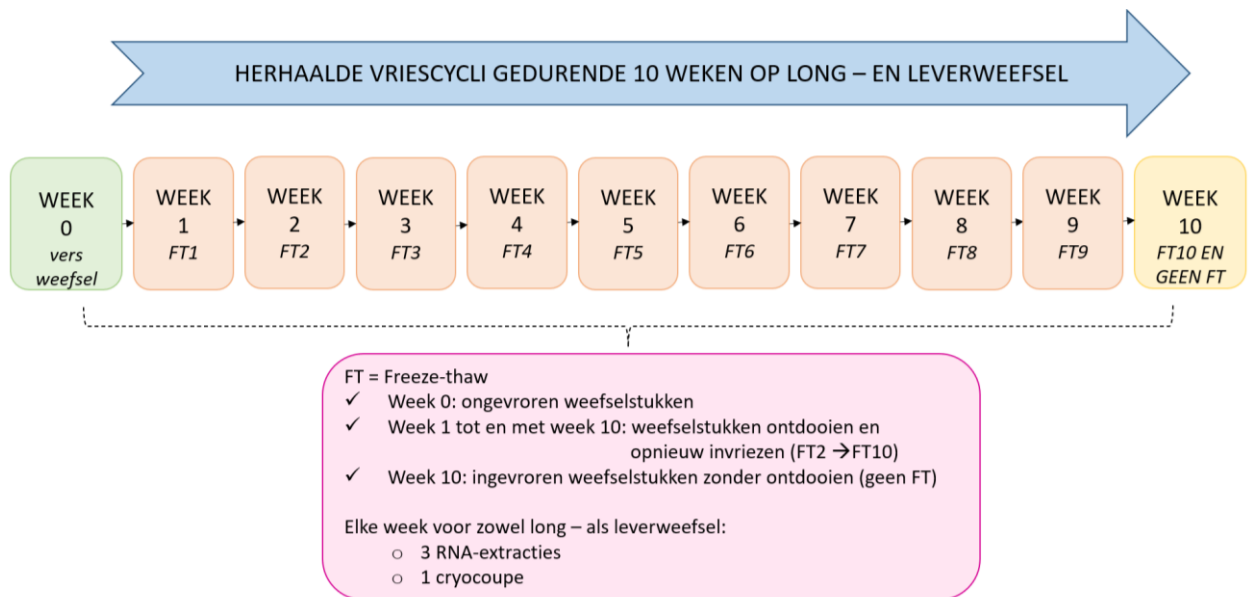
Figuur 6: Schematische weergave van het stageonderzoek. Hierbij worden verschillende invriesmethoden (droogijs met en zonder isopentanaan; CryoPod™ met en zonder isopentanaan) en tijdstippen (T1: <2uur; T2: >4uur; T3: 12 uur) onderzocht naar de invloed op weefselkwaliteit. Ook de grootte (cryovial en alucup) wordt in rekening gebracht. Dit zijn allemaal factoren die een invloed kunnen hebben op weefselkwaliteit.

1.5.2 Herhaalde vriescycli

Met de herhaalde vriescycli wordt de moleculaire en histologische degradatie in functie van de tijd voor zowel long- als leverweefsel onderzocht (cf. Figuur 7).

Het biologisch materiaal wordt bij -80°C m.b.v. droogijs en isopentanaan ingevroren. Het gehele proces wordt over een periode van 10 weken uitgevoerd om voldoende reproduceerbaarheid te kunnen garanderen. Alle weefselstukken worden wekelijks ontdooid gedurende 45 minuten (min) en vervolgens opnieuw ingevroren. Bij week 0 gebruikt men vers niet ingevroren weefsel als baseline voor de analyses. Het eindpunt van de analyses is een weefselstuk dat gedurende 10 weken niet ontdooid wordt.

Het ontdooide staal wordt geanalyseerd op significante wijzigingen via een RNA-extractie en de aanwezigheid van vriesartefacten. Dankzij de bekomen resultaten van de vries- en dooicycli en de baseline, kan de degradatie worden opgevolgd.



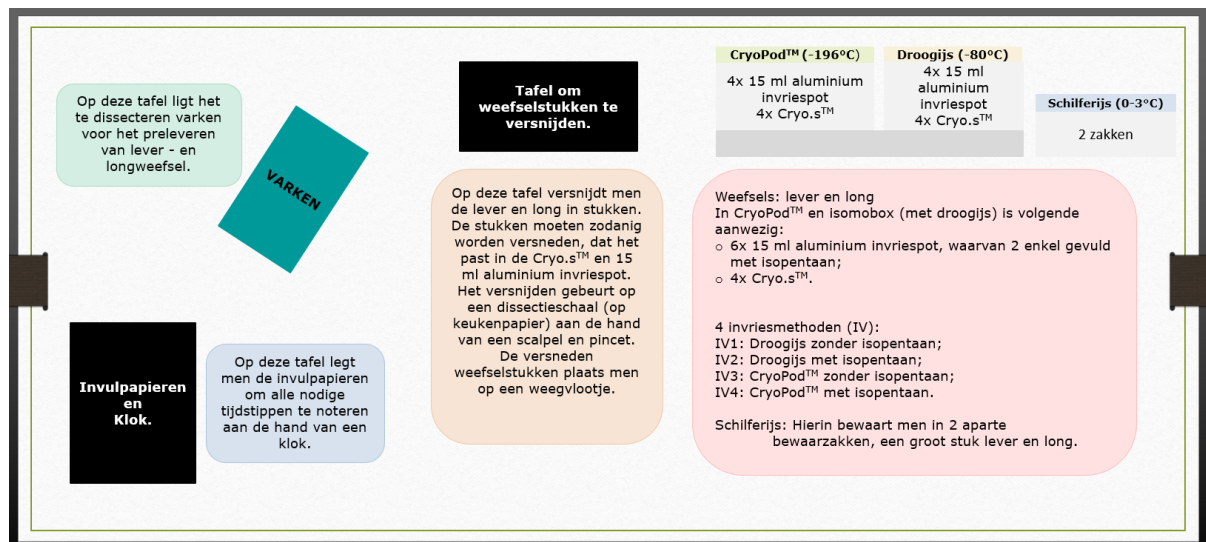
Figuur 7: Schema van het verloop van de herhaalde vriescycli. FT = *freeze-thaw* (herhaalde vries- en dooicycli). Onbevoren weefselstukken in week 0; weefselstukken van week 1 tot en met week 10 ondergaan FT-cycli; geen FT-cycli voor ingevoren weefselstukken in week 10.

2 Materialen en methoden

2.1 Prelevatie van dierlijk weefsel

Het ORSI Academy (Melle, Oost-Vlaanderen) stelt 3 volwassen varkens ter beschikking. Van deze dieren worden het lever- en longweefsel gepreleveerd (cf. Bijlage 2). Voorafgaand zijn er tal van medische proeven uitgevoerd op de dieren. Nadien zijn de varkens geëuthanaseerd via een lethale injectie.

Een deel van het gepreleveerde weefsel wordt ter plaatse bij het ORSI in stukken gesneden en ingevroren via vier verschillende invriemethoden (cf. Figuur 10). Het overige weefsel dient men in afgesloten recipiënten te transporteren op schilferijs (0 tot -3°C) naar het Bioresource center Ghent. Nadien moet het weefsel op 2 later vastgestelde tijdstippen versneden en ingevroren worden. Tijdens de dissectie en het invriezen zijn de tijdstippen genoteerd en bijgehouden (cf. Bijlage 14).



Figuur 8: De organisatorische opzet in het ORSI Academy voor de dissectie en het invriezen.

2.2 Pre-analytische variabelen (PAV)

Pre-analytische variabelen hebben een grote invloed op de kwaliteit van het geïsoleerde RNA en de morfologie van het weefsel. Een aantal van deze factoren zal worden onderzocht, namelijk de weefselgrootte, de verschillende invriestijdstippen, de invriemethode en de herhaalde vries- en dooicycli.

2.2.1 PAV 1: Weefselgrootte

Het invriezen van de gecollecteerde weefselstukken gebeurt in twee verschillende groottes, passend in een *cryovial* (Greiner Bio-One) en alucup (Sanbio). Deze zijn ontworpen voor het stockeren van biologisch materiaal bij lage temperaturen tot -196°C.

Het weefsel dat in een *cryovial* zal worden gestockeerd, wordt in stukken gesneden van 0,5*0,5*2,0 cm met een volume van ongeveer 0,5 cm³. In de alucup hebben de weefselstukken een volume van 8,0 cm³ (zijden van 2,0 cm).



Figuur 9: Voorbeeld van weefselgroottes die in een *cryovial* (links) en alucup (rechts) gestockeerd worden. (Hiruz, s.d.)

2.2.2 PAV 2: Tijd tussen prelevatie en invriezen

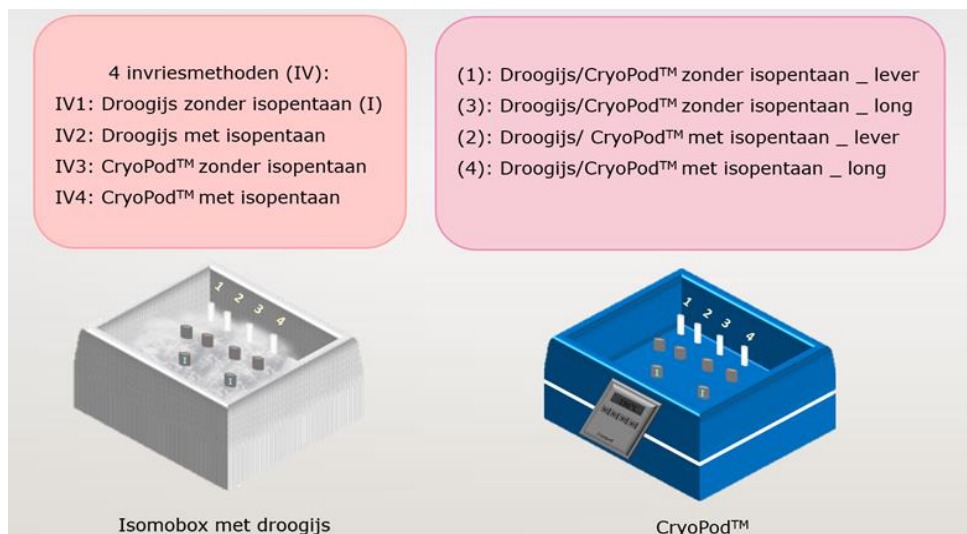
Het weefsel wordt na versnijden ingevroren op drie verschillende tijdstippen. Zie Tabel IV voor een gedetailleerd overzicht. Tijdens het transport moet men het weefsel bewaren op schilferijs (0 tot -3°C), om nadien in de koelkast (2-8°C) van het Bioresource center Ghent te stockeren, alvorens in te vriezen.

Tabel IV: Verschillende onderzochte tijdstippen tussen weefselafname en invriezen.

T1	Minder dan 30 min na staalafname.
T2	2-4 uur (u) na staalafname.
T3	12-24 u na staalafname.

2.2.3 PAV 3: Invriesmethoden

Vier verschillende invriesmethoden (cf. Figuur 10) worden experimenteel met elkaar vergeleken. Hierbij wordt gebruik gemaakt van droogijs (-80°C, Alpha BV) en vloeibare stikstof (-196°C, Air Liquide), al dan niet in combinatie met isopentaan (Honeywell International Inc.). De weefselstukken worden na onderdompelen in isopentaan overgebracht in een nieuwe alucup/*cryovial*.



Figuur 10: Schema organisatie van invriezen: hoe de cryovial en de alucup in de isomobox met droogijs en in de CryoPod™ worden geplaatst. Weefselstukken worden volgens 4 invriesmethoden (IV) ingevroren: droogijs zonder isopentaan (IV1); droogijs met isopentaan (IV2); CryoPod™ zonder isopentaan (IV3); CryoPod™ met isopentaan (IV4). Weefselstukken worden na onderdompelen in isopentaan overgebracht in een nieuwe alucup/cryovial.

2.2.3.1 Isopentaan

Isopentaan moet met zorgvuldigheid behandeld worden. Gedurende de gehele procedure moet men werken met veiligheidshandschoenen en een veiligheidsbril. De handelingen dienen te gebeuren onder een laminaire airflow kast (LAF-kast, SafeFast Classic - faster).

Het vullen van 14 alucups met elk 12 ml isopentaan gebeurt 24 uur (u) op voorhand (cf. Tabel V). Deze worden bewaard in een *Ultra Low Temperature* (ULT) vriezer (-80°C) om de optimale werkingstemperatuur van isopentaan te verkrijgen. Na 24 u worden 6 alucups getransporteerd op droogijs richting het ORSI Academy.

Men dient voor weefselafname 4 potten te koelen op droogijs en 2 potten in een CryoPod™ (-196°C, Brooks Life Sciences) gedurende 10 min. Deze tijd moet gerespecteerd worden, aangezien isopentaan overgaat in een vaste vorm bij -160°C.

Na prelevatie moet men het weefsel binnen de 30 min invriezen volgens de juiste invriesmethode (IV). De stukken weefsel van tijdstip 1 voor IV2, IV4 en de *freeze-thaw* (FT) worden onmiddellijk na weefselafname ondergedompeld in isopentaan, gevolgd door de correcte invriesprocedure. De overige 9 alucups worden later in de biobank gebruikt om het weefsel in te vriezen op 2 later vastgestelde tijdstippen.

Tabel V: Aantal benodigde potten isopentaaan per tijdstip en voor de FT.

Tijdstip	Benodigde potten isopentaaan
T1	4 x 15 ml aluminium invriespotten
T2	4 x 15 ml aluminium invriespotten
T3	4 x 15 ml aluminium invriespotten
FT	2 x 15 ml aluminium invriespotten

2.2.3.2 CryoPod™

Alvorens de CryoPod™ te kunnen gebruiken, wordt het automatisch gevuld met vloeibare stikstof aan de hand van een vulstation (cf. Bijlage 11). Hierbij is het belangrijk om cryo-handschoenen en een veiligheidsbril te dragen als bescherming tegen de vrieskou.

De CryoPod™ wordt op de lade van het vulstation geplaatst en het deksel positioneert men in de dekselhouder. Vervolgens duwt men de CryoPod™ in het toestel tot er een klik hoorbaar is. Via het bedieningspaneel wordt 'filling' en vervolgens 'start' geselecteerd. Eens het vulproces voltooid is, kan het deksel opnieuw op de CryoPod™ worden geplaatst en is deze klaar voor gebruik.

Bij invriesmethode 3 en 4 wordt gebruik gemaakt van de CryoPod™. De *cryovials* en alucups worden vooraf gekoeld door deze 10 min voor invriezen in de CryoPod™ te plaatsen.

Wanneer isopentaaan vereist is (IV4), wordt het weefsel hierin ondergedompeld gedurende 10 seconden (s). Voor zowel IV3 en IV4 hebben we het weefsel gedurende een vast tijdsinterval van 10 s in de gekoelde recipiënten geplaatst. Eenmaal ingevroren, transporteert men de gevulde recipiënten op droogijs naar het Bioresource center Ghent. Daar worden ze vervolgens bewaard in een ULT-vriezer van Thermo Fisher Scientific.

2.2.3.3 Droogijs

De *cryovials* en alucups worden op voorhand gekoeld door deze 10 min op droogijs te plaatsen voor invriezen. Als isopentaaan vereist is (IV2), dient men het weefsel hier eerst in onder te dompelen gedurende 10 s. Vervolgens worden de weefsels van zowel IV1 als IV2 voor 10 s ingevroren in de gekoelde recipiënten. De recipiënten met het weefsel worden uiteindelijk getransporteerd op droogijs naar de biobank, om daar te bewaren in een ULT-vriezer.

2.2.4 PAV 4: Herhaalde vries- en dooicycli

Tijdens de prelevatie van het varken collecteren we 5 stukken weefsel, van zowel long als lever. Voor beide weefseltypes wordt hiervan 1 stuk niet ingevroren, maar onmiddellijk in een alucup op schilferijs geplaatst om naar het Bioresource center Ghent te transporteren.

Het resterende weefsel wordt in vier alucups ingevroren. De recipiënten worden vooraf gekoeld door ze gedurende 10 min op droogijs te plaatsen. De gebruikte invriesmethode omvat isopentaaan in combinatie met droogijs. Het weefsel wordt voor 10 s in voorgekoeld isopentaaan ondergedompeld. De alucups met het ingevroren weefsel worden vervolgens op droogijs naar het Bioresource center Ghent getransporteerd.

Bij aankomst in het Bioresource center Ghent zal het onbevroren weefsel onmiddellijk verwerkt en geanalyseerd worden. Dit beschouwt men als de *baseline*. Het eerder ingevroren weefsel, voor zowel long als lever, moet men stockeren in een ULT-vriezer. Eén van deze recipiënten blijft 10 weken in bewaring zonder te ontdooien. De andere recipiënten worden wekelijks ontdooid gedurende 45 min. Een deel van het ontdooid weefsel zal men verwerken en analyseren, terwijl de resterende weefselstukken opnieuw worden ingevroren.

2.3 Verwerking van dierlijk weefsel

2.3.1 Manuele RNA-extractie met TRI Reagent®

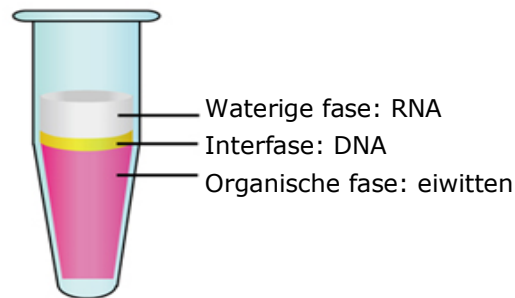
De extractie van RNA uit het geïsoleerde weefsel gebeurt manueel a.d.h.v. een TRI Reagent®-protocol (Sigma-Aldrich) (cf. Bijlage 5). Tijdens het uitvoeren van dit protocol moet er onder een laminaire *airflow* kast gewerkt worden met handschoenen, om contaminatie tegen te gaan. Het is ook belangrijk om het dissectiemateriaal vooraf te decontamineren.

Er wordt eerst een kleine hoeveelheid weefsel (0,04 - 0,06 g) afgewogen en versneden tot pulp met een scalpel op een dissectieschaal. Deze pulp wordt vervolgens overgebracht in een eppendorftube (2 ml polypropyleen microbuis, Greiner Bio-One) en hieraan voegt men 1 ml TRI Reagent® toe. Met behulp van de *TissueRuptor*® II (Qiagen®) en wegwerpbare tips wordt het weefsel gehomogeniseerd gedurende 30 s. Vervolgens volgt een incubatiestap van 5 min bij kamertemperatuur.

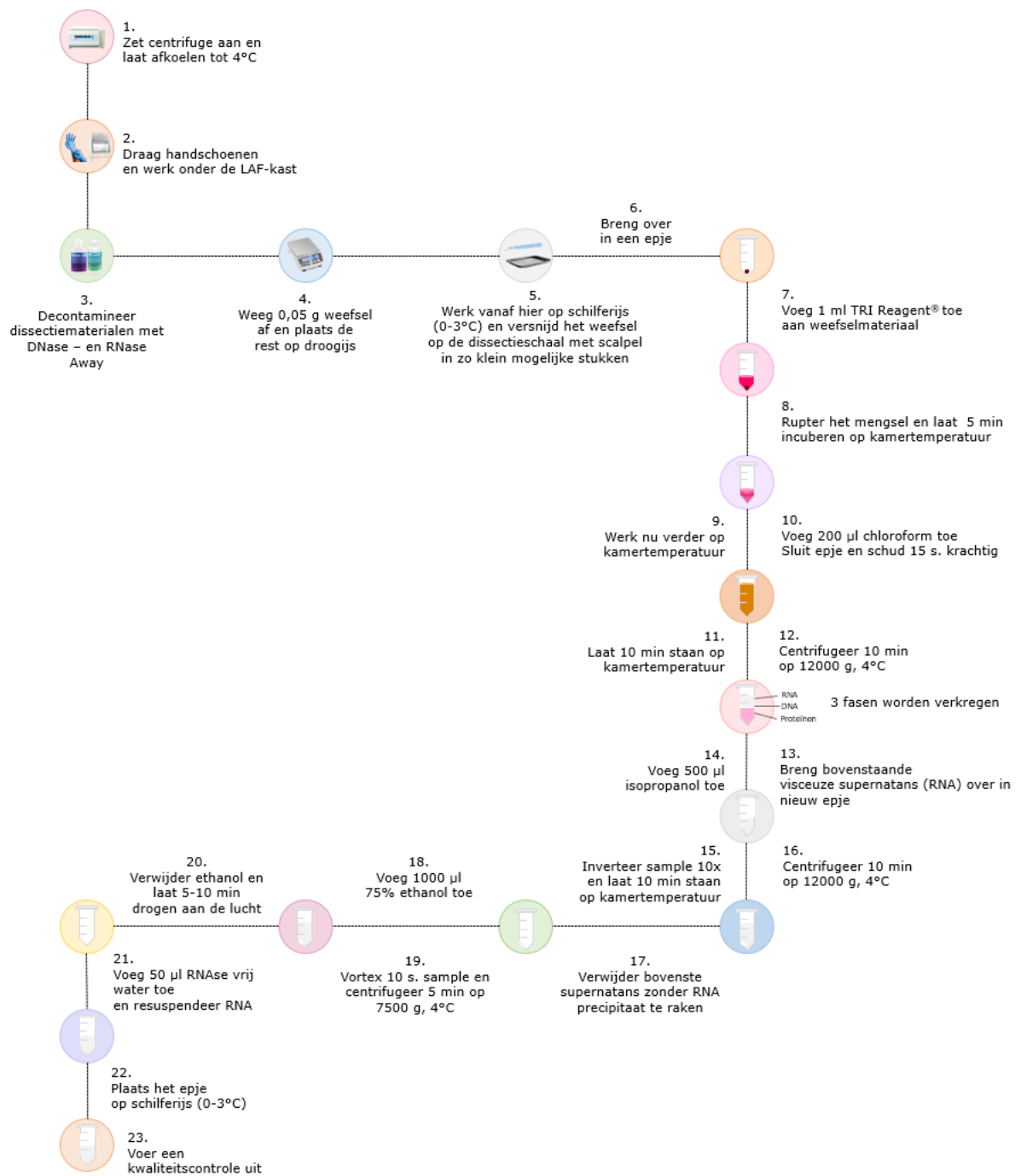
Na toevoeging van 200 µl chloroform (Sigma-Aldrich) wordt het mengsel krachtig geschud gedurende 15 s. De eppendorftube laat men voor 10 min incuberen bij kamertemperatuur, waarna een centrifugatiestap volgt van 10 min bij 12000 g (relatieve centrifugale kracht). Hierdoor zal het gehomogeniseerde weefsel in 3 fasen scheiden (cf. Figuur 11). De onderstaande roze fase bevat proteïnen, terwijl de tussenliggende fase bestaat uit DNA. De bovenstaande transparante fase bevat het RNA en wordt overgebracht in een nieuwe eppendorftube.

Vervolgens wordt 500 µl isopropanol (Sigma-Aldrich) toegevoegd en opgemengd door 10 maal te inverteren. Het mengsel wordt opnieuw geïncubeerd op kamertemperatuur gedurende 10 min en daaropvolgend gecentrifugeerd voor 10 min bij 12000 g. Het bovenstaande supernatans verwijdert men, waarna een wasstap volgt. Hierbij lost het precipitaat op in 1000 µl 75% (v/v) ethanol (Honeywell International Inc.).

Na kort vortexen en centrifugeren gedurende 5 min op 7500 g, wordt de bovenstaande vloeistof verwijderd. Bij deze stap dient men voorzichtig te zijn, aangezien het wolkje door het vortexen los kan liggen. Het resterende precipitaat in de eppendorftube wordt gedurende 10 min aan de lucht gedroogd. Er wordt zuiver RNA verkregen, dat na drogen in 50 μ l DNase- en RNase- vrij water wordt geresuspendeerd.



Figuur 11: Afbeelding van de fasescheiding. Bovenste waterige fase bevat RNA, de interfase bevat DNA, de onderste organische fase bevat proteïnen en lipiden. (Creative Diagnostics, 2007)



Figuur 12: Gedetailleerd protocol manuele RNA-extractie met TRI Reagent®.
g= centrifugale snelheid, s= seconden, °C= graden Celsius, µl= microliter

2.3.2 Cryocoupes snijden, kleuren, en inscannen

2.3.2.1 Snijden van cryocoupes

Het maken van cryocoupes gebeurt m.b.v. een cryostaat (Thermo Fisher Scientific; cf. Bijlage 14). De temperatuur en dikte waarbij de coupes gesneden worden, is afhankelijk van het type weefsel. De coupes van het leverweefsel hebben we gesneden bij een temperatuur van -25°C en zijn $4\ \mu\text{m}$ dik.

Afhankelijk van de weefselgrootte (alucup en *cryovial*), wordt het longweefsel gesneden bij een kamertemperatuur tussen -20 en -25°C met een monstertemperatuur tussen -13°C en -18°C .

Na inbedding van het weefsel in cryogel (Sakura[®] Finetek *Optimal Cutting Temperature Compound*), wordt de cryocassette op de cryokop van de cryostaat gemonteerd. Door aan het handwiel te draaien, beweegt het preparaat naar het snijblad. Zodra een coupe met een goede kwaliteit en zonder scheuren wordt verkregen, wordt het op een objectglas bij kamertemperatuur gemonteerd. De gebruikte objectglazen (SuperFrost[®] Ultra Plus, Thermo Fisher Scientific) zijn geschikt voor kwetsbare weefsels en immunohistochemie, en beschikken over een coating met silaan voor extra adhesie.

2.3.2.2 Kleuren en inscannen van coupes met HE

De gesneden cryocoupes worden op de dienst pathologische anatomie (UZ Gent) gekleurd met een HE-kleuring en afgedekt met een *Tissue-Tek[®] Coverslipping* (TissueTek Sakura) (cf. Bijlage 8). Na kleuring worden de coupes bij een vergroting van 40x gescand m.b.v. de Pannoramic 250 virtuele microscoop (Sysmex) (cf. Bijlage 9).

2.4 Analyse kwaliteitscontrole

Na de RNA-extractie wordt de kwaliteit van het geïsoleerde RNA nagegaan. De 2 belangrijkste parameters hiervoor zijn de OD ratio en de RIN-score. Ook de cryocoupes vormen een belangrijk onderdeel in de kwaliteitscontrole en geven meer info over al dan niet ontstane vriesartefacten tijdens *snapfreezing*. Via een vooropgesteld scoresysteem (cf. 2.4.3) worden de coupes beoordeeld en de resultaten worden weergegeven in een *heat map*.

2.4.1 Concentratie en OD ratio

De concentratie en OD ratio worden bepaald aan de hand van het *little lunatic* toestel van Unchained Labs (cf. Bijlage 6). Men schakelt het toestel in door de knop achteraan aan te zetten en op het scherm te tikken. Nadien vullen we de standaard lunatic chips met $2\ \mu\text{l}$ RNA-extract per well. Elke chip bevat 16 microcuvetten, waardoor er 15 stalen en een blanco per chip bepaald kunnen worden. Gebruik voor de blanco $2\ \mu\text{l}$ DNase- en RNase-vrij water.

Men selecteert nadien de knop 'measure' in het hoofdmenu van het toestel. Zowel de juiste gebruiker als de gebruikte chip (*Regular Lunatic chip*) worden geselecteerd, en men definieert waar de blanco en stalen zich bevinden. Vervolgens wordt de chip in het toestel geplaatst. Na selectie van de correcte toepassing (RNA-bepaling) bepaalt het toestel het absorptiespectrum van het staal.

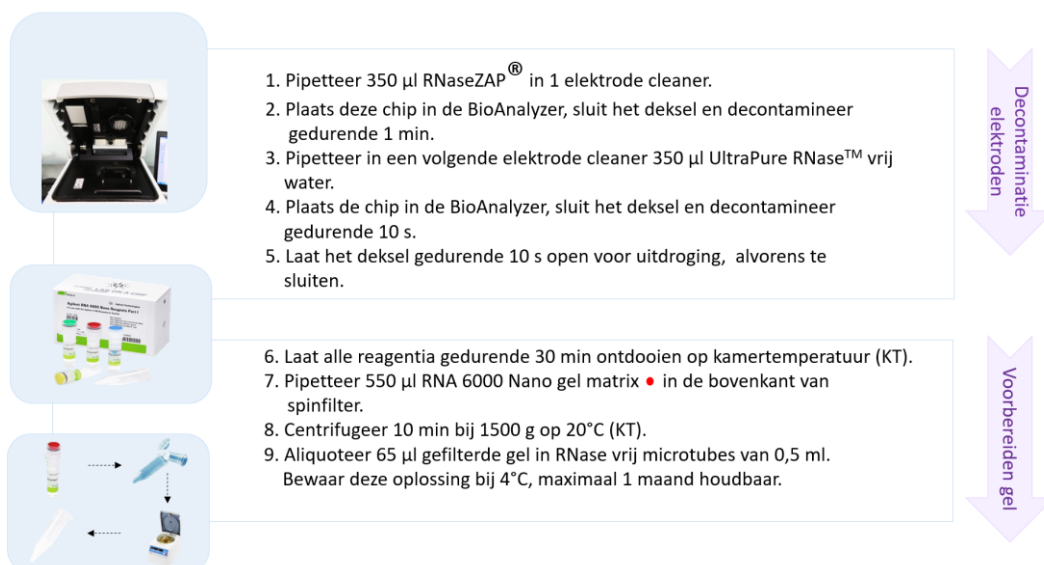
Na enkele seconden zal zowel de concentratie aan nucleïnezuren als het percentage residuen op het scherm verschijnen. Ook volgende parameters worden gemeten: onzuiverheden, achtergrond, A260, OD ratio en A260/A230-verhouding. Via een USB-stick kan men de resultaten exporteren. Het resterende extract wordt uitverdeeld in verschillende eppendorftubes met een volume van 5-6 µl en ingevroren bij -80°C.

Tabel VI: Toegekende scores voor de kwaliteit van RNA na verkrijgen van de OD ratio.

OD 260/280	Score
1,8 en 2,0	4
1,6 en 1,8	3
1,4 en 1,6	2
1,2 en 1,4	1
Lager dan 1,2	0

2.4.2 RIN-score

Voordat de RIN-score bepaald kan worden via de Agilent 2100 BioAnalyzer, dienen er enkele voorbereidende stappen te gebeuren (cf. Figuur 13). De elektroden moeten voor gebruik gereinigd worden met een elektrode *cleaner*. Ook de gel wordt bereid en hieraan wordt het kleurenconcentraat toegevoegd. Vervolgens worden de stalen en controles geladen op de chip, waarna de analyse kan plaatsgrijpen.





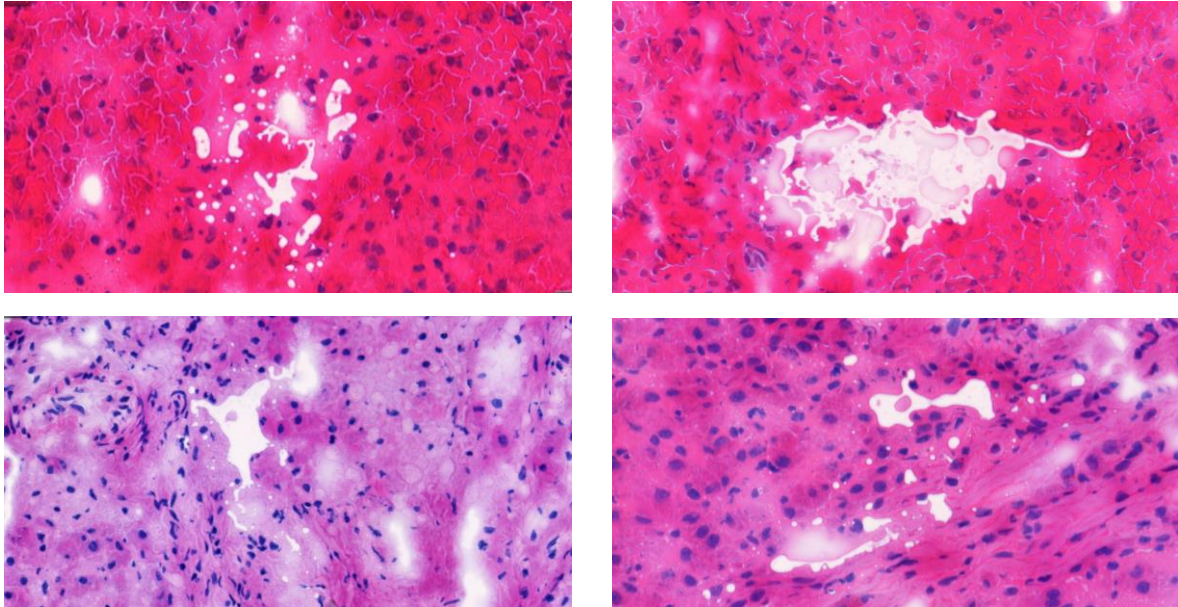
Figuur 13: Gedetailleerd protocol voor het bepalen van de RIN-score. KT= kamertemperatuur; RPM= revolutions per minutes, C= controle, G= gauge.

2.4.3 Vriesartefacten coupes

Na inscannen van de coupes wordt de kwaliteit van het weefsel histologisch beoordeeld door de coupes te controleren op vriesartefacten. Deze beoordeling gebeurt a.d.h.v. van het programma *CaseViewer* van 3DHISTECH Ltd. Om de scoring zo objectief mogelijk te maken, worden de coupes door 1 persoon geëvalueerd zodat er geen intervariabiliteit ontstaat. Iedere coupe wordt onderverdeeld in verschillende vierkanten met een oppervlakte van 2,5 mm² (0,5 mm x 0,5 mm). Controleer elk vierkant op vriesartefacten (cf. 1.4.4.4).

Op basis van de hoeveelheid artefacten krijgt het weefsel een score van 0 tot 3:

- 0= geen
- 1= weinig
- 2= intermediair
- 3= veel



Figuur 14: Vriesartefacten. Cryocoupees van leverweefsel gekleurd volgens een haematoxyline-eosinekleuring, waarin vriesartefacten aanwezig zijn.

Per score wordt procentueel berekend hoe vaak deze in de coupe voorkomt. Deze percentages worden via volgende formule verwerkt:

$$1 \times (\% \text{ score } 0) + 2 \times (\% \text{ score } 1) + 3 \times (\% \text{ score } 2) + 4 \times (\% \text{ score } 3)$$

Vergelijking 4: Formule om de algemene morfologische score van een coupe te bepalen.

De verkregen waarde kan geklasseerd worden volgens volgend classificatiesysteem. Zo krijgt de coupe een algemene score.

Tabel VII: Classificatiesysteem om histologische kwaliteit van weefsel weer te geven.

100-149	OK	0
150-199	OK	1
200-249	Intermediair	2
250-299	Intermediair	3
300-349	Slecht	4
350-400	Slecht	5

De algemene scores per coupe worden vervolgens verwerkt in een *heat map*. (Cf. Bijlage 10)

2.5 Dataverwerking resultaten

2.5.1 Grafische analyse

De morfologie van het weefsel wordt gecontroleerd door de coupes te beoordelen op vriesartefacten. Na deze beoordeling stelt men een *heat map* op met de toegewezen scores om te achterhalen hoe de data verdeeld is. Hoe meer artefacten aanwezig zijn in de coupes, hoe roder de *heat map* eruit zal zien.

Zo is via een kleurenschaal duidelijk te zien bij welke coupes en variabelen er veel artefacten terug te vinden zijn.

Daarnaast zal de RNA-concentratie worden uitgezet t.o.v. de onderzochte variabelen. De grafische analyse wordt uitgevoerd door middel van Microsoft Excel® (Microsoft). Via de standaarddeviatie zullen foutenbalken worden opgesteld in de grafieken. Hoe groter de balk, hoe groter de variatie tussen de verschillende waarden binnen één PAV. Aan de hand van deze grafieken kunnen mogelijke trends zichtbaar worden. Om na te gaan of deze significant zijn, wordt er een statistische analyse uitgevoerd (cf. 2.5.2).

2.5.2 Statistische analyse

In het statistisch programma SPSS® *Statistics* (V26, IBM®) wordt de Shapiro-Wilk normaliteitstest gebruikt om na te gaan of de gemiddelde concentraties normaal verdeeld zijn. Een statistische beslissingsboom (cf.) wordt gebruikt om te bepalen welke testen men moet uitvoeren. Bij niet normaal verdeelde resultaten waar de variabele twee mogelijkheden kan bevatten, wordt de Mann-Whitney U test uitgevoerd. Bij normaal verdeelde resultaten waar de variabele meer dan twee mogelijkheden kan bevatten, wordt de One-Way ANOVA en post hoc Tukey test of de Kruskal-Wallis test uitgevoerd. Een p-waarde $\leq 0,05$ wordt voor alle testen als statistisch significant beschouwd.

Tabel VIII: Weergave van de uitgevoerde statistische analyses.

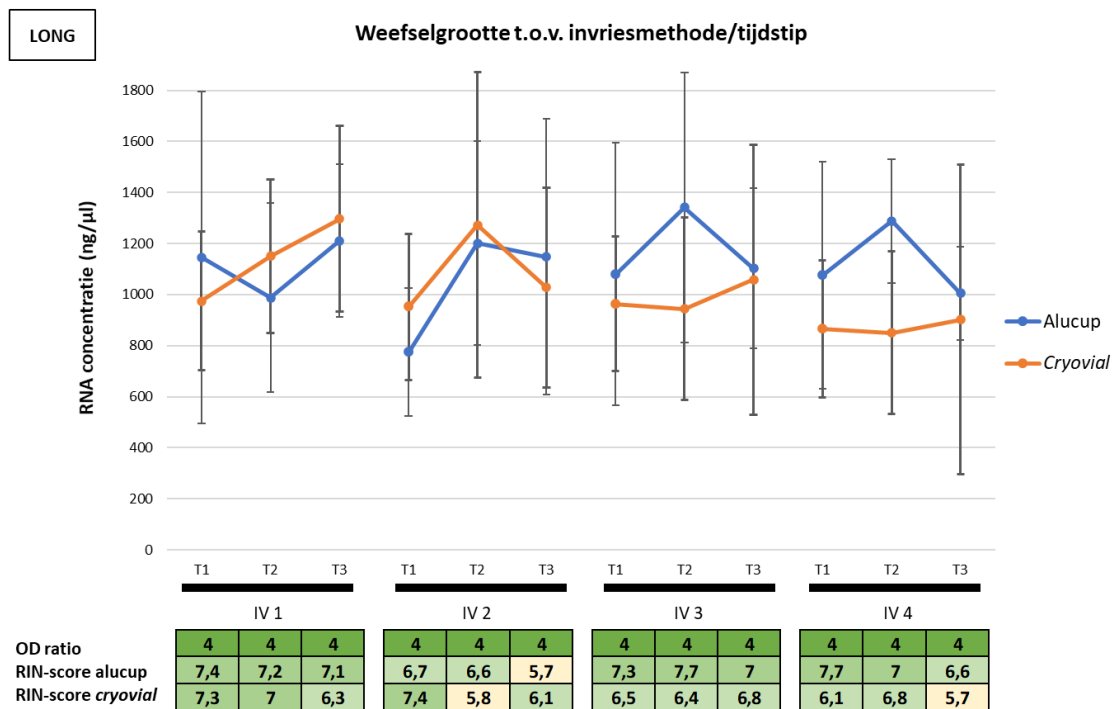
Weefseltype	PAV	Normaliteit	Statistische test
Long	Invriesmethode	Neen	Kruskal-Wallis
	Invriestijdstip	Ja	One-Way ANOVA en post hoc Tukey test
	Weefselgrootte	Neen	Mann-Whitney U
Lever	Invriesmethode	Ja	One-Way ANOVA en post hoc Tukey test
	Invriestijdstip	Ja	One-Way ANOVA en post hoc Tukey test
	Weefselgrootte	Neen	Mann-Whitney U

3 Resultaten

3.1 Resultaten kwaliteitscontrole (longweefsel)

3.1.1 Moleculaire analyse

3.1.1.1 PAV 1: Weefselgrootte

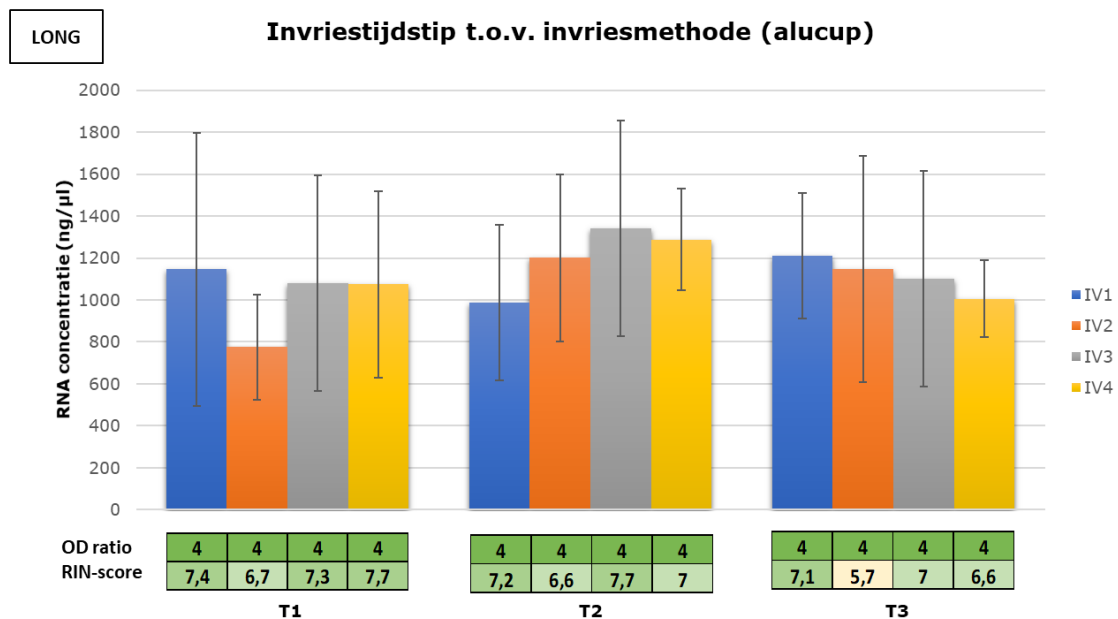


Figuur 15: Grafiek weefselgrootte t.o.v. invriemethode/tijdstip. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentratie (ng/µl) weergegeven voor de verschillende weefselgroottes per invriemethode en bijhorende tijdstippen. De foutbalken geven de standaarddeviatie weer. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur. OD ratio's (4= goed, 3= intermediair) en RIN-scores (<6= slecht, 6-7= acceptabel, 7-8= goed, >8= goed).

Op bovenstaande grafiek (cf. Figuur 15) is zichtbaar dat IV 3 en 4 een gelijkaardig patroon vertonen: de gemiddelde RNA-concentraties zijn hoger bij de weefsels in de alucups, waarvan tijdstip 2 de hoogste RNA-opbrengst geeft. Bij invriemethode 2 zien we opnieuw de hoogste RNA-concentratie bij tijdstip 2. We zien een ander beeld voor invriemethode 1: tijdstip 3 geeft de hoogste opbrengst. Als laatste kan er opgemerkt worden dat bij invriemethode 1) en 2) de RNA-opbrengst over het algemeen hoger is bij de weefsels in de cryovials.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores voor de weefsels in de alucups bevinden zich tussen 5,7 en 7,7. Bij de weefsels in de cryovials bevinden de RIN-scores zich tussen 5,7 en 7,4. Over de gehele lijn kunnen we vaststellen dat de RIN-waarden bij alucup hoger liggen dan bij cryovial. Er kan geen significant verschil worden aangetoond tussen de verschillende weefselgroottes voor de 4 invriemethoden en bijhorende tijdstippen ($p = 0,2 - 1,0$).

3.1.1.2 PAV 2: Tijd tussen prelevatie en invriezen

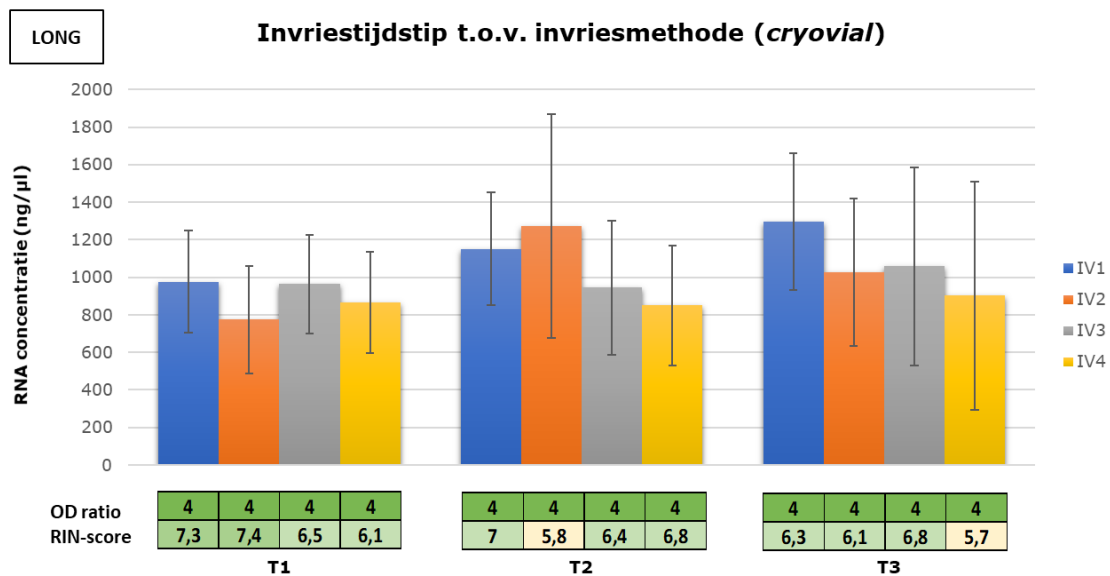


Figuur 16: Grafiek tijd tussen prelevatie en invriezen voor longweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentraties (ng/µl) weergegeven van alucup voor de verschillende invriestijdstippen per invriesmethode. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur. OD ratio's (4= goed) en RIN-scores (7-8= goed, 6-7= intermediair, <6= slecht).

Invriesmethoden 2, 3 en 4 geven de hoogste RNA-opbrengst bij tijdstip 2. Invriesmethode 1 geeft daarentegen een hogere RNA-concentratie bij tijdstip 1 en 3. Tot slot zien we bij tijdstip 1 een ander beeld: invriesmethode 2 geeft de laagste opbrengst.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores voor de weefsels in de alucups bevinden zich tussen 5,7 en 7,7. Wanneer de RIN-scores van de 3 tijdstippen met elkaar vergeleken worden, kan men opmerken dat er een lichte daling optreedt naarmate de tijd van invriezen toeneemt. We zien volgende trend: T1>T2>T3.

Er kan geen significant verschil worden aangetoond voor alucup tussen de verschillende tijdstippen en bijhorende invriesmethoden (p= 0,068 - 0,806).



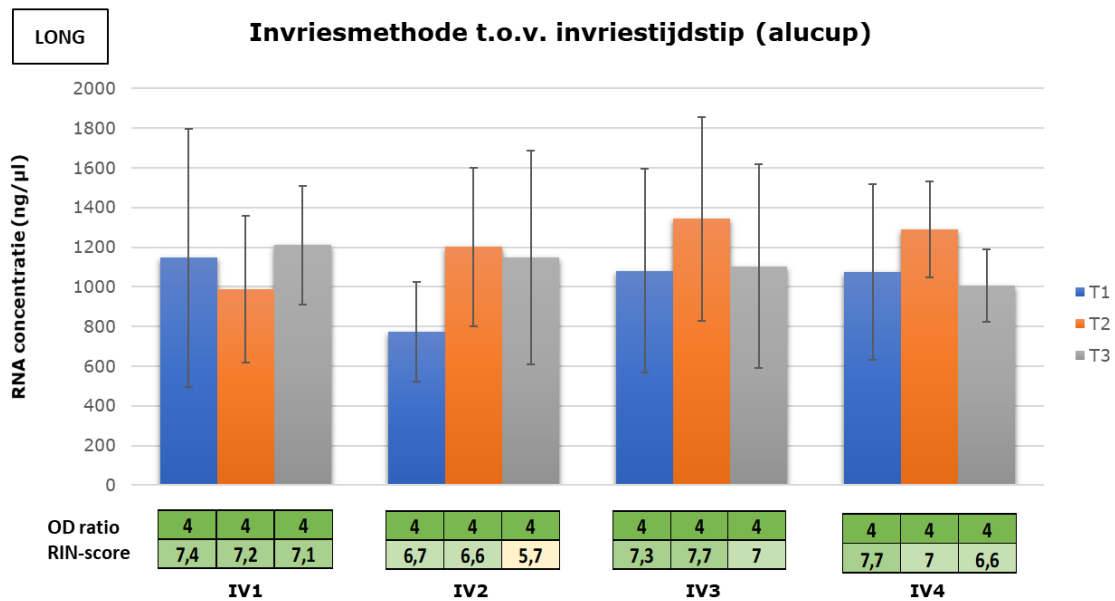
Figuur 17: Grafiek tijd tussen prelevatie en invriezen voor longweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentraties (ng/ μ l) weergegeven van *cryovial* voor de verschillende invriestijdstippen per invriesmethode. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur. OD ratio's (4= goed) en RIN-scores (7-8= goed, 6-7= intermediair, <6= slecht).

Men kan op Figuur 17 opmerken dat tijdstip 1 de laagste RNA-concentraties oplevert voor invriesmethode 1 en 2. In tegenstelling tot tijdstip 1 en 3, neemt men visueel waar dat bij tijdstip 2 de hoogste RNA-opbrengst wordt bekomen voor invriesmethode 2. Er kan opgemerkt worden dat de concentraties voor IV4 stabiel blijven bij de 3 verschillende tijdstippen. Bij IV1 stijgt de RNA-concentratie naargelang de tijdsduur tot invriezen. Bij IV3 en IV4 kan er waargenomen worden dat IV3 steeds een hogere RNA-opbrengst heeft.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores voor de weefsels in de *cryovials* bevinden zich tussen 5,7 en 7,4. Er is geen duidelijke trend waarneembaar in RIN-scores tussen de 3 tijdstippen. Er zijn zowel dalingen als stijgingen zichtbaar.

Er kan geen significant verschil worden aangetoond voor *cryovial* tussen de verschillende tijdstippen en bijhorende invriesmethoden ($p = 0,262 - 0,839$).

3.1.1.3 PAV 3: Invriesmethoden

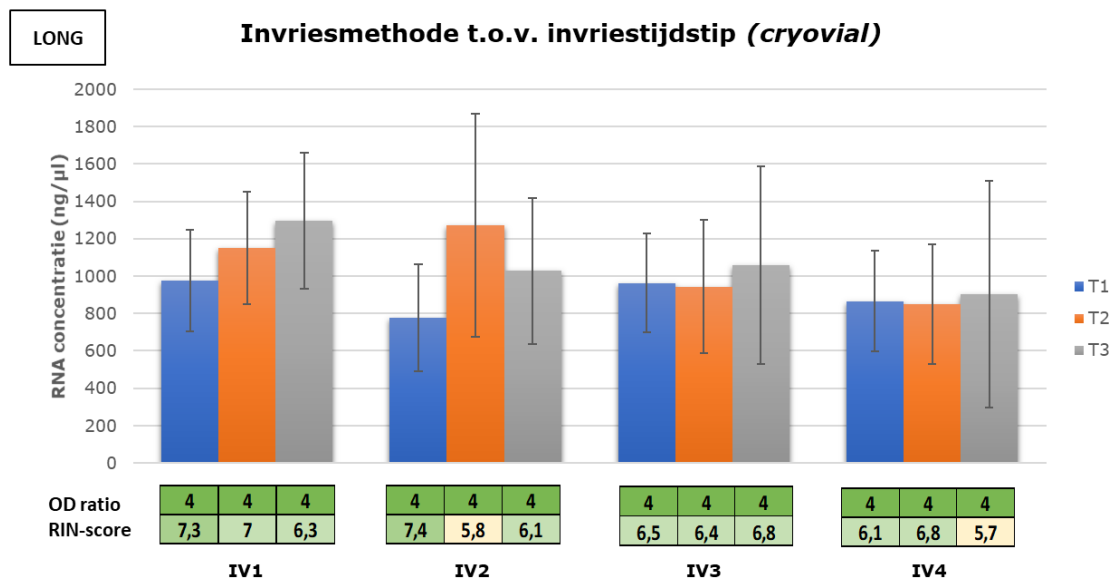


Figuur 18: Grafiek invriesmethoden voor longweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentraties (ng/ μ l) weergegeven van alucup voor de verschillende invriesmethoden per tijdstip. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur. OD ratio's (4= goed) en RIN-scores (7-8= goed, 6-7= intermediair, <6= slecht).

Op bovenstaande grafiek (cf. Figuur 18) ziet men, met uitzondering van tijdstip 2, dat de hoogste RNA-opbrengst wordt bekomen bij invriesmethode 1. Daarnaast merken we op dat invriesmethode 2 de laagste RNA-concentratie oplevert bij tijdstip 1. Bij invriesmethode 3, tijdstip 2 wordt er een hoge RNA-opbrengst bekomen. Tot slot is er per tijdstip over de verscheidene invriesmethoden geen duidelijke trend waarneembaar. Tijdstip 3 geeft een zeer lichte daling in RNA-opbrengst bij alle invriesmethoden.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores voor de weefsels in de alucup bevinden zich tussen 5,7 en 7,7. Opvallend zijn de lagere RIN-scores bij invriesmethode 2.

Er kan geen significant verschil worden aangetoond voor alucup tussen de verschillende invriesmethode en bijhorende tijdstippen ($p = 0,204 - 0,750$).



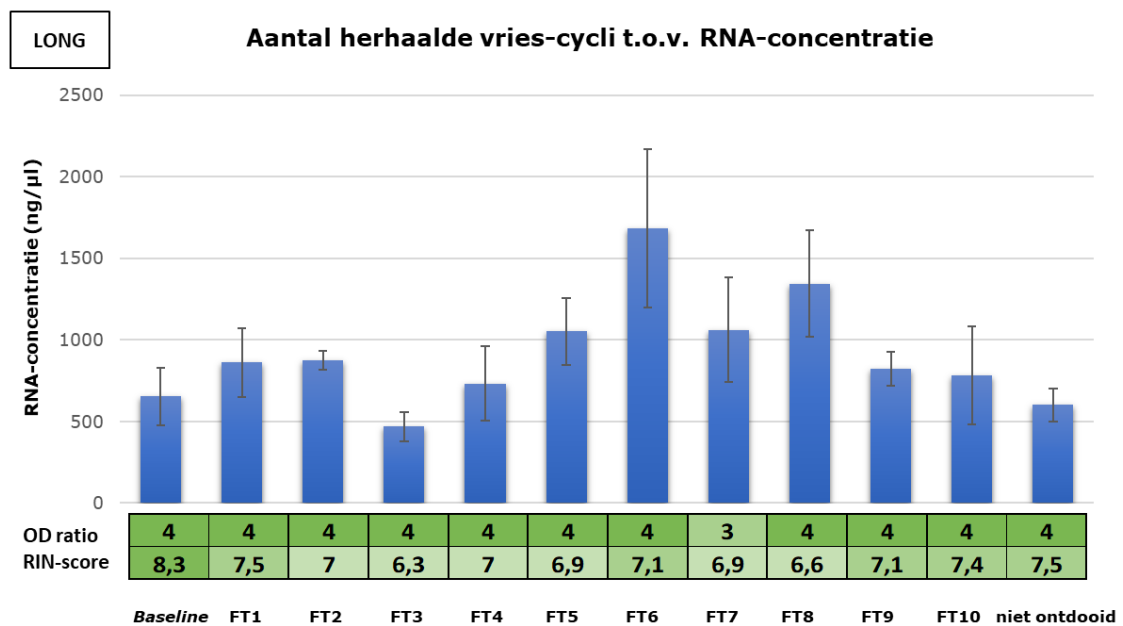
Figuur 19: Grafiek invriesmethoden voor longweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentraties (ng/µl) weergegeven van *cryovial* voor de verschillende invriesmethoden per tijdstip. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur. OD ratio's (4= goed) en RIN-scores (7-8= goed, 6-7= intermediair, <6= slecht).

Uit Figuur 19 kan men afleiden dat, met uitzondering van tijdstip 2, de hoogste RNA-opbrengst wordt verkregen bij invriesmethode 1. Verder is visueel op te merken dat invriesmethode 1 en 2 de laagste RNA-concentraties behalen bij tijdstip 1. Daarnaast vertonen invriesmethode 3 en 4 een gelijkaardige patroon. Bij invriesmethode 1 is er een stijging naarmate de tijdsduur tussen prelevatie en invriezen toeneemt.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores voor de weefsels in de *cryovial* bevinden zich tussen 5,7 en 7,4. Er is verder geen duidelijke trend zichtbaar, behalve bij IV1 kan er opgemerkt worden dat de RIN-scores een daling ondergaan.

Er kan geen significant verschil worden aangetoond voor *cryovial* tussen de verschillende invriesmethoden en bijhorende tijdstippen ($p = 0,253 - 0,970$).

3.1.1.4 PAV 4: Herhaalde vries-cycli



Figuur 20: Grafiek invries- en ontdoocykli voor longweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentraties (ng/µl) weergegeven voor de verschillende cycli die weefselstukken gedurende 10 weken hebben ondergaan. *Baseline*, FT1 t.e.m. FT10, niet-ontdooide. OD ratio's (4= goed) en RIN-scores (>8= goed, 7-8= goed, 6-7= intermediair)

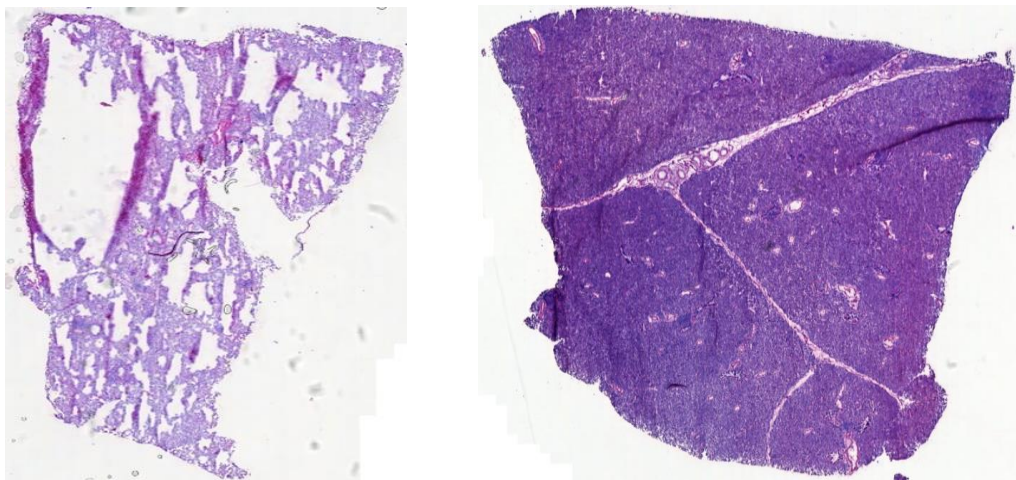
Uit de grafiek in Figuur 20 kan worden vastgesteld dat FT6 de hoogste RNA-concentratie oplevert en FT3 de laagste. Men merkt op dat er een gelijkaardige trend in RNA-opbrengst wordt verkregen tussen:

- *Baseline* en niet-ontdooide weefsel;
- FT1 en FT2;
- FT5 en FT7;
- FT4, FT9 en FT10.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn, met uitzondering van FT7, een score 4. De RIN-scores bevinden zich tussen 6,3 en 8,3. Deze zijn het hoogst bij de *baseline*, gevolgd door het niet-ontdooide stuk weefsel en FT1. Tot slot is er aan de hand van de RIN-scores geen opvallende trend op te merken.

3.1.2 Histologische analyse

Het protocol voor het snijden van cryocoupes bij longweefsel heeft men geoptimaliseerd bij varken 3, waardoor de coupes van de verschillende varkens niet uniform werden gemaakt. De coupes van varken 1 en 2 bevatten namelijk meer mechanische artefacten dan deze van varken 3. Omwille van deze reden is het niet mogelijk om alle coupes equivalent en uniform te scoren, waardoor we ervoor hebben gekozen om de histologische analyse voor het longweefsel niet uit te voeren. Onderstaande Figuur 21 geeft duidelijk het verschil weer tussen de niet-geoptimaliseerde (links) en geoptimaliseerde (rechts) gesneden longcoupes. Bij de niet-geoptimaliseerde gesneden longcoupe zijn er duidelijk veel mechanische artefacten (scheuren) zichtbaar.



Figuur 21: Voorbeeld van een gesneden longcoupe. Links staat een niet-geoptimaliseerde crycoupe (varken 1, invriesmethode 3, tijdstip 2, alucup) gesneden bij kamertemperatuur -25°C en monstertemperatuur -30°C met een dikte van 4 µm; rechts wordt een geoptimaliseerde crycoupe (varken 3, invriesmethode 2, tijdstip 2, alucup) afgebeeld, gesneden met een dikte van 4 µm bij kamertemperatuur -20°C en monstertemperatuur -18°C.

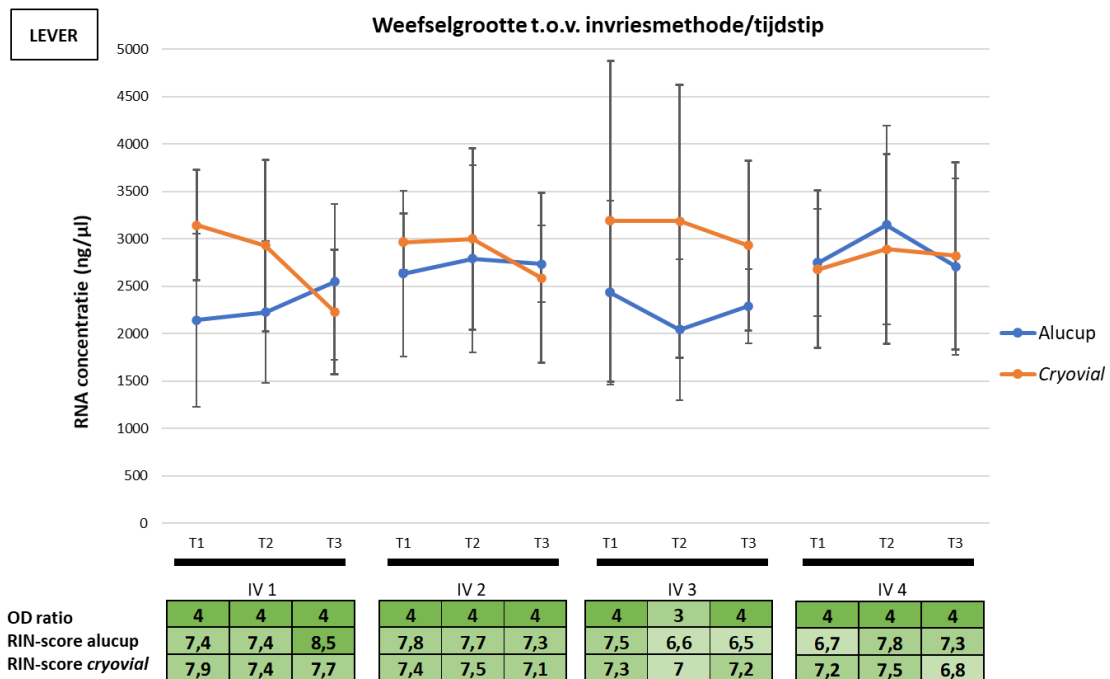
3.2 Resultaten kwaliteitscontrole (leverweefsel)

3.2.1 Moleculaire analyse

3.2.1.1 PAV 1: Weefselgrootte

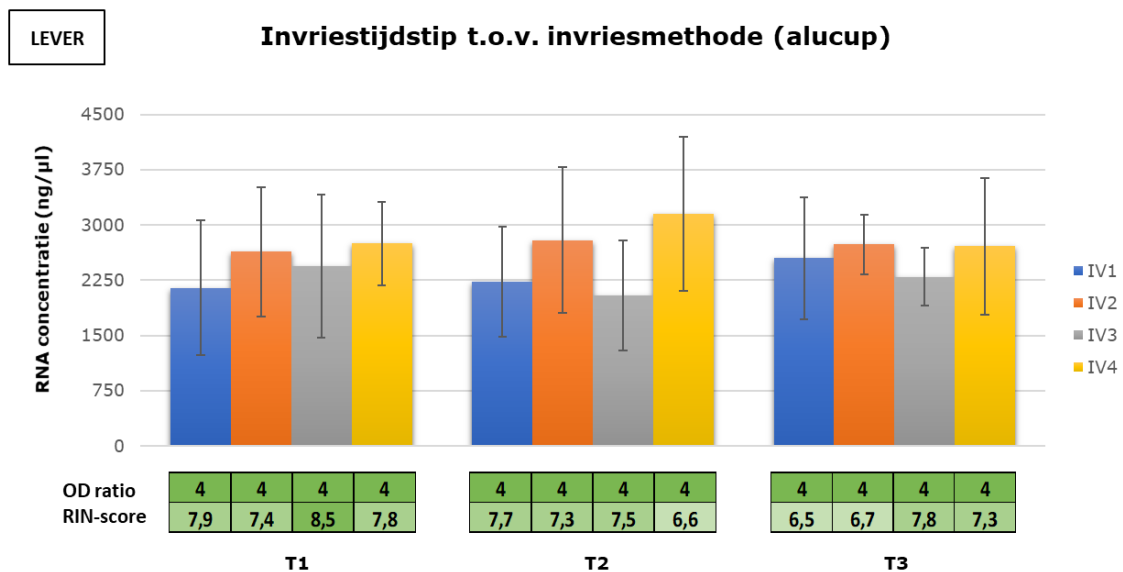
Op onderstaande grafiek (cf. Figuur 22) is zichtbaar dat de 4 invriesmethoden geen gelijkaardige patroon vertonen. Weliswaar zijn de gemiddelde RNA-concentraties bij invriesmethode 1, 2 en 3 hoger bij de weefsels in de *cryovials*. Bij invriesmethode 2 en 3 zien we de hoogste RNA-opbrengst bij tijdstip 2. Echter wordt bij invriesmethode 1 een hogere concentratie aan RNA bekomen bij tijdstip 1. Men ziet bij invriesmethode 4 een ander beeld: de gemiddelde RNA-concentraties zijn hoger bij de weefsels in de alucups en tijdstip 2 geeft de hoogste RNA-opbrengst. Tot slot kan er opgemerkt worden dat invriesmethode 3 over het algemeen de hoogste RNA-concentratie oplevert bij het weefsel in de *cryovial*.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores voor de weefsels in de alucups bevinden zich tussen 6,6 en 8,5. Bij de weefsels in de *cryovials* bevinden de RIN-scores zich tussen 7 en 7,9. Over de gehele lijn kunnen we vaststellen dat de RIN-waarden bij de alucup hoger liggen dan bij de *cryovial*. Er kan geen significant verschil worden aangetoond tussen de verschillende weefselgroottes voor de verschillende invriescmethoden en bijhorende tijdstippen ($p = 0,2 - 1,0$).



Figuur 22: Grafiek weefselgrootte t.o.v. invriescmethode/tijdstip voor leverweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentratie (ng/μl) weergegeven voor de verschillende weefselgroottes per invriescmethode en bijhorende tijdstippen. De foutbalken geven de standaarddeviatie weer. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur. OD ratio's (4= goed, 3= intermediair) en RIN-scores (6-7= intermediair, 7-8= goed, >8= goed).

3.2.1.2 PAV 2: Tijd tussen prelevatie en invriezen

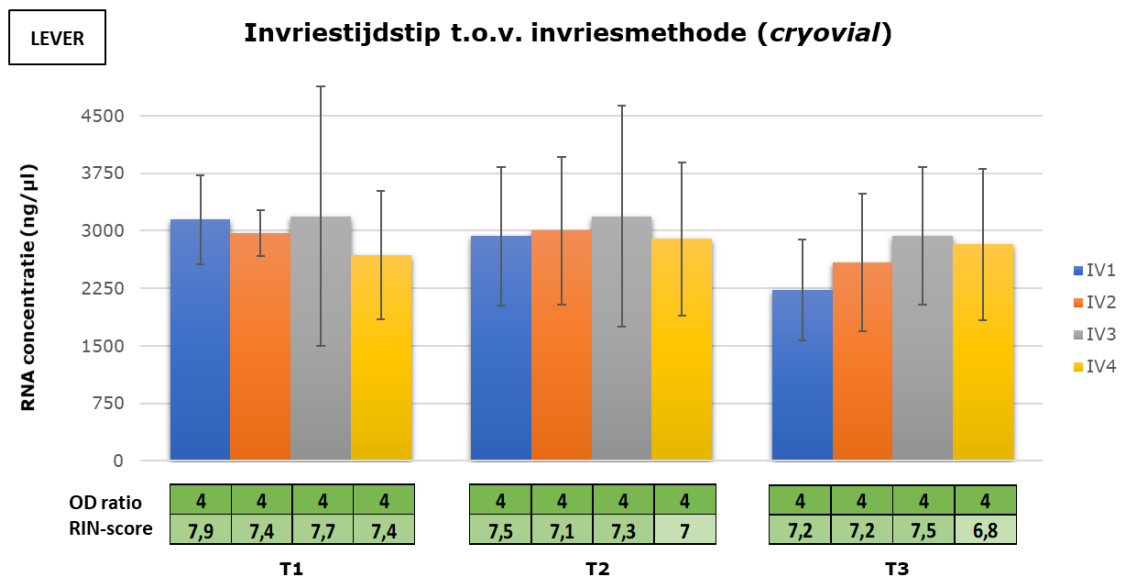


Figuur 23: Grafiek tijd tussen prelevatie en invriezen voor leverweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentraties (ng/µl) weergegeven van alucup voor de verschillende invriestijdstippen per invriesmethode. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentanaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentanaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur. OD ratio's (4= goed) en RIN-scores (>8= goed, 7-8= goed, 6-7= intermediair).

Uit Figuur 22 kan men tussen de 3 tijdstippen geen duidelijke trend waarnemen in de RNA-opbrengst. Echter valt ons op dat bij tijdstip 1, in tegenstelling tot tijdstip 2 en 3, een hogere RNA-concentratie wordt bekomen voor invriesmethode 3. Daarnaast ziet men enkel voor tijdstip 2 een hoge RNA-opbrengst bij invriesmethode 4. In het algemeen behaalt tijdstip 3 de laagste RNA-concentraties.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores voor weefsels in de alucups bevinden zich tussen 6,5 en 8,5. Uit de verkregen resultaten stelt men vast dat enerzijds tijdstip 1 de beste RIN-scores behaalt. Anderzijds is het opvallend dat tijdstip 3 minder goed scoort.

Er kan geen significant verschil worden aangetoond voor alucup tussen de verschillende tijdstippen en bijhorende invriesmethoden ($p = 0,147 - 0,850$).



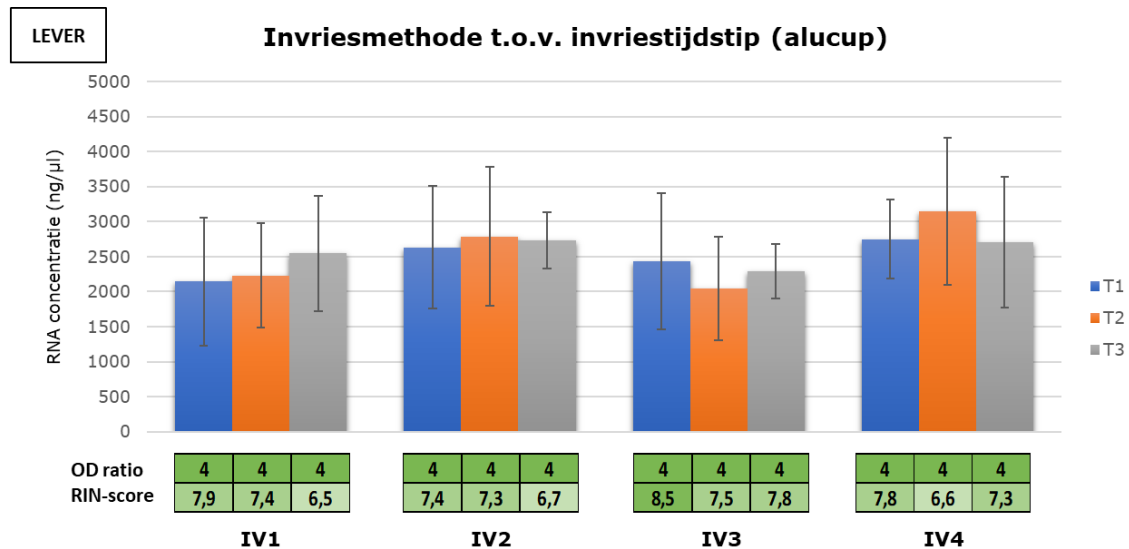
Figuur 24: Grafiek tijd tussen prelevatie en invriezen voor leverweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentraties (ng/ μ l) weergegeven van *cryovial* voor de verschillende invriestijdstippen per invriemethode. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur. OD ratio's (4= goed) en RIN-scores (7-8= goed, 6-7= intermediair)

Allereerst is uit bovenstaande grafiek geen duidelijke trend waar te nemen tussen de 3 tijdstippen. Over het algemeen zien we lagere RNA-opbrengsten bij tijdstip 3. Vervolgens is het opmerkelijk dat enkel T3 een veel lagere RNA-concentratie bekommt bij invriemethode 2 en dat bij elk tijdstip de hoogste RNA-opbrengst wordt behaald bij invriemethode 3.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores voor de weefsels in de *cryovials* bevinden zich tussen 6,8 en 7,9. Bij IV1 en IV4 is er een lichte daling waarneembaar in de RIN-scores.

Er kan geen significant verschil worden aangetoond voor *cryovial* tussen de verschillende tijdstippen en bijhorende invriemethoden ($p = 0,288 - 0,974$).

3.2.1.3 PAV 3: Invriesmethode

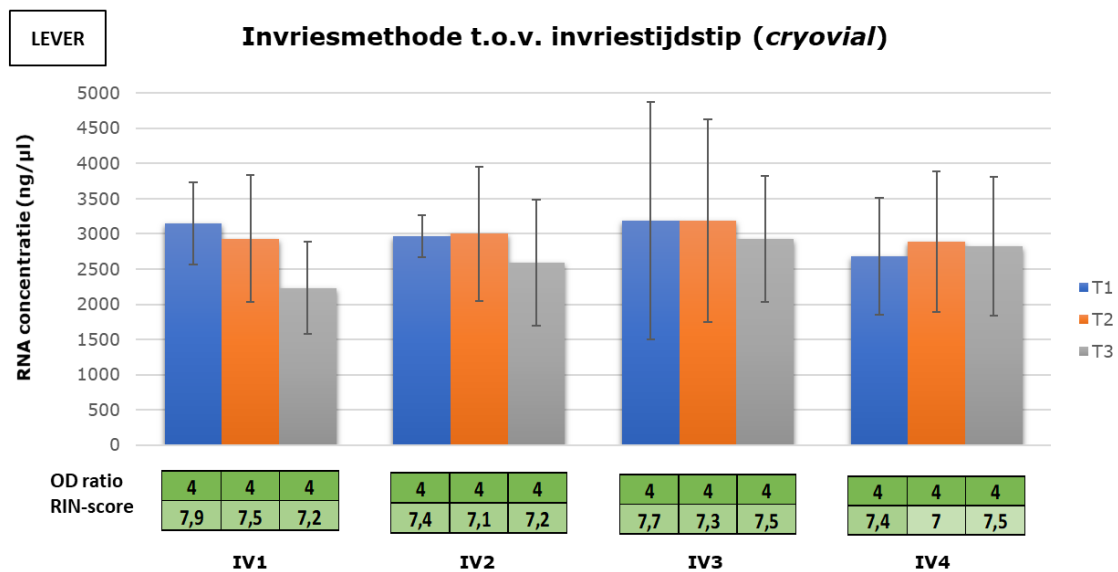


Figuur 25: Grafiek invriesmethoden voor leverweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentraties (ng/μl) weergegeven van alucup voor de verschillende invriesmethoden per tijdstip. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur. OD ratio's (4= goed) en RIN-scores (>8= goed, 7-8= goed, 6-7= intermediair)

Uit de grafiek in Figuur 25 stellen we vast dat de RNA-concentraties van invriesmethode 1 met de tijd toenemen. Verder is het opmerkelijk dat invriesmethode 4 de hoogste RNA-opbrengst oplevert bij tijdstip 2. Daarnaast heeft invriesmethode 3 de hoogste concentratie aan RNA bij tijdstip 1.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores voor de weefsels in de alucups bevinden zich tussen 6,5 en 8,5. Bij invriesmethode 3 worden er hogere RIN-scores opgemerkt. Er is verder geen trend op te merken.

Er kan geen significant verschil worden aangetoond voor alucup tussen de verschillende invriesmethode en bijhorende tijdstippen ($p = 0,642 - 0,964$).



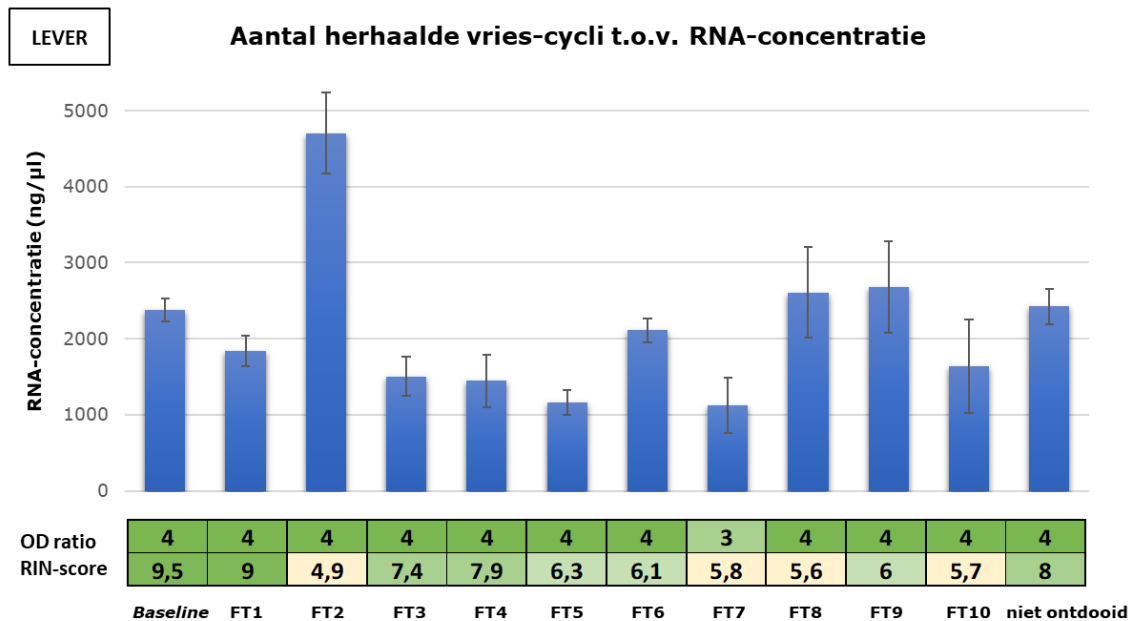
Figuur 26: Grafiek invriesmethoden voor leverweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentraties (ng/µl) weergegeven van *cryovial* voor de verschillende invriesmethoden per tijdstip. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur. OD ratio's (4= goed) en RIN-scores (7-8= goed, 6-7= intermediair).

We zien bij bovenstaande grafiek dat de RNA-concentraties van invriesmethode 1 met de tijd afnemen en dat invriesmethode 3 hogere RNA-opbrengsten oplevert. Voor invriesmethode 2 en 4 is een tegenovergesteld patroon waar te nemen bij tijdstip 1 en tijdstip 3. Tijdstip 1 heeft namelijk een hogere RNA-concentratie bij invriesmethode 2, terwijl de opbrengst aan RNA voor invriesmethode 4 hoger ligt bij tijdstip 3.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores voor de weefsels in de *cryovials* bevinden zich tussen 6,8 en 7,9. Invriesmethode 4 geeft lagere RIN-scores, maar er is geen algemene trend zichtbaar.

Er kan geen significant verschil worden aangetoond voor *cryovial* tussen de verschillende invriesmethode en bijhorende tijdstippen ($p = 0,208 - 0,906$).

3.2.1.4 PAV 4: Herhaalde vries-cycli



Figuur 27: Grafiek herhaalde vries-cycli voor leverweefsel. Op de grafiek worden de gemiddelde RNA-concentraties (ng/µl) weergegeven voor de verschillende cycli die weefselstukken gedurende 10 weken hebben ondergaan. *Baseline*, FT1 t.e.m. FT10, niet-ontdooide. OD ratio's (4= goed) en RIN-scores (>8= goed, 7-8= goed, 6-7= intermediair, <6= slecht).

Uit de grafiek in Figuur 26 kan worden vastgesteld dat FT2 de hoogste RNA-concentratie heeft en FT7 de laagste. Men merkt op dat er een gelijkaardige trend in RNA-opbrengst wordt verkregen tussen:

- *Baseline* en niet-ontdooide stuk weefsel;
- FT3 en FT4;
- FT5 en FT7;
- FT8 en FT9.

De OD ratio's hebben over de volledige lijn een score 4. De RIN-scores bevinden zich tussen 4,9 en 9,5. Deze zijn het hoogst bij de *baseline*, gevolgd door FT1 en het niet-ontdooide stuk weefsel. Tot slot is er aan de hand van de RIN-scores geen opvallende trend op te merken. Wat ons wel opvalt is dat vanaf cyclus 5 een opmerkelijk lagere RIN-score wordt bekomen.

3.2.2 Histologische analyse

3.2.2.1 PAV 1: Weefselgrootte

Uit Tabel IX kunnen we afleiden dat alle morfologische scores zich tussen 0 en 2 bevinden. Bij IV1 en 2 scoort *cryovial* opvallend beter dan alucup, terwijl de waarden bij IV4 voor beide weefselgroottes gelijkwaardig zijn aan elkaar. Voor zowel tijdstip 1, 2 als 3 wordt een hogere score verkregen bij het gebruik van een alucup. Voor de weefselgrootte kan de algemene trend waargenomen worden dat de scores voor alucup hoger zijn dan voor *cryovial*.

Tabel IX: Heat map van de weefselgrootte voor leverweefsel. In de heat map worden de gemiddelde histologische scores (0-1= goed, 2-3= intermediair) weergegeven voor de verschillende weefselgroottes per invriesmethode en -tijdstip. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur.

Invriesmethode	Alucup			Cryovial		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
IV1	2	2	2	1	1	2
IV2	1	1	2	0	1	1
IV3	1	1	2	1	1	1
IV4	1	1	1	1	1	1

3.2.2.2 PAV 2: Tijd tussen prelevatie en invriezen

Alle morfologische scores nemen een waarde aan tussen 0 en 2. Tijdstip 3 scoort opvallend hoger dan de andere 2 tijdstippen. Daarnaast bevindt de enige 0-score zich bij tijdstip 1. Verder vertonen T1 en T2 een gelijkaardig patroon, met uitzondering van de 0-score.

Tabel X: Heat map tijd tussen prelevatie en invriezen voor leverweefsel. In de heat map worden de gemiddelde histologische scores (0-1= goed, 2-3= intermediair) weergegeven voor de verschillende invriestijdstippen per invriesmethode en weefselgrootte. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur.

Invriesmethode	T1		T2		T3	
	Alucup	Cryovial	Alucup	Cryovial	Alucup	Cryovial
IV1	2	1	2	1	2	2
IV2	1	0	1	1	2	1
IV3	1	1	1	1	2	1
IV4	1	1	1	1	1	1

3.2.2.3 PAV 3: Invriesmethode

Alle morfologische scores nemen een waarde aan tussen 0 en 2. De enige 0-score bevindt zich bij invriesmethode 2. De bekomen resultaten bij IV1 zijn opvallend hoger dan de waarden bij IV2, 3 en 4. Bij IV4 wordt bij alle tijdstippen en weefselgroottes dezelfde waarde bekomen, namelijk score 1. Verder vertonen IV2 en 3 een gelijkaardig beeld, uitgenomen van de 0-score.

Tabel XI: Heat map invriemethoden voor leverweefsel. In de *heat map* worden de gemiddelde histologische scores (0-1= goed, 2-3= intermediair) weergegeven voor de verschillende invriemethoden per tijdstip en weefselgrootte. IV 1: droogijs; IV 2: droogijs met isopentaaan; IV 3: CryoPod™, IV 4: CryoPod™ met isopentaaan; T1: <30 minuten; T2: 2-4 uur en T3: >12 uur.

Invriemethode	IV1		IV2		IV3		IV4	
	Alucup	Cryovial	Alucup	Cryovial	Alucup	Cryovial	Alucup	Cryovial
T1	2	1	1	0	1	1	1	1
T2	2	1	1	1	1	1	1	1
T3	2	2	2	1	2	1	1	1

3.2.2.4 PAV 4: Herhaalde vries-cycli

Uit Tabel XII kan men visueel opmerken dat er histologisch voor de herhaalde vries-cycli geen duidelijke trend waarneembaar is. Alle morfologische scores nemen een waarde aan tussen 0 en 1. Zowel de *baseline*, het niet-ontdooide stuk weefsel, FT4 en FT6 krijgen de score 0. Alle andere tijdstippen behalen dezelfde score, namelijk 1.

Tabel XII: Heat map freeze-thaw (FT) voor leverweefsel. In de *heat map* worden de gemiddelde histologische scores (0-1= goed, 2-3= intermediair) weergegeven voor de verschillende cycli die weefselstukken gedurende 10 weken hebben ondergaan. *Baseline*, FT1 t.e.m. FT10, niet-ontdooit.

Baseline	0
FT1	1
FT2	1
FT3	1
FT4	0
FT5	1
FT6	0
FT7	1
FT8	1
FT9	1
FT10	1
Niet ontdooit	0

4 Discussie

Uit de literatuurstudie blijkt dat er tal van PAV een invloed hebben op de staalkwaliteit. Verschillende variabelen, namelijk de weefselgrootte, het invriestijdstip, de invriemethode en de vries-ontdooicycli, worden systematisch onderzocht. Door gebruik te maken van grafische- en statistische analyses kan een conclusie geformuleerd worden omtrent de onderzochte variabelen. Studies door Kap et al. aan de Erasmus MC biobank, hebben onderzocht dat stalen met een RIN-score groter dan 6,5 acceptabel zijn voor verder onderzoek. (Ji et al., 2017).

4.1 Moleculaire analyse

Dankzij de voldoende beschikbare data die werd verkregen bij de weefselgrootte, invriemethode en invriestijdstip, kan op de bekomen resultaten statistiek worden toegepast. Deze statistiek wordt uitgevoerd om te bepalen of de waargenomen trends bij de resultaten significant zijn. Daarnaast worden de bekomen resultaten voor elke variabele vergeleken en gestaafd met eerder uitgevoerde studies, indien mogelijk. Dit heeft betrekking tot de RNA-concentratie, RIN-score, OD ratio en statistische testen.

4.1.1 PAV 1: Weefselgrootte

Long

We zien dat de RNA-concentraties en bijhorende RIN-scores voor alucup over het algemeen hoger zijn dan voor *cryovial*. Dit kan wijzen op een mogelijks betere kwaliteit van het weefsel in de alucups. De omvang van het stuk weefsel heeft dus potentieel een invloed op de kwaliteit. In de studie van Kap et al. wordt beschreven dat het versnijden van weefsel in kleinere stukken nucleasen kan vrijstellen. Deze schadelijke enzymen degraderen nucleïnezuren en zorgen voor een daling van de kwaliteit.

De OD ratio's zijn over de gehele lijn goed met een score van 4, waardoor we kunnen stellen dat bij beide weefselgroottes voor het longweefsel een goede zuiverheid wordt bekomen. Voor de weefselgrootte wordt de statistische Mann-Whitney U test uitgevoerd. De bekomen resultaten hebben een p-waarde groter dan 0,05 waardoor deze niet significant zijn. De RNA-concentraties en bijhorende RIN-scores die voor alucup over het algemeen hoger zijn dan die voor *cryovial*, kunnen bevestigd worden indien er verder onderzoek wordt uitgevoerd. De resultaten worden mogelijks door verschillende factoren, zoals massa, type weefsel etc., beïnvloed.

Lever

In tegenstelling tot het longweefsel geeft de *cryovial* bij lever, tegen onze verwachtingen in, over het algemeen de hoogste RNA-opbrengst. Een mogelijke verklaring hiervoor is het optreden van een technische fout tijdens het uitvoeren van het TRI Reagent® protocol, bijvoorbeeld door onvoldoende homogenisatie.

Een andere mogelijkheid is dat het invriezen in verschillende weefselgroottes weefselafhankelijk is. Dit is aan te halen met het feit dat men bij longweefsel een omgekeerde trend waarneemt, namelijk betere resultaten bij alucup. Uit studies van Walker et al. is aangetoond dat RNA van een relatief hoge kwaliteit kan worden geïsoleerd uit alle postmortale weefsels, maar met variabiliteit in resultaten tussen verschillende weefseltypes.

Bij de RIN-scores vertoont de alucup opnieuw een beter resultaat. Dit ligt wel binnen onze verwachtingen, aangezien het versnijden van het weefsel zorgt voor de vrijstelling van nucleasen. Deze enzymen zullen een degradatie van nucleïnezuren veroorzaken. (ZYMO, 2019) (Kap, Oomen, Arshad, de Jong, & Riegman, 2014)

Daarnaast worden ook hier over de volledige lijn goede OD ratio's bekomen, waaruit we kunnen afleiden dat de RNA-extracten een goede zuiverheid hebben.

Voor de weefselgrootte wordt de statistische Mann-Whitney U test uitgevoerd. De bekomen resultaten hebben een p-waarde groter dan 0,05 waardoor deze niet significant zijn. Met het feit dat de resultaten mogelijks worden beïnvloed door verschillende factoren (bv. weefseltype en massa), kan de statistiek voor de bovenstaande aangehaalde resultaten niet worden ondersteund. Om dit te bevestigen zijn meer experimenten nodig.

4.1.2 PAV 2: Invriestijdstippen

Long

Bij de alucup worden de hoogste RNA-concentraties waargenomen bij tijdstip 2, terwijl de hoogste RNA-opbrengst voor de *cryovial* wordt bekomen bij tijdstip 3. We zien dat de RIN-scores bij de alucup beter zijn. Deze trend is te verwachten, opnieuw door de vrijstelling van schadelijke enzymen die een invloed zullen hebben op de RNA-kwaliteit.

Wanneer de RIN-scores van de 3 tijdstippen met elkaar vergeleken worden, ziet men een lichte daling naarmate de tijd tussen prelevatie en invriezen toeneemt. Aangezien, volgens onderzoek van Grizzle et. al en Walker et. al, de KIT veranderingen in transcriptie, genen en mRNA beïnvloedt, zal een betere RNA-kwaliteit worden verkregen bij een kortere KIT. Zowel de weefseldegradatie als de kans op artefacten worden dan tot een minimum herleid.

Voor de verschillende invriestijdstippen van alle RNA-extracten wordt een goede zuiverheid bekomen, mits alle OD ratio's een score van 4 behalen. Alle OD ratio's behalen een score van 4, wat wijst op een goede zuiverheid van alle RNA-extracten voor de verschillende invriestijdstippen.

De waarden van de RNA-concentraties voor deze variabele zijn normaal verdeeld, waardoor de One-Way ANOVA test wordt uitgevoerd. Bij alle resultaten wordt een p-waarde groter dan 0,05 bekomen, waardoor er geen significant verschil is op te merken.

Wanneer meerdere variabelen met elkaar vergeleken worden, is de kans groter dat er significante verschillen worden bekomen die feitelijk niet betekenisvol zijn. De post hoc Tukey test is hiervoor een correctie en zal de juiste significante verschillen weergeven, zonder vals positieve waarden. Bij de post hoc test wordt er echter ook geen significantie teruggevonden, aangezien alle resultaten groter zijn dan de p-waarde van 0,05. De concentratieverschillen zijn mogelijks niet te wijten aan de verschillende tijdstippen van invriezen, maar door toeval. Een andere mogelijke oorzaak is dat het afgewogen gewicht met 0,01 g varieert bij aanvang van de RNA-extracties, en aldus hogere en/of lagere concentraties teweegbrengt. Daarnaast zijn de concentratieverschillen mogelijks te verklaren doordat het tijdstip van invriezen weefselafhankelijk is. Dit wordt bevestigd in studies van Walker et. al, die aantonen dat RNA van een relatief hoge kwaliteit kan worden geïsoleerd uit alle postmortale weefsels, maar met variabiliteit in resultaten tussen verschillende weefseltypes. Ten slotte kunnen variaties in de handelingen leiden tot verschillen.

Lever

Bij de alucup zijn de RNA-concentraties gelijkaardig over de volledige lijn. Bij de resultaten van de *cryovial* zien we bij tijdstip 2 de hoogste RNA-concentraties, alhoewel het verschil minimaal is. Opnieuw worden bij alucup betere RIN-scores gevonden dan bij de *cryovial*. Zoals hierboven vermeld valt dit binnen de verwachtingen, door de invloed van vrijgestelde schadelijke enzymen.

Wanneer de RIN-scores van de 3 tijdstippen met elkaar vergeleken worden, ziet men eenzelfde trend als bij het longweefsel. Er is namelijk een lichte daling naarmate de tijd tussen prelevatie en invriezen toeneemt. De toenemende KIT beïnvloedt zowel de transcriptie als veranderingen in genen en mRNA. Een lagere KIT zal daarom de kwaliteit van het RNA beter waarborgen, alsook de kans op artefacten verkleinen. (Walker et al., 2016) (Grizzle, Otali, Sexton, & Atherton, 2016)

Met het feit dat de OD ratio's over de gehele lijn een score 4 aannemen, kunnen we een goede zuiverheid stellen voor de bekomen RNA-extracten. Aangezien we voor de invriestijdstippen eenzelfde trend waarnemen omtrent de RNA-kwaliteit van zowel long- als leverweefsel, is deze pre-analytische variabele vermoedelijk weefselafhankelijk.

De waarden van de RNA-concentraties van deze variabele zijn normaal verdeeld, waardoor de One-Way ANOVA en post hoc Tukey test wordt uitgevoerd. Alle resultaten hebben echter een p-waarde groter dan 0,05. Er is dus geen sprake van significantie. Een mogelijke aanleiding is de gebruikte range (0,04 – 0,06 g) voor het afwegen van weefsel bij aanvang van de RNA-extracties. Verschillen kunnen opduiken door variaties in de uitgevoerde handelingen. Tot slot is de weefselafhankelijkheid ook een mogelijke oorzaak. Dit werd al bevestigd in studies en besproken bij 4.1.1.

4.1.3 PAV 3: Invriesmethoden

Long

We zien bij zowel de alucup als de *cryovial*, dat de hoogste RNA-concentraties worden bekomen bij het gebruik van droogijs. De concentraties bij IV1 en IV2 zijn gelijkaardig of hoger dan bij IV3 en IV4. Dit valt niet binnen onze verwachtingen, want invriezen met vloeibare stikstof in combinatie met isopentaaan wordt beschreven als de norm. Uit een studie van Biocision blijkt dat er zo een gelijkmatige snelle bevriezing wordt bekomen, waardoor minder RNA-degradatie optreedt.

Wanneer de RIN-scores van de 4 invriesmethoden met elkaar vergeleken worden, merkt men op dat deze allemaal een score van 5,7 of hoger behalen. Over het algemeen behaalt alucup betere RIN-scores dan *cryovial*. Of de invriesmethode hier een rol in speelt, is onbekend en wordt niet besproken in studies. Echter kan opnieuw de omvang van het weefsel een oorzaak zijn van de betere RIN-scores.

De OD ratio's scoren over de gehele lijn de maximumwaarde, waardoor we kunnen stellen dat bij de alle invriesmethodes voor longweefsel een goede zuiverheid wordt bekomen.

De resultaten van de invriesmethoden zijn niet normaal verdeeld, en aldus wordt de Kruskal-Wallis test uitgevoerd. Doordat alle resultaten de p-waarde van 0,05 overschrijden, is er bij deze variabele geen significantie gevonden. Hieruit kunnen we concluderen dat de vier invriesmethoden mogelijks gelijkaardig zijn aan elkaar.

Lever

Bij de alucup zien we dat vloeibare stikstof in combinatie met isopentaaan de hoogste RNA-concentraties oplevert. Bij de *cryovial* is er geen duidelijke trend waarneembaar. Dit is volgens onze verwachtingen, aangezien vloeibare stikstof in combinatie met isopentaaan in de literatuur van Steu et. al wordt beschreven als de norm. Doordat het weefsel bij een lagere temperatuur wordt ingevroren, zal er sneller een volledige bevriezing tot stand komen. Hierdoor zal het ontstaan van ijskristallen tot een minimum worden herleid, wat zal leiden tot minder weefsel- en RNA-degradatie. (Biocision, 2013)

Wanneer de RIN-scores van de 4 invriesmethoden met elkaar vergeleken worden, merkt men op dat deze een score van 6,5 of hoger behalen. Opvallend bij alucup zijn de lage RIN-scores bij het gebruik van droogijs (IV1 en IV2) op tijdstip 3. Een mogelijke oorzaak van deze lage scores is de vorming van ijskristallen door *snappfreezing*. Dit leidt namelijk tot zoutophoping en celschade, wat de integriteit kan beïnvloeden. (Thermofisher, s.d.) (Neumeister, 2014)

Voor alle RNA-extracten kan over een goede zuiverheid worden gesproken omdat de OD ratio's over de gehele lijn een waarde van 4 aannemen.

De resultaten van de invriesmethoden zijn normaal verdeeld, en aldus wordt de One-Way ANOVA en post hoc Tukey test uitgevoerd. Bij deze variabele is er geen significantie gevonden, aangezien alle resultaten groter zijn dan de p-waarde van 0,05. Hieruit kunnen we concluderen dat de vier invriesmethoden mogelijks gelijkaardig zijn aan elkaar, zoals de studie van Steu et.al bevestigd.

4.1.4 PAV 4: Invries- en ontdooicycli

Allereest wordt voor de bekomen resultaten van de herhaalde vries-dooi cycli geen statistiek uitgevoerd door de minimale hoeveelheid data. Studies van Keke Yu et al. en Jochumsen et al. halen aan dat 3 herhaalde vries-dooi cycli een beperkte invloed hebben op de RNA-kwaliteit. Bijkomend worden in deze studies hoge RIN-waarden waargenomen bij weefsels die geen invries- en ontdooicycli hebben ondergaan. Deze vaststelling is ook in dit onderzoek op te merken bij de bekomen RIN-scores van de *baseline* van zowel long- als leverweefsel, respectievelijk 8,3 en 9,5. (cf. 3.1.1.4 en 3.2.2.4)

Lever

Het aantal cycli dat leidt tot een significante vermindering van de kwaliteit, is afhankelijk van het nucleasegehalte in de weefselsoort. Voor leverweefsel blijkt uit het onderzoek van Keke Yu et al. dat de RNA-kwaliteit significant daalt na 5 herhaalde invries- en ontdooicycli. In ons onderzoek is er vanaf FT5 (cf. 3.2.2.4) een daling van de RIN-scores op te merken, die vervolgens abrupt afneemt. Opvallend is de lage RNA-kwaliteit bij FT2, met een RIN-score van 4,9. Een mogelijke verklaring hiervoor zijn variaties van de uitgevoerde handelingen tijdens het RIN-protocol, zoals het verdunnen van het staal of het vullen van de chip. Daarnaast kan dit ook wijzen op weefselafhankelijkheid.

De OD ratio's behalen voor alle herhaalde vriescycli de maximumwaarde, waardoor er dus sprake is van een goede zuiverheid.

Long

Het onderzoek van Keke Yu et al. haalt eveneens aan dat voor longweefsel de RNA-kwaliteit significant daalt na 5 herhaalde invries- en ontdooicycli. Uit hun studie hebben ze ondervonden dat de RNA-kwaliteit na 3 herhaalde cycli daalt met 17,75%. Na 5 herhaalde cycli daalde de RNA-integriteit echter met 31,29%.

Voor het longweefsel zijn alle bekomen RIN-scores hoger dan 6,3. Uit ons eigen onderzoek is geen daling in RNA-kwaliteit op te merken tussen de verschillende cycli. Er is namelijk een golvend patroon van stijgingen en dalingen op te merken in de RIN-scores. Een oorzaak hiervoor is nog niet bekend. Een mogelijke verklaring is de beperkte hoeveelheid resultaten, waardoor het uitvoeren van een statische analyse niet mogelijk is.

Naast de weefselafhankelijkheid, kunnen uitgevoerde handelingen leiden tot technische fouten, zoals het maken van een verdunning of het vullen van de chip.

Echter wordt aangehaald in de studies van Keke Yu et al. en Benjamin P. Kellman et al. dat de oorzaken die een effect uitoefenen op de weefseldegradatie onbekend zijn. Een uitgebreide kwantificering is noodzakelijk om het effect van herhaalde vriescycli te onderzoeken.

De bekomen resultaten in deze pilootstudie zijn onvoldoende om concrete besluiten te vormen. Verder onderzoek, zoals meerdere herhalingen van hetzelfde experiment, is noodzakelijk om een correcte conclusie te kunnen formuleren.

De OD ratio's behalen net zoals bij het leverweefsel een score 4, waardoor er voor alle herhaalde vriescycli een goede zuiverheid wordt bekomen.

4.2 Histologische analyse

Voor het longweefsel wordt er geen histologische analyse uitgevoerd, omdat de optimalisatie van het protocol voor het snijden van longcoupes pas plaatsvond bij varken 3. Hierdoor zijn de coupes van de verschillende varkens niet op een uniforme wijze gemaakt. Er zijn namelijk meer mechanische artefacten, zoals scheuren, aanwezig in de cryocoupes van de eerste 2 varkens (cf. Figuur 21).

Voor het leverweefsel nemen alle morfologische scores een waarde aan tussen 0 en 2. In het algemeen kunnen we uit dit onderzoek voor leverweefsel dus concluderen dat de weefselkwaliteit voor alle onderzochte weefselgroottes, invriesmethoden en invriestijdstoppen goed tot intermediair aanvaardbaar is. De gebruikte methode is echter subjectief, waardoor in de toekomst aangeraden wordt een objectief scoresysteem te ontwikkelen.

4.2.1 PAV 1: Weefselgrootte

We zien in de *heat map* dat de scores verkregen bij het leverweefsel allemaal een waarde aannemen tussen de range van 0 en 2. De scores voor de *cryovial* zijn algemeen lager dan deze voor de *alucup*. Dit kan mogelijks wijzen op een betere kwaliteit bij een kleinere weefselgrootte. De omvang van het weefsel heeft dus een potentiële invloed op de histologische kwaliteit. Deze resultaten bevestigen onze verwachtingen, aangezien de literatuur hetzelfde fenomeen beschrijft. Bij een kleiner stuk weefsel zal er sneller een volledige bevriezing plaatsvinden. Hoe kleiner het stuk, hoe gelijkmatiger en grondiger deze bevriezing tot stand zal komen.

Bij een kortere invriestijd zal de vorming van ijskristallen tot een minimum worden herleid, waardoor de kans op artefacten verkleind. Er wordt aangeraden om geen weefselstukken in te vriezen die groter zijn dan de diameter van de cryocassette/cryokop van het toestel waarmee men de coupes zal snijden. Op deze manier wordt vermeden dat het weefsel opnieuw versneden moet worden, wat gunstig zal zijn voor de weefselkwaliteit. (Wallace, 2020) (Bruce-Gregorios, 2006)

4.2.2 PAV 2: Invriestijdstippen

Wanneer de morfologische scores van het leverweefsel voor de verschillende tijdstippen met elkaar vergeleken worden, wordt een verhoging waargenomen naargelang de tijd tussen prelevatie en invriezen toeneemt. Men ziet dus een lichte daling van de weefselkwaliteit naarmate de KIT stijgt. Dit resultaat geeft aan dat hoe langer men wacht met het invriezen van weefsel, hoe slechter de morfologie zal zijn. Deze resultaten bevestigen onze verwachtingen, aangezien eerder onderzoek van Grizzle et al. aantoont dat zowel de weefseldegradatie als de kans op artefacten tot een minimum worden herleid bij een kortere KIT (cf. 1.3.2.1). Andere studies werden hierover niet teruggevonden. (Grizzle, Otali, Sexton, & Atherton, 2016)

4.2.3 PAV 3: Invriesmethoden

Bij IV3 en 4 worden respectievelijk betere resultaten bekomen dan bij IV1 en 2. Dit valt binnen onze verwachtingen. *Snapfreezing* met vloeibare stikstof zal minder artefacten veroorzaken dan *snapfreezing* met droogijs, doordat het weefsel bij een lagere temperatuur wordt ingevroren. De lagere temperatuur zorgt voor een snellere invriezing, waardoor de kans op het vormen van ijskristallen en artefacten zal verkleinen. Wanneer men de morfologie van het weefsel wil bewaren, is het dus aangeraden om vloeibare stikstof te gebruiken in plaats van droogijs.

De histologische scores bij IV1 zijn opvallend hoger, en dus minder goed, dan de scores verkregen bij IV2. Dit is een te verwachten fenomeen. Droogijs heeft een temperatuur van -80°C , waardoor er bij grote weefsels een trage en ongelijkmatige bevroering optreedt. Uit studies van Suvarna et al. is gebleken dat invriezen met droogijs zorgt voor ijsvorming.

Wanneer droogijs gecombineerd wordt met isopentaaan zal een gelijkmatigere bevroering plaatsgrijpen. Dit zal leiden tot een drastische vermindering van vriesartefacten.

Vloeibare stikstof in combinatie met isopentaaan heeft volgens de literatuur van NYU Langone *Medical Center* en Suvarna et al. de voorkeur. Door vloeibare stikstof met isopentaaan te combineren, zal er geen dampscherm rondom de warme weefsels (KT) gevormd worden. Hierdoor zal het weefsel gelijkmatiger bevroren, wat zal leiden tot minder vriesartefacten. Dit fenomeen is ook in ons eigen onderzoek waar te nemen.

Over het algemeen worden bij IV4 de beste resultaten bekomen, waardoor vloeibare stikstof in combinatie met isopentaaan wordt aanbevolen.

4.2.4 PAV 4: Invries- en ontdooicycli

In eerder uitgevoerde studies van Ji et al. en Shabihkhani et al. wordt een betere morfologie waargenomen bij weefsels die geen invries- en ontdooicycli hebben ondergaan. Door het optreden van meerdere invriescycli zal de vorming van ijskristallen, en dus ook het aantal vriesartefacten, toenemen.

Deze ijskristallen verhogen de degradatie van RNA en andere componenten. Daarnaast zorgt de ontdooiing van weefsel voor de vrijstelling van nucleasen.

In dit onderzoek nemen alle scores een waarde aan van 0 of 1. Hieruit kunnen we afleiden dat de kwaliteit bij de verschillende cycli gelijkaardig is. Er is dus geen stijging van scores, of daling van kwaliteit, op te merken naarmate het weefsel meerdere invries- en ontdooicycli ondergaat. De beperkte hoeveelheid gegevens kan hier een mogelijke aanleiding en verklaring voor zijn. Hierdoor is het uitvoeren van een statische analyse niet mogelijk en wordt er geen reproduceerbaarheid bekomen. De bekomen resultaten zijn dus niet volledig betrouwbaar en verder onderzoek is noodzakelijk om een betrouwbare conclusie te formuleren. (Ji et al., 2017) (Shabihkhani et al., 2014)

5 Besluit

In deze bachelorproef is gezocht naar een antwoord op de onderzoeksvraag: 'Welke invloed hebben pre-analytische variabelen op zowel moleculair als histologisch vlak in long- en leverweefsel?'. Hiervoor hebben we een kwantitatief onderzoek uitgevoerd, waarbij de concentraties van de onderzochte stalen werden geanalyseerd. Via deze kwantitatieve methode zijn we in staat om de RIN-score en OD ratio te bepalen, waarna een inzicht wordt gekregen in de kwaliteit van het weefsel.

Invriezen in een *cryovial* bij een kortere KIT blijkt voor beide weefsels de beste RNA-kwaliteit op te leveren. Bij de verschillende invriesmethoden is er echter geen opvallende trend waarneembaar. Uit de statistische testen is gebleken dat de waargenomen trends bij de PAV van lever- en longweefsel niet significant zijn, en dus mogelijks gebaseerd zijn op toeval. De kleine omvang van de bekomen dataset kan echter een mogelijke reden zijn voor de statische insignificantie. Om dit te bevestigen moet het experiment meerdere malen herhaald worden, zodat een grotere representatievere dataset wordt verkregen.

Bij het onderzoek van de herhaalde invries- en ontdooicycli is de geleidelijke afname van RNA-kwaliteit, zoals beschreven in studies, niet terug te vinden. Dit kan mogelijks door de beperkte hoeveelheid gegevens, maar de specifieke reden hiervoor is nog niet gekend. Evenwel heeft de *baseline* voor beide weefsels de beste kwaliteit, gevolgd door het niet-ontdooide stuk en de eerste cyclus.

Uit de OD ratio's is gebleken dat bij alle verschillende variabelen zuiver RNA is bekomen. Het gebruikte RNA-extractie protocol, in combinatie met de bijhorende invriesmethoden, is dus aanbevolen.

Zowel een kleinere weefselgrootte als een kortere KIT zullen leiden tot een betere morfologie. Invriesmethode 4, gebruikmakend van vloeibare stikstof in combinatie met isopentaan, geeft minder vriesartefacten door de snellere en gelijkmatigere invriezing. De gebruikte methode is echter subjectief, waardoor de ontwikkeling van een objectief scoresysteem in de toekomst aangeraden wordt. De minimale hoeveelheid aan gegevens zorgt ervoor dat op basis van onze bekomen resultaten geen definitieve conclusie kan getrokken worden.

Algemeen kunnen we uit dit onderzoek besluiten dat een kleinere weefselgrootte bij een zo kort mogelijke koude ischamietijd de beste RNA-kwaliteit oplevert. Daarnaast blijkt vloeibare stikstof in combinatie met isopentaan het best de histologische kwaliteit te waarborgen. Uit de bekomen OD ratio's blijkt dat bij alle PAV zuiver RNA wordt verkregen. Echter werd bij alle onderdelen slechts een minimale hoeveelheid data verkregen. Omwille van deze reden is het aangeraden om verder onderzoek uit te voeren. Alsook is het aanbevolen additionele condities te onderzoeken, zoals andere tijdstippen, groottes etc. om de reproduceerbaarheid na te gaan.

Bibliografie

- 3DHistech. (2018, 4 juni). *Pannoramic 250 Flash III*. Geraadpleegd op 27 maart 2020, van <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/APD/Product-Guides/US-Only-Pannoramic-250-FLASH-III-2-Users-Guide-EN-Rev1.pdf>
- Agilent. (2019, 30 april). *Sample Quality Control, Electrophoresis, Bioanalyze*. Geraadpleegd op 8 maart 2020, van <https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-instrument/2100-bioanalyzer-instrument-228250>
- Agilent technologies. (2006). *Agilent 2100 Bioanalyzer 2100 Expert User's Guide* (2006^{ste} editie). Geraadpleegd op 8 maart 2020, van http://www.ihb.cas.cn/fxcszx/fxcs_xgz/201203/P020120322529861139260.pdf
- Agilent technologies. (2017 februari). *Using Your Chip Priming Station*. Geraadpleegd op 9 juni 2020, van <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/chipPriming%20.pdf>
- Alpha. (s.d.). Droogijs bestellen bij Alpha. Geraadpleegd op 1 juni 2020, van <https://www.alpha.be/nl/technologie/212714/droogijs-bestellen>
- Anderlik, M. R. (2003). Commercial Biobanks and Genetic Research. *American Journal of Pharmacogenomics*, 3(3), 203–215. Geraadpleegd op 9 mei 2020, van <https://doi.org/10.2165/00129785-200303030-00006>
- Auer, H., Mobley, J., Ayers, L., Bowen, J., Chuaqui, R., Johnson, L., ... Ramirez, N. (2014). The effects of frozen tissue storage conditions on the integrity of RNA and protein. *Biotechnic & Histochemistry*, 89(7), 518–528. Geraadpleegd op 30 mei, van <https://doi.org/10.3109/10520295.2014.904927>
- Belgian cancer registry. (2009). *The Belgian Virtual Tumourbank*. Geraadpleegd op 8 mei 2020, van https://kankerregister.org/tumourbank.aspx?url=BVT_home
- Betsou, F., Barnes, R., Burke, T., Coppola, D., DeSouza, Y., Eliason, J., ... Gunter, E. (2009). Human Biospecimen Research: Experimental Protocol and Quality Control Tools. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18(4), 1017–1025. Geraadpleegd op 7 april 2020, van <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-08-1231>
- Betsou, F., Lehmann, S., Ashton, G., Barnes, M., Benson, E. E., Coppola, D., ... Gunter, E. (2010). Standard Preanalytical Coding for Biospecimens: Defining the Sample PREanalytical Code. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(4), 1004–1011. Geraadpleegd op 8 mei 2020, van <https://doi.org/10.1158/1055-9965.epi-09-1268>

- Bindhu, P., Krishnapillai, R., Thomas, P., & Jayanthi, P. (2013). Facts in artifacts. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 17(3), 397. Geraadpleegd op 23 april 2020, van <https://doi.org/10.4103/0973-029x.125206>
- Biocision. (2013 oktober). *Snap Freezing Using Dry Ice or Liquid Nitrogen*. Geraadpleegd op 5 juni 2020, van https://biocision.com.s219960.gridserver.com/uploads/docs/appnote_snapfreezing_2013.pdf
- Brooks life sciences. (s.d.). *CryoPod™ Carrier For Cryogenic Sample Transport | Brooks Life Sciences*. Geraadpleegd op 25 maart 2020, van <https://www.brookslifesciences.com/products/cryopod-carrier>
- Bruce-Gregorios, J. (2006). *Histopathologic Techniques* (2de editie). Quezon City, Philippines: Goodwill Trading Co., Inc.
- Budimir, D., Polašek, O., Marušić, A., Kolčić, I., Zemunik, T., Boraska, V., ... Rudan, I. (2011). Ethical aspects of human biobanks: a systematic review. *Croatian Medical Journal*, 52(3), 262–279. Geraadpleegd op 4 april 2020, van <https://doi.org/10.3325/cmj.2011.52.262>
- Carraro, P., Zago, T., & Plebani, M. (2012). Exploring the Initial Steps of the Testing Process: Frequency and Nature of Pre-analytic Errors. *Clinical Chemistry*, 58(3), 638–642. Geraadpleegd op 22 april 2020, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.175711>
- Children's tumor foundation. (s.d.). *Tissue Biobank*. Geraadpleegd op 4 mei 2020, van <https://www.ctf.org/understanding-nf/ctf-biobank>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2), 581–585. Geraadpleegd op 6 maart 2020, van <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
- Clinical lab products. (2015, 17 december). *Cryogenic Carrier Facilitates Transport of Specimens*. Geraadpleegd op 25 maart 2020, van <http://www.clpmag.com/2015/12/cryogenic-carrier-facilitates-transport-specimens/>
- Coppola, L., Cianflone, A., Grimaldi, A. M., Incoronato, M., Bevilacqua, P., Messina, F., ... Salvatore, M. (2019). Biobanking in health care: evolution and future directions. *Journal of Translational Medicine*, 17(1). Geraadpleegd op 3 mei 2020, van <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1922-3>
- Creative Diagnostics. (2007). *Total Protein Extraction by TRIzol* [Foto]. Geraadpleegd op 29 februari 2020, van <https://www.creative-diagnostics.com/total-protein-extraction-by-trizol.htm>

- Cutler, C. (2020, 25 maart). *Overview Agilent Micro fluidics* [Presentatieslides]. Geraadpleegd op 10 maart, van <https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/Overview%20Agilent%20Microfluidics.pdf>
- Ellervik, C., & Vaught, J. (2015). Preanalytical Variables Affecting the Integrity of Human Biospecimens in Biobanking. *Clinical Chemistry*, *61*(7), 914–934. Geraadpleegd op 3 mei, van <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.228783>
- Europese patiëntenacademie. (2015, 17 november). *P-waarde*. Geraadpleegd op 30 mei 2020, van <https://www.eupati.eu/nl/glossary/p-waarde/>
- Giri, D. (2020, 9 januari). *Hematoxylin and Eosin staining : Principle, Procedure and Interpretation*. Geraadpleegd op 8 maart 2020, van <https://laboratoryinfo.com/hematoxylin-and-eosin-staining/>
- Glasa, J., Kollár, D., Čvapek, P., Glasová, H., Antošová, M., Pella, D., & Kvietiková, I. (2020). Establishing a national biobank. Biobanking infrastructure initiative in Slovakia - Public policy, legal and ethical issues. *Health Policy and Technology*, *9*(1), 53–55. Geraadpleegd op 3 mei, van <https://doi.org/10.1016/j.hlpt.2019.11.005>
- Grizzle, W. E., Bell, W. C., & Sexton, K. C. (2011). Issues in collecting, processing, and storing human tissues and associated information to support biomedical research. *Cancer Biomarkers*, *9*(1–6), 531–549. Geraadpleegd op 22 april 2020, van <https://doi.org/10.3233/cbm-2011-0183>
- Grizzle, W. E., Otali, D., Sexton, K. C., & Atherton, D. S. (2016a). Effects of Cold Ischemia on Gene Expression: A Review and Commentary. *Biopreservation and Biobanking*, *14*(6), 548–558. Geraadpleegd op 22 april 2020, van <https://doi.org/10.1089/bio.2016.0013>
- Guerrera, F., Tabbò, F., Bessone, L., Maletta, F., Gaudiano, M., Ercole, E., ... Inghirami, G. (2016). The Influence of Tissue Ischemia Time on RNA Integrity and Patient-Derived Xenografts (PDX) Engraftment Rate in a Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Biobank. *PLOS ONE*, *11*(1), e0145100. Geraadpleegd op 8 mei 2020, van <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145100>
- Hansson, M. G. (2008). Ethics and biobanks. *British Journal of Cancer*, *100*(1), 8–12. Geraadpleegd op 10 april, van <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604795>
- Harati, M. D., Williams, R. R., Movassaghi, M., Hojat, A., Lucey, G. M., & Yong, W. H. (2018). An Introduction to Starting a Biobank. *Methods in Molecular Biology*, 7–16. Geraadpleegd op 10 april, van https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_2
- Hiruz. (s.d.). *Bioresource Center Ghent*. Geraadpleegd op 8 maart 2020, van <http://hiruz.be/service/brc/>

- Hiruz. (s.d.). *Operational support: sample processing or storage needs?* Geraadpleegd op 8 maart 2020, van <http://hiruz.be/operational-support-sample-processing-or-storage-needs/>
- Huebinger, J., Han, H.-M., Hofnagel, O., Vetter, I. R., Bastiaens, P. I. H., & Grabenbauer, M. (2016). Direct Measurement of Water States in Cryopreserved Cells Reveals Tolerance toward Ice Crystallization. *Biophysical Journal*, *110*(4), 840–849. Geraadpleegd op 30 maart 2020, van <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.09.029>
- IBM. (s.d.). *Sign up for SPSS Statistics*. Geraadpleegd op 9 juni 2020, van <https://www.ibm.com/account/reg/be-en/signup?formid=urx-19774>
- ISO. (2018). *Biotechnology - Biobanking - General requirements for biobanking*. Geraadpleegd op 8 mei 2020, van <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:20387:ed-1:v1:en>
- Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., ... Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, *6*(1), 12–18. Geraadpleegd 7 april 2020, van <https://doi.org/10.1016/j.imr.2016.12.001>
- Kap, M., Oomen, M., Arshad, S., de Jong, B., & Riegman, P. (2014). Fit for Purpose Frozen Tissue Collections by RNA Integrity Number-Based Quality Control Assurance at the Erasmus MC Tissue Bank. *Biopreservation and Biobanking*, *12*(2), 81–90. Geraadpleegd 22 april, van <https://doi.org/10.1089/bio.2013.0051>
- Kap, M., Sieuwerts, A. M., Kubista, M., Oomen, M., Arshad, S., & Riegman, P. (2015). The Influence of Tissue Procurement Procedures on RNA Integrity, Gene Expression, and Morphology in Porcine and Human Liver Tissue. *Biopreservation and Biobanking*, *13*(3), 200–206. Geraadpleegd op 23 april 2020, van <https://doi.org/10.1089/bio.2014.0076>
- Karlsson, J. O. M., & Toner, M. (1996). Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*, *17*(3), 243–256. Geraadpleegd op 23 april 2020, van [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)85562-1](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)85562-1)
- Kinkorová, J. (2015). Biobanks in the era of personalized medicine: objectives, challenges, and innovation. *EPMA Journal*, *7*(1). Geraadpleegd op 5 april 2020, van <https://doi.org/10.1186/s13167-016-0053-7>
- Kirwan, J. A., Brennan, L., Broadhurst, D., Fiehn, O., Cascante, M., Dunn, W. B., ... Velagapudi, V. (2018). Preanalytical Processing and Biobanking Procedures of Biological Samples for Metabolomics Research: A White Paper, Community Perspective (for "Precision Medicine and Pharmacometabolomics Task Group"—The Metabolomics Society Initiative). *Clinical Chemistry*, *64*(8), 1158–1182. Geraadpleegd op 22 april 2020, van <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.287045>

- Klebe, R. J., Grant, G. M., Grant, A. M., Garcia, M. A., Giambernardi, T. A., & Taylor, G. P. (1996). RT-PCR Without RNA Isolation. *BioTechniques*, 21(6), 1094–1100. <https://doi.org/10.2144/96216rr02>
- Liebeke, M., & Bundy, J. G. (2011). Tissue disruption and extraction methods for metabolic profiling of an invertebrate sentinel species. *Metabolomics*, 8(5), 819–830. Geraadpleegd op 6 maart 2020, van <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0377-1>
- Lightfoot, S. (2002, 1 augustus). *Quantitation comparison of total RNA using the Agilent 2100 bioanalyzer, ribogreen analysis and UV spectrometry*. Geraadpleegd op 25 maart 2020, van <https://genome.duke.edu/sites/default/files/Quantitation%20with%20agilent%20bioanalyzer%20ribogreen%20UV.pdf>
- Lippi, G., Betsou, F., Cadamuro, J., Cornes, M., Fleischhacker, M., Fruekilde, P., ... Simundic, A.-M. (2019). Preanalytical challenges – time for solutions. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 57(7), 974–981. Geraadpleegd op 23 april 2020, van <https://doi.org/10.1515/cclm-2018-1334>
- Loerting, T., Fuentes-Landete, V., Handle, P. H., Seidl, M., Amann-Winkel, K., Gainaru, C., & Böhmer, R. (2015). The glass transition in high-density amorphous ice. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 407, 423–430. Geraadpleegd op 30 maart 2020, van <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2014.09.003>
- Lou, J. J., Mirsadraei, L., Sanchez, D. E., Wilson, R. W., Shabihkhani, M., Lucey, G. M., ... Yong, W. H. (2014). A review of room temperature storage of biospecimen tissue and nucleic acids for anatomic pathology laboratories and biorepositories. *Clinical Biochemistry*, 47(4–5), 267–273. Geraadpleegd op 18 maart 2020, van <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.12.011>
- Ma, Y., Dai, H., & Kong, X. (2012). Impact of warm ischemia on gene expression analysis in surgically removed biosamples. *Analytical Biochemistry*, 423(2), 229–235. Geraadpleegd op 8 mei 2020, van <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.02.003>
- Mayo clinic. (2019, 6 augustus). *Center for Clinical and Translational Science (CCaTS)*. Geraadpleegd op 8 mei 2020, van <https://www.mayo.edu/research/centers-programs/center-clinical-translational-science/community/integrating-special-populations-program/mayo-clinic-umbilical-cord-blood-biobank>
- Micke, P., Ohshima, M., Tahmasebpoor, S., Ren, Z.-P., Östman, A., Pontén, F., & Botling, J. (2006). Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Laboratory Investigation*, 86(2), 202–211. Geraadpleegd op 3 mei 2020, van <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700372>

- Microchem laboratory. (s.d.). *Freeze-Thaw Stability Testing | Microchem Laboratory*. Geraadpleegd op 22 februari 2020, van <http://microchemlab.com/test/freeze-thaw-stability-testing>
- Mitchell, D., Geissler, J., Parry-Jones, A., Keulen, H., Schmitt, D. C., Vavassori, R., & Matharoo-Ball, B. (2015). Biobanking from the patient perspective. *Research Involvement and Engagement*, 1(1). Geraadpleegd op 15 februari 2020, van <https://doi.org/10.1186/s40900-015-0001-z>
- Mueller, O., Lightfoot, S., & Schroeder, A. (2016, 21 januari). *RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control*. Geraadpleegd op 15 maart 2020, van <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-1165EN.pdf>
- Neumeister, V. M. (2014). Tools to assess tissue quality. *Clinical Biochemistry*, 47(4–5), 280–287. Geraadpleegd 26 februari 2020, van <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.02.016>
- Novus biologicals. (s.d.). *IHC Sample Preparation (Frozen vs. Paraffin)*. Geraadpleegd op 25 april 2020, van <https://www.novusbio.com/sample-preparation-for-ihc-experiments>
- NYU Langone medical center. (2016, 16 december). *Freezing tissues for histology*. Geraadpleegd op 23 februari 2020, van <https://med.nyu.edu/research/scientific-cores-shared-resources/sites/default/files/nyu-expath-freezing-and-embedding-tissue.pdf>
- Peakman, T., & Elliott, P. (2010). Current standards for the storage of human samples in biobanks. *Genome Medicine*, 2(10), 72. Geraadpleegd op 12 maart, van <https://doi.org/10.1186/gm193>
- Pegg, D. E. (2010). The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*, 60(3), S36–S44. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.02.003>
- Perkampus, H. H. (1992). *UV-VIS spectroscopy and its applications*. Heidelberg, Duitsland: Springer Medizin Verlag.
- Peters, S. (2011, 20 oktober). *An Intro to Cryosectioning: The Art of Sectioning Frozen Tissue*: Geraadpleegd op 25 april 2020, van <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/the-art-of-embedding-tissue-for-frozen-section/>
- Rastogi, V. (2013). Artefacts: A Diagnostic Dilemma – A Review. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*. Geraadpleegd op 23 april, van <https://doi.org/10.7860/jcdr/2013/6170.3541>
- Reckamp, K. L., & Kernstine, K. H. (2010). *Lung Cancer*. New York, Verenigde Staten: Springer Publishing.

- Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb.prot5439. Geraadpleegd op 29 februari 2020, van <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., ... Ragg, T. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology*, 7(1). Geraadpleegd op 15 maart, van <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>
- Shabihkhani, M., Lucey, G. M., Wei, B., Mareninov, S., Lou, J. J., Vinters, H. V., ... Yong, W. H. (2014a). The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clinical Biochemistry*, 47(4-5), 258-266. Geraadpleegd op 8 mei, 2020, van <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.01.002>
- Shen, C.-H. (2019). Extraction and Purification of Nucleic Acids and Proteins. *Diagnostic Molecular Biology*, 143-166. Geraadpleegd op 29 februari 2020, van <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802823-0.00006-7>
- Smith, M. E., & Aufox, S. (2013). Biobanking: The Melding of Research with Clinical Care. *Current Genetic Medicine Reports*, 1(2), 122-128. Geraadpleegd op 2 mei 2020, van <https://doi.org/10.1007/s40142-013-0014-6>
- Steu, S., Baucamp, M., von Dach, G., Bawohl, M., Dettwiler, S., Storz, M., ... Schraml, P. (2008). A procedure for tissue freezing and processing applicable to both intra-operative frozen section diagnosis and tissue banking in surgical pathology. *Virchows Archiv*, 452(3), 305-312. Geraadpleegd op 27 april 2020, van <https://doi.org/10.1007/s00428-008-0584-y>
- Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2018). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (8ste editie). Maarssen, Nederland: Elsevier Gezondheidszorg.
- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1-10. Geraadpleegd op 29 februari 2020, van <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Teen Kids News. (2018). *How is glass made?* [Foto]. Geraadpleegd op 28 maart van <https://teenkidsnews.com/tkn-news/science/how-is-glass-made/>
- Thermofisher. (s.d.). *Thaw Frozen Tissues Without Damaging RNA*. Geraadpleegd op 16 april 2020, van <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/references/ambion-tech-support/rna-buffers-chemicals/tech-notes/thaw-frozen-tissues--without-damaging-rna.html>

- ThermoFisher Scientific. (s.d.). *Quantitating RNA*. Geraadpleegd op 20 mei 2020, van <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/quantitating-rna.html>
- T'Joen, V., Phlypo, S., & Bekaert, S. (2018). Bimetra Biobank: A High-Quality Biobank Facility to Stimulate Translational Biomedical Research. *Open Journal of Bioresources*, 5. Geraadpleegd op 2 mei, van <https://doi.org/10.5334/ojb.37>
- Transcendente Meditatie. (s.d.). *Wat is een p-waarde?*. Geraadpleegd op 30 mei 2020, van <https://transcendentemeditatie.be/wat-is-een-p-waarde/>
- UK Biobank. (2019, 25 februari). *Understanding genetic research | UK Biobank*. Geraadpleegd op 4 mei 2020, van <https://www.ukbiobank.ac.uk/understanding-genetic-research/>
- UMC Utrecht. (2017, 1 december). *Biobank met levende borstkankercellen*. Geraadpleegd op 8 mei 2020, van <https://www.umcutrecht.nl/nl/nieuws/biobank-met-levende-borstkankercellen>
- University of Vigo. (2019, 24 juli). *Histological techniques. 4. Sectioning*. Geraadpleegd op 25 april 2020, van <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/6-tecnicas/4-criotomos.php>
- van Geest, Q. (2013, 11 april). *Wetenschappelijk vertaalbureau*. Geraadpleegd op 8 mei 2020, van <https://www.msweb.nl/actueel/columns/quinten-van-geest/wetenschappelijk-vertaalbureau/?cn-reloaded=1>
- Vasan, S. (2017, 5 augustus). *Histopathology - CRYOSTAT [Presentatieslides]*. Geraadpleegd op 28 februari, van <https://www.slideshare.net/8056933252/histopathology-crtostat>
- Vora, T., & Thacker, N. (2015). Impacts of a biobank: Bridging the gap in translational cancer medicine. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*, 36(1), 17. Geraadpleegd op 3 mei, van <https://doi.org/10.4103/0971-5851.151773>
- Walker, D. G., Whetzel, A. M., Serrano, G., Sue, L. I., Lue, L.-F., & Beach, T. G. (2016). Characterization of RNA isolated from eighteen different human tissues: results from a rapid human autopsy program. *Cell and Tissue Banking*, 17(3), 361–375. Geraadpleegd op 30 mei, van <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9555-8>
- Wallace, J. (2020, 25 februari). *Frozen section methodology*. Geraadpleegd op 1 juni 2020, van <https://www.pathologyoutlines.com/topic/methodsfrozen.html?mobile=off&fbclid=IwAR27mMHsVXN7wWO1BRQLe8dN3LWw4BSeJr2PF5fZICLXnyaqj88n3k5ig0>

- Witec. (s.d.). *CryoPod™ Carrier Automatic Filling Station*. Geraadpleegd op 25 maart 2020, van <https://www.witec.ch/products/molecular-microbiology/sample-cooling-molecular-microbiology/cryopod-carrier-automatic-filling-station/>
- Wowk, B. (2010). Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*, 60(1), 11–22. Geraadpleegd op 16 april, van <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.05.007>
- Zika, E., Paci, D., Braun, A., Rijkers-Defrasne, S., Deschênes, M., Fortier, I., ... Ibarreta, D. (2011). A European Survey on Biobanks: Trends and Issues. *Public Health Genomics*, 14(2), 96–103. Geraadpleegd op 8 mei 2020, van <https://doi.org/10.1159/000296278>
- ZYMO. (2019, 17 juni). *Optimizing RNA Extraction from Cells and Tissues with TRIzol®*. Geraadpleegd op 1 juni 2020, van https://blog.quartzy.com/optimizing_rna_extraction_with_trizol_zymo_sponsored

Bijlage 1

Lijst van materialen

Tabel I: Lijst van alle gebruikte materialen in het onderzoek.

Algemene benodigheden	Algemeen materiaal	Toestellen	Reagentia
Handschoenen (Nitra-Touch)	Alucups (Sanbio)	Balans (SE202 van VWR)	Ethanol 70% (v/v) (Honeywell)
Labojas	<i>Cryovials</i> (Greiner Bio-One)	BioAnalyzer (Agilent Technologies)	Umonium ³⁸ (Laboratoire Huckert's International)
Beschermende <i>overall</i>	Micropipetten (Corning Lambda plus, Elscolab)	LAF-kast (SafeFAST Classic – Faster)	TRI Reagent® (Sigma-Aldrich)
Mondmasker	Tips (Greiner Bio-One)	Centrifuge (ThermoScientific)	Isopropanol (Sigma-Aldrich)
Veiligheidsbril	Cryobox (VWR en Greiner Bio-One)	Vortex mixer (LSE™ Corning) (IKA® MS 3)	UltraPure™ RNase vrij water (Invitrogen)
Overschoenen	Pincet	Cryostaat (Thermo Fisher)	Chloroform (Sigma-Aldrich)
Papier	Scalpel (Swann-morton)	Pannoramic 250 (Sysmex)	RNase away (MBP, VWR)
Afvalcontainer	Spatel	Little Lunatic (Unchained labs)	DNase away (MBP, VWR)
Afvalbeker	Weegvlotjes (VWR)	Heat block (THERMO-SHAKER)	Gedestilleerd water
Naaldcontainer (Sharpsafe)	Timer (ROTH)	Vortex (LSE™ Corning)	
Potlood	Labels (Elscolab)		
	Maatbeker		
	Rek voor eppendorftubes		
	Eppendorftubes (Greiner Bio-One)		

Dissectiemateriaal	Cryocoupes	RNA-extractie en RIN-bepaling	Invriesmateriaal
Dissectieschaal	Microscopglaasjes (KP KLINIPATH)	<i>TissueRuptor</i> [®] II (Qiagen [®])	Isomobox
Afklemmer	Slide map	<i>Lunatic</i> chip (Trinean)	Isopentaaan (Honeywell)
Potten voor het bewaren van weefsel	Cryogel (Sakura [®] Finetek <i>O.C.T. Compound</i>)	Elektrode <i>Cleaner</i> (Agilent Technologies)	Koudebestendige handschoenen (VWR)
Kompresen	Cryokop	Safe-LockTubes 0,5 ml (Agilent Technologies)	CryoPod [™] (-196°C)
Naald	Cryokophoudertje	RNA Nano Chips (Agilent Technologies)	Schilferijs (0-3°C)
Draad	Mes voor cryostaat	Chip priming station (Agilent Technologies)	Droogijs (-80°C)
	Penseel	Plunger (Agilent Technologies)	ULT-vriezer (Thermo Fisher Scientific)
		Ladder (Agilent Technologies)	
		RNAse Away (VWR)	
		RNA 6000 Nano gel matrix (Agilent Technologies)	
		RNA 6000 kleurstofconcentraat (Agilent Technologies)	
		Spin filter (Agilent Technologies)	
		PCR-ependorftubes (Sapphire)	

Bijlage 2

Protocol prelevatie van dierlijk weefsel

Benodigheden

Materiaal	Reagentia
<ul style="list-style-type: none">• Handschoenen (Nitra-Touch)• Overschoenen (wegwerp)• Labojas• Beschermend overtrek• Mondmasker• Veiligheidsbril• Dissectieschaal• Scalpel (Swann-morton)• Pincet• Afklemmer• Deponeerpot• Potten of zakjes om weefsel in te bewaren• Naaldcontainer• Timer (ROTH)• Papier• Kompressen• Schilferijs (0-3°C)• Naald• Draad• Overzichtstabellen waarop de temperatuur, tijdstippen en gewichten genoteerd kunnen worden.	<ul style="list-style-type: none">• Ethanol 70% (v/v) (Honeywell)• Umonium³⁸ (<i>Laboratoire Huckert's International</i>)

Protocol

- Vul de overzichtstabellen in tijdens de dissectie.
- Maak met een scalpel een incisie in de buik van het varken.
- De lever is meestal snel zichtbaar. Haal deze voorzichtig uit m.b.v. een pincet en scalpel.
- Plaats de lever in een pot of zak op schilferijs (0-3°C).
- Knip de ribben door.
- De longen zijn nu zichtbaar. Haal deze voorzichtig uit m.b.v. een pincet en scalpel.
- Plaats de longen in een pot of zak op schilferijs (0-3°C).
- Naai het varken toe m.b.v. naald en draad.
- Desinfecteer het dissectiemateriaal met umonium³⁸ en ethanol 70% (v/v).

Bijlage 3

Protocol invriezen

Benodigdheden

Materiaal	Reagentia
<ul style="list-style-type: none">• Isomobox met droogijs (-80°C)• CryoPod™ (-196°C)• Pincet• Scalpel (Swann morton)• Dissectieschaal• Alucup (Sanbio)• <i>Cryovial</i> (Greiner Bio-One)• Timer (ROTH)• ULT-vriezer (Thermo Fisher Scientific)• Koudebestendige handschoenen (VWR)• Veiligheidsbril	<ul style="list-style-type: none">• Isopentaan (Honeywell)• Ethanol 70% (v/v) (Honeywell)• Umonium³⁸ (Laboratoire Huckert's International)

Protocol

- Draag altijd een labojas en handschoenen om jezelf te beschermen tegen de koude temperaturen.
- Plaats de gelabelde *cryovial* of alucup in de isomobox met droogijs of in de CryoPod™ om voor te koelen.
- Optioneel: Breng isopentaan in een alucup en plaats deze in de isomobox met droogijs of in de CryoPod™ om voor te koelen.
- Snijd het weefsel in de gewenste grootte met behulp van een scalpel en pincet op een dissectieschaal.
 - Zorg ervoor dat het weefsel in een alucup of *cryovial* past.
 - Probeer alle stukken zo uniform mogelijk te snijden.
- Optioneel: Gebruik de pincet om het weefsel 30 s in isopentaan te koelen.
- Breng het weefsel over in de voorgekoelde alucup of *cryovial*. Noteer dit tijdstip.
- Bewaar het weefsel na *snappfreezing* in een diepvries met een temperatuur van -80°C.
- Desinfecteer het gebruikte materiaal met umonium³⁸ en ethanol 70% (v/v).

Bijlage 4

Protocol snijden van cryocoupes

Benodigdheden

Materiaal	Reagentia
<ul style="list-style-type: none">• Cryostaat (Thermo Fisher)• Handschoenen (Nitra-Touch)• Papier• Objectglas (KP KLINIPATH)• Slide map• Pincet• Scalpel (Swann-morton)• Penseel• Potlood• Cryokop• Cryokophouder• Mes voor cryostaat• Cryogel (Sakura® Finetek <i>O.C.T. Compound</i>)• Maatbeker• Afvalcontainer	<ul style="list-style-type: none">• Ethanol 70% (v/v) (Honeywell)• Umonium³⁸ (Honeywell)• Gedestilleerd water

Protocol

- Laat het weefsel ongeveer 20 min op temperatuur komen in de cryokamer.
- Reinig de cryokop met ethanol 70% (v/v) en laat deze goed drogen.
- Laat de cryocassette op temperatuur komen in de cryokamer.
- Label het objectglas met potlood.
- Vervolgens wordt het weefsel ingevroren:
 - Breng cryogel aan op de voorgekoelde cryocassette.
 - Plaats deze op de cryobar.
 - Positioneer het te snijden weefsel met een pincet in de cryogel.
 - Breng vervolgens extra cryogel aan rond en boven het weefsel.

- Wacht tot het weefsel en de cryogel bevroren zijn.
- Stel de snijtemperatuur (monsterkop) in afhankelijk van het weefseltype:
 - Zorg ervoor dat de kamertemperatuur 5 à 10°C lager is dan de temperatuur van de monsterkop.
 - Deze kunnen ingesteld worden door respectievelijk op 'Kamer' en 'Monster' te drukken, en vervolgens via de pijltjestoetsen de gewenste temperatuur te selecteren.
- Klem de cryocassette vast in de monsterkop aan de hand van de bijhorende hendel.
- Verwijder de bescherming van het mes.
- Breng het ingevroren weefsel dichterbij het mes toe a.d.h.v. de knoppen aan de zijkant van het venster.
- Maak het handwiel los.
- Begin met het trimmen van het weefsel.
 - Hierbij wordt een dikte van 20 µm ingesteld. Selecteer hiervoor 'Micron' en stel de gewenste dikte in via de pijltjestoetsen.
 - Draai vervolgens gelijkmatig aan het handwiel tot de coupes een gewenste oppervlakte hebben.
- Snijd het weefsel door het handwiel gelijkmatig een volledige omwenteling te draaien. Zo wordt een coupe verkregen.
 - Hierbij wordt een dikte van 4 µm ingesteld. Selecteer hiervoor 'Micron' en stel de gewenste dikte in via de pijltjestoetsen.
 - De coupe kan vastgehouden worden door gebruik te maken van een penseel.
 - Er kan ook gebruik worden gemaakt van de anti-rolplaat. Zo wordt voorkomen dat de coupe zal opkrullen.
 - Verwijder de ongewenste coupes door ze met een penseel weg te vegen. Veeg altijd mee in de richting van het mes.
- Vang de coupes op het objectglas.
 - Zet het handwiel vast.
 - Zorg ervoor dat de monsterkop zich onder het mes bevindt.
 - Breng het objectglas snel en gelijkmatig op de coupe.
 - Bewaar het objectglas met de coupe bij een temperatuur van -20°C.
- Plaats de mesbeschermer op het mes.
- Haal de cryocassette uit de monsterkop aan de hand van de bijhorende hendel.
- Gebruik het scalpel om de cryogel rond het weefsel weg te snijden en verwijder het weefsel van de cryocassette met een scalpel.

- Breng het weefsel opnieuw in het juiste recipiënt met een pincet.
- Plaats het recipiënt op droogijs (-80°C).
- Ontsmet de cryokop door deze in een maatbeker met umonium³⁸ te weken.
- Reinig het scalpel en de pincet met ethanol 70% (v/v).
- Verwijder alle restanten van de coupes uit de cryostaat en reinig de kamer met ethanol 70% (v/v).
- Sluit het venster.

Bijlage 5

Protocol manuele RNA-extractie m.b.v. TriReagent®

Benodigdheden

Materiaal	Reagentia
<ul style="list-style-type: none">• Gekoelde centrifuge (0-3°C) (Thermo Fisher Scientific)• <i>TissueRuptor</i>® II (Qiagen®)• Dissectieschaal• Spatel / lepeltje• Pincet• Scalpel (Swann-morton)• Weegschaal (Thermo Scientific)• Weegvlotjes (VWR)• Micropipetten van 200 µl en 1000 µl (Corning Lambda plus)• Tips van 200 µl en 1000 µl (Greiner Bio-One)• Timer (ROTH)• Eppendorftubes (Greiner Bio-One)• Rek voor eppendorftubes• Schilferijs (0-3°C)• Handschoenen (Nitra-touch)• LAF-kast (SafeFAST Classic - Faster)• Papier• Droogijs (-80°C) in isomobox• Vortex (Corning)• Afvalbeker• Afvalcontainer	<ul style="list-style-type: none">• TRI Reagent® (Sigma-Aldrich)• Chloroform (Sigma-Aldrich)• Isopropanol (Sigma-Aldrich)• Ethanol 75% (v/v) (Honeywell)• UltraPure™ RNase vrij water (Invitrogen)• RNase away (MBP)• DNase away (MBP)• Umonium³⁸ (Laboratoire Huckert's International)

Protocol

- Zet de microcentrifuge aan en laat deze koelen tot 4°C.
 - Druk op het 'vriesicoon'.
 - Selecteer vervolgens 4°C.

- Druk op 'start'.
- Werk onder de LAF-kast en draag handschoenen.
- Decontamineer het dissectiemateriaal (scalpel, schaal, pincet, weegvlotje, spatel) met DNase en RNase away.
- Weeg 0,04 - 0,06 gram weefsel af en plaats het resterende weefsel opnieuw op droogijs.
- Werk voor de volgende stappen op schilferijs (0-3°C).
- Versnijdt het weefsel zo fijn mogelijk op de dissectieschaal en breng dit vervolgens over in een eppendorftube.
- Voeg 1 ml TRI Reagent® toe.
- Gebruik de *TissueRuptor*® II om het weefsel 10 s te homogeniseren.
- Laat het weefsel 5 min incuberen in de TRI Reagent® oplossing bij kamertemperatuur.
- Werk vanaf hier verder op kamertemperatuur.
- Voeg 200 µl chloroform toe.
- Sluit de eppendorftube goed en schud krachtig gedurende 15 s.
- Laat 10 min staan op kamertemperatuur.
- Centrifugeer de eppendorftube 10 min op 12000 g en 4°C.
- Je verkrijgt 3 fasen. Breng de bovenstaande transparante fase over in een nieuwe eppendorftube.
- Voeg hier 500 µl isopropanol aan toe.
- Mix dit door 10 keer te inverteren.
- Laat 10 min staan op kamertemperatuur.
- Centrifugeer 10 min op 12000 g en 4°C.
- Het RNA precipitaat is zichtbaar op de bodem als een wolk. Verwijder het bovenstaande supernatans zonder de wolk mee te nemen.
- Voeg 1000 µl 75% (v/v) ethanol toe.
- Vortex de eppendorftube 10 s.
- Centrifugeer de eppendorftube 5 min op 7500 g en 4°C.
- Verwijder alle bovenstaande vloeistof.
- Laat open drogen aan de lucht gedurende 5-10 min.
- Voeg tot slot 50 µl UltraPure™ DNase en RNase vrij water toe en resuspendeer het RNA door op en neer te pipetteren.
- Zet het bekomen RNA op schilferijs (0-3°C).
- Voer een kwaliteitscontrole uit om de concentratie en zuiverheid te bepalen.

Bijlage 6

Protocol kwaliteitscontrole m.b.v. Little Lunatic van Unchained Labs

Benodigdheden

Materiaal	Reagentia
<ul style="list-style-type: none">• Little Lunatic toestel (Unchained labs)• <i>Regular Lunatic</i> chip (Trinean)• Micropipetten van 2 µl en 10 µl (Corning Lambda plus)• Tips van 2 µl en 10 µl (Greiner Bio-One)• Eppendorftubes (Greiner Bio-One)• Afvalbeker• Afvalcontainer• Handschoenen (Nitra-touch)	<ul style="list-style-type: none">• UltraPure™ DNase en RNase vrij water (Invitrogen)

Protocol

- Schakel het toestel in door de knop achteraan aan te zetten en vervolgens op het scherm te tikken.
- Vul de chip.
 - Pipetteer 2 µl RNA-extract per well.
 - Plaats de tip schuin in de well en vul deze rustig. Probeer zo te voorkomen dat er luchtballen ontstaan.
 - Neem een blanco mee. Gebruik hiervoor UltraPure™ DNase en RNase vrij water.
- Selecteer 'Measure' in het hoofdmenu van het toestel.
- Selecteer de juiste gebruiker en de gebruikte chip (*Regular Lunatic chip*).
- Definieer waar de blanco en stalen zich bevinden in de chip.
- Plaats de chip in het toestel.
- Benoem het experiment en de verschillende stalen.
- Selecteer de correcte toepassing. In dit geval gaat het om een RNA-bepaling.
- Vervolgens worden de resultaten weergegeven op het scherm.
- De resultaten kunnen geëxporteerd worden op een USB-stick of kunnen geprint worden.

- Aliquoteer het resterende extract in verschillende eppendorftubes met een volume van 5-6 μl .
- Vries deze eppendorftubes in bij -80°C . Deze zullen later gebruikt worden voor de RIN-bepaling.

Bijlage 7

RIN-bepaling

Benodigdheden

Materialen	Reagentia
<ul style="list-style-type: none">• BioAnalyzer (Agilent Technologies)• Elektrode <i>cleaner</i> (Agilent Technologies)• Spin filter (Agilent Technologies)• RNase-vrije microtubes (0,5 ml)• Centrifuge (ThermoScientific)• Vortex (LSE™ Corning)• Vortex mixer (LSE™ Corning) (IKA® MS 3)• RNA Nano Chip (Agilent Technologies)• Chip priming station (Agilent Technologies)• Ladder (Agilent Technologies)• Schilferijs (0-3°C)• Timer (ROTH)	<ul style="list-style-type: none">• UltraPure™ RNase vrij water (Invitrogen)• RNA 6000 Nano gel matrix (Agilent Technologies)• Gefilterde gel (Agilent Technologies)• RNA 6000 kleurstofconcentraat (Agilent Technologies)• RNase away (MBP, VWR)

Protocol

- Vooraleer men de RIN kan bepalen, moeten de elektroden gedecontamineerd worden:
 - 1 elektrode *cleaner* met 350 µl RNase Away, gedurende 1 min.
 - 1 elektrode *cleaner* met 350 µl RNase vrij water, gedurende 10 s.
 - Wacht 10 s vooraleer het deksel langzaam te sluiten.
- Voorbereiden van de gel:
 - Laat alle reagentia gedurende 30 min staan op kamertemperatuur.
 - Pipetteer 550 µl RNA 6000 Nano gel matrix in de bovenkant van een spin filter.
 - Centrifugeer 10 min op 1500 g bij kamertemperatuur.

- Aliquoteer 65 µl gefilterde gel in RNase-vrije microtubes van 0,5 ml.
- Bewaar deze bij 4°C. Deze oplossing is 1 maand houdbaar bij 4°C.
- Bereiden van de gel-mix:
 - Laat alle reagentia gedurende 30 min staan op kamertemperatuur.
 - Vortex het RNA 6000 kleurstofconcentraat gedurende 10 s.
 - Voeg 1 µl van het RNA 6000 kleurstofconcentraat toe aan een aliquot (65 µl) van de gefilterde gel.
 - Vortex het mengsel gedurende 5 s.
 - Centrifugeer de gemaakte gel-mix 10 min op 13000 g bij kamertemperatuur.
 - Bewaar de gel-mix in het donker en gebruik deze binnen de 24 u.
- Wanneer de voorgaande handelingen zijn voldaan, kan men starten met het laden van de gel-mix:
 - Laat alle reagentia gedurende 30 min staan op kamertemperatuur.
 - Ontdooi de ladder en plaats deze op schilferijs (0-3°C).
 - Plaats een chip op de *chip priming station*. Let hierbij op de correcte plaats van het priming station, positie C dient voor de RNA-assay.
 - Pipetteer 9 µl gel-mix in de vette G.
 - Positioneer de plunger op 1 ml.
 - Sluit de *chip priming station*. Bij het sluiten is een klik hoorbaar.
 - Duw de plunger in een vloeiende beweging naar beneden.
 - Wacht 30 s en laat hierna de plunger los. Het is van belang dat de plunger voorbij de 0,3 ml merker komt te staan.
 - Wacht 5 s, plaats de plunger op 1 ml en open nadien het station.
 - Pipetteer 9 µl gel-mix in de gewone G's.
- Laden van de RNA 6000 nanomerker, gevolgd door het laden van de ladder en stalen:
 - Ontdooi de ladder en plaats deze op schilferijs (0-3°C).
 - Pipetteer 5 µl RNA 6000 nanomerker in alle wells, ook in de well met het ladder symbool.
 - Denatureer de stalen gedurende 2 min bij 70°C aan de hand van een heat block (DRY BATH).
 - Pipetteer 1 µl van de ladder in de well met het ladder symbool.
 - Pipetteer 1 µl van de 12 stalen in alle wells, behalve de well met het ladder symbool.
 - Plaats de chip gedurende 60 s bij 2400 RPM in de vortex mixer.

- Na alle voorgaande handelingen te hebben uitgevoerd, wordt de chip verder geanalyseerd aan de hand van de Agilent 2100 BioAnalyzer.

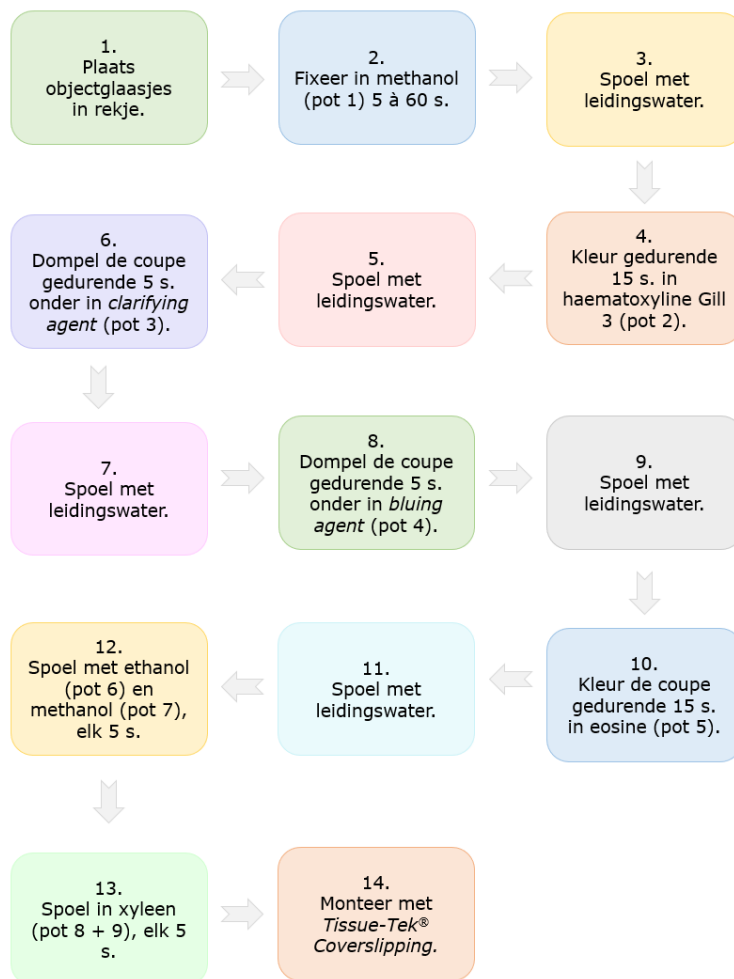
Bijlage 8

Protocol Haematoxyline eosine kleuring

Benodigheden

Materiaal	Reagentia
<ul style="list-style-type: none">• Kleurbaden• Vriescoupes• Leidingwater	<ul style="list-style-type: none">• Methanol (pot 1 + 7)• Haematoxyline (pot 2) (ProPath)• Clarifying agent (pot 3) (ProPath)• Bluing agent (pot 4) (ProPath)• Eosine (pot 5) (ProPath)• Ethanol (pot 6)• Methanol (pot 7)• Xyleen (pot 8 + 9)

Protocol



Figuur 1: Protocol HE-kleuring

Bijlage 9

Protocol inscannen coupes a.d.h.v. de Panoramic 250



Benodigdheden


Materiaal	Reagentia
<ul style="list-style-type: none">• Toestel Panoramic 250 (Sysmex)• Computer met het programma CaseViewer (3DHISTECH Ltd.) en Panoramic scanner• Computermuis• Slide• Cassette (Sysmex)	/


Protocol

- Zet het toestel en de computer aan. De computer logt zich automatisch in.
- Start de volgende software op:

Panoramic scanner  en *CaseViewer* .

- De *Panoramic scanner software* zal een pop-up weergeven met de vraag 'Would you like to use the CaseCenter-UZgent.be – secured connection which was being used the last time you were scanning?'. Kies voor 'yes'.
- Log in onder uw eigen LDAP-naam en wachtwoord.
- Een nieuw pop-up scherm opent zich. Kies voor '*Brightfield modus*; manueel'.
- Het startscherm (*Routine work*) van de *Panoramic scanner* wordt geopend. Plaats de in te scannen slide in een cassette en plaats de cassette in de scanner op een correcte manier. Hiervoor wordt verwezen naar de uitgebreide SOP.
- Klik op het startscherm van de *Panoramic scanner* op de volgende knop:
 De cassette met de slide zal door het toestel worden opgenomen.
- Druk op de knop  om de gewenste in te scannen slide voor de lens van de scanner klaar te zetten (bij '*current slide*' kan de gewenste slide worden ingegeven).
- Pas de '*routine work settings*' aan:
 - Onder '*Scan options*' kunnen volgende aanpassingen worden doorgevoerd:
 - '*Image quality*': standaard staat dit op '*Good*'
 - '*Scanning mode*': standaard staat dit op '*Flash mode*'

- '*Scan settings*': standaard staat dit op '*Use stitching*'
 - '*Scan slide destination*': standaard staat dit op '*Scan to CaseCenter*'
- Bij '*Objective position*' wordt de keuze gemaakt tussen een 20x en 40x vergroting.
- Pas de '*Preview menu settings*' aan. Volgende rubrieken staan steeds aangeduid:
 - *Scan specimen with auto threshold*
 - *Remove coverslip*
 - *Fill holes in scan area*
 - *Remove specks*
- Pas de '*Focus menu settings*' aan:
 - Klik op '*live*' om een live beeld van de slide te verkrijgen.
 Rechts onderaan is het mogelijk om doorheen de slide te bewegen, gebruikmakende van de navigatie knoppen.
 - Eens een beeld van het weefsel wordt verkregen, die het volledige *live* beeld overschaduwet, klik dan op '*auto focus*'. Het beeld wordt scherp gesteld.
 - Standaard wordt gekozen voor '*Single Layer*'. Als men opmerkt dat de coupe niet egaal zuiver wordt gescand, kiest men onder '*Multi Layer*' voor '*extended focus*'.
- Ondertussen is *CaseViewer* opgestart in de achtergrond. Klik onderaan in de taalbalk op het *CaseViewer* pictogram.
- Bovenaan heeft men de mogelijkheid te kiezen tussen 'UZ Gent' en de lokale server. Kies voor 'UZ Gent'.
- Log in onder uw eigen LDAP – naam en wachtwoord.
- Creëer uitgaande van het inname formulier een nieuwe map met de datum van de die dag en een titel.
- Klik onderaan in de taalbalk op *Panoramic scanner* om terug te keren naar de *Panoramic scanner software*.
- Bij '*set server parameter*' is het mogelijk de gewenste locatie van de slide in te geven.
- Klik op '*Start scan*'.
- Eens de slide volledig is gescand, wordt hiervan een melding gegeven door middel van een pop-up.
- Klik op  om de slide terug in de cassette te plaatsen.

- Klik op  om de gehele cassette uit het toestel te verwijderen.
- Haal de cassette uit het toestel.
- Sluit de *Panoramic – en CaseViewer software* af. Sluit vervolgens het toestel af en schakel tenslotte de computer uit.

Bijlage 10

Protocol beoordelen van cryocoupes

Benodigdheden

Materiaal	Reagentia
<ul style="list-style-type: none">• Computer met het programma <i>CaseViewer</i> (3DHISTECH Ltd.)• Harde schijf met de ingescande coupes• Externe computermuis	/

Protocol

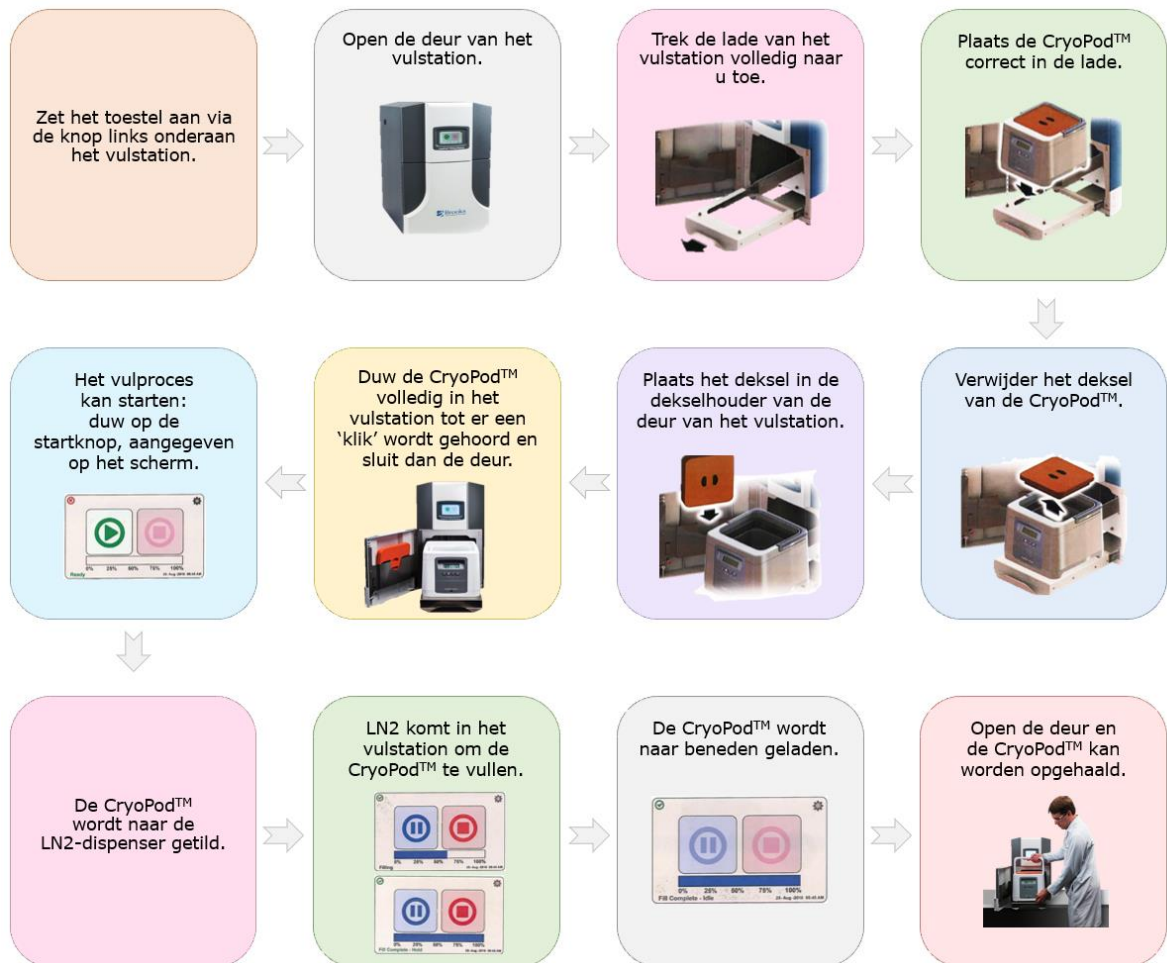
- Start de computer op en verbind zowel de muis als de harde schijf.
- Open het programma *CaseViewer*.
- Selecteer 'Local computer' en kies vervolgens voor de harde schijf.
- De coupes verschijnen in *CaseViewer*.
- Selecteer de coupe die u wilt beoordelen door er dubbel op te klikken.
- Selecteer vervolgens 'Annotations' en kies voor de rechthoek.
- Stel de standaardoppervlakte in op 2,5 mm².
 - Selecteer rechts bovenaan 'Settings'
 - Kies vervolgens voor het tabblad 'Fixed proportions for annotations'.
 - Stel volgende waarden in bij 'Fix rectangular':
 - *Width*: 1,580 mm
 - *Height*: 1,580 mm
 - *Perimeter*: 6,3 mm
 - *Area*: 2,5 mm²
 - Bewaar deze instellingen door rechts bovenaan 'Save changes' te selecteren.
- Verdeel de volledige coupe in rechthoeken met deze standaard-oppervlakte van 2,5 mm².
- Controleer elke rechthoek op de aanwezigheid van vriesartefacten en geef deze vervolgens een score van 0 tot 3:
 - 0= geen
 - 1= weinig
 - 2= intermediair
 - 3= veel

- Bepaal voor elke score (0-3) hoeveel rechthoeken deze score kregen.
- Bereken vervolgens het percentage bij elke score door het getal bekomen in de vorige stap te delen door het totaal aantal rechthoeken. Vermenigvuldig dit vervolgens met 100.
- Gebruik de bekomen percentages in volgende formule:
 $1 \times (\% \text{ score } 0) + 2 \times (\% \text{ score } 1) + 3 \times (\% \text{ score } 2) + 4 \times (\% \text{ score } 3)$
- De bekomen score wordt geklasseerd volgens volgend systeem:
 - 100 – 149: OK
 - 150 – 199: OK
 - 200 – 249: intermediair
 - 250 – 299: intermediair
 - 300 – 349: slecht
 - 350 – 399: slecht
- Het bekomen resultaat bij de vorige stap is de algemene beoordeling voor de volledige coupe.

Bijlage 11

Protocol vullen van CryoPod™ met vulstation

Een CryoPod™ is een draagbaar systeem waarin vloeibare stikstof wordt opgeslagen en gedurende meer dan 4 u een temperatuurstabiliteit (-150°C tot -196°C) biedt. Het systeem bevat een cryogene kamer die bestaat uit geanodiseerd metaal. Hieronder bevindt zich een sponskussen, dat de vloeibare stikstof absorbeert.



Figuur 1: Stappenplan om CryoPod™ te vullen m.b.v. het vulstation.

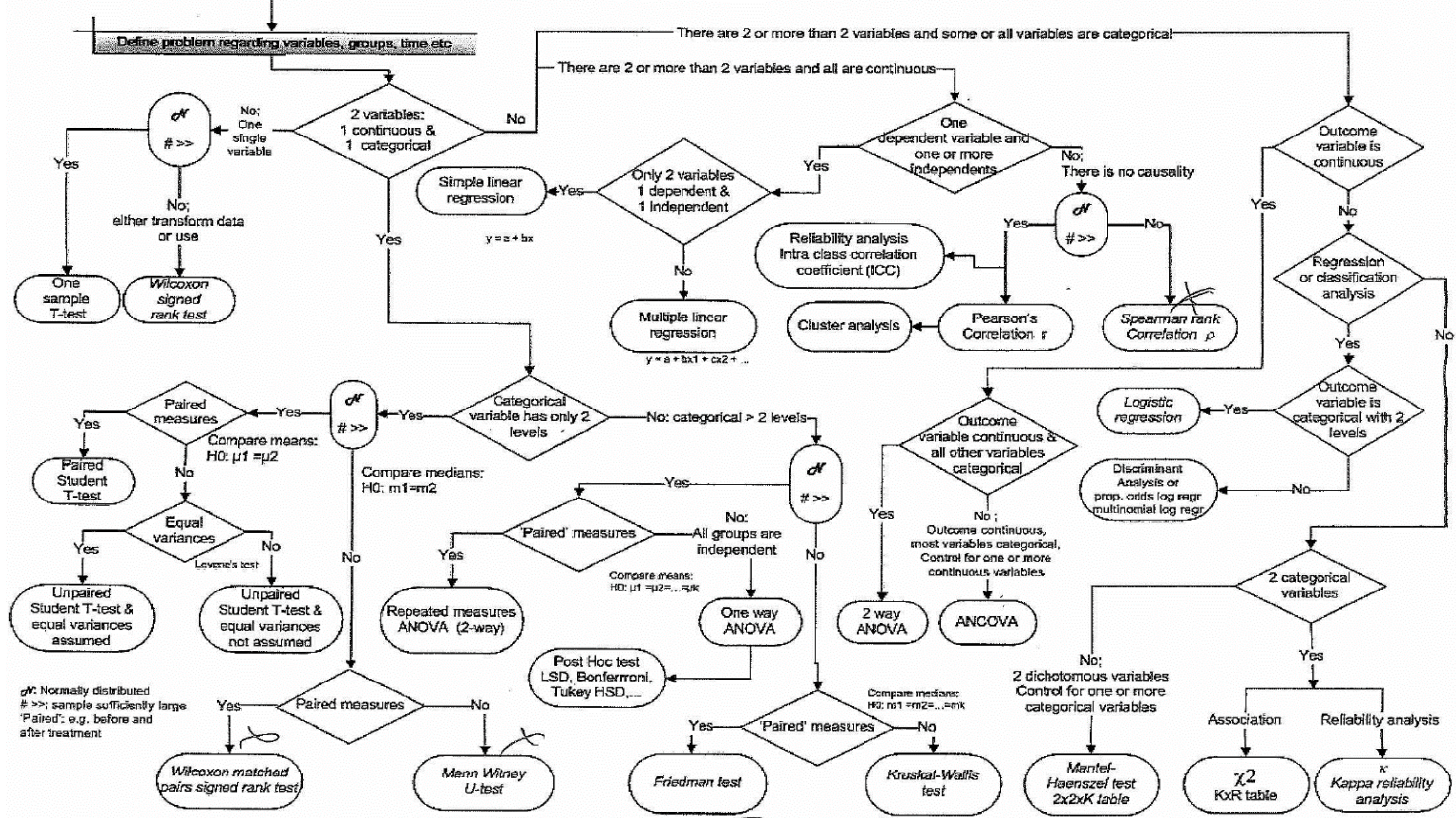
Bijlage 12

Beslissingsboom voor statistische analyses

Problem Study – Research, inspection and (visual) exploration of database
Quality Control - Outliers - Missing data - Boxplots - Histograms –
Scatter plots - Normality (K-S test)

**Flossie's STATISTICS
DECISION TREE**

© Prof. Dr. Floris WUYTS - University of Antwerp, Belgium
Floris.Wuyts@ua.ac.be
September 2005

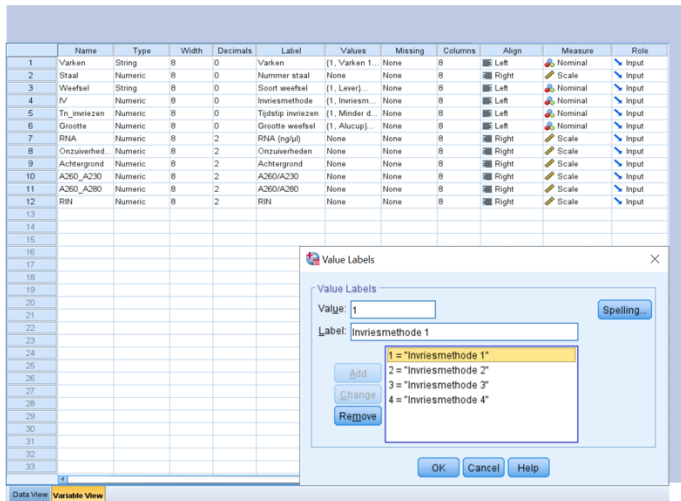


Figuur 1: Gebruikte beslissingsboom voor het bepalen van de statistische analyses.

Bijlage 13

Werking van SPSS

- Vooraleer SPSS gebruikt kan worden, dient de gebruiker dit programma te installeren via het internet. (IBM, *s.d.*)
- Bij het openen van SPSS worden er 2 werkbladen weergegeven:
 - **Data view:** is het werkblad waarin alle data geordend is. Elke regel representeert een deelnemer, onderwerp of casus. In ons geval is dit een varken. Elke kolom omvat een variabele. Er kunnen zoveel variabelen zijn als nodig voor het onderzoek. Bij dit onderzoek betreft het de invriesmethode, weefselgrootte, weefseltype, etc.
 - **Variable view:** in dit werkblad kunnen de verschillende soorten variabelen en gegevens worden aangemaakt/aangepast. Elke regel betreft 1 variabele. Via de verschillende kolommen kunnen de gegevens worden aangevuld:
 - Naam: hierbij kan een korte identificatie worden gegeven van de variabele. Belangrijk: er mogen geen spaties worden aangebracht, speciale tekens, en de naam mag niet met een nummer beginnen;
 - Type: hoe de data moet worden weergegeven: numeriek, wetenschappelijke notatie, etc.
 - Decimalen: het aantal cijfers na de komma;
 - Label: volledig uitschrijven van de naam, of extra specificeren;
 - *Values*: hierin worden de variabelen gecategoriseerd volgens nummer. Bv. varken 1 → 1; Varken 2 → 2. Zo weet SPSS dat 1 staat voor varken 1 en vice versa. Het zorgt voor een verkorte notatie;
 - Meting: Hierbij kan worden geselecteerd waar de variabele toe behoort. Bv. de verschillende varkens zijn nominaal, want ze kunnen in een categorie worden geplaatst. Het zijn kwalitatieve variabelen. *Scale* staat voor zowel ratio als interval. Dit zijn de kwantitatieve variabelen zoals de RNA-concentratie.



Hier is de *variable view* geselecteerd.

Naam: Geef een korte identificatie van de variabele. Gebruik geen spaties, begin niet met een cijfer, en gebruik geen speciale tekens.

Type: Kies numeriek bij 'scale' variabele (kwantitatief). Kies string bij waarden die beschouwd moeten worden als tekst, de kwalitatieve variabelen.

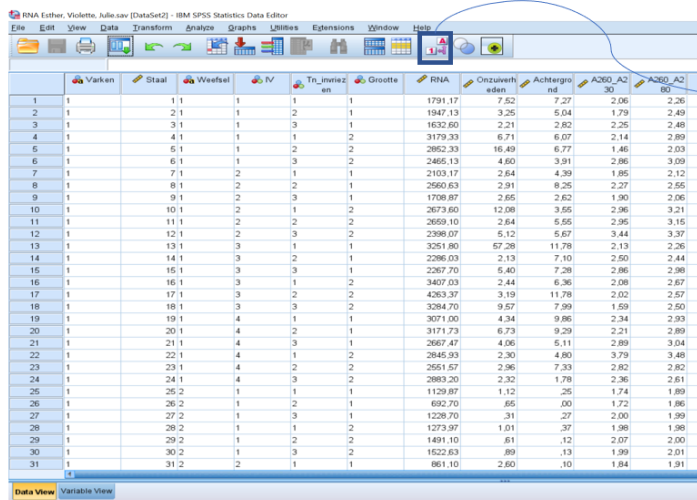
Width: Deze wordt niet aangepast.

Decimals: De kwantitatieve variabelen krijgen 2 cijfers na de komma.

Label: Volledige omschrijving van de 'naam'. Hier mogen wel spaties, etc. worden gebruikt.

Values: hierin worden de variabelen gecategoriseerd volgens nummer. Kies deze functie via: **Value Labels**.

Meting: Hierbij kan worden geselecteerd waar de variabele toe behoort bv. de verschillende varkens zijn nominaal, want ze kunnen in een categorie worden geplaatst. Het zijn kwalitatieve variabelen. *Scale* staat voor zowel ratio als interval, dit zijn de kwantitatieve variabelen zoals de RNA concentratie.



Hieronder kan de keuze worden gemaakt tussen data view en variable view. Hier is de data view geselecteerd.

Via deze knop kunnen de cijfers van de kwalitatieve variabelen omgezet worden naar tekst en vice versa.

Data view is het werkblad waarin alle data geordend is. Elke regel representeert een deelnemer, onderwerp of casus. In ons geval is dit een varken. Elke kolom omvat een variabele. Er kunnen zoveel variabelen zijn als nodig voor het onderzoek. Bij dit onderzoek betreft het de IV, grootte weefsel, type weefsel, etc.

Figuur 1: Visuele weergave met uitleg over het gebruik van SPSS.

Bijlage 14

Overzichtstabel prelevatie varkensweefsel

Tabel I: Overzichtstabel prelevatie van long varken 1.

VARKEN 1 – LONG Datum: 25/02/2020				
DISSECTIESTAP	DISSECTIEPROCEDURE	TIJDSTIPPEN		
1	Start euthanasie van het varken	16h49		
2	Dood varken	16h51		
3	Start dissectie varken	17h04		
4	Start snijden van weefselorgaan (long) binnenin het varken	17h20		
5	Weefsel uithalen	17h23		
6	Begin snijden van weefselorgaan in stukken voor de verschillende alucups en <i>cryovials</i>	17h24		
7	Weefsel op nat ijs	17h24		
8	Invriezen tijdstip 1 (onmiddellijk) Start snijden weefsel: 17h24 Temperatuur CryoPod™: -165°C → -159°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	17h42	17h43
		IV2	17h42	17h43
		IV3	17h34	17h37
		IV4	17h34	17h38
9	Invriezen tijdstip 2 (na 2uur) Start snijden weefsel: 19h27 Temperatuur CryoPod™:		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	19h39	19h41
		IV2	19h39	19h43
		IV3	19h33	19h36 + 19h38
		IV4	19h33	19h36 + 19h38
10	Invriezen tijdstip 3 (na 12uur) Start snijden weefsel: 9h27 Temperatuur CryoPod™: -164°C → -156°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	09h39	09h40
		IV2	09h39	09h41
		IV3	09h33	09h34
		IV4	09h33	09h35

Tabel II: Overzichtstabel prelevatie van lever varken 1.

VARKEN 1 – LEVER Datum: 25/02/2020				
DISSECTIESTAP	DISSECTIEPROCEDURE	TIJDSTIPPEN		
1	Start euthanasie van het varken	16h49		
2	Dood varken	16h51		
3	Start dissectie varken	17h04		
4	Start snijden van weefselorgaan (lever) binnenin het varken	17h08		
5	Weefsel uithalen	17h10		
6	Begin snijden van weefselorgaan in stukken voor de verschillende alucups en <i>cryovials</i>	17h11		
7	Weefsel op nat ijs	17h13		
8	Invriezen tijdstip 1 (onmiddellijk) Start snijden weefsel: 17h11 Temperatuur CryoPod™: -165°C → -155°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	17h19	17h21
		IV2	17h19	17h21
		IV3	17h14	17h16
		IV4	17h14	17h16
9	Invriezen tijdstip 2 (na 2uur) Start snijden weefsel: 19h13 Temperatuur CryoPod™: -185°C → -143°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	19h30	19h31
		IV2	19h30	19h31
		IV3	19h20	19h22
		IV4	19h20	19h22
10	Invriezen tijdstip 3 (na 12uur) Start snijden weefsel: 9h13 Temperatuur CryoPod™:		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	09h21	09h22
		IV2	09h21	09h23
		IV3	09h17	09h18
		IV4	09h17	09h19

Tabel III: Overzichtstabel prelevatie van long varken 2.

VARKEN 2 – LONG Datum: 03/03/2020				
DISSECTIESTAP	DISSECTIEPROCEDURE	TIJDSTIPPEN		
1	Start euthanasie van het varken	16h25		
2	Dood varken	/		
3	Start dissectie varken	16h48		
4	Start snijden van weefselorgaan (long) binnenin het varken	16h52		
5	Weefsel uithalen	16h53		
6	Begin snijden van weefselorgaan in stukken voor de verschillende alucups en <i>cryovials</i>	16h57		
7	Weefsel op nat ijs	16h56		
8	Invriezen tijdstip 1 (onmiddellijk) Start snijden weefsel: 16h56 Temperatuur CryoPod™: -82°C → -76°C	IV1	<u>Alucups</u> 17h07	<u>Cryovials</u> 17h08
		IV2	17h07	17h08
		IV3	17h03	17h05
		IV4	17h03	17h05
9	Invriezen tijdstip 2 (na 2uur) Start snijden weefsel: 18h56 Temperatuur CryoPod™: -158°C → -151°C	IV1	<u>Alucups</u> 19h06	<u>Cryovials</u> 19h07
		IV2	19h06	19h08
		IV3	19h03	19h04
		IV4	19h03	19h04
10	Invriezen tijdstip 3 (na 12uur) Start snijden weefsel: 8h56 Temperatuur CryoPod™: -184°C → -168°C	IV1	<u>Alucups</u> 09h06	<u>Cryovials</u> 09h08
		IV2	09h06	09h08
		IV3	09h03	09h05
		IV4	09h03	09h05

Tabel IV: Overzichtstabel prelevatie van lever varken 2.

VARKEN 2 – LEVER Datum: 03/03/2020				
DISSECTIESTAP	DISSECTIEPROCEDURE	TIJDSTIPPEN		
1	Start euthanasie van het varken	16h25		
2	Dood	/		
3	Start dissectie varken	16h48		
4	Start snijden van weefselorgaan (lever) binnenin het varken	16h49		
5	Weefsel uithalen	16h50		
6	Begin snijden van weefselorgaan in stukken voor de verschillende alucups en <i>cryovials</i>	16h51		
7	Weefsel op nat ijs	16h52		
8	Invriezen tijdstip 1 (onmiddellijk) Start snijden weefsel: 16h51 Temperatuur CryoPod™: -99°C → -89°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	16h59	17h00
		IV2	16h59	17h00
		IV3	16h56	16h57
		IV4	16h56	16h57
9	Invriezen tijdstip 2 (na 2uur) Start snijden weefsel: 18h50 Temperatuur CryoPod™: -171°C → -158°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	18h59	19h00
		IV2	18h59	19h01
		IV3	18h55	18h57
		IV4	18h56	18h57
10	Invriezen tijdstip 3 (na 12uur) Start snijden weefsel: 8h50 Temperatuur CryoPod™: -196°C → -184°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	09h00	09h00
		IV2	09h00	09h01
		IV3	08h55	08h57
		IV4	08h56	08h57

Tabel IV: Overzichtstabel prelevatie van long varken 3.

VARKEN 3 – LONG				
Datum: 04/03/2020				
DISSECTIESTAP	DISSECTIEPROCEDURE	TIJDSTIPPEN		
1	Start euthanasie van het varken	16h52		
2	Dood varken	/		
3	Start dissectie varken	17h09		
4	Start snijden van weefselorgaan (long) binnenin het varken	17h18		
5	Weefsel uithalen	17h19		
6	Begin snijden van weefselorgaan in stukken voor de verschillende alucups en <i>cryovials</i>	17h20		
7	Weefsel op nat ijs	17h25		
8	Invriezen tijdstip 1 (onmiddellijk) Start snijden weefsel: 16h56 Temperatuur CryoPod™: -169°C → -158°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	17h31	17h32
		IV2	17h31	17h32
		IV3	17h29	17h30
		IV4	17h29	17h30
9	Invriezen FT-onderzoek (onmiddellijk) Start snijden weefsel: 17h30 Baseline op nat ijs: 17h35	Alucup 1	17h33	
		Alucup 2	17h33	
		Alucup 3	17h35	
		Alucup 4	17h36	
10	Invriezen tijdstip 2 (na 2uur) Start snijden weefsel: 19h24 Temperatuur CryoPod™: -162°C → -154°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	19h32	19h33
		IV2	19h32	19h33
		IV3	19h29	19h30
		IV4	19h29	19h31
11	Invriezen tijdstip 3 (na 12uur) Start snijden weefsel: 9h24 Temperatuur CryoPod™: -155°C → -148°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	09h34	09h35
		IV2	09h34	09h36
		IV3	09h30	09h31
		IV4	09h30	09h32

Tabel IV: Overzichtstabel prelevatie van lever varken 3.

VARKEN 3 – LEVER Datum: 04/03/2020				
DISSECTIESTAP	DISSECTIEPROCEDURE	TIJDSTIPPEN		
1	Start euthanasie van het varken	16h52		
2	Dood	/		
3	Start dissectie varken	17h09		
4	Start snijden van weefselorgaan (lever) binnenin het varken	17h11		
5	Weefsel uithalen	17h12		
6	Begin snijden van weefselorgaan in stukken voor de verschillende alucups en <i>cryovials</i>	17h12		
7	Weefsel op nat ijs	17h16		
8	Invriezen tijdstip 1 (onmiddellijk) Start snijden weefsel: 17h12 Temperatuur CryoPod™: -157°C → -151°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	17h20	17h21
		IV2	17h20	17h21
		IV3	17h16	17h18
		IV4	17h16	17h18
9	Invriezen FT-onderzoek (onmiddellijk) Start snijden weefsel: 17h22 Baseline op nat ijs: 17h25	Alucup 1	17h23	
		Alucup 2	17h25	
		Alucup 3	17h26	
		Alucup 4	17h27	
10	Invriezen tijdstip 2 (na 2uur) Start snijden weefsel: 19h12 Temperatuur CryoPod™: -178°C → -161°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	19h22	19h23
		IV2	16h22	19h24
		IV3	19h18	19h20
		IV4	19h18	19h21
11	Invriezen tijdstip 3 (na 12uur) Start snijden weefsel: 9h12 Temperatuur CryoPod™: -188°C → -168°C		<u>Alucups</u>	<u>Cryovials</u>
		IV1	09h21	09h21
		IV2	09h21	09h22
		IV3	09h17	09h18
		IV4	09h17	09h19

Bijlage 15

Resultaten statische analyses SPSS

Tabel I: Verkregen resultaten van de normaliteitstesten (P-waarde= 0,05) voor zowel long- als leverweefsel.

Normaliteitstest			
Conditie	Long	Conditie	Lever
IV1	0,206	IV1	0,318
IV2	0,546	IV2	0,444
IV3	0,028	IV3	0,453
IV4	0,068	IV4	0,177
T1	0,634	T1	0,784
T2	0,204	T2	0,110
T3	0,408	T3	0,676
Alucup	0,274	Alucup	0,532
<i>Cryovial</i>	0,079	<i>Cryovial</i>	0,151

Tabel II: Verkregen resultaten van de Mann-Whitney U test (P-waarde= 0,05) voor de weefselgrootte van zowel long- als leverweefsel.

Weefselgrootte			
Conditie	Long Mann-Whitney U test (P-waarde = 0,05)	Conditie	Lever Mann-Whitney U test (P-waarde = 0,05)
IV1 T1	0,400	IV1 T1	0,200
IV1 T2	1,000	IV1 T2	0,200
IV1 T3	0,700	IV1 T3	0,700
IV2 T1	0,700	IV2 T1	0,400
IV2 T2	1,000	IV2 T2	1,000
IV2 T3	0,700	IV2 T3	1,000
IV3 T1	0,400	IV3 T1	0,200
IV3 T2	0,400	IV3 T2	0,100
IV3 T3	1,000	IV3 T3	0,400
IV4 T1	0,200	IV4 T1	1,000
IV4 T2	0,400	IV4 T2	1,000

IV4 T3	1,000	IV4 T3	1,000
--------	-------	--------	-------

Tabel III: Verkregen resultaten van de One-way ANOVA en post hoc Tukey test (P-waarde= 0,05) voor de invriestijdstippen van zowel long- als leverweefsel.

Invriestijdstippen			
Conditie	Long One-Way ANOVA en post hoc Tukey test	Conditie	Lever One-Way ANOVA en post hoc Tukey test
IV1 cryovial	0,555 0,528	IV1 cryovial	0,209 0,208
IV2 cryovial	0,266 0,253	IV2 cryovial	0,746 0,769
IV3 cryovial	0,813 0,820	IV3 cryovial	0,888 0,906
IV4 cryovial	0,970 0,969	IV4 cryovial	0,897 0,890
IV1 alucup	0,663 0,653	IV1 alucup	0,774 0,776
IV2 alucup	0,204 0,225	IV2 alucup	0,964 0,961
IV3 alucup	0,724 0,748	IV3 alucup	0,660 0,642
IV4 alucup	0,750 0,747	IV4 alucup	0,645 0,671

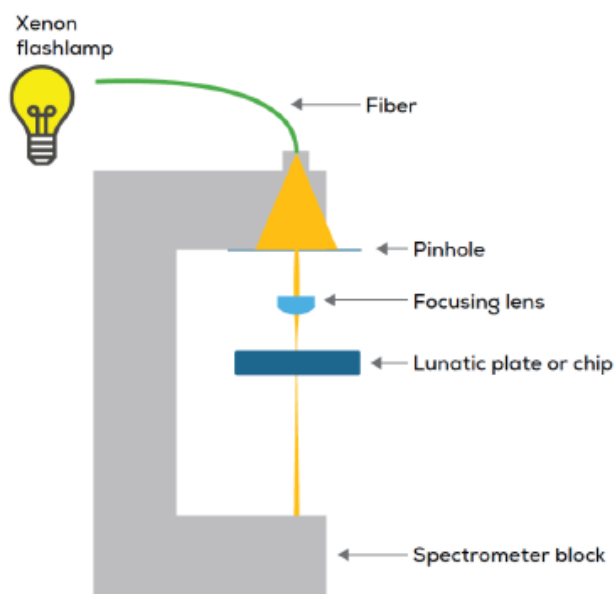
Tabel IV: Verkregen resultaten van de One-Way ANOVA en post hoc Tukey test (P-waarde = 0,05) en Kruskal-Wallis test (P-waarde = 0,05) voor de invriesmethoden van zowel long- als leverweefsel.

Invriesmethoden			
Conditie	Long Kruskal-Wallis test	Conditie	Lever One-Way ANOVA en post hoc Tukey test
T1 cryovial	0,839	T1 cryovial	0,732 0,738
T2 cryovial	0,319	T2 cryovial	0,974 0,973
T3 cryovial	0,262	T3 cryovial	0,297 0,288
T1 alucup	0,068	T1 alucup	0,718 0,702
T2 alucup	0,592	T2 alucup	0,147 0,163
T3 alucup	0,806	T3 alucup	0,844 0,850

Bijlage 16

Little Lunatic (Unchained labs)

Het *Little Lunatic* toestel heeft een uniek optisch design. Door de verticale oriëntatie kunnen snel resultaten verkregen worden. Het toestel beschikt over een xenonflitslamp en een glasvezelkabel die het licht door een klein gaatje stuurt. Op deze manier wordt een smalle bundel van lichtstralen verkregen. A.d.h.v. een lens wordt het licht gefocust, zodat het brandvlak door het midden van de microcuvet gaat. Hierdoor wordt een maximale gevoeligheid verkregen. Het licht zal gesplitst worden in 2 bundels, waarvan er één door een referentiefotodiode gaat. De andere bundel wordt door de chip gestuurd waarin de stalen werden geladen. Wanneer het licht de microcuvet is gepasseerd, komt het in de spectrofotometerblok. Hierin worden verschillende afzonderlijke optische componenten, zoals een cilindrische lens, een diffractielens, een spiegel en een detector, in één module gecombineerd. Dit zorgt voor een compact toestel. Het volledige UV/VIS spectrum wordt gemeten zonder gebruik te maken van bewegende filters of roosters, wat resulteert in een snelle analyse. (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2016)



Figuur 1: Opbouw van de Little Lunatic. (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2016)

De *Little Lunatic* kan absorpties meten van 0,03 OD tot 275 OD in het volledige UV/VIS spectrum. Er is een volume van 2 μ l per monster vereist om een betrouwbaar resultaat te verkrijgen. A.d.h.v. bijhorende strips kunnen de stalen geladen worden. In deze strips bevinden zich circuits waarin microcuvetten zijn ingebouwd. Elke strip bevat 16 van deze circuits, waardoor er 16 stalen per meting geanalyseerd kunnen worden. De volledige analyse neemt 2 min in beslag.

Er bestaan 2 soorten *Lunatic strips*. Enerzijds heeft de *regular strip* een meetbereik tot 40 OD, anderzijds heeft de *high lunatic strip* een meetbereik tot 275 OD. De monsters worden in de *input well* gepipetteerd. Vooraleer de analyse

uitgevoerd kan worden, bepaalt het toestel het intensiteitsspectrum van het licht dat door de xenonflitslamp wordt uitgezonden. Dit gebeurt a.d.h.v. een fotodiode en een monsterspectrofotometer. Voor een optimale meting te verkrijgen, wordt de chip zodanig gepositioneerd dat het brandpunt van het uitgezonden licht door het midden van elke microcuvet gaat. Het toestel bepaalt de lichtintensiteit doorheen de lege cuvet en vervolgens wordt aan de hand van een pompsysteem het staal geladen. Uiteindelijk wordt het intensiteitsspectrum van de gevulde cuvet gemeten, dat aan de hand van de software zal worden omgezet naar het absorptiespectrum van het staal.

De detector in het toestel bevat fotodiodes die elk een stroom zullen genereren wanneer ze aan licht worden blootgesteld. Wanneer het witte licht van de xenonflitslamp gescheiden wordt door het diffractierooster, zullen de verschillende golflengtes op verschillende fotodiodes vallen. Op deze manier wordt de intensiteit bij elke golflengte bepaald. Door de lichtintensiteit te vergelijken dat doorheen een lege en volle cuvet wordt gelaten, kan het absorptiespectrum van het monster bepaald worden. (Mueller, Lightfoot, & Schroeder, 2016)



Figuur 2: Little Lunatic (zelf genomen foto). (Bioresource center Ghent, 2020)

Bijlage 17

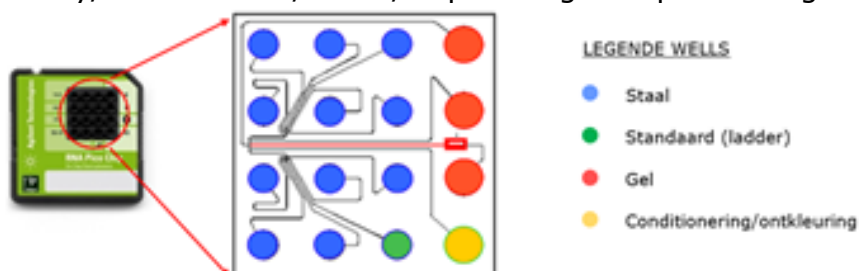
Informatie 2100 BioAnalyzer (Agilent)

Het 2100 BioAnalyzer-systeem laat toe om een kwaliteitscontrole uit te voeren van stalen. Samen met de software biedt het een zeer nauwkeurige analytische evaluatie van verschillende soorten stalen in diverse *workflows*, zoals NGS, genexpressie, biofarmaceutisch onderzoek, etc. Digitale gegevens bieden een objectieve beoordeling van de grootte, concentratie, integriteit en zuiverheid van DNA, RNA en eiwitten. (Agilent, 2019)



Figuur 1: 2100 BioAnalyzer.

De BioAnalyzer werkt volgens het principe van gelelektroforese. Dit wordt geïntegreerd in een chipformaat. Een chip-gelelektroforese wordt uitgevoerd voor het analyseren van DNA, RNA en proteïnen. De chip beschikt over wells voor het laden van stalen, een ladder, de gel en een conditionering/ontkleuring. Onderstaande afbeelding geeft schematisch de betekenis van de wells weer met bijhorende legende. Voor een uitgebreide manuele handleiding over het gebruik van de *chip priming station* wordt verwezen naar <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/chipPriming%20.pdf> van Agilent technologies, 2017.



Figuur 2: Schematische betekenis van wells met bijhorende legende. (Cutler, 2020)

Om een verbonden netwerk te creëren tussen deze wells zijn de microkanalen gemaakt uit glas. Zowel de microkanalen als de wells worden tijdens de chipvoorbereiding gevuld met een zeefpolymeer en fluorescentiekleurstof. Op die manier ontstaat een geïntegreerd elektrisch circuit. De zestien-pinnen elektroden van de cartridge zijn zo gerangschikt dat ze in de wells van de chip passen. Elke elektrode is aangesloten op een onafhankelijke voeding die maximale controle en flexibiliteit biedt.

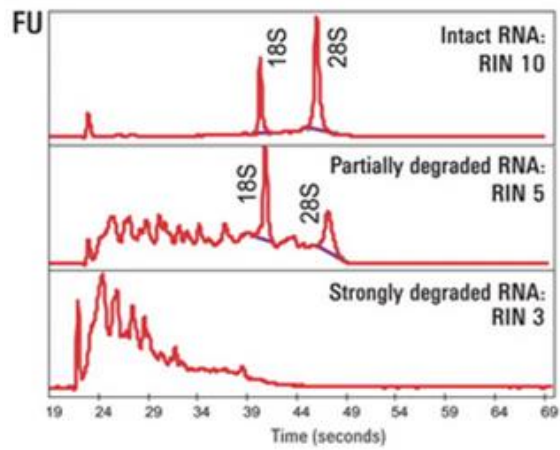
Geladen biomoleculen worden aangedreven door een spanningsgradiënt. De moleculen worden gescheiden op basis van grootte vanwege een constante massa-ladingsverhouding en door de aanwezigheid van een zeefpolymeermatrix. Kleinere fragmenten migreren sneller dan grotere. Uit de migratietijd dat voor elk fragment wordt gemeten, kan de grootte worden berekend.

Kleurstofmoleculen intercaleren zich in DNA- of RNA-strengen, of proteïnen. Op deze manier kunnen ze gedetecteerd worden door een laser geïnduceerde fluorescentie. De gedetecteerde gegevens worden vertaald in banden en elektroferogrammen. Met behulp van de ladder kan een standaardcurve worden opgesteld. De migratietijd wordt uitgezet tegenover de fragmentgrootte. De ladder bestaat voornamelijk uit componenten met gekende grootte.

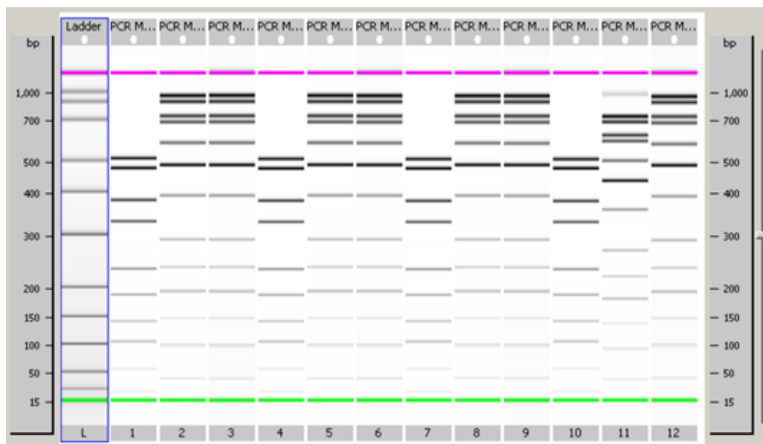
Interne standaarden worden gebruikt als markeringen om de gegevens van de ladder af te stemmen op de gegevens van de stalen geladen in de wells. Markeringen zijn nodig om drifteffecten, opgetreden tijdens de *chip run*, te compenseren.

Voor RNA-assays gebeurt de kwantificatie aan de hand van het laddergebied. Het gebied onder de ladder wordt vergeleken met de som van de monsterpiekgebieden. Voor totale RNA-assays wordt de ribosomale ratio bepaald. De ribosomale ratio zegt iets meer over de integriteit van het RNA-staal. Echter kan het RNA-integriteitsgetal (RIN) worden gebruikt om de integriteit van totale RNA-monsters te schatten op basis van het volledige elektroforetische spoor van het RNA-monster, inclusief de aan- of afwezigheid van afbraakproducten.

De 2100 expertsoftware, geïntegreerd in de 2100 BioAnalyzer, zet de fluorescentie-intensiteit uit tegenover de fragmentgrootte/migratietijd. Op die manier wordt voor elk staal een elektroferogram geproduceerd. De gegevens kunnen ook worden weergegeven in een densitometerplot, waardoor een bandenpatroon ontstaat. (Cutler, 2020) (Agilent technologies, 2006)



Figuur 3: Elektrogram met bekomen RIN-waarden. (Cutler, 2020)



Figuur 4: Voorbeeld van een densitometerplot. (Cutler, 2020)

Bijlage 18

Standaard Pre-analytische code (SPREC)

Table 1. Preanalytical variables included in the SPREC (seven-element-long SPREC), version SPREC-01, applied to fluid samples. Codes in bold come from the LDMS

Type of sample	
Ascites fluid	ASC
Amniotic fluid	AMN
Bronchoalveolar lavage	BAL
Blood (whole)	BLD
Bone marrow aspirate	BMA
Breast milk	BMK
Buccal cells	BUC
Unficolled buffy coat, viable	BUF
Ficoll mononuclear cells, viable	CEL
Fresh cells from non blood specimen type	CEN
Cells from nonblood specimen type (e.g., disrupted tissue), viable	CLN
Cord blood	CRD
Cerebrospinal fluid	CSF
Nasal washing	NAS
Ficoll mononuclear cells, nonviable	PEL
Cells from nonblood specimen type (e.g., disrupted tissue), nonviable	PEN
Pleural fluid	PFL
Plasma, single spun	PL1
Plasma, double spun	PL2
Saliva	SAL
Semen	SEM
Serum	SER
Sputum	SPT
Stool	STL
Synovial fluid	SYN
Tears	TER
24-h urine	U24
Urine	URN
Other	ZZZ
Type of primary container	
Vacutainer acid citrate dextrose or equivalent	ACD
Vacutainer citrate phosphate dextrose or equivalent	CPD
Vacutainer lithium heparin or equivalent	HEP
Vacutainer hirudin or equivalent	HIR
Oragene collection container or equivalent	ORG
Paxgene blood RNA+	PAX
Vacutainer potassium EDTA or equivalent	PED
S8820 protease inhibitor tablets or equivalent	PI1
Protease inhibitors	PIX
Polypropylene tube sterile	PPS
Paxgene blood DNA	PXD
Paxgene bone marrow RNA	PXR
Vacutainer sodium citrate or equivalent	SCI
Vacutainer sodium EDTA or equivalent	SED
Vacutainer sodium fluoride/potassium oxalate or equivalent	SPO

Table 1. Preanalytical variables included in the SPREC (seven-element-long SPREC), version SPREC-01, applied to fluid samples. Codes in bold come from the LDMS (Cont'd)

Type of primary container		
Vacutainer serum separator tube or equivalent		SST
Tempus tube		TEM
Vacutainer trace elements		TRC
Unknown		XXX
Other		ZZZ
Precentrifugation (delay between collection and processing)		
RT*	<2 h	A
3°C to 7°C	<2 h	B
RT	2-4 h	C
3°C to 7°C	2-4 h	D
RT	4-8 h	E
3°C to 7°C	4-8 h	F
RT	8-12 h	G
3°C to 7°C	8-12 h	H
RT	12-24 h	I
3°C to 7°C	12-24 h	J
RT	24-48 h	K
3°C to 7°C	24-48 h	L
RT	>48 h	M
3°C to 7°C	>48 h	N
35°C to 38°C	<2 h	O
Unknown		X
Other		Z
Centrifugation		
RT 10 min	<3,000 g no braking	A
RT 10 min	<3,000 g with braking	B
3°C to 7°C 10 min	<3,000 g no braking	C
3°C to 7°C 10 min	<3,000 g with braking	D
RT 10 min	3,000-6,000 g with braking	E
3°C to 7°C 10 min	3,000-6,000 g with braking	F
RT 10 min	6,000-10,000 g with braking	G
3°C to 7°C 10 min	6,000-10,000 g with braking	H
RT 10 min	>10,000 g with braking	I
3°C to 7°C 10 min	>10,000 g with braking	J
No centrifugation		N
Unknown		X
Other		Z
Second centrifugation		
RT 10 min	<3,000 g no braking	A
RT 10 min	<3,000 g with braking	B
3°C to 7°C 10 min	<3,000 g no braking	C
3°C to 7°C 10 min	<3,000 g with braking	D
RT 10 min	3,000-6,000 g with braking	E
3°C to 7°C 10 min	3,000-6,000 g with braking	F

(Continued on the following page)

Table 1. Preanalytical variables included in the SPREC (seven-element-long SPREC), version SPREC-01, applied to fluid samples. Codes in bold come from the LDMS (Cont'd)

Second centrifugation		
RT 10 min	6,000-10,000g with braking	G
3-7°C 10 min	6,000-10,000 g with braking	H
RT 10 min	>10,000 g with braking	I
3°C to 7°C 10 min	>10,000 g with braking	J
No second centrifugation		N
Unknown		X
Other		Z
Postcentrifugation delay		
<1 h 3°C to 7°C		A
<1 h RT		B
1-2 h 3°C to 7°C		C
1-2 h RT		D
2-8 h 3°C to 7°C		E
2-8 h RT		F
8-24 h 3°C to 7°C		G
8-24 h RT		H
>24 h 3°C to 7°C		I
>24 h RT		J
Unknown		X
Other		Z
Long-term storage		
PP tube 0.5-2 mL ¹	-85°C to -60°C	A
PP tube 0.5-2 mL	-35°C to -18°C	B
Cryotube 1-2 mL	Liquid nitrogen ¹	C
Cryotube 1-2 mL	-85°C to -60°C	D
Cryotube 1-2 mL	Programmable freezing to <-135°C	E
Straw	Liquid nitrogen	F
Straw	-85°C to -60°C	G
Straw	-35°C to -18°C	H
Straw	Programmable freezing to <-135°C	I
PP tube ≥5 mL	-85°C to -60°C	J
PP tube ≥5 mL	-35°C to -18°C	K
Microplate	-85°C to -60°C	L
Microplate	-35°C to -18°C	M
Paraffin block	RT	P
Unknown		X
Other		Z

*RT, room temperature: 18°C to 25°C.
¹PP, polypropylene.
¹Liquid nitrogen refers to either vapor or liquid phase.

Table 2. Preanalytical variables included in the SPREC (seven-element-long SPREC), version SPREC-01, applied to solid samples. Codes in bold come from the LDMS

Type of sample	
Fresh cells from nonblood specimen type	CEN
Cells from nonblood specimen type (e.g., disrupted tissue), viable	CLN
Cells from fine needle aspirate	FNA
Hair	HAR
Cells from laser capture microdissected tissue	LCM
Cells from nonblood specimen type (e.g., disrupted tissue), nonviable	PEN
Solid tissue	TIS
Cells from disrupted tissue	LCM
Other	ZZZ
Type of collection	
Autopsy <6 h postmortem	A06
Autopsy 6-12 h postmortem	A12
Autopsy 12-24 h postmortem	A24
Autopsy 24-48 h postmortem	A48
Autopsy 48-72 h postmortem	A72
Biopsy	BPS
Fine needle aspirate	FNA
Puncture	PUN
Surgical excision	SRG
Swab	SWB
Other	ZZZ
Warm ischemia time	
<2 min	A
2-10 min	B
10-20 min	C
20-30 min	D
30-60 min	E
>60 min	F
Unknown	X
Not applicable (e.g., biopsy)	N
Other	Z
Cold ischemia time	
<2 min	A
2-10 min	B
10-20 min	C
20-30 min	D
30-60 min	E
>60 min	F
Unknown	X
Not applicable (e.g., autopsy)	N
Other	Z
Fixation type	
Nonaldehyde with acetic acid	ACA
Aldehyde based	ALD
Alcohol based	ETH
Nonbuffered formalin	FOR
Snap freezing	SNP
Nonaldehyde without acetic acid	NAA
Neutral buffered formalin	NBF

Table 2. Preanalytical variables included in the SPREC (seven-element-long SPREC), version SPREC-01, applied to solid samples. Codes in bold come from the LDMS (Cont'd)

Fixation type		
Optimum cutting temperature medium		OCT
RNA Later		RNL
Unknown		XXX
Other		ZZZ
Fixation time		
<15 min		A
15 min to 1 h		B
1-4 h		C
4-8 h		D
8-24 h		E
24-48 h		F
48-72 h		G
Unknown		X
Other		Z
Long-term storage		
PP tube 0.5-2 mL*	-85°C to -60°C	A
PP tube 0.5-2 mL	-35°C to -18°C	B
Cryotube 1-2 mL	Liquid nitrogen [†]	C
Cryotube 1-2 mL	-85°C to -60°C	D
Cryotube 1-2 mL	Programmable freezing to <-135°C	E
Straw	Liquid nitrogen	F
Straw	-85°C to -60°C	G
Straw	-35°C to -18°C	H
Straw	Programmable freezing to <-135°C	I
PP tube ≥5 mL	-85°C to -60°C	J
PP tube ≥5 mL	-35°C to -18°C	K
Microplate	-85°C to -60°C	L
Microplate	-35°C to -18°C	M
Paraffin block	RT	P
Unknown		X
Other		Z

NOTE: RT, room temperature: 18°C to 25°C.

*PP, polypropylene.

[†]Liquid nitrogen refers to either vapor or liquid phase.

Table 3. Biospecimen description examples according to SPREC-01

Fluid specimens	Serum	Plasma	Urine	Cerebrospinal fluid
Sample type	SER	PL2	U24	CSF
Type of container	SST	SED	PIX	PPT
Precentrifugation	A	B	B	B
Centrifugation	E	B	A	C
Second centrifugation	N	E	N	N
Postcentrifugation	A	A	A	A
Storage	G	G	J	A
Solid specimens	Solid tissue			
Sample type	TIS			
Type of collection	BPS			
Warm ischemia	N			
Cold ischemia	B			
Fixation type	RNL			
Fixation time	A			
Storage	A			

Figuur 1: SPREC-code voor pre-analytische variabelen.