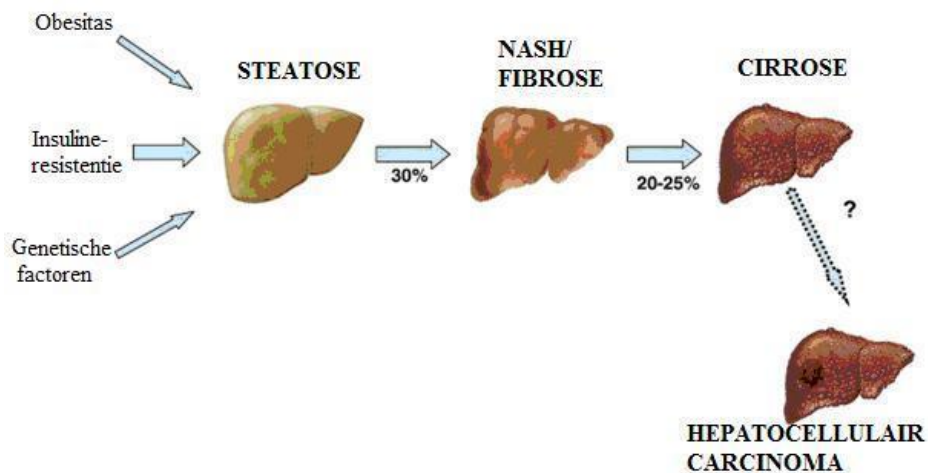


Professionele bachelor Agro- en Biotechnologie Biotechnologie



Genexpressiestudie met behulp van lasermicrodissectie op segmenten van de galwegen van muismodellen met primaire biliaire cirrose

Elien Jacobs

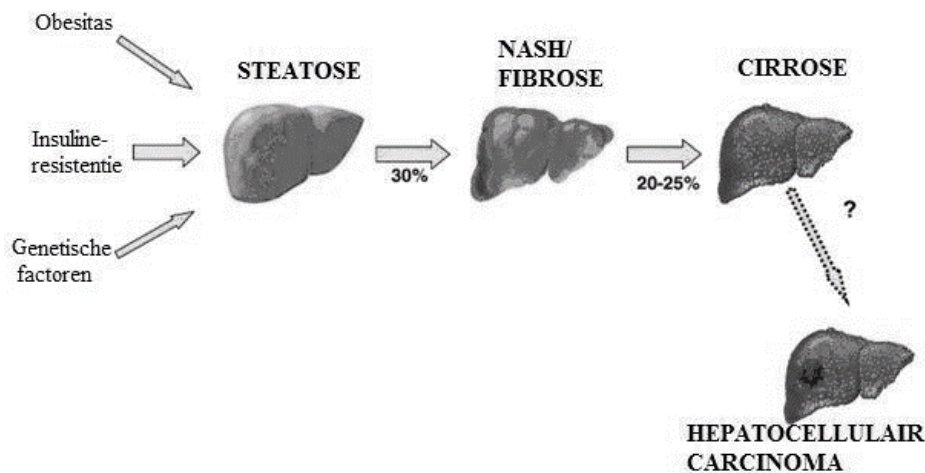
Promotoren:

Prof. Dr. Tania Roskams
Kathleen Van den Eynde
Dr. Jasper Wouters
Dr. Lieve Vangeel
Evelyne Wirix

KU Leuven
KU Leuven
KU Leuven
UZ Leuven
PXL-Tech



Professionele bachelor Agro- en Biotechnologie Biotechnologie



Genexpressiestudie met behulp van lasermicrodissectie op segmenten van de galwegen van muismodellen met primaire biliaire cirrose

Elien Jacobs

Promotoren:

Prof. Dr. Tania Roskams
Kathleen Van den Eynde
Dr. Jasper Wouters
Dr. Lieve Vangeel
Evelyne Wirix

KU Leuven
KU Leuven
KU Leuven
UZ Leuven
PXL-Tech



Voorwoord

De laatste stap in de boeiende opleiding tot professionele bachelor Agro-en Biotechnologie met specialisatie cel- en gentechnologie is een kans om de leerstof toe te passen in de praktijk, namelijk de bachelorproef. Het onderwerp van mijn bachelorproef is het uitvoeren van een genexpressiestudie met behulp van lasermicrodissectie op segmenten van de galwegen van muismodellen met primaire biliaire cirrose. Het onderzoek vond plaats in het labo voor translationeel cel- en weefselonderzoek aan de KU Leuven. Dit labo is verbonden aan het labo pathologische ontleedkunde van UZ Gasthuisberg.

Wat me erg aansprak in de stage was dat er een goede combinatie was tussen technieken die ik reeds aangeleerd had in de opleiding Biotechnologie en de nieuwe technieken waarmee ik leerde werken zoals het maken van vriescoupes, het uitvoeren van kleuringen en de lasermicrodissectie. Door het uitvoeren van deze stage heb ik heel wat technische vaardigheden aangeleerd die nodig zijn om goed te kunnen functioneren in het labo. Ik heb geleerd om zelfstandig en individueel te leren werken. Verantwoordelijkheid nemen speelt een belangrijke rol bij het uitvoeren van een stage. Het is belangrijk om initiatief te tonen en om goed te communiceren met de promotors maar ook met de andere laboranten. Het leggen van sociale contacten met de andere laboranten in het labo zorgt voor een goede samenwerking in groepsverband. Ik heb geleerd om kritisch om te gaan met wetenschappelijke informatie en bronnen om zo een betrouwbare bachelorproef te kunnen schrijven. Het uitvoeren van de bachelorproef vormt een ideale voorbereiding op het latere functioneren op de werkvloer.

Desondanks verliep niet alles zoals het gepland was. Bij het uitvoeren van wetenschappelijk onderzoek dient men rekening te houden met de beperkingen die een onderzoek met zich mee brengen. Het uitvoeren van wetenschappelijk onderzoek is vaak moeilijk en afhankelijk van veel factoren. Wat wel zeer positief is was het leuke team waarin ik ben terecht gekomen. Dit zorgde ervoor dat ik me snel kon inwerken.

De positieve feedback en de goede raad die ik van mijn promotors kreeg waren een enorme steun en drijfveer om in het onderzoek te blijven geloven en om ervoor te gaan. Het grootste woord van dank wil ik bij deze richten aan mijn promotors namelijk mevrouw Kathleen Van den Eynde, dr. Jasper Wouters, dr. Lieve Vangeel en mevrouw Evelyne Wirix.

Ik heb het onderzoek samen uitgevoerd met de doctoraatstudent Matthias Van Haele, ook hem zou ik willen bedanken om mij meer inzicht te bezorgen in de histologie van de lever en voor de ondersteuning in het labo. Emilie Bittoun zou ik graag bedanken voor de hulp in het labo en voor het aanleren van de nieuwe technieken.

Tot slot zou ik al de lectoren van de opleiding Biotechnologie willen bedanken voor de kennis bij te brengen die nodig is voor het uitvoeren van een bachelorproef, het aanleren van de technieken in het labo en voor het leren verwerken van resultaten.

Samenvatting

Primaire biliaire cirrose (PBC) is een leveraandoening waarbij de kleine galkanaaltjes in de lever chronisch ontsteken waardoor de galkanaaltjes steeds verder vernauwen. De galvloeistof kan hierdoor niet worden afgevoerd. Deze ophopingen van galvloeistof in de lever leiden tot ontstekingen en beschadigingen van de levercellen. Uiteindelijk raken de levercellen onherstelbaar beschadigd en wordt er littekenweefsel gevormd. Dit proces is onomkeerbaar en wordt levercirrose genoemd. In zeer ernstige gevallen is een levertransplantatie de enige mogelijke oplossing om te genezen. De oorzaak van de ziekte is tot nu toe onbekend, men vermoedt dat het een auto-immuunaandoening is. De maatschappelijke relevantie van deze bachelorproef is dus een bijdrage voor de medische wereld en de geneeskunde om op die manier meer inzicht te krijgen in deze leveraandoening om zo nieuwe behandelingen te ontwikkelen.

Er wordt gewerkt met vriescoupes die gesneden zullen worden met de cryostaat. De coupes worden aangebracht op een FrameSlide en worden vervolgens gekleurd met behulp van de cresyl violet kleuring om zo het weefsel zichtbaar te maken voor lasermicrodissectie. Vervolgens worden de segmenten van de galwegen van muismodellen met PBC gemicrodissecteerd met behulp van lasermicrodissectie. Deze segmenten van interesse zijn de galwegen, het lymfocytair infiltraat en de venen. De volgende stap is de RNA-extractie. Het is de bedoeling om zuiver RNA te verkrijgen met een zo hoog mogelijke opbrengst. De RNA-extractie wordt gevolgd door de RNA sequencing om te bepalen welke genen onderzocht zullen worden in de genexpressiestudie. Tot slot volgt de real-time PCR om te bepalen welke genen meer of minder tot expressie komen bij de muizenstalen met PBC in vergelijking met de controlegroep, namelijk de gezonde muizenstalen.

Het onderzoek is binnen de periode van de stage niet afgerond. De structuren van interesse waren moeilijk te onderscheiden van elkaar. Na het uittesten van verschillende kleuringen bleek dat de hematoxyline- eosinekleuring en de keratinekleuring het beste resultaat opleverden. Deze kleuringen waren nodig om de kwaliteit van de stalen te bepalen en om te controleren of de verschillende structuren te onderscheiden zijn voor de lasermicrodissectie. De lasermicrodissectie werd vervolgens uitgevoerd op controlestalen en op enkele muizenstalen met primaire biliaire cirrose. Hierbij doken volgende problemen op. De coupes bleken niet aan de gewenste kwaliteit te voldoen waardoor het moeilijk was om de verschillende structuren van elkaar te onderscheiden, ook waren er vele scheurtjes in het weefsel die een invloed hadden op de waarneming. Normaal gezien zou er in het geval van leverweefsel gedurende 10 minuten gemicrodissecteerd mogen worden per coupe om zo het weefsel minimaal te beschadigen en om RNA van goede kwaliteit te verkrijgen. Een andere belangrijke vereiste is om genoeg cellen te hebben per microtube (ongeveer 1 miljoen cellen). Het microdissecteren nam te veel tijd in beslag (45 minuten). De verklaring hiervoor is een gebrek aan ervaring voor het werken met de lasermicrodissectie en in mijn geval ook een gebrek aan kennis omtrent histologie. Bovendien is het noodzakelijk om zuivere cellen of weefsel te microdissecteren voor de real-time PCR. Een gevolg hiervan is dat het gemicrodissecteerd materiaal een zeer slechte kwaliteit kreeg. Momenteel is men aan het proberen om de techniek te optimaliseren om op die manier coupes te verkrijgen van betere kwaliteit en om zo bijgevolg makkelijker de verschillende structuren te kunnen onderscheiden. Het huidige project is uitgevoerd tot aan de RNA-extractie. De zuiverheid en opbrengst van het RNA worden bepaald in een externe firma. De resultaten hiervan werden niet tijdig ontvangen om te verwerken in deze bachelorproef. De voornaamste resultaten zijn microscopische foto's van weefsel van muismodellen met primaire biliaire cirrose waarop de structuren zichtbaar zijn die met behulp van de lasermicrodissectie geïsoleerd werden.

Inhoudsopgave

| | |
|---|----|
| Voorwoord | 4 |
| Samenvatting..... | 5 |
| Inhoudsopgave | 6 |
| Lijst met afkortingen | 9 |
| 1. Inleiding | 10 |
| 2. Literatuurstudie..... | 11 |
| 2.1. Morfologie en fysiologie van de lever | 11 |
| 2.2. De gal en galwegen..... | 12 |
| 2.3. Functie van de lever | 12 |
| 2.3.1. Productie van gal | 12 |
| 2.3.2. De productie van galzure zouten | 13 |
| 2.3.3. De vetstofwisseling in het lichaam..... | 13 |
| 2.3.4. De productie van cholesterol | 13 |
| 2.3.5. Afbraak van rode bloedcellen | 14 |
| 2.3.6. Overige functies van de lever | 14 |
| 2.4. Regeneratievermogen van de lever | 14 |
| 2.4.1. Stamcellen | 15 |
| 2.4.2. De rol van stamcellen bij leverregeneratie | 15 |
| 2.5. Pathologie van de lever | 16 |
| 2.6. Levercirrose | 17 |
| 2.6.1. Andere aandoeningen van de lever | 17 |
| 2.7. Primaire Biliaire cirrose | 18 |
| 2.7.1. Beschrijving van de ziekte | 18 |
| 2.7.2. Oorzaak van de ziekte | 18 |
| 2.7.3. Klachten en symptomen van de aandoening..... | 19 |
| 2.7.4. Diagnose | 19 |
| 2.7.5. Behandeling..... | 20 |
| 2.8. Genen betrokken bij primaire biliaire cirrose | 21 |
| 2.9. Theoretische achtergrond van de gebruikte technieken | 21 |
| 2.9.1. Vriescoupes | 21 |
| 2.9.2. H&E-kleuring..... | 22 |
| 2.9.3. Immunohistochemische kleuring | 22 |
| 2.9.4. Lasermicrodissectie | 23 |
| 2.9.5. RNA-extractie | 24 |

| | | |
|--------|--|----|
| 2.9.6. | Real-time PCR | 25 |
| 3. | Materialen en methoden | 27 |
| 3.1. | Flowschema..... | 27 |
| 3.2. | Weefsel invriezen | 28 |
| 3.2.1. | Materiaal | 28 |
| 3.2.2. | Methode..... | 29 |
| 3.3. | Vriescoupes snijden..... | 30 |
| 3.3.1. | Materiaal | 30 |
| 3.3.2. | Methode..... | 31 |
| 3.4. | Hematoxyline-eosinekleuring..... | 32 |
| 3.4.1. | Materiaal | 32 |
| 3.4.2. | Methoden..... | 33 |
| 3.5. | Immunohistochemische kleuring op vriescoupes..... | 34 |
| 3.5.1. | Materiaal | 34 |
| 3.5.2. | Methode..... | 36 |
| 3.6. | Cresyl violet kleuring voor lasermicrodissectie | 37 |
| 3.6.1. | Materiaal | 37 |
| 3.6.2. | Methoden..... | 38 |
| 3.7. | Lasermicrodissectie | 39 |
| 3.7.1. | Materiaal | 39 |
| 3.7.2. | Methode..... | 39 |
| 3.8. | RNA-extractie | 47 |
| 3.8.1. | Materiaal | 47 |
| 3.8.2. | Methode..... | 48 |
| 4. | Resultaten en discussie | 49 |
| 4.1. | Resultaten en discussie microscopische slides..... | 49 |
| 4.1.1. | Vergelijking leverweefsel van muismodel met PBC en wildtype muismodel | 49 |
| 4.1.2. | Vergelijking H&E-kleuring en keratine kleuring | 50 |
| 4.1.3. | Microscopische afbeelding van vene met lymfocytair infiltraat | 51 |
| 4.1.4. | Microscopische afbeelding van het actief ziekteproces van PBC..... | 52 |
| 4.1.5. | Microscopische afbeelding van ver gevorderd ziektestadium bij PBC..... | 52 |
| 4.2. | Resultaten lasermicrodissectie..... | 53 |
| 4.2.1. | Resultaten van lasermicrodissectie van scheurtjes en gaatjes in het weefsel..... | 53 |
| 4.2.2. | Resultaten van lasermicrodissectie van een galweg | 54 |
| 4.2.3. | Resultaten van lasermicrodissectie van twee galwegen..... | 55 |

| | |
|---|----|
| 4.2.4. Resultaten van lasermicrodissectie van een lymfocytair infiltraat, vier galwegen en een vene | 56 |
| 5. Algemene discussie | 57 |
| 5.1. Algemene discussie microscopische slides..... | 57 |
| 5.2. Discussie lasermicrodissectie | 57 |
| 6. Conclusie | 59 |
| Bibliografie | 60 |
| Figurenlijst | 65 |
| Tabellenlijst | 66 |
| Bijlagen | 67 |

Lijst met afkortingen

| | |
|----------------|---|
| CCL5 | <i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i> |
| cDNA | <i>Copy desoxyribonucleïnezuur</i> |
| CT-scan | Computer Tomografie |
| C _t | <i>Cyclus treshold</i> |
| CTSL | <i>Cathepsin L</i> |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| DNA | Desoxyribonucleïnezuur |
| FRET | Fluorescentie resonantie energie transfer |
| HDL | <i>High density lipoprotein</i> |
| H&E-kleuring | Hematoxyline – eosine kleuring |
| LDL | <i>Low density lipoprotein</i> |
| MRI-scan | <i>Magnetic Resonance Imaging scan</i> |
| mRNA | <i>Messenger ribonucleïnezuur</i> |
| PBC | Primaire biliaire cirrose |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> |
| RNA | Ribonucleïnezuur |
| TYROBP | <i>Tyrosine kinase binding protein</i> |

1. Inleiding

Primaire biliaire cirrose is een aandoening die voornamelijk voorkomt bij vrouwen van middelbare leeftijd (35 à 55 jaar). De ziekte is vrij zeldzaam en komt voor bij ongeveer 1 op 5000 personen (prevalentie). Bij patiënten met primaire biliaire cirrose ontsteken en verdwijnen de kleine galwegentakjes in de lever. De galwegen voeren gal af en spelen hierdoor een belangrijke rol in de vetvertering en in het afvoeren van afvalstoffen van de lever naar de darmen. Wanneer de galwegentakjes verdwijnen zal de vetafbraak niet meer goed kunnen gebeuren en zullen het vet en de afvalstoffen zich opstapelen in het lichaam. Het gevolg hiervan is dat patiënten zich vermoeid en gedeprimeerd gaan voelen en er zullen onderhuidse vetopstapelingen verschijnen.

Er wordt in deze bachelorproef onderzoek uitgevoerd op segmenten van de galwegen in muismodellen met primaire biliaire cirrose. Aan de hand van dit onderzoek is het de bedoeling om onderzoek uit te voeren op stalen van patiënten om zo nieuwe behandelingen te ontwikkelen voor patiënten met deze aandoening.

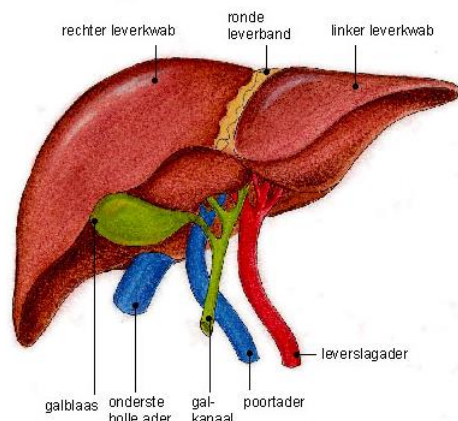
Het is de bedoeling om na te gaan welke genen meer of minder tot expressie komen bij muismodellen met primaire biliaire cirrose in vergelijking met een controlegroep van gezonde muizen. Hiervoor wordt er een genexpressiestudie uitgevoerd door middel van een RNA-extractie uit weefsel, clusters van cellen die geïsoleerd worden met behulp van lasermicrodissectie. De segmenten van de galwegen die gemicrodissecteerd worden zijn de galwegen, het lymfocyttaire infiltraat en de venen. Vervolgens wordt het RNA dat verkregen wordt door de RNA-extractie gesequenced en tot slot is er de real-time PCR om te bepalen welke genen up en down gereguleerd worden bij de aandoening primaire biliaire cirrose.

Er moet op voorhand een selectie gemaakt worden welke genen onderzocht gaan worden. Voor dit onderzoek is het de bedoeling om de genen te onderzoeken die betrokken zijn met de ziekte primaire biliaire cirrose. De vereiste hiervoor is wel dat de genen van de muizen moeten overeenkomen met de humane genen om zo relevante vergelijkingen te kunnen maken. Het RNA wordt na de RNA-extractie gesequenced. Vervolgens wordt er gebruik gemaakt van bioinformatica om de sequentie van het muismodel te vergelijken met de humane sequentie om op die manier te bepalen welke genen onderzocht zullen worden met behulp van real-time PCR.

2. Literatuurstudie

2.1. Morfologie en fysiologie van de lever

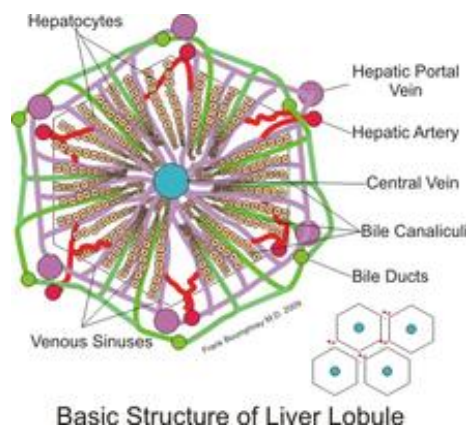
De lever is rechtsboven in de buikholte gelegen, naast de maag. De bovenzijde van de lever is gewerveld, deze past in het rechterdeel van de koepel van het middenrif, waarmee het plaatselijk vergroeid is. De onderzijde is afgeplat. Het is een groot orgaan en weegt ongeveer anderhalve tot twee kilo. De lever is verdeeld in twee leverkwabben, een grote rechterkwab en een kleinere linkerkwab (zie figuur 1). In de lever zijn er twee systemen die afzonderlijk van elkaar functioneren om op die manier al de verschillende functies van de lever uit te voeren, namelijk het bloedvatensysteem en het galgangstelsel.



Figuur 1: Morfologie van de lever [62]

De lever is opgebouwd uit kleine, onderling samenhangende formaties van ongeveer zeshoekige cellen. Deze cellen worden hepatocyten of leverparenchymcellen genoemd. Deze, uit cel-‘platen’ opgebouwde formaties kunnen als kwabjes beschouwd worden. Er zijn gespecialiseerde cellen aanwezig in elk van deze kwabjes. Deze zijn verantwoordelijk voor het uitvoeren van de verschillende functies van de lever. Tussen deze kwabjes is bindweefsel gelegen. In het bindweefsel liggen takken van de poortader, leverslagader en galgangen, zoals zichtbaar is op figuur 1. Het bloed stroomt vanuit de bloedvaten via de leversinusoiden naar de centrale adertjes die midden in het kwabje gelegen zijn en die zich tot leveraders gaan verenigen. De lever is rijk aan bloedvaten.

De wanden van de sinusoiden zijn opgebouwd uit platte leverendothelcellen met geperforeerde wanden. Deze poriën vormen de zeefplaten, hierdoor is er een verbinding tussen de sinusoiden en de parenchymcellen. De zeefplaten vervullen een bloedfilterfunctie. Er stroomt bloed met opgenomen voedingsstoffen uit het darmstelsel en de milt via de poortader de lever binnen. Vervolgens wordt het bloed in de lever gezuiverd en stoffen die erin zitten worden verwerkt. De levercellen kunnen deze stoffen omzetten, opslaan of terug afgeven aan de bloedvaten. Het gezuiverde bloed komt in de onderste holle ader terecht in de rechter boezem van het hart. Op onderstaande afbeelding is de structuur van een leverkwabje zichtbaar.



Figuur 2: Structuur van een leverkwab [1]

De leverparenchymcellen scheiden gal af. Deze gal komt in nauwe galbuisjes tussen de cellen terecht. De galbuisjes verenigen zich tot galgangetjes, die zich vervolgens verenigen tot de galgang. Via dit galgangstelsel wordt de galvloeistof afgevoerd uit de lever naar de galblaas. De galblaas doet dienst als opslagplaats. Vervolgens wordt de galvloeistof ingedikt in de galblaas.

De leverparenchymcellen hebben ronde tot eivormige kernen en zijn rijk aan mitochondriën en lysosomen. In het cytoplasma zijn ophopingen van glycogeen en soms van vetten en een geelbruin pigment (vooral bij veroudering) aanwezig [2] [3] [4] [5].

2.2. De gal en galwegen

Het zijn voornamelijk de kleine galwegen in de lever die een rol spelen bij de aandoening primaire biliaire cirrose. De lever en de galwegen zijn dan ook nauw verbonden met elkaar.

De levercellen produceren gal. De gal druppelt constant in de kleine galwegen, in de gemeenschappelijke galweg en in het duodenum, het eerste deel van de dunne darm.

De gal bevat verschillende chemische stoffen en galzouten. De kleur van de gal is geelgroen. Met behulp van gal kan voedsel, voornamelijk vettig voedsel verteerd worden. Ook zorgt de gal ervoor dat bepaalde vitaminen (A, D, E en K) uit de voeding geabsorbeerd kunnen worden.

Onder de lever ligt de galblaas die dienst doet als opslagplaats, het is een zakje dat aan de gemeenschappelijke galweg hangt en gevuld wordt met gal. Wanneer er voedsel geconsumeerd wordt trekt de galblaas samen. De galblaas ledigt zich in de grote galweg tot in het duodenum. [6] [7] [8].

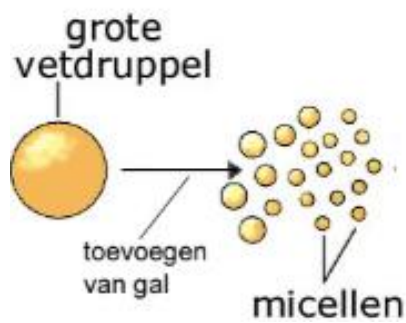
2.3. Functie van de lever

Een 600-tal processen vinden plaats in de lever. Er worden verschillende essentiële stoffen geproduceerd, zoals vetten en eiwitten. Een bijkomende functie van de lever is om giftige stoffen, zoals medicijnen of alcohol, te neutraliseren en deze hierdoor onschadelijk te maken. De lever speelt ook een belangrijke rol bij de energiehuishouding [9]. In volgende alinea's worden de functies besproken die betrokken zijn bij de aandoening primaire biliaire cirrose die de symptomen verklaren.

2.3.1. Productie van gal

Zoals reeds in voorgaande paragrafen al besproken werd, wordt de galvloeistof geproduceerd door leverparenchymcellen en vervolgens getransporteerd naar de galblaas. Bij het consumeren van vetten trekt de galblaas samen. Op die manier wordt er galvloeistof afgegeven aan de dunne darm. De galvloeistof zal zorgen voor de vertering van vetten en het verwijderen van afvalstoffen naar de darmen. Bij patiënten met een leveraandoening is er vaak een verminderde afvoer van de galvloeistof, dit kan leiden tot jeuk [9].

2.3.2. De productie van galzure zouten



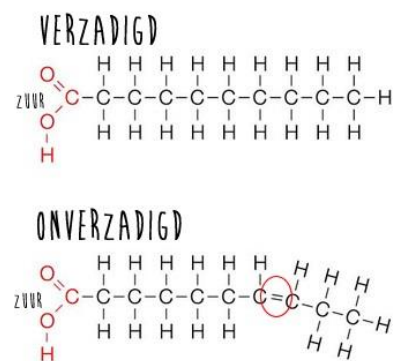
Figuur 3: Invloed van gal op vetdruppels [61]

Galzure zouten vormen een onderdeel van de gal en worden geproduceerd door de levercellen en uitgescheiden in de kleine galwegen. De galzure zouten hebben een sterk emulgerend karakter en spelen een rol bij de vertering van het voedsel. De galzure zouten doen de grotere vetbolletjes uit elkaar vallen in tal van kleine bolletjes, de micellen, zoals zichtbaar is op figuur 3. De zouten ontstaan bij de afbraak van overtollige cholesterol. De galzure zouten nemen water op [10].

Een tekort aan galzouten in de darm kan leiden tot vette diarree en tekorten aan vetoplosbare vitamines. Bij een leveraandoening lopen de galzouten naar het bloed wat ook jeuk kan veroorzaken. [11].

2.3.3. De vetstofwisseling in het lichaam

De vertering van vetten vindt plaats in de dunne darm. Hierdoor ontstaan er vetzuren, die via het bloed naar de lever getransporteerd worden. In de lever worden deze veranderd van structuur, de verzadigde vetten worden omgezet in onverzadigde vetten. Beide structuren zijn zichtbaar op figuur 4. Onverzadigde vetten zijn beter bruikbaar voor de stofwisseling. Ze kunnen namelijk gebruikt worden als brandstof of kunnen worden omgezet in lichaamsvet. Bij een teveel aan vetten zullen er vetopstapelingen ontstaan wat zal leiden tot moeheid [9].



Figuur 4: Structuur verzadigd en onverzadigd vetzuur [49]

2.3.4. De productie van cholesterol

Cholesterol is een component die aanwezig is in de lever, afkomstig van vet uit vlees, melk en kaas en wordt via het voedsel opgenomen uit de darm. De lever kan ook zelf cholesterol aanmaken. Van cholesterol kunnen de geslachtshormonen oestrogeen, testosteron en progesteron aangemaakt worden in de testes bij de man en in de eierstokken bij de vrouw. Oestrogeen en testosteron zijn hormonen die voorkomen bij zowel mannen en vrouwen maar in verschillende hoeveelheden. Progesteron daarentegen komt enkel voor bij vrouwen. Via de gal wordt het teveel aan cholesterol in de lever uitgescheiden. Cholesterol en triglyceriden zijn niet oplosbaar in bloedplasma vermits deze een hydrofoob karakter hebben. Hierdoor worden deze getransporteerd als lipoproteïnen [10].

Bovendien zijn vetten en cholesterol nauw met elkaar verbonden. Het is belangrijk om niet teveel producten te consumeren die cholesterol bevatten om zo het cholesterolgehalte op peil te houden. Het lichaam heeft zo weinig mogelijk verzadigde vetten nodig. Deze vetten zorgen ervoor dat de slechte cholesterol, de *Low density lipoproteïnen* (LDL), in het bloed toeneemt. Teveel LDL in het bloed kan leiden tot het ontstaan van hart- en vaatziekten. Onverzadigde vetten zijn wel noodzakelijk voor het lichaam. Deze vetten worden uit planten gemaakt en zijn essentieel voor het goed functioneren van het lichaam. Deze goede cholesterol, de *high density lipoproteïnen* (HDL), die afkomstig is uit onverzadigde vetten zal de slechte afbreken. Op die manier daalt het cholesterolgehalte in het bloed. Bij een teveel aan cholesterol ontstaan er vetbolletjes op de huid en rond de ogen [12].

2.3.5. Afbraak van rode bloedcellen

Rode bloedcellen leven ongeveer 120 dagen en worden vervolgens afgebroken in de milt. Bij dit proces komt er bilirubine vrij dat door de lever wordt verwerkt vermits deze stof giftig is. Bij de afbraak van rode bloedcellen ontstaat de galkleurstof uit hemoglobine. Bij patiënten met een leverfunctiestoornis wordt bilirubine niet of niet volledig afgebroken. Hierdoor zal de persoon een gelige huidskleur vertonen. De galkleurstof veroorzaakt de bruine kleur van de ontlasting na bacteriële omzetting in de darmen. Het ijzer, afkomstig uit hemoglobine wordt in de cellen opgeslagen als ferritine om later weer af te geven aan de rode bloedcellen [10].

2.3.6. Overige functies van de lever

De lever staat ook in voor de koolhydraatstofwisseling en voor het op peil houden van de bloedsuikerspiegel. Een deel van de suiker wordt onder de vorm van glycogeen opgeslagen in de lever.

Een bijkomende functie is de eiwitstofwisseling. Bij de vertering van eiwitten in de dunne darm ontstaan er aminozuren die afgevoerd worden naar de lever en waarvan nieuwe, bruikbare eiwitten gemaakt worden.

De lever kan schadelijke stoffen ontgiften. Voor dit neutralisatieproces zal de lever de schadelijke stoffen binden aan het eiwit glucuronzuur of de schadelijke stoffen van structuur veranderen.

De lever doet daarnaast ook dienst als opslagplaats voor allerlei stoffen zoals bijvoorbeeld glycogeen, vetten, aminozuren, vitamines en metalen.

Tot slot vindt in de lever het proces gluconeogenese plaats. Hierbij wordt glucose gevormd uit vetten, aminozuren en in mindere maten ook andere monosachariden [10].

2.4. Regeneratievermogen van de lever

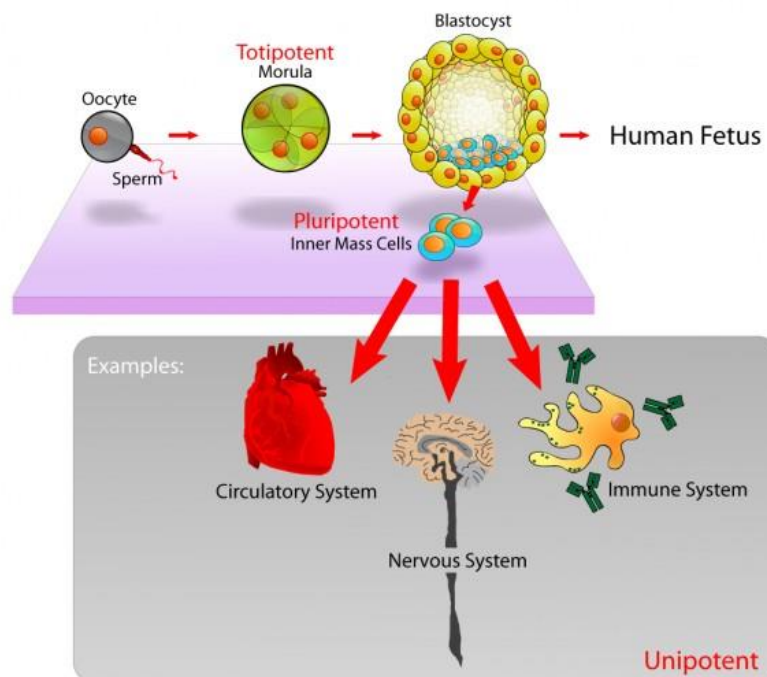
De lever heeft het vermogen om te regenereren. Dit betekent dat hij in staat is om opnieuw aan te groeien en uit te groeien tot een volledige lever als deze gedeeltelijk verwijderd is. Hierbij is het belangrijk dat het overblijvende deel gezond is. De lever heeft een enorme reservecapaciteit en kan zijn functies blijven uitoefenen wanneer een deel ervan niet meer functioneert.

Regeneratie werkt met behulp van stamcellen. Deze worden voornamelijk aangemaakt in het beenmerg en zijn in staat om te differentiëren tot alle soorten celtypen.

Aangetaste of beschadigde delen van de lever groeien weer aan. Dit kan echter niet onbeperkt, op een bepaald moment is de lever niet meer in staat om voldoende te regenereren. In dit geval is er een levertransplantatie nodig. Bij een levertransplantatie is het voldoende wanneer slechts een deel (ongeveer de helft) van de donorlever wordt ingebracht bij de patiënt. De andere helft van de lever zal vanzelf aangroeien tot de lever zijn oorspronkelijke grootte bereikt heeft [13].

2.4.1. Stamcellen

Stamcellen zijn ongeprogrammeerde cellen die onbeperkt kunnen delen en kunnen differentiëren in andere gespecialiseerde celtypen. Embryonale stamcellen kunnen differentiëren in meer dan 220 celtypen waaruit het menselijk lichaam is opgebouwd. Voor andere stamcellen geldt dat het één en ander afhankelijk is van waar de stamcel geogst is en wat voor soort stamcel het is. Doorgaans worden stamcellen ingedeeld in embryonale en volwassen stamcellen. Ook wordt er een onderscheid gemaakt of een stamcel pluri- of multipotent is. Pluripotente stamcellen kunnen differentiëren in ieder ander celtype. Multipotente stamcellen daarentegen kunnen differentiëren tot de verschillende celtypen die in één specifiek weefsel voorkomen. De stamcellen in de lever zijn multipotente stamcellen [13] [14]. Op figuur 5 wordt deze differentiatie van de stamcellen weergegeven.



Figuur 5: Differentiatie van stamcellen [15]

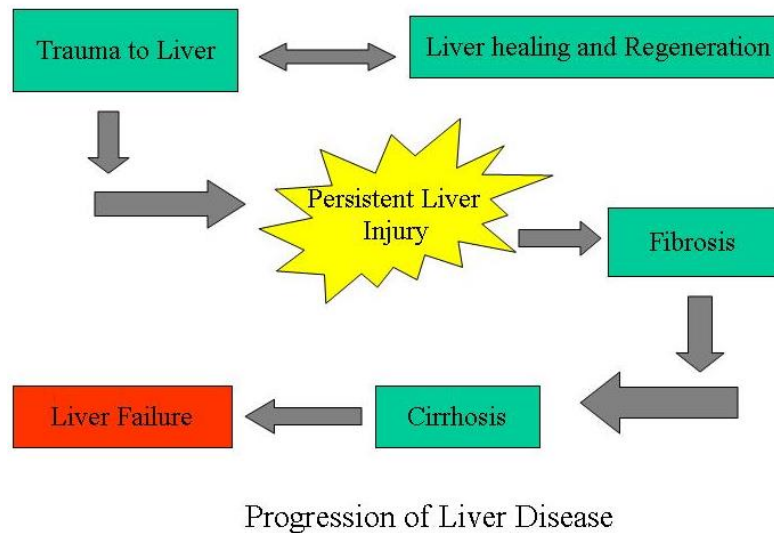
2.4.2. De rol van stamcellen bij leverregeneratie

Om delen van het lichaam te kunnen regenereren is het noodzakelijk om een startpunt te hebben. Dit startpunt is de stamcel. Een stamcel zal zich delen wanneer een weefsel beschadigd is en hersteld moet worden. Er ontstaan bij de deling twee soorten van cellen. Er wordt een kopie gevormd van de stamcel die zich heeft gedeeld, op die manier wordt de voorraad stamcellen op peil gehouden. Ook ontstaat er een cel die zich gespecialiseerd heeft voor het beschadigde weefsel. Dit tweede celtype zal vervolgens nog meerdere malen delen om zo voldoende cellen te maken om het weefsel te herstellen.

Een stamcel is veelzijdig en bovendien ook onsterfelijk. Normale lichaamscellen delen veelvuldig en worden bij elke deling een beetje ouder. Stamcellen verouderen ook bij elke deling. Maar deze delen enkel wanneer er weefsel beschadigd is. Hierdoor kunnen ze makkelijk overleven. Gedurende het hele leven is er de mogelijkheid tot regeneratie [16] [17].

2.5. Pathologie van de lever

Er zijn verschillende oorzaken die kunnen leiden tot een beschadiging van de lever zoals een overmatig alcoholgebruik, het gebruik van medicijnen, ongezonde voeding, zwaarlijvigheid, chronische virale hepatitis,... . Wanneer de lever beschadigd wordt, zullen stamcellen gaan delen en differentiëren in nieuw leverweefsel. Op die manier kan de lever zichzelf herstellen na een beschadiging.



Figuur 6: Pathologie leveraandoeningen [18]

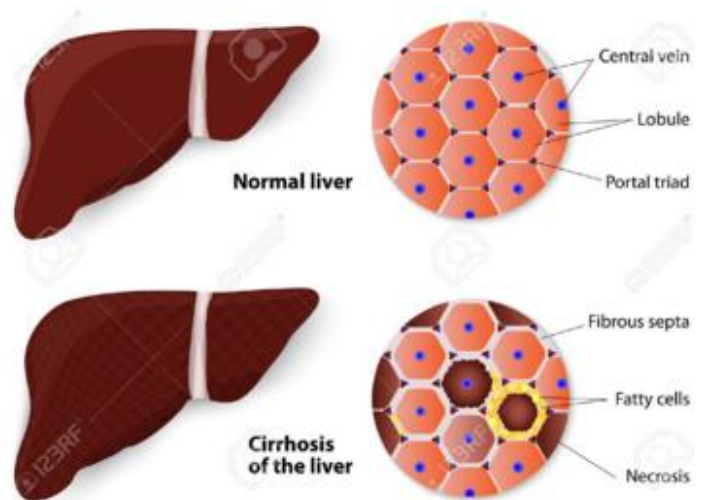
Bij een slechte vertering stapelen levercellen vet op waardoor vervetting van de lever ontstaat. Dit stadium wordt de steatose genoemd. De oorzaak hiervan is dat de kleine afvoerkanalen van de galwegen verstopt geraken door taaie slijmen waardoor de galafscheiding in de darm vermindert. Dit kan verbeteren door de voeding te optimaliseren en door verteringseiwitten in te nemen.

Na verloop van tijd kan er verharding en verlittekening van de lever ontstaan. Dit wordt leverfibrose genoemd. Door deze leverstijfheid kan de doorbloeding van de lever beperkt worden. Wanneer de bloeddorstrooming door de lever te veel weerstand ondervindt, dan zal het bloed een uitweg zoeken langs alternatieve wegen. Het gevolg hiervan is het ontstaan van uitgezette bloedvaten rondom de slokdarm. Deze abnormale en uitgezette bloedvaten worden slokdarmvarices genoemd. Het is mogelijk dat er een bloeding ontstaat uit deze varices, die aanleiding kan geven tot bloedbraken. Een kleine groep van patiënten krijgt ernstige leverproblemen, namelijk levercirrose.

In het geval van levercirrose is het leverweefsel zo erg beschadigd dat het niet meer kan herstellen door regeneratie. De levercellen gaan ontsteken en sterven vervolgens af. De afgestorven cellen worden vervangen door littekenweefsel. In een verder gevorderd stadium kan de lever zodanig beschadigd zijn dat een levertransplantatie de enige mogelijkheid is om te kunnen overleven [6] [19] [20].

2.6. Levercirrose

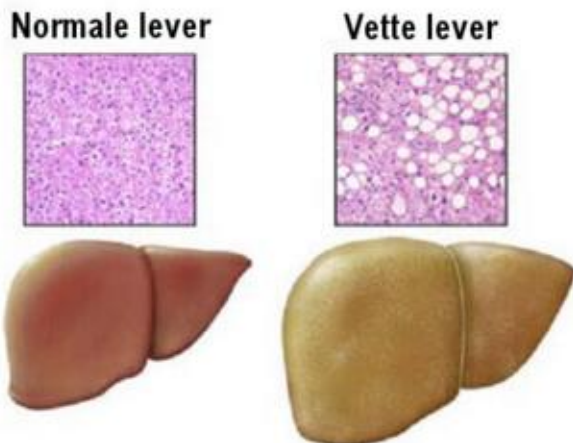
Bij levercirrose treedt er verlittekening van het leverweefsel op zoals zichtbaar is op figuur 7. Levercellen worden vervangen door littekenweefsel (bindweefsel). De lever is zo steeds minder in staat om zijn functies uit te oefenen. Om dit functieverlies zoveel mogelijk op te vangen gaan gezonde levercellen zich delen. Bij beginnende levercirrose kan de lever dan ook groter worden. In een later stadium wordt de lever juist weer kleiner. Levercirrose is een onomkeerbaar proces dat zich steeds verder kan uitbreiden. Er kunnen hierbij op termijn ernstige complicaties ontstaan dus is het belangrijk om het proces tijdig stop te zetten [4].



Figuur 7: Levercirrose [58]

Er zijn drie stadia van levercirrose te onderscheiden. Stadium A is het beginstadium, dat in principe nog omkeerbaar is. De littekenvorming wordt hierbij langzaam minder wanneer de achterliggende oorzaak van de leverziekte wordt weggenomen. Stadium B is ernstiger en stadium C is zeer ernstig. Beide stadia zijn in tegenstelling tot stadium A onomkeerbaar. In een vergevorderd stadium (stadium C) is een levertransplantatie de enige mogelijke behandeling die een kans op genezing biedt [19].

2.6.1. Andere aandoeningen van de lever



Figuur 8: Leververvetting [59]

Een andere aandoening van de lever die uiteindelijk kan leiden tot primaire biliare cirrose is leververvetting. Leververvetting treedt op wanneer de vetstofwisseling verstoord raakt. Dit is een omkeerbaar proces, dit betekent dat de vetopstapeling verdwijnt wanneer de onderliggende oorzaak ervan wordt weggenomen. Bij een langdurige leververvetting is er een kans op hepatitis waarbij de lever zal ontsteken. Deze leverontsteking kan op de duur overgaan naar levercirrose. De oorzaak van leververvetting is doorgaans een verandering in voeding- en leefgewoontes [21]. Op figuur 8 is het uitwendige verschil van de lever zichtbaar tussen een gezonde lever en een vette lever alsook het verschil in morfologie.

Hepatitis of een leverontsteking kan op verschillende manieren veroorzaakt worden en kan leiden tot primaire biliare cirrose. De meest voorkomende oorzaken zijn weergegeven in tabel 1, namelijk een besmetting met een virus (hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D en hepatitis E), ernstige bacteriële infectie, amoebische infectie, vergiftiging door overdosis geneesmiddel of abnormale reactie van de lever en een vergiftiging door stoffen als alcohol [22].

| | Besmetting via | vaccin | genezing |
|--------------|--|--------------|--------------------------|
| Hepatitis A | besmet voedsel-glazen, gebrekkige hygiëne | ja | geneest meestal volledig |
| Hepatitis B | bloed! -wondjes- drugs!, = SOA! (zeer besmettelijk) | ja + condoom | kan chronisch worden |
| hHepatitis C | bloed! - wondjes - drugs, geen SOA (tenzij bloed) | nee | kan chronisch worden |

Tabel 1: Overzicht besmetting, vaccin en genezing bij verschillende soorten hepatitis [22]

Wanneer primaire biliare cirrose niet tijdig behandeld wordt kan de aandoening leiden tot leverkanker [23].

2.7. Primaire Biliare cirrose

2.7.1. Beschrijving van de ziekte

Bij de aandoening Primaire Biliare Cirrose (PBC) is er een chronische ontsteking aanwezig in de kleine galkanaaltjes in de lever. De galkanaaltjes gaan door deze ontsteking steeds verder vernauwen. De galvloeistof kan hierdoor niet worden afgevoerd. Door de ophoping van de galvloeistof zullen de levercellen ontsteken en beschadigen. Uiteindelijk zullen de levercellen onherstelbaar beschadigd raken en wordt er littekenweefsel gevormd. Enkel in een ver gevorderd stadium kan er sprake zijn van levercirrose. De ziekte komt voornamelijk voor bij vrouwen van middelbare leeftijd (35 jaar – 55 jaar) [24].

- ❖ Primair: De oorzaak van de ziekte is onbekend. Bij een gekende oorzaak, vb. alcohol of andere gifstoffen, spreekt men van ‘secundair’.
- ❖ Biliair: Het tast de galwegen aan, bilium is de gal.
- ❖ Cirrose: De ziekte vordert en kan de levercellen beschadigen en kan zo littekens veroorzaken op de lever. Cirrose betekent het verlittekenen van de lever en kan verschillende oorzaken hebben [8].

2.7.2. Oorzaak van de ziekte

De precieze oorzaak van de aandoening is voorlopig onbekend. Er wordt verondersteld dat primaire biliare cirrose een auto-immuunaandoening is. Het afweersysteem beschermt het lichaam tegen invloeden van buitenaf. Er worden antistoffen aangemaakt tegen vreemde indringers in het lichaam. Met behulp van deze antistoffen kunnen bacteriën en virussen onschadelijk gemaakt worden. Bij een auto-immuunaandoening is het afweersysteem overactief. In dit geval maakt het lichaam antistoffen aan tegen vreemde indringers maar ook tegen bepaalde gezonde cellen van het eigen lichaam. Bij primaire biliare cirrose worden er antistoffen aangemaakt tegen het weefsel van de galkanaaltjes in de lever. Het gevolg hiervan is dat de galkanaaltjes ontsteken. Mogelijk kan een infectie met een virus of bacterie een prikkel zijn die het afweersysteem activeert. Een andere mogelijke trigger voor het afweersysteem zouden gifstoffen kunnen zijn.

PBC komt regelmatig voor samen met het syndroom van Sjögren. Dit is een aandoening waarbij droge ogen en een droge mond kenmerkend zijn. Als gevolg van een auto-immunreactie ontstaan chronische ontstekingen van de traan- en speekselklieren. PBC kan ook voorkomen in combinatie met sclerodermie. Sclerodermie is een huidaandoening waarbij verharding van de huid optreedt. Tot slot komt PBC ook regelmatig samen voor met Reumatoïde artritis (reuma), een chronische ontsteking van de gewrichten [24].

2.7.3. Klachten en symptomen van de aandoening

De symptomen van de ziekte zijn wisselend bij elke patiënt. De ziekte kan zeer traag verlopen. Daarbovenop heeft de lever een grote reservecapaciteit. Hierdoor kan het lang duren vooraleer de eerste klachten optreden. Meestal heeft PBC een mild verloop en gaan er jaren overheen voordat de klachten toenemen.

Vaak zijn de eerste klachten die ontstaan het gevolg van galstuwning. Hierdoor is er een verhoogd gehalte aan bilirubine waarneembaar in het bloed. Bilirubine moet het lichaam met de ontlasting en de urine verlaten. Bij galstuwning gebeurt dat niet.

Volgende reeks van klachten kunnen ontstaan:

- ❖ Moeheid
- ❖ Jeuk: door de verminderde afvoer van galvloeistof en ophoping in de bloedbaan
- ❖ Geelzucht: door de ophoping van bilirubine in het bloed
- ❖ Vetdiarree: door een tekort aan galvloeistof in de dunne darm. Galvloeistof is nodig voor een goede vetvertering. Bij een tekort ontstaat een plakkerige, vette ontlasting.
- ❖ Verhoogde cholesterol: door de verminderde galafvoer is het gehalte aan vet en cholesterol in het bloed verhoogd, waardoor vetbobbeltjes ontstaan op de huid en rond de oogleden.
- ❖ Ontkleurde ontlasting: tekort aan bilirubine in de darm
- ❖ Rode of roze gloed van de handen kan ontwikkelen
- ❖ Misselijkheid

Hoe meer de lever beschadigd raakt, hoe meer klachten er kunnen ontstaan die typerend zijn voor levercirrose. In vele gevallen is de lever en de milt sterk vergroot. Het is mogelijk dat er vochtophopingen in de buik ontstaan. Er kunnen bloedingen ontstaan als gevolg van spataderen in de slokdarm en maag. Wanneer de lever zijn functie niet meer kan uitoefenen dan kunnen er giftige stoffen zich ophopen in het lichaam. Hierdoor kunnen ook de hersenen worden aangetast [24].

2.7.4. Diagnose

Er kunnen een aantal onderzoeken worden uitgevoerd om de diagnose te stellen.

2.7.4.1. Bloedonderzoek naar de leverfuncties

Dit onderzoek geeft aanwijzingen in de richting van een leveraandoening. Bij PBC worden verschillende leverenzymen in te hoge waarden aangetroffen in het bloed. Vele patiënten met PBC hebben ook verhoogde cholesterolwaarden. Dit is meestal de goede, HDL, cholesterol. Er is vastgesteld dat PBC de cholesterol productie van de lever verbetert zodanig dat de HDL/LDL ratio's geen verhoogd risico meer vormen voor het optreden van hart- en vaatziekten. PBC is in staat om triglyceriden en LDL cholesterol te verlagen terwijl het niveau van de goede HDL cholesterol gehandhaafd blijft [24] [25].

2.7.4.2. Bloedonderzoek naar antilichamen

Met behulp van deze bloedtest wordt gekeken naar de aanwezigheid van een bepaald type antilichaam, namelijk de antilichamen tegen mitochondriën. Deze antilichamen komen voor bij ongeveer 95% van de patiënten met PBC en reageren met de binnenbekleding van de mitochondriën. Mitochondriën zijn de energieleveranciers die aanwezig zijn in al de cellen, dus ook in de cellen van de lever en de galwegen. De mitochondriën maken gebruik van zuurstof uit het bloed als brandstof om energie te genereren. Er is vastgesteld dat bij patiënten met PBC de antilichamen tegen de mitochondriën binden aan de antigenen van het pyruvaat dehydrogenase complex. Het pyruvaat dehydrogenase complex is opgenomen in multi-enzym complexen die zich aan de binnenkant van de mitochondriën bevinden [24] [26].

2.7.4.3. Beeldvormend onderzoek

Door gebruik te maken van beeldvormend onderzoek kan er in de meeste gevallen worden vastgesteld of het gaat over levercirrose. In dit geval kan de arts een echo, een Computer Tomografie (CT-scan) of een *Magnetic Resonance Imaging scan* (MRI-scan) laten maken.

Bij het maken van een CT-scan wordt er gel op de huid van de buik aangebracht en een meetapparaatje wordt over de huid bewogen. Met behulp van geluidsgolven worden dan de galwegen zichtbaar gemaakt. Bij een MRI-scan worden er met behulp van een grote, sterke magneet en radiogolven bepaalde signalen in het lichaam opgewekt. Deze signalen worden door een antenne weer opgevangen. Een computer verwerkt de signalen tot een afbeelding die op een beeldscherm kan worden weergegeven. Met deze techniek kunnen gemakkelijk doorsneden van het lichaam of van bepaalde organen gemaakt worden alsof er plakjes van zijn gesneden [24] [27].

2.7.4.4. Leverbiopsie

De diagnose kan met zekerheid gesteld worden door het uitvoeren van een leverbiopsie. Bij dit onderzoek zal de arts een holle naald in de lever brengen via de buikwand. Op die manier wordt er een klein stukje weefsel genomen van de lever, een biopt. Vervolgens zal het biopt verder onderzocht worden in een labo pathologische anatomie. Ook de ernst van de leverschade kan hiermee goed worden vastgesteld [24].

2.7.5. Behandeling

Tot nu toe is er nog geen behandeling die primaire biliare cirrose kan genezen. Het medicijn ursodeoxycholzuur speelt een belangrijke rol bij de behandeling van Primaire Biliaire Cirrose. Ursodeoxycholzuur beïnvloedt de samenstelling van de gal en heeft een beschermend effect op de levercellen. Het zuur zorgt ervoor dat de cholesterol beter oplost in de gal. Het werkingsmechanisme van ursodeoxycholzuur bij PBC berust op een direct beschermend effect tegen de toxiciteit van hydrofobe endogene galzouten, een veranderde enterohepatische circulatie van endogene galzouten, een verhoogde galsecretie en op immunomodulatie. Het medicijn zorgt voor een gedeeltelijke verbetering van de leverfuncties, het kan klachten verminderen en het lijkt het ziekteproces te vertragen.

Indien een PBC patiënt hevige jeuk vertoont, kan de arts antihistaminica voorschrijven die de klachten kunnen verminderen. Cholestyramine is het meest gebruikte medicijn bij jeuk. De werking is gebaseerd op een binding tussen het medicijn en de gal in de darm. Wanneer gal in de darm terecht komt, zal de gal getransporteerd worden naar de dikke darm waar een deel ervan terug geabsorbeerd wordt in de bloedbaan en vervolgens terug naar de lever gevoerd wordt waar het hergebruikt kan worden. Wanneer cholestyramine bindt aan de gal in de dikke darm stopt deze heropname en op die manier wordt de gal dan afgescheiden via de faeces. Op die manier zal de gal die opgehoopt zit in de lever en bloedbaan verminderen. De patiënt zal bijgevolg minder jeuk hebben. Een levertransplantatie is op lange termijn noodzakelijk in ernstige gevallen. Dit is echter een ingrijpende operatie en de kans op complicaties is reëel [24] [8] [28] [29] [30].

2.8. Genen betrokken bij primaire biliaire cirrose

Uit onderzoek is gebleken dat er drie genen belangrijk zijn bij primaire biliaire cirrose, namelijk tyrosine kinase binding protein (TYROBP), chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) en cathepsin L (CTSL). TYROBP en CCL5 worden down gereguleerd en CTSL wordt up gereguleerd bij patiënten met primaire biliaire cirrose [30].

Het tyrosine kinase binding protein codeert voor een transmembraan signalisatie polypeptide dat een immunoreceptor tyrosine- gebaseerd activatie motief in het cytoplasmatische domein bevat. Het gecodeerde eiwit kan associëren met de killer-cel remmende receptor familie van membraan glycoproteïnen. Het kan fungeren als een activerend signaaltransductie element. Dit eiwit kan geassocieerde eiwitkinase en de milt tyrosinekinase binden, speelt een rol bij de signaaltransductie, botmodellering, hersenen myelinisatie en bij ontsteking [31].

Chemokine (C-C motif) ligand 5 is één van de verscheidene chemokine genen geclusterd op de Q-arm van chromosoom 17. Chemokinen vormen een superfamilie van eiwitten die betrokken zijn bij immunoregulerende en ontstekingsprocessen. Dit chemokine fungeert als een chemoattractant voor bloedmonocyten, geheugen T-helpercellen en eosinofielen [32].

Het proteïne gecodeerd door het cathepsin L gen is een lysosomaal cysteine protease dat een belangrijke rol speelt in de intracellulaire eiwitafbraak. Het gecodeerde eiwit is betrokken bij een aantal pathologische processen [33].

Primaire biliaire cirrose is een ontstekingsziekte van de lever vandaar dat de genen TYROBP en CCL5 betrokken zijn bij de aandoening. Een van de functies van de lever is het afbreken van eiwitten hierdoor speelt het gen CTSL een rol bij primaire biliaire cirrose.

Uit resultaten is gebleken dat 65 genen verschillend tot expressie komen bij patiënten met primaire biliaire cirrose in vergelijking met een controlegroep van gezonde mensen. 20 van deze genen worden up gereguleerd en 45 genen worden down gereguleerd [34].

2.9. Theoretische achtergrond van de gebruikte technieken

2.9.1. Vriescoupes

Een weefselbiopt krijgt de vereiste stevigheid om het te kunnen snijden door het te bevriezen en bij zeer lage temperaturen te snijden. De coupes worden op 5 – 10 µm dikte gesneden. Hierna zal de fixatie en de kleuring plaatsvinden. Er wordt bij vriescoupes gewerkt met vers weefsel.

Een vriescoupe kan gemaakt worden tijdens een operatie om snel een diagnose te kunnen stellen. Dit kan voorkomen als er voorafgaand aan de operatie onzekerheid is of een afwijking kwaadaardig is. Een andere mogelijkheid is dat de chirurg tijdens de operatie iets onverwachts tegenkomt. In deze gevallen wordt er een biopt genomen en bewerkt in een labo pathologie. Het afgezonderde weefsel wordt eerst bevroren tot -140°C in vloeibare stikstof. Vervolgens worden er coupes gesneden en hierna wordt de coupe gekleurd. De patholoog kan op die manier meteen de primaire diagnose stellen [40] [41].

2.9.2. H&E-kleuring

De hematoxyline-eosinekleuring of H&E-kleuring is de meest gebruikte kleuringstechniek in de medische diagnostiek. De kleuring gebeurt met de basische kleurstof hematoxyline. De werkwijze van de kleuring omvat het aanbrengen van hemalum, een complex gevormd uit aluminiumionen en hematine. Hematine is het oxidatieproduct van hematoxyline en het werkzame bestanddeel in de kleuroplossing. Het kleurstof-metaalcomplex zal binden met de nucleïnezuren van de basofiele structuren. Nucleïnezuren zijn aanwezig in de ribosomen, de chromatinerijke celkern en de RNA-rijke cytoplasmatische gebieden. Het resultaat van deze kleuring is dat de kernen van cellen en enkele andere structuren zoals keratohyaline korrels en verkalkt materiaal blauw kleuren. De verklaring hiervoor is dat het DNA en RNA aanwezig zijn in de celkern en RNA in ribosomen in het ruw endoplasmatisch reticulum. DNA en RNA zijn zuur omdat deze een fosfaatruuggengraat hebben van negatief geladen nucleïnezuren. De basische kleurstoffen bevatten positieve ladingen waardoor dat de kleurstof zal binden aan het DNA en RNA. Hematoxyline is niet geclassificeerd als een kleurstof omdat het molecuule geen chromofoor bevat.

De nucleaire kleuring wordt gevolgd door een tegenkleuring met een waterige of alcoholische oplossing van eosine. Deze kleurstof zal de eosinofiele structuren ophelderen in verschillende tinten van rood, roze en oranje. De eosinofiele structuren zijn doorgaans samengesteld uit intracellulaire of extracellulaire proteïnen. De meeste proteïnen in het cytoplasma zijn positief geladen door de arginine en lysine aminozuurresiduen. Eosine is een zure kleurstof en bevat negatieve ladingen. Hierdoor bindt eosine aan de aminozuren. Het grootste gedeelte van het cytoplasma is eosinofiel. Eosinofiel is een term die door histopathologen gebruikt wordt en die het microscopisch beeld van cellen en weefsels beschrijft die gekleurd zijn met de zure kleurstof eosine. Ook de intracellulaire membranen en extracellulaire vezels worden aangekleurd met eosine [35] [36].

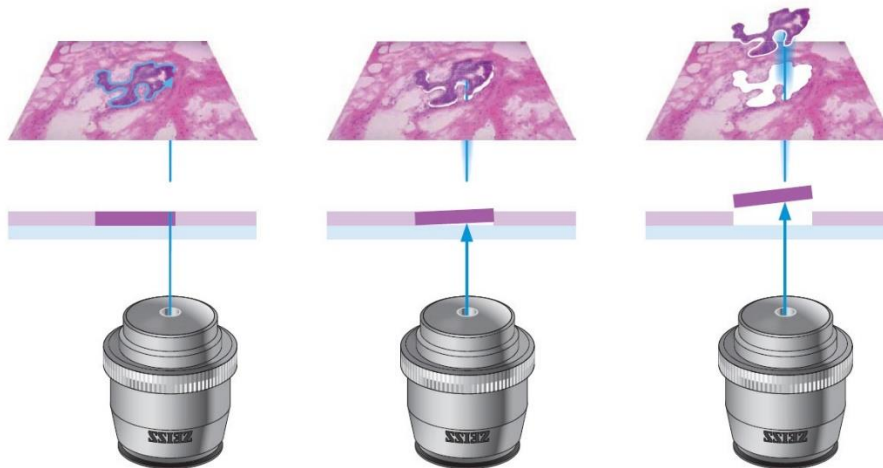
2.9.3. Immunohistochemische kleuring

Immunohistochemie is een methode waarbij specifieke cel- of weefselantigenen zichtbaar worden gemaakt, met behulp van immunochemische reacties van hoge affiniteit en specificiteit, door de aanwezigheid van contrastrijke labels. Een voordeel van deze methode is dat morfologische details behouden blijven bij de visualisering van deze antigenen. Het principe van deze kleuring is dat specifieke antilichamen vervaardigd worden die gericht zijn tegen cel of weefsel gebonden antigenen of weefsel/cel eiwitten. Er is een hoge affiniteitsbinding tussen antilichaam en antigen aanwezig. De antigenen kunnen zichtbaar gemaakt worden onder een microscoop door middel van een fluorescerende kleurstof, een enzym of colloïdaal goud. Met behulp van secundaire antilichamen en daaraan gekoppelde kleursystemen kan een binding van het primaire antilichaam met het antigen in de coupe worden aangetoond [37] [38] [39].

De microscopische slides van de muismodellen met primaire biliaire cirrose worden aangekleurd met de keratine kleuring. De keratine kleuring doet de epitheliale componenten ophelderen. Het antilichaam dat voor deze kleuring gebruikt wordt is het polyclonal rabbit anti-cytokeratin.

2.9.4. Lasermicrodissectie

Een lasermicrodissectie systeem wordt gebruikt voor het zuiver isoleren van specifieke structuren van weefsels, cellen of organismen. Het gemicrodissecteerde materiaal wordt vervolgens gebruikt voor DNA, RNA of proteïnen expressie analyses. Deze analyses kaderen in diverse studies naar de moleculaire karakteristieken of verschillen van specifieke celtypes in fysiologische versus pathologische condities of doorheen progressie van een biologisch proces of een pathologie. Er wordt gewerkt met weefselbiopten van patiënten en preklinische modellen.



Figuur 9: Principe lasermicrodissectie [42]

Er wordt een laser gekoppeld in een omkeermicroscoop, deze focuseert op het weefsel op de FrameSlide. Een FrameSlide is een soort van preparaat dat bestaat uit een metalen houdertje met daartussen een membraan. Het membraan is erg dun, transparant en hittegevoelig. Het gebied van interesse wordt met behulp van een cursor aangeduid op een computerscherm door middel van een software door de laborant. Vervolgens zal de laser dit gebied microdissecteren door het weefsel te beschieten en door de beweging te maken die vooraf werd aangeduid door de laborant zoals zichtbaar is op figuur 9. Het gewenste stukje weefsel of de clusters van cellen komen vervolgens terecht in het dekseltje van de geselecteerde microtube. Na het microdissectieproces volgt doorgaans een extractieprocedure.

Er wordt meestal gebruik gemaakt van een laser met ultraviolet licht bij 355 nanometer voor het microdissecteren van stukjes weefsel of clusters van cellen. Deze golflengte veroorzaakt geen of slechts minimale schade aan het DNA en RNA. Ook kan er gebruikt gemaakt worden van een laser met ultraviolet licht in combinatie met infraroodlicht. De infraroodlaser is verantwoordelijk voor het verwarmen of smelten van een kleverig polymeer voor cellulaire hechting en isolatie. De infraroodlaser biedt een zachtere aanpak bij gevoelige weefsels voor de lasermicrodissectie.

Het is belangrijk om de vriescoupe aan te brengen op het membraan van een FrameSlide. De laser beschiet het membraan waardoor het stukje weefsel of de clusters van cellen in het dekseltje van een microtube terecht komt. Vooraleer de lasermicrodissectie kan plaatsvinden moet de coupe gekleurd worden met behulp van Cresyl violet. Deze korte kleuring procedure kleurt de kernen violet en het cytoplasma zwak violet. De Cresyl violet wordt gemaakt door kristalviolet op te lossen in DEPC (diethylpyrocarbonate) water. Het DEPC water inactieveert RNase enzymen. Er wordt gewerkt met een alcoholreeks van ethanol in combinatie met kristalviolet voor het kleuren van de coupes. De coupes worden met behulp van verschillende, dalende concentraties van ethanol ontvet. Vervolgens worden de coupes in de kristalviolet gedompeld om te kleuren. De kristalviolet is positief geladen en bindt met

zure, negatief geladen delen van cellen zoals de ribosomen, de celkernen en de nucleoli. Tot slot worden de coupes gerehydrateerd door de coupes opnieuw in een toenemende reeks van ethanolconcentraties te brengen. Het weefsel is nu zichtbaar voor het microdissecteren [43] [44] [45].

Er is onderzocht en vastgesteld dat er gedurende 10 minuten gemicrodissecteerd mag worden per coupe leverweefsel om DNA of RNA van goede kwaliteit te verkrijgen (zie protocol lasermicrodissectie). Wanneer er langer gemicrodissecteerd wordt zal het weefsel verbranden en beschadigen. Er zal bijgevolg RNA verkregen worden van zeer slechte kwaliteit waarmee er niet kan worden verder gewerkt. Er zijn ongeveer 1 miljoen cellen per microtube nodig voor de RNA-extractie. De software telt het aantal cellen dat in elke microtube aanwezig is. Op die manier weet de laborant wanneer er genoeg cellen verzameld zijn en wanneer de RNA-extractie kan plaatsvinden.

2.9.5. RNA-extractie

Het is de bedoeling om met behulp van de RNA extractie zo zuiver mogelijk RNA te isoleren met een hoge zuiverheid zonder contaminanten en eiwitten. Het RNA moet geschikt zijn voor verder onderzoek, namelijk real-time PCR. Er zijn verschillende stappen te onderscheiden in de RNA-extractie.

De eerste stap is de staalname en staalvoorbereiding. De manier waarop deze stap gebeurt, is afhankelijk van het type staal. Het doel is om het staal te verkleinen, te homogeniseren en de cellen vrij te maken zodat het staal klaar is voor de volgende stap. De staalname zal gebeuren met behulp van de lasermicrodissectie. Er worden specifieke structuren, clusters van cellen, geïsoleerd uit een weefsel.

De volgende stap is de cellysis. In deze stap wordt het celmembraan afgebroken alsook het kernmembraan. Op die manier komt de gehele celinhoud vrij. De cellysis kan chemisch, door toevoegen van een base, enzymatisch of mechanisch door hitte of soniceren gebeuren. Het is belangrijk om een goede lysisbuffer te gebruiken. Het is belangrijk dat de lysisbuffer de DNA-structuur behoudt doorheen de procedure. De lysisbuffer moet de isolatie van het RNA bevorderen door de verwijdering van DNA en eiwitten te vergemakkelijken. Ook moeten degraderende enzymen geïnhibeerd worden met behulp van de buffer.

De derde stap van de RNA-extractie is het verwijderen van contaminanten. De belangrijkste contaminanten zijn de resten van het celmembraan, eiwitten en DNA. Eiwitten kunnen verwijderd worden met behulp van enzymen zoals proteïnase K. Het is ook mogelijk om de eiwitten af te scheiden met behulp van een dichtheidscentrifugatie. De eiwitten kunnen ook worden uitgezouten. Het DNA kan verwijderd worden met behulp van DNases.

In een volgende stap wordt het RNA geconcentreerd. Het RNA wordt hiervoor opgelost in een kleiner volume. De precipitatie gebeurt met een alcohol in aanwezigheid van zout. Het zout schermt de ladingen van het RNA af en door de lagere polariteit van ethanol slaat het RNA neer.

Vervolgens wordt de concentratie en de zuiverheid van het RNA bepaald met behulp van UV-spectrometrie. Voor zuiver RNA moet de verhouding A260/A280, die een indicatie geeft over de zuiverheid, rond de 2 liggen.

Tot slot wordt het geïsoleerde RNA opgeslaan onder conserverende omstandigheden. Voor korte termijn wordt het RNA in de koelkast bewaard. Voor lange termijn bewaring wordt het RNA diepgevroren bij -70°C [46].

2.9.6. Real-time PCR

De genexpressiestudie wordt uitgevoerd met behulp van kwantitatieve real-time *polymerase chain reaction* (PCR). Het grote verschil met een gewone PCR is dat bij de real-time PCR na iedere cyclus de hoeveelheid gevormde PCR producten bepaald kan worden. Er is een opvolging mogelijk van de amplificatie in real time. Real-time PCR maakt een accurate kwantificering mogelijk van het startmateriaal met behulp van standaarden en ijklijnen.

Om de amplificatie te kwantificeren wordt er gebruikt gemaakt van fluorescentie. De fluorescentie komt vrij tijdens de amplificatie van de PCR. In het PCR toestel zit een spectrometer geïntegreerd die deze fluorescentie meet in real time dus tijdens de volledige PCR of na elke PCR cyclus. Dit betekent dat hoe meer startmateriaal er aanwezig is, hoe meer amplificatie er is en hoe meer fluorescentie er gemeten wordt.

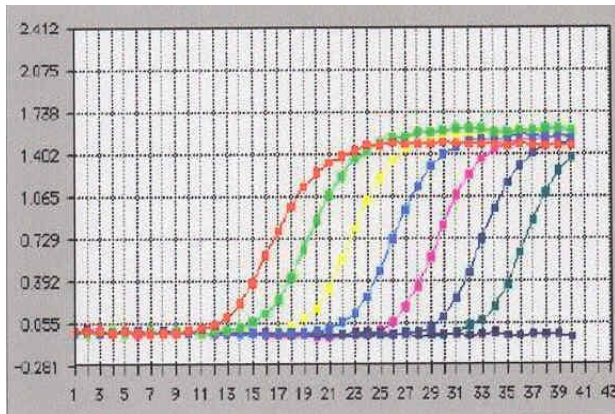
Om de PCR te kunnen volgen kan er gebruik gemaakt worden van fluorescent gemerkte hybridiserende probes. Er zijn hierbij drie mogelijkheden, namelijk Molecular Beacon probes, TaqMan probes en FRET probes. Anderzijds kan er ook gebruik gemaakt worden van DNA bindende kleurstoffen zoals SYBR green.

De Molecular Beacon probe bevat een lus die complementair is met de sequentie die men wil amplificeren in de PCR reactie en een stamhybride. In ongebonden toestand bevindt de fluorofoor zich dichtbij de quencher, waarbij de quencher de fluorescentie kan opvangen. Wanneer de probe bindt aan het PCR product, dan bindt de lus met de matrijs. Hierdoor worden fluorofoor en quencher gescheiden waardoor dat de fluorescentie niet meer gedoofd wordt. De probe bindt best in het midden. De fluorescentie wordt gemeten aan het einde van de annealing stap omdat dan de primers en probes gebonden zijn.

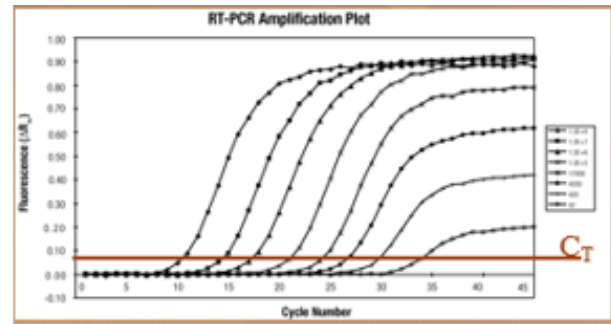
Een andere probe is de TaqMan probe. Deze probe lijkt qua structuur op een primer. De TaqMan probe is een enkelstrengig stukje DNA. Het is belangrijk dat het 3'-uiteinde beschermd wordt om te voorkomen dat de probe beschouwd wordt als een primer. Er treedt fluorescentie op bij de TaqMan probe wanneer het Taq polymerase de reporter en quencher knipt. De fluorescentie wordt gemeten wanneer de Taq polymerase de reporter wegduwt in de elongatiefase. Er is een toename in fluorescentie vermits er steeds meer probes stuk worden geknipt.

Tot slot zijn er ook FRET (Fluorescentie Resonantie Energie Transfer) probes. Hierbij is er een fluoresceïne gelabelde donorprobe en een LC-Red gelabelde acceptorprobe. Wanneer beide gehecht zijn, is er een energieoverdracht van donor naar acceptor en komt er fluorescentie vrij. De emissiegolflengte van fluoresceïne is de excitatiegolflengte van LC-Red. LC-Red zal fluorescentie uitzenden die gemeten kan worden. Fluoresceïne kan geen fluorescentie uitzenden.

Het is ook mogelijk om in de plaats van probes gebruik te maken van DNA bindende kleurstoffen om de fluorescentie te meten. Het nadeel van deze kleurstoffen is dat ze niet specifiek zijn zoals de probes. Het voordeel is dat ze goedkoop zijn.



Figuur 10: Amplificatieplot [47]



Figuur 11: Ct-waarde [47]

In figuur 10 wordt een amplificatieplot weergegeven. Dit is de output van de real-time PCR. Er is duidelijk zichtbaar dat het fluorescentiesignaal groeit gedurende het proces. Hoe meer amplificatie er is, hoe meer fluorescentie er wordt uitgezonden. Elke kleur geeft de amplificatie van één staal weer. Op het einde is er in elk staal evenveel RNA aanwezig. Op de X-as van de grafiek worden het aantal cycli weergegeven en op de Y-as de fluorescentie meting.

De Cyclus treshold (Ct-waarde) is de grens die bepaald wordt tijdens de exponentiële fase van de amplificatie. Het is het niveau van detectie of het punt wanneer de reactie een fluorescentiewaarde bereikt vanaf waar er optimaal gemeten kan worden. De Ct-waarde is aangeduid in figuur 11.

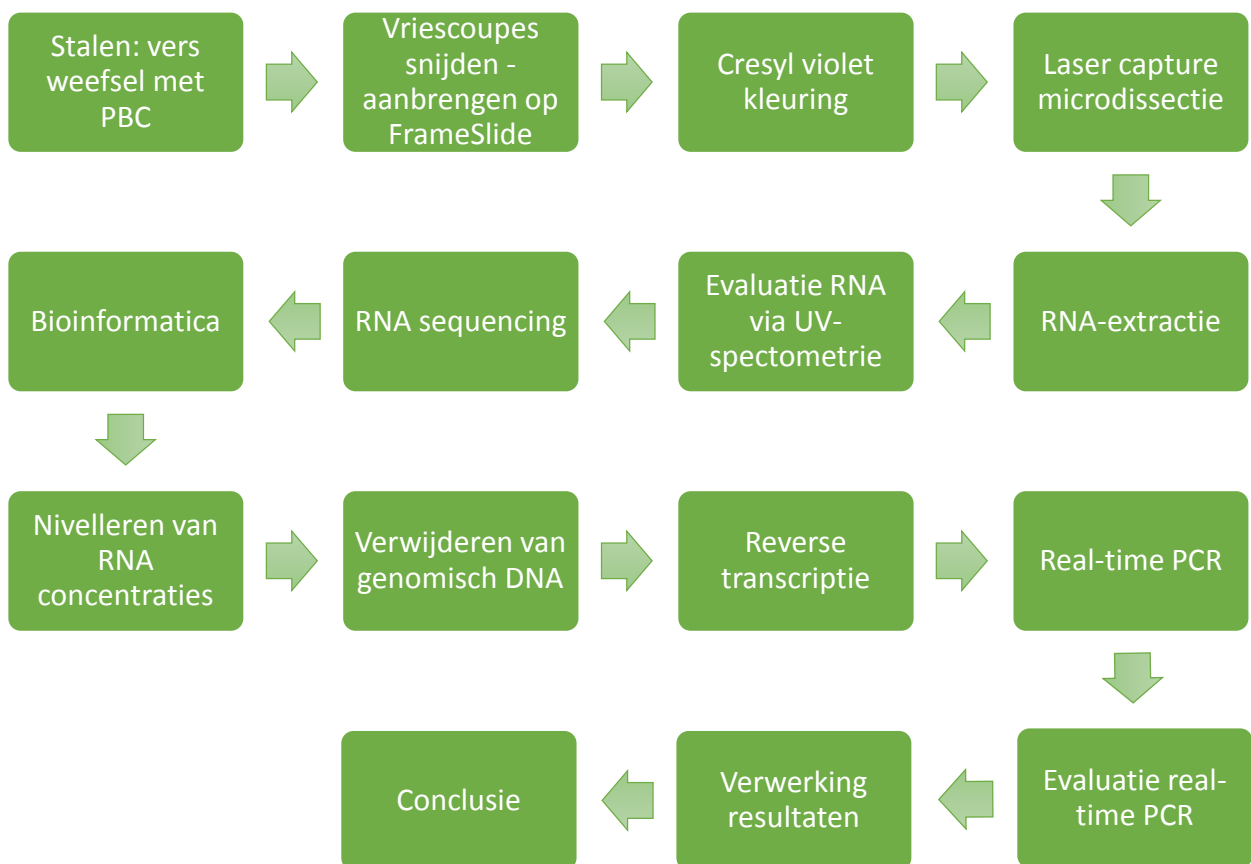
De componenten die aanwezig zijn in de mastermix voor de real-time PCR zijn probes of een DNA bindende kleurstof om de fluorescentie te meten. Ook zijn er forward en reverse primers nodig om te bepalen welk gebied geamplificeerd wordt. Tot slot wordt er ook RNase vrij water en cDNA aan toegevoegd.

Het cDNA wordt bekomen door reverse transcriptie van mRNA. Deze gebeurt met behulp van het enzym reverse transcriptase. Het is belangrijk om het genomisch DNA te verwijderen vooraleer de reverse transcriptie wordt uitgevoerd om zo een overschatting van het resultaat van de real-time PCR te voorkomen [47].

3. Materialen en methoden

3.1. Flowschema

De gebruikte aanpak voor het uitvoeren van dit onderzoek wordt weergegeven in onderstaand flowschema. Er wordt gestart met een biopsie van een muizenstaal met primaire biliëre cirrose en een controlestaal van een gezond muismodel. Van dit biopsie worden er met behulp van de vriesmicrotoom coupes gesneden. Deze coupes worden aangebracht op een frameslide en worden vervolgens gekleurd door middel van de cresyl violet kleuring om zo het weefsel zichtbaar te maken voor lasermicrodissectie. Na het isoleren van de gewenste structuren uit de coupe door lasermicrodissectie volgt de RNA-extractie. Vervolgens wordt de zuiverheid en de concentratie van dit RNA bepaald om na te gaan of het RNA geschikt is om mee verder te werken. Vervolgens wordt het RNA gesequenced om de volgorde van nucleotiden te bepalen en om zo na te gaan welke genen onderzocht gaan worden met behulp van de real-time PCR. Het is hierbij belangrijk dat de genen bij de muismodellen overeenkomen met de humane genen. Om dit te onderzoeken wordt er gebruik gemaakt van bioinformatica. De RNA concentraties worden genivelleerd, het genomisch DNA wordt verwijderd en er wordt een reverse transcriptie uitgevoerd. Tot slot volgt de real-time PCR.



3.2. Weefsel invriezen

3.2.1. Materiaal

3.2.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur



/

3.2.1.2. Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

| Hardware | Doel |
|---------------------|---|
| Glazen buis met dop | Vloeistofcontainer voor 2-methyl butaan |
| Kurkje | Weefsel op aanbrenen |
| Pipet | Weefsel vastnemen |

Tabel 2: Overzicht gebruikte glaswerk en disposables bij het maken van vriescoupes

3.2.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

| Stofnaam of naam oplossing | V/ VI. | MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.) | Risico's H-zinnen | Veiligheids voorschrift en P-zinnen | Doel | Afvalverwerking |
|----------------------------|--------|---|---|-------------------------------------|---|---------------------------------|
| 2- methyl butaan | VI. | | H224-H304-H336-H411  | P210-P261-P273-P301+P310-P331 | Weefsel bevroren | In afvalvat voor chemisch afval |
| Vloeibare stikstof | Gas | | H280  | P410+P403 | Weefsel bevroren | Bewaren voor volgend gebruik |
| Frozen tissue lijm | VI. | | / | / | Weefsel vastkleven aan kurk en kurk vastkleven aan schijfje | Restafval |

Tabel 3: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen bij het maken van vriescoupes

3.2.2. Methode

1. Isolatie van het weefsel
2. Beschrijf en meet het weefsel
3. Plaats de buis met 2-methylbutaan in de vloeibare stikstof
4. Van zodra er onderaan in de buis witte vlokjes zichtbaar zijn kan het staal worden bevroren bij -160°C in de 2-methylbutaan

De weefsels worden niet rechtstreeks bevroren in de vloeibare stikstof. Vloeibare stikstof leidt tot schade aan het weefsel vermits het weefsel begint te koken in aanwezigheid van vloeibare stikstof. 2-methyl butaan brengt geen wijzigingen aan bij het weefsel.

5. Neem een kurkje en merk het met de juiste gegevens
6. Breng op het kurkje een druppel frozen tissue lijm aan
7. Breng vervolgens een stukje weefsel aan op de lijm
8. Wacht tot de lijm bevroren is

Opmerking: Bij stap 5 kan er ook gewerkt worden met een plastic houdertje. Deze methode wordt gebruikt wanneer er gewerkt wordt met grotere stukjes weefsel. Er wordt lijm aangebracht in het houdertje en vervolgens wordt het weefsel aangebracht. Bij het snijden wordt het plastic kapje verwijderd.

3.3. Vriescoupes snijden

3.3.1. Materiaal

3.3.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur

| Hardware | Merk en type | Doel |
|-----------------------------------|--------------|----------------|
| Vriesmicrotoom / cryostaat | | Coupes snijden |

Tabel 4: Overzicht gebruikte apparatuur voor het snijden van vriescoupes

3.3.1.2. Overzicht gebruikte glaswerk en disposables

| Hardware | Doel |
|-------------------------------|---|
| Schijfje | Kurkje op bevestigen voor het snijden van het weefsel |
| Mes | Snijden van de coupe |
| Anti-plooi glaasje | Zorgen dat de coupe mooi vlak gevormd wordt |
| Borsteltje/ penseeltje | Restjes van coupes weg vegen |

Tabel 5: Overzicht gebruikte glaswerk en disposables voor het snijden van vriescoupes

3.3.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

| Stofnaam of naam oplossing | V/VI. | MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.) | Risico's H-zinnen | Veiligheidsvoorschriften P-zinnen | Doel | Afvalverwerking |
|----------------------------|-------|---|-------------------|-----------------------------------|---|-----------------|
| Frozen tissue lijm | VI. | | / | / | Weefsel vastkleven aan kurk en kurk vastkleven aan schijfje | Restafval |

Tabel 6: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor het snijden van vriescoupes

3.3.2. Methode

1. Leg het krukje met weefsel in de vriesmicrotoom (-20°C)
2. Breng het krukje aan op een metalen schijfje met behulp van een druppel frozen tissue lijm
3. Monteer het schijfje in het houdertje wanneer de lijm bevroren is en klem het schijfje vast
4. Stel de snijdikte van de microtoom in op 20 µm
5. Zet de rem af
6. Trim het weefsel tot een gladde oppervlakte verkregen wordt door aan de hendel te draaien
7. Zet de rem op
8. Maak het snijoppervlak zuiver met behulp van een penseel/ borsteltje
9. Stel de snijdikte van de microtoom in op 5 µm
10. Breng het anti-plooi glaasje aan
11. Zet de rem af
12. Snij een coupe door langzaam aan de hendel te draaien
Doe dit rustig aan zodat de coupe niet zal dichtvouwen, breken.
13. Zet de rem op
14. Plooi het anti-plooi glaasje open
15. Neem een preparaat en druk het op de coupe
Niet bewegen met het preparaat want dan zullen de cellen uitgerokken worden.
16. Veeg met een borsteltje de restjes van de coupe weg
17. Zet de rem af
18. Breng het weefsel terug boven het mes met behulp van de hendel
19. Zet de rem op
20. Breng het anti-plooi glaasje aan
21. Zet de rem af
22. Draai verder aan de hendel om een volgende coupe te snijden
23. Dit proces blijft zich herhalen tot men het gewenste aantal coupes gesneden heeft
24. De coupe kan nu gekleurd worden

Opgelet: wanneer er vriescoupes gesneden worden voor lasermicrodissectie, dan worden deze aangebracht op een FrameSlide.

3.4. Hematoxyline-eosinekleuring

3.4.1. Materiaal




3.4.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur

/

3.4.1.2. Overzicht gebruikte glaswerk en disposables

/

3.4.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

| Stofnaam of naam oplossing | V/VI. | MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.) | Risico's H-zinnen | Veiligheidsvoorschriften P-zinnen | Doel | Afvalverwerking |
|----------------------------|-------|---|---|-----------------------------------|--|------------------------------|
| Fixatievloeistof | VI. | | / | / | Fixatie coupe | Bewaren voor volgend gebruik |
| Haematoxyline | VI. | | H302- H315- H319-H335  | P261- P305+P351+ P338 | Kleuren van celkernen | Verwijderen in afvalvat |
| Cleaning agent | VI. | | / | / | Chemische reactie laten opgaan | Bewaren voor volgend gebruik |
| Eosine | VI. | | / | / | Cytoplasma aankleuren | Verwijderen in afvalvat |
| Alcohol | VI. | 100% | / | / | Dehydratere n | Bewaren voor volgend gebruik |
| Xyleen | VI. | | H226- H312- H315-H332   | P280 | Coupe ophelderen + lijm oplossen bij het aanbrengen van het dekglasje (hechting) | Verwijderen in afvalvat |

Tabel 7: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen bij hematoxyline – eosinekleuring

3.4.2. Methoden

1. Coupe fixeren: 5 seconden
2. Coupe kleuren met haematoxyline: 10 seconden
3. Coupe in Cleaning agent brengen: 2 seconden
Chemische reactie laten opgaan. De paarse kleurstof zal blauw kleuren.
4. Coupe kleuren met eosine: 10 seconden
Eosinofiele structuren in het cytoplasma worden rood / roze gekleurd.
5. 3 x wassen met alcohol (100%)
Dehydrateren
6. 2 x wassen met xyleen
Coupe doen ophelderen en zorgen dat de lijm die op het dekglasje wordt aangebracht kan binden.
7. Lijm aanbrengen op dekglasje
8. Dekglasje aanbrengen op preparaat

3.5. Immunohistochemische kleuring op vriescoupes

3.5.1. Materiaal

3.5.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur

| Hardware | Merk en type | Doel |
|-------------|--------------|----------------------------------|
| Zuurkast | | Kernkleuring + monteren |
| Copling jar | Dako | Drager voor coupes voor kleuring |



Tabel 8: Overzicht gebruikte apparatuur bij immunohistochemische kleuring op vriescoupes

















3.5.1.2. Overzicht gebruikt glaswerk en disposables

| Hardware | Doel |
|--------------------------|---------------------------|
| Incubeerdoos | Incubereren voor kleuring |
| Maatbeker of erlenmeyer | Opvangen van kleurstof |
| Maatcilinder 1l en 50 ml | Afmeten van vloeistoffen |
| Papieren doekjes | Preparaten afdrogen |

Tabel 9: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables bij immunohistochemische kleuring op vriescoupes

3.5.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

| Stofnaam of naam oplossing | V/VI. | MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.) | Risico's H-zinnen | Veiligheidsvoorschriften P-zinnen | Doel | Afvalverwerking |
|---|-------|---|---|---------------------------------------|---|------------------------------|
| Envision FLEX/HRP | | | / | / | Secundair antilichaam → gericht tegen primair antilichaam | Bewaren voor volgend gebruik |
| Envision FLEX peroxidase-blocking reagent | | | H271- H302- H314- H315- H319- H332-H335  | P260- P280- P305+P351+ P338 | Endogene peroxidase blokkeren | Verwijderen in afvalvat |
| Envision FLEX linker | | | / | / | Indien resultaat te zwak → linker → signaal amplificeren | Bewaren voor volgend gebruik |
| Envision FLEX substrate buffer | | | / | / | Chromogeen | Bewaren voor volgend gebruik |
| Envision FLEX DAB + chromogen | | | H350-H341  | P201-P280- P308+P313- P405-P501 | Chromogeen | Bewaren voor volgend gebruik |

| | | | | | | |
|----------------------------------|-----|--------|--|---|----------------------|------------------------------|
| Envision FLEX wash buffer | | 20x | H319-H315  | P280-P264-P305+P351+P338 | Spoelen / wegwassen | Bewaren voor volgend gebruik |
| Aminoethylcarbозол | | 210.27 | H301-H350   | P201-P301+P310-P308+P313 | Chromogeen | Bewaren voor volgend gebruik |
| Real antibody diluent | | | / | / | | Bewaren voor volgend gebruik |
| Primair antilichaam | | | / | / | Binding met antigeen | Bewaren voor volgend gebruik |
| Hematoxyline | | 302.28 | H302-H315-H319-H335  | P261-P305+P351+P338 | Tegenkleuring | Verwijderen in afvalvat |
| Mayer's Haemaluin | | | H302  | P301+P312 | Tegenkleuring | Bewaren voor volgend gebruik |
| Zure alcohol | | | / | / | Tegenkleuring | Verwijderen in afvalvat |
| Xyleen | | 100% | H226-H312-H315-H332   | P280 | Monteren | Verwijderen in afvalvat |
| Ethanol | | 99,8% | H225  | P210 | Monteren | Bewaren voor volgend gebruik |
| Methanol | | 5% | H225-H301-H311-H331-H370    | P210-P260-P280-P301+P310-P311 | Monteren | Bewaren voor volgend gebruik |
| Glycerine gelatine kaiser | | | / | / | Monteren | Bewaren voor volgend gebruik |
| Mounting medium | | | H226-H315-H361d-H336-H373    | P201-P280-P210-P241-P260-P304+P340-P303+P361+P353-P235-P501 | Monteren | Bewaren voor volgend gebruik |
| Aceton | VI. | | H225-H319-H336   | P210-P261-P305+P351+P338 | | Bewaren voor volgend gebruik |

Tabel 10: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen bij immunohistochemische kleuring op vriescoupes

3.5.2. Methode

1. Fixatie van vriescoupes in aceton voor: 10 minuten
2. Na afloop: coupes laten drogen op kamertemperatuur: 5 minuten
3. Wassen in Envision FLEX wash buffer: 2 minuten
4. Incubatie met Envision FLEX Peroxidase-blocking reagent: 5 minuten
De endogene peroxidase blokkeren. Het visualisatiesysteem dat gebruikt wordt is gebaseerd op een peroxidase-reactie. Om deze reden worden eerst de endogene peroxidasen geblokkeerd met peroxidase -blocking reagent om vals positieve resultaten te voorkomen.
5. Wassen in Envision FLEX wash buffer: 2 x 3 minuten
6. Optioneel: Verdunning van het primair antilichaam in Dako Real antibody diluent
→ de juiste verdunning kan voor elk antilichaam opgezocht worden in de antisera lijst
7. Incubatie van het primair antilichaam voor: 30 minuten
Een nieuw primair lichaam wordt eerst op punt gesteld op een positieve controle. Hierbij wordt er nagegaan wat de ideale concentratie is. Sommige primaire antilichamen vereisen een langere incubatietijd dan 30 minuten.
8. Wassen in Envision FLEX Wash buffer: 2 x 3 minuten
9. Incubatie van secundair antilichaam Envision FLEX/HRP: 30 minuten
Het secundair antilichaam bestaat uit een dextraanketen met antilichamen gericht tegen primaire antilichamen gemaakt in konijn en muis en peroxidase enzymen.
10. Wassen in Envision wash buffer: 2 x 3 minuten

Vervolgens kan de kleuring gevisualiseerd worden met een bruine kleur (3,3'-Diaminobenzidine; DAB) of een rode kleur (Aminoethylcarbazol; AEC)

1. DAB

- Incubatie van het chromogeen: Envision FLEX DAB + chromogeen in Envision FLEX substrate buffer (1 druppel/ml): 10 minuten
- Overmatig spoelen met koud kraantjeswater
- Kernkleuring met hematoxyline voor: 5 minuten
- Overmatig spoelen met koud kraantjeswater
- Dip de coupes enkele seconden in zure alcohol
- Dehydrateer de coupes in 4 bakjes ethanol (99,8%) met dalende concentratie gedurende 1 minuut per bakje
- Breng de coupes over in 4 bakjes xyleen (100%) met aflopende concentratie voor 30 seconden per bakje
- Monteer het preparaatglaasje met behulp van Mounting medium

2. AEC

- Incubatie van het chromogeen: Aminoethylcarbazol: 15 minuten
- Overmatig spoelen met gedestilleerd water
- Kernkleuring met Mayer's Haemaluin voor: 5 minuten
- Overmatig spoelen met gedestilleerd water
- Monteer het preparaatglaasje m.b.v. Glycerine Gelatine Kaiser (37°C)

3.6. Cresyl violet kleuring voor lasermicrodissectie

3.6.1. Materiaal

3.6.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur



/

3.6.1.2. Overzicht gebruikte glaswerk en disposables

| Hardware | Doel |
|----------------------------|---|
| Falcontubes (50 ml) | Vloeistofcontainer: alcoholreeks in maken |
| Maatbeker | Vloeistofcontainer |
| Weegschuitje | Afwegen van kristalviolet |
| Penseel | Balans zuiver maken |
| Balans | Afwegen van kristalviolet |
| Spatel | Kristalviolet in weegschuitje doen |
| Tissues | Afdeppen van vloeistof bij kleuring |

Tabel 11: Overzicht gebruikte glaswerk en disposables voor de cresyl violet kleuring

3.6.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

| Stofnaam of naam oplossing | V/VI. | MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.) | Risico's H-zinnen | Veiligheidsvoorschrift en P-zinnen | Doel | Afvalverwerking |
|----------------------------|-------|---|--|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| DEPC water | VI. | | / | / | Inactiveren van RNase enzymen | Gootsteen |
| Kristalviolet | Vast | 1,5% | H351- H302- H318-H410  | P273- P280+P301 +P312 | Kleuren van weefsel | Afvalbak voor chemisch afval |
| Ethanol | VI. | 100% | H225  | P210 | Dehydratatie en rehydratatie | Afvalbak voor chemisch afval |

Tabel 12: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor cresyl violet kleuring

3.6.2. Methoden

1. Maak 2 alcoholreeksen met behulp van ethanol en DEPC water van 100%, 95%, 75% en 50%
BEREKENING:

| Concentratie | Ethanol | DEPC water |
|---------------|---------|------------|
| 100% | 50 ml | 0 ml |
| 95% | 47,5 ml | 2,5 ml |
| 75% | 37,5 ml | 12,5 ml |
| 50% | 25 ml | 25 ml |
| Volume | 50 ml | |

2. Label falcontubes
3. Voeg het grootste volume eerst in de falcontube en daarna pas het kleinere volume
4. Meng goed
5. Maak kristalviolet van 1,5%

BEREKENING

$$1,5\% = 1,5 \text{ g} / 100 \text{ ml} \rightarrow 0,75 \text{ g} / 50 \text{ ml}$$

6. Weeg 0,75 g af van de kristalviolet in een weegschuitje
7. Breng de kristalviolet over in een falcontube
8. Vul de falcontube aan met DEPC water tot 50 ml
9. Goed zwenken om de oplossing te mengen
10. Breng de FrameSlide met erop de aangebrachte coupe in ethanol 100%: 1 minuut
Fixatie van de coupes
11. Breng de FrameSlide met erop de aangebrachte coupe in ethanol 95%: 30 seconden
Ontvetten van coupes
12. Breng de FrameSlide met erop de aangebrachte coupe in ethanol 75%: 30 seconden
Ontvetten van coupes
13. Breng de FrameSlide met erop de aangebrachte coupe in ethanol 50%: 30 seconden
Ontvetten van coupes
14. Breng de FrameSlide met erop de aangebrachte coupe in kristalviolet 1,5%: 1 minuut
Kleuring van coupes
15. Breng de FrameSlide met erop de aangebrachte coupe in ethanol 50%: 30 seconden
Rehydratatie van coupes
16. Breng de FrameSlide met erop de aangebrachte coupe in ethanol 75%: 30 seconden
Rehydratatie van coupes
17. Breng de FrameSlide met erop de aangebrachte coupe in ethanol 95%: 30 seconden
Rehydratatie van coupes
18. Breng de FrameSlide met erop de aangebrachte coupe in ethanol 100%: 1 minuut
Rehydratatie van coupes

3.7. Lasermicrodissectie

3.7.1. Materiaal

3.7.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur

| Hardware | Merk en type | Doel |
|----------------------------|--------------------------------------|---|
| Lasermicrodissectie | Leica LMD6500 Serienummer: 333871 | Nauwkeurige en contaminatie- vrije isolatie van specifieke gebieden binnen een specimen |
| PC met touchscreen | HP | Beeld weergeven |

Tabel 13: Overzicht gebruikte apparatuur voor lasermicrodissectie



- Leica CTR6000 Elektronische box
Controleert LMD systeem en de microscoop.
- Laser
- Leica EL6000
Externe lichtbron voor fluorescentie.
- Leica LMD6500
Omvat het lasermicrodissectie systeem
- SmartMove controle element
Gebruikt om het specimen te bewegen en om hierop te focussen met behulp van de draaiknoppen.

Leica LMD6500

SmartMove controle element

Figuur 29: Lasermicrodissectie toestel met computerscherm [63]

3.7.2. Methode

1. Gebruik toestel

1.1. Opstarten

- Zet de Leica CTR6000 elektronische box aan via de aan/uit schakelaar
→ In de aan-stand zal het lampje groen worden
→ De gemotoriseerde microscoopcomponenten ondergaan vervolgens eerst een initialisatie fase, hierna vertoont het scherm van de microscoop de huidige instellingen
- Zet de PC aan
- Zet de laser aan met behulp van de sleutelschakelaar
→ De sleutel moet in positie 1 gezet worden
- Bij fluorescentie: zet de schakelaar van de Leica EL6000 aan
- Start de microscoop met het objectief met de kleinste vergroting
- Nadat de installatie afgerond is, verschijnen de huidige microscoopinstellingen op het Leica scherm

1.2. Leica scherm

- Op de statuspagina toont het Leica scherm de huidige microscopinstellingen
- De microscop kan via verschillende menu's op het Leica scherm bediend worden
- Het Leica scherm geeft drie verschillende tabbladen weer:
 - Tabblad 1: navigatiepaneel
 - Tabblad 2: menu paneel
 - Tabblad 3: informatie- en controlepaneel
- Het actieve paneel is aangeduid in het zwart

1.2.1. Navigatiepaneel

- Het navigatiepaneel geeft de navigatie items weer:
 - Basic setting of microscope
 - Contrast method
 - Magnification
 - Documentation port
 - Stage and focus settings
 - LeicaScreen configuration

1.2.2. Menupaneel

- Elk navigatie item bevat verschillende menu's die via het menu paneel geselecteerd kunnen worden

1.2.3. Informatie- en controlepaneel

- Dit paneel toont de huidige instellingen en functies die via dit paneel bediend kunnen worden

1.3. Functieknoppen

- De functieknoppen met een vaste functie bevinden zich aan de linkerkant van de microscop
- TL/IL switcht tussen invallend licht (incident light) en uitgezonden licht (transmitted light)
- INT past de lichtintensiteit aan
- AP regelt de diafragma opening
- FD regelt het "field" diafragma

1.4. SmartMove controle element

- Het specimen kan zowel in x- als in y-richting bewegen met de draaiknoppen
- Het beeld kan scherper gesteld worden met de draaiknop
- De hoogte van de draaiknoppen kan aangepast worden m.b.v. schroef
- M.b.v. de drukknoppen kan nauwkeurig of grof worden gemicrometreerd

1.5. Transmitted light-bright field illumination

Soms kan het nodig zijn het condensorpunt van de condensor terug in te stellen:

- Selecteer een objectief met een matige vergroting (10x – 20x)
- Duw op de TL/IL knop
- Als contrastmethode, kies 'bright field' m.b.v. de BF knop
- Plaats het specimen in de specimen houder
- Micrometreer op het specimen
- Regel de lichtintensiteit met de INT knoppen
- Sluit het 'field' diafragma met de FD functieknop totdat de rand van het diafragma verschijnt in het vlak van het specimen
- Gebruik de condensor hoogte- aanpasser om de condensor aan te passen
- Indien het beeld niet in het midden van het veld verschijnt, moet de condensor naar het midden van het veld bewogen worden met behulp van de 2 centrerende bouten
- Open het 'field' diafragma net genoeg zodat het niet zichtbaar is in het veld

2. Gebruik software

2.1. Opstarten van de software

- Start het programma door te klikken op het 'Leica Laser Microdissection' icoon op het bureaublad van de PC
- In de menu balk bevinden zich alle opties voor het controleren van de microdissectie software. De menu balk bevat volgende menu's:
 - 'File': opslaan van beelden, snijpatronen, instellingen en selecteren van de camera configuratie
 - 'View': aan- en uitzetten van de iconen, schaal en statusbalk
 - 'Camera': camera selectie en configuratie → wanneer een andere camera wordt geselecteerd, moet de microdissectie software opnieuw worden opgestart
 - 'Image': wisselen tussen live en statisch beeld
 - 'Laser': instellen en kalibratie van de laser
 - 'Autoshape': activatie van de AVC module
 - 'Options': Microscoop controle, database aanpassingen, creëren van overzichten,...
 - 'Help': contacteren van de online hulp, informatie over copyrights

2.2. Laden van een specimen

- Om een specimen te laden, druk op de 'Unload' knop
- Het 'change specimen' scherm opent
- Plaats een slide in de slidehouder met het weefsel naar beneden gericht
- Verlaat het 'change specimen' scherm door op de knop 'continue' te klikken

2.3. Plaatsen van de PCR-tubes in de microtube houder

- Om de microtube houder te verwijderen, klik op de 'Unload' knop
- Het 'charge collector device' scherm wordt geopend
- Duw een PCR-tube door de opening van de microtube houder van onderuit
- Duw de cap zo ver mogelijk door
- Duw het einde van de PCR-tube omhoog totdat het vastklikt
- Plaats de microtube houder op de microscoop

2.4. Selecteren van een PCR tube dekseltje

- Selecteer een cap door te klikken op het overeenkomstig rond, rood symbool beneden op het scherm → de geselecteerde cap kleurt groen
- Elke PCR-tube heeft een specifieke kleurcode die wordt weergegeven door een balkje in dezelfde kleur onder de cap van de PCR-tube
- De snijpatronen die aan elke PCR-tube worden toegekend, worden in dezelfde kleur als het balkje weergegeven

2.5. Selecteren van de teken modus

Er kan gekozen worden tussen 'single shape' en 'multiple shapes'. Als 'single shape' geselecteerd is, wordt slechts één snijpatroon getekend per keer. Als 'Multiple shapes' geselecteerd is, kunnen verschillende snijpatronen getekend worden in hetzelfde beeld. Deze kunnen toegewezen worden aan slechts één of aan verschillende PCR-tubes. De snijpatronen worden vervolgens automatisch uitgesneden wanneer naar de snijmodus wordt overgegaan.

2.6. Creëren van een snijpatroon

- 'Single shape' modus:
 - Selecteer de 'single shape' modus in het 'Draw Shape' venster rechtsboven op het scherm
 - De 'close Line' optie kan geactiveerd worden als je wil dat de getekende vorm automatisch wordt gesloten
 - Open het 'Microscope Control' venster via de 'MicCtrl' knop
 - Selecteer de contrastmethode vb. 'TL-BF'
 - Kies het gepaste objectief (5x, 6.3x of 10x)
 - Selecteer de 'Line' knop links op het scherm of selecteer de 'Draw' optie in het pop-up menu na rechts klikken met de muis om zelf een lijn te tekenen
 - Als alternatief kan ook de 'Ellipse' of de 'Rectangle' knop worden geselecteerd om deze vormen als snijfiguur te gebruiken
 - om een cirkel te tekenen: houd de SHIFT toets ingedrukt bij het tekenen van de ellipse
 - Indien je nog geen PCR-tube hebt geselecteerd ('No Cap' positie is actief), dan zal je gevraagd worden dit te doen
 - Teken een figuur rond het gebied dat je wilt uitsnijden
 - De kleur van de getekende lijn verwijst naar de kleur van de geselecteerde PCR-tube
 - Een snijpatroon dat je reeds hebt gebruikt, kan opnieuw worden gebruikt.
 - Klik op de 'Reuse' knop en klik vervolgens op de gewenste positie in het beeld

- 'Multiple shapes' modus:
 - Selecteer de 'multiple shapes' modus in het 'Draw Shape' venster rechtsboven op het scherm. De 'close line' optie kan geactiveerd worden als je wilt dat de getekende vorm automatisch wordt gesloten
 - Open het 'Microscope control' venster via 'MicCtrl' knop
 - Selecteer de contrastmethode, vb. 'TL-BF'
 - Kies het gepaste objectief (5x, 6.3x of 10x) en zorg dat de relevante details zichtbaar zijn op het scherm
 - Indien je elk stukje gedissecteed materiaal in een specifieke tube wilt, dan moet je de 'No cap/No well' positie selecteren
 - Zo heb je de mogelijkheid om elk snijpatroon aan een specifieke tube toe te wijzen
 - De snijpatronen worden eerst getekend in de kleur die gedefinieerd is voor de 'No cap/No well' positie
 - Nadat elk snijpatroon aan een specifieke tube is toegewezen zal de kleur van dit snijpatroon overeenkomen met de bijhorende tube
 - Als er reeds een tube is geselecteerd voor het activeren van de tekenfunctie, dan zal het scherm 'Collecting Tube Cap' niet verschijnen en al het gedissecteed materiaal zal in dezelfde tube terechtkomen
 - Druk op de 'Line' knop of selecteer de 'Draw' optie in het pop-up menu dat tevoorschijn komt na rechtsklikken met de muis om zelf een lijn te tekenen
 - Als alternatief kan ook de 'Ellipse' of de 'Rectangle' knop worden geselecteerd om deze vormen als snijfiguur te gebruiken
 - Om een cirkel te tekenen, houd de SHIFT toets ingedrukt bij het tekenen van de ellips
 - Teken een figuur rond het gebied dat je wilt uitsnijden
 - De tekenfunctie wordt gesloten wanneer de muisknop wordt losgelaten
 - De lijn zal automatisch worden gesloten als de functie 'Close Line(s)' is aangevinkt
 - Nu kan het volgende snijpatroon worden getekend
 - Snijpatronen kunnen ook worden gewist door eerst te klikken op de 'select' knop en vervolgens de 'Erase all' functie te kiezen in de 'shape list' box of door eerst een snijpatroon te selecteren en vervolgens de 'Erase' functie te gebruiken om alleen dit snijpatroon te wissen
 - Via het pop-up menu, na rechtsklikken met de muis, verschijnen ook de 'Erase/Erase all' functies
 - Een snijpatroon dat je reeds hebt gebruikt, kan opnieuw worden gebruikt door op de knop 'Reuse' te klikken en vervolgens op de gewenste positie in het beeld
 - Elk patroon dat is getekend wordt opgeslaan samen met een aantal parameters in een lijst, de 'shape list'
 - Wanneer al de patronen getekend zijn, kunnen deze patronen in de lijst geherpositioneerd worden m.b.v een dubbele klik
 - De parameters die in de 'shape list' staan, zijn weergegeven in een specifieke kleur overeenkomstig met het snijpatroon
 - De lijst van snijpatronen kan gesorteerd worden op elke parameter, en dit door een of tweemaal te klikken op de relevante parameter
 - De snijpatronen worden uitgesneden in de volgorde van de gesorteerde lijst

2.7. Uitsnijden van de patronen

- Selecteer een snijmodus in het 'CutShape(s)' veld → 3 mogelijkheden:
 - Draw + cut
 - Move + cut
 - Draw + scan

In de 'draw + cut' modus worden de snijpatronen eerst getekend en vervolgens uitgesneden.

In de 'move + cut' modus zal de laser de snijlijn volgen gelijktijdig met dat deze getekend wordt door de laborant, zodat het specimen onmiddellijk wordt uitgesneden.

In de 'draw + scan' modus is niet beschikbaar om specimen op een membraan te snijden. In deze snijmodus wordt de laser over de snijlijn geleid in een meanderend patroon.

- In de 'draw + cut' modus: snij het specimen door te klikken op 'start cut' in het 'Cut shape(s)' veld of selecteer de 'cut' functie via het pop-up scherm dat verschijnt na rechterklikken met de muis. Met behulp van de 'stop cut' knop wordt het snijproces afgebroken.

2.8. Inspecteren van het resultaat

- Druk op de 'Collector' knop
- De vorige ingestelde cap positie wordt gebruikt
- Stel het beeld scherp en inspecteer het resultaat van het snijden
- Duw op de 'Specimen' knop om terug te gaan naar de laatste snijpositie

2.9. Metingen

Op elk moment, zowel voor als na het snijden kunnen metingen worden gedaan.

De volgende metingen zijn mogelijk

- Metingen van de lengte:
 - Eerst moet de 'Measurement' knop in het 'View' menu worden geactiveerd
 - Dan is de 'Length' knop beschikbaar
 - Druk op deze knop
 - Beweeg de muiscursor naar het startpunt van de afstand die je wilt meten
 - Als het beeld wordt bewogen of een tekenfunctie wordt geselecteerd, zal de meetlijn verdwijnen
 - De kleur van de meetlijn is dezelfde als de kleur van de cap die op dat moment geselecteerd is
 - Door te klikken op de optie 'Scale' in het 'View' menu wordt een schaal weergegeven, de kleur van de schaal komt overeen met de kleur van de cap die op dat moment geselecteerd is
- Metingen van de oppervlakte:
 - In de 'shape list' worden de oppervlakten van de verschillende snijpatronen weergegeven in μm^2
 - De totale oppervlakten van al de getekende figuren worden weergegeven onderaan de lijst bij 'Total selected area'
- Aantal tekeningen:
 - Het geschatte aantal tekeningen binnen het snijgebied wordt berekend en weergegeven in de 'shape list'
 - Om dit te doen moet je de gemiddelde diameter in μm van een enkele tekening invullen in het 'Diameter' veld van het 'Options/ Settings/ Object counting' venster

2.10. Opslaan van posities

Een onbeperkt aantal posities kan worden opgeslaan

- Beweeg naar de relevante positie en focus het beeld
- Klik op 'Add' om de huidige positie op te slaan
- Om naar een opgeslagen positie te bewegen, klik op het overeenkomstige nummer in de lijst
- Om een opgeslagen positie te wissen, selecteer eerst de positie in de lijst en klik vervolgens op 'Erase Memory'
- Wis al de opgeslagen posities tegelijkertijd via 'Erase All'

2.11. Kalibratie van de laser

De kalibratie van de laser is noodzakelijk voor elk objectief zodat de coördinaten van de muiscursor correct worden omgezet in de coördinaten van de laserstraal.

Het doel van de kalibratie is ervoor te zorgen dat de figuur, getekend met behulp van de cursor op het scherm, identiek is met de vorm die de laser uitsnijdt.

Kalibratie van de laser is enkel nodig indien er afwijkingen zijn tussen de getekende lijn en de uitsnijding.

- Focus op een leeg gebied van de slide of focus op een gebied dat niet interessant is voor het onderzoek
- Bekijk de instellingen van de laser om optimale snijkwaliteit te verzekeren via het 'Laser' menu en vervolgens 'Laser Control' te selecteren
- De 'Power' en 'Speed' parameters kunnen aangepast worden naargelang het specimen
- 'Specimen Balance' is de parameter voor het aanpassen van de laser instellingen aan de verschillende eigenschappen van verschillende specimen
- Klik vervolgens op 'OK' in het 'Laser Control' menu
- Selecteer de optie 'Calibrate' in het 'Laser' menu en bevestig de volgende boodschap door op 'Yes' te klikken
- De laser snijdt een kruis in de rechterbovenhoek van het specimen
- Beweeg met de muiscursor naar het centrum van het kruis en bevestig door te klikken
- Herhaal dit voor de drie andere kruisjes
- Beëindig de kalibratie procedure door te klikken op 'Stop Calibration' in het volgend scherm
- De kruisjes zouden een rechthoek moeten vormen

2.12. Kalibratie van de microtube houder

- Om de microtube houder te verwijderen, druk op de knop: unload
- Kies het soort microtube houder bij 'Device type':
PCR-tubes (houder voor 4 PCR tubes) of 8-fold strip (8-well houder)
- Verwijder de UV beschermingskap
- Verwijder de slide houder
- Kies het gewenste objectief (5x, 6.3x of 10x)
- Klik op 'Move to Reference Point' in het 'Adjust Reference point (RP)' veld van het 'Change collector device' scherm
- Een kalibratie cirkel op de microtube houder zal vervolgens automatisch in het lichtveld bewegen

- Deze cirkel kan op het scherm gezien worden als een heldere circulaire vlek op een zwarte achtergrond
- Zorg ervoor dat de cirkel in het centrum komt te liggen door het beeld scherp te stellen en door eventueel de positie te corrigeren
- Bevestig de correcte positie met 'OK'
- Het scherm wordt gesloten en de microtube houder plaatst zich terug in zijn vorige positie
- Klik opnieuw op de 'unload' knop om de slide houder terug in positie te brengen
- Sluit het venster
- Stel het beeld scherp als de slide zich terug in zijn vorige positie bevindt
- Nu kan de UV beschermingskap terug worden geplaatst

2.13. Controleren van de microtube houder

Na microdissectie kan het materiaal dat in de microtubes is terechtgekomen, gecontroleerd worden

- Klik op een PCR-tube op het pc scherm
- De overeenkomstige tube kleurt groen
- Selecteer de 'Settings' optie in het 'options' menu
- Klik vervolgens op 'Inspection Position' en dan op 'start'
- Selecteer een objectief (5x, 6.3x, 10x of 20x)
- Objectieven met een vergroting van meer dan 20x zijn niet geschikt voor deze inspectie omwille van te kleine afstanden t.o.v. het microtube
- Corrigeer eventueel de positie van het microtube
- Stel het beeld scherp
- Het focuspunt ligt op de onderkant/basis van het dekseltje van de PCR-tube
- De parameters worden opgeslagen door te klikken op 'Learn Inspection Settings'

2.14. Veranderen van de camera

- Klik op 'Microscope Control'
- Onder 'Contrast Methods' bevindt zich een lijst met alle contrast methodes die mogelijk zijn met deze configuratie, hier is het mogelijk om het objectief, de lichtintensiteit en focus te wijzigen
- Selecteer bijvoorbeeld 'Fluorescence' als contrastmethode ('FLUO' knop) en vervolgens de 'Fluorescence control' optie
- In het venster 'Microscope control/ Fluorescence control' kan het geschikte diafragma en de lichtintensiteit worden gekozen
- Klik op 'Preview' om de blootstellingstijd aan te passen

Opgelet: Voor leverweefsel mag er maximaal 10 minuten gemicrodissecteerd worden per coupe om DNA of RNA van goede kwaliteit te verkrijgen. Er zijn ongeveer 1 miljoen cellen per microtube nodig voor de RNA-extractie.

3.8. RNA-extractie

3.8.1. Materiaal

3.8.1.1. Overzicht gebruikte apparatuur

| Hardware | Merk en type | Doel |
|-----------------------------------|----------------|-----------------------|
| RNeasy plus micro kit | Qiagen – 74034 | RNA-extractie |
| Tissuruptor of tissuelyser | | Weefsel homogeniseren |
| Centrifuge | | Stalen centrifugeren |
| Micropipetten | | Vloeistof pipetteren |
| Vortex | | Oplossingen mengen |



Tabel 14: Overzicht gebruikte apparatuur voor RNA-extractie

3.8.1.2. Overzicht gebruikte glaswerk en disposables

| Hardware | Doel |
|---------------------------------------|--------------------|
| Pipettippen voor micropipetten | Vloeistofcontainer |
| gDNA eliminator spinkolom | RNA-extractie |
| 2 ml tubes | Vloeistofcontainer |
| 1,5 ml tubes | Vloeistofcontainer |
| RNeasy MinElute spinkolom | RNA-extractie |

Tabel 15: Overzicht gebruikte glaswerk en disposables voor RNA-extractie

3.8.1.3. Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen

| Stofnaam of naam oplossing | V/VI. | MW stof of samenstelling oplossing (stoffen en conc.) | Risico's H-zinnen | Veiligheidsvoorschrift en P-zinnen | Doel | Afvalverwerking |
|----------------------------|-------|---|---|------------------------------------|----------------|---------------------------------------|
| Buffer RLT plus | VI. | | | | Cellen lyseren | Verzamelen in afvalbak onder trekkast |
| 70% ethanol | VI. | | H225  | P210 | | Chemische afvalbak |
| Buffer RW1 | VI. | | | | | Gootsteen |
| Buffer RPE | VI. | | | | | Gootsteen |
| 80% ethanol | VI. | | H225  | P210 | | Chemische afvalbak |
| RNase-free water | VI. | | / | / | RNA elueren | Gootsteen |

Tabel 16: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor RNA-extractie

3.8.2. Methode

De RNA-extractie wordt uitgevoerd met behulp van de RNeasy plus micro kit.

1. **Cellen:** oogst een maximum van 5×10^5 cellen in een cel pellet of door directe lysis in de cel cultuur dish (tot 10 cm diameter).

Voeg 350 μ l buffer RLT plus toe.

Homogeniseer het lysaat.

Weefsels: Gebruik niet meer dan 5 mg weefsel.

Voeg 350 μ l buffer RLT plus toe.

Maak het weefsel stuk en homogeniseer het weefsel door gebruik te maken van de 'Tissuruptor' of de 'TissueLyser'.

Centrifugeer het lysaat voor 3 minuten op maximale snelheid.

Verwijder het supernatans door het over te pipetteren en gebruik dit supernatans in de tweede stap.

Gemicrodissecteerde vriessecties: Verzamel de cluster van cellen / stukje weefsel meteen in een passend volume buffer RLT plus. Het volume is afhankelijk van de hoeveelheid verzameld materiaal, gebruikt voor lasermicrodissectie, maar mag niet meer dan 65 μ l zijn. Stel het volume af op 350 μ l buffer RLT plus. Vortex 30 seconden.

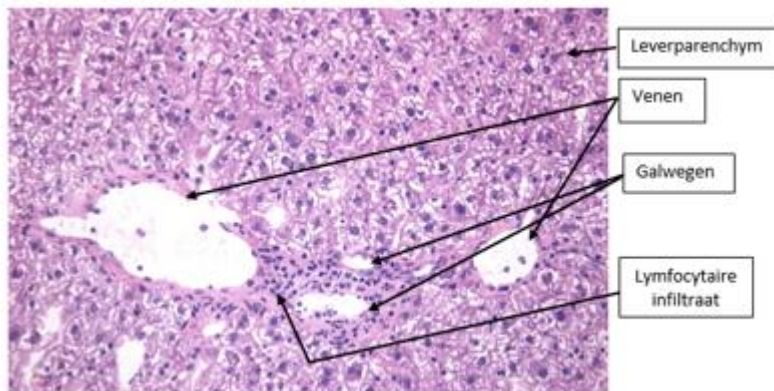
2. Breng het lysaat over naar een gDNA eliminator spinkolom die geplaatst is in een 2 ml verzameltube.
Centrifugeer 30 seconden bij $>8000 \times g$. Gooi de kolom weg en bewaar de flow-through.
3. Voeg 1 volume (meestal 350 μ l) van 70% ethanol bij de flow-through en mix door op en neer te pipetteren. Niet centrifugeren.
4. Breng de sample, inclusief het precipitaat dat mogelijk gevormd is, over naar een RNeasy MinElute spinkolom die geplaatst is in een 2 ml verzameltube. Sluit het dekseltje en centrifugeer voor 15 seconden bij $> 8000 \times g$. Gooi de Flow-through weg.
5. Breng 700 μ l buffer RW1 aan op de RNeasy MinElute spinkolom. Sluit het dekseltje en centrifugeer 15 seconden bij $> 8000 \times g$. Gooi de flow-through weg.
6. Breng 500 μ l buffer RPE aan op de RNeasy MinElute spinkolom. Sluit het dekseltje en centrifugeer 15 seconden bij $> 8000 \times g$. Gooi de flow-through weg.
7. Breng 500 μ l van ethanol 80% aan op de RNeasy MinElute spinkolom. Sluit het dekseltje en centrifugeer 2 minuten bij $> 8000 \times g$ om het spinkolommembraan te wassen. Gooi de verzameltube met de flow through weg.
8. Plaats de RNeasy MinElute spinkolom in een andere 2 ml verzameltube. Open het dekseltje van de spinkolom en centrifugeer op maximale snelheid voor 5 minuten om het membraan te drogen. Verwijder de verzameltube met de flow through.
9. Plaats de RNeasy MinElute spinkolom in een 1,5 ml verzameltube. Voeg 14 μ l RNase-free water toe op het spinkolommembraan. Sluit het dekseltje voorzichtig en centrifugeer 1 minuut op maximale snelheid om het RNA te elueren.

4. Resultaten en discussie

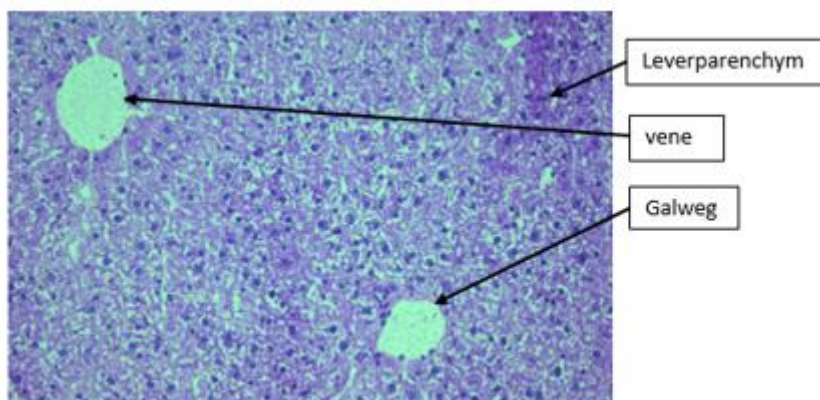
4.1. Resultaten en discussie microscopische slides

Op onderstaande afbeeldingen worden er foto's weergegeven van coupes van leverweefsel van muismodellen met primaire biliaire cirrose en van een wildtype muismodel. Op die manier kan er een vergelijking gemaakt worden tussen het weefsel van gezonde muizen en muizen met PBC. Deze coupes werden aangekleurd met behulp van de H&E-kleuring en de keratine kleuring. De bedoeling van deze coupes is om de kwaliteit van de stalen te beoordelen, om een duidelijk beeld te krijgen van het leverweefsel en om een idee te hebben waar de structuren van interesse gelegen zijn in het weefsel. Dit is nodig om in een latere stap bij de lasermicrodissectie snel deze gebieden van interesse terug te vinden vermits er slechts gedurende 10 minuten gemicrodissecteerd mag worden en vermits de coupes die gekleurd worden met de cresyl violet kleuring voor de lasermicrodissectie veel minder duidelijk zijn om de verschillende structuren te onderscheiden. Wanneer er gestart wordt met de lasermicrodissectie zal er ondertussen ook gebruik gemaakt worden van een lichtmicroscop en deze microscopische slides om zo de verschillende structuren makkelijker terug te vinden in de overeenkomstige coupes voor de lasermicrodissectie.

4.1.1. Vergelijking leverweefsel van muismodel met PBC en wildtype muismodel



Figuur 12: Leverweefsel van muismodel met PBC



Figuur 13: Leverweefsel van wildtype muismodel

In **figuur 12** is leverweefsel zichtbaar van een muismodel met PBC. De drie structuren van interesse zijn zichtbaar op deze afbeelding. Deze structuren zijn de galwegen, het lymfocytair infiltraat en de venen (portaveld). Het lymfocytair infiltraat is typisch bij de aandoening vermits levercirrose een ontsteking van de lever is. De lymfocyten zijn de donker blauw gekleurde cellen. Het zijn kleine, ronde dikke cellen met een grote blauwe celkern en weinig cytoplasma. Er is een ophoping van deze lymfocyten aanwezig. Bij een ontsteking zijn lymfocyten betrokken. Een lymfocyt is een type witte

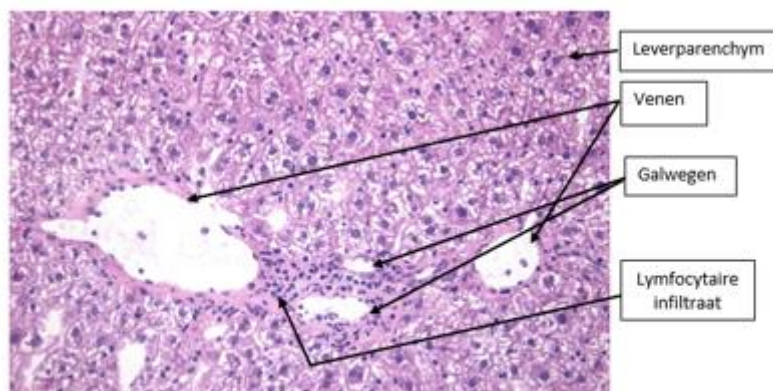
bloedcel dat in het rode beenmerg gevormd wordt uit een lymfoïde voorlopercel en rijpt in de lymfoïde organen. Lymfocyten spelen een belangrijke rol in het verworven immuunsysteem. Lymfocyten ontstaan uit stamcellen in het beenmerg van de platte beenderen. Een deel ontwikkelt via een aantal stappen in het beenmerg en rijpt uit tot B-lymfocyten terwijl de voorlopercel van de T-lymfocyt zich in de thymus verder ontwikkelt tot T-lymfocyt. Er bestaan vier groepen van lymfocyten namelijk: T-lymfocyten, B-lymfocyten, Natural killer cellen en Natural killer T-cellen. T-lymfocyten zijn betrokken bij de cellulaire immuunrespons. B-lymfocyten zijn verantwoordelijk voor de humorale immuunrespons, ze herkennen niet-lichaamseigen antigenen. Natural killer cellen spelen een rol bij het doden van cellen en ze scheiden cytokinen uit. Deze cytokinen worden gebruikt tegen pathogenen.

De galwegen zijn erg betrokken bij PBC. Wanneer de galwegen vernauwen door taaie slijmen en door het lymfocytair infiltraat kan de gal niet meer worden afgevoerd en zal deze bijgevolg ophopen in de lever. Tot slot zijn ook de venen betrokken bij PBC vermits de lever ook een rol speelt als bloedfilterfunctie. De venes zijn herkenbaar door hun plat endotheel. Verder bestaat het leverweefsel voor 80% uit leverparenchym.

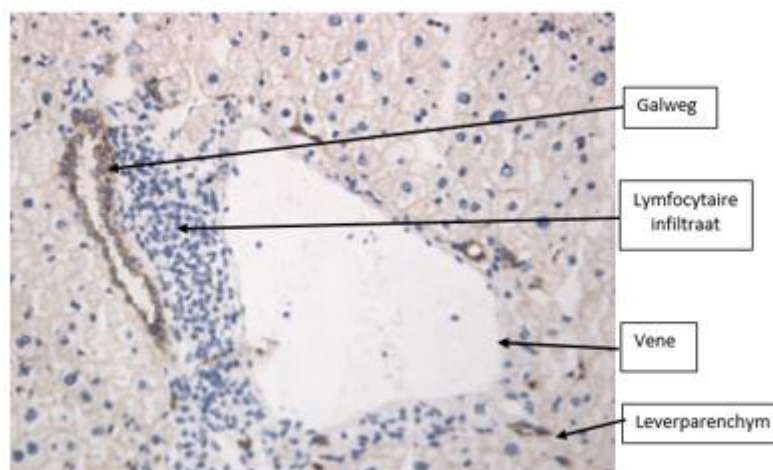
In **figuur 13** is leverweefsel zichtbaar van een wildtype muismodel. Op deze afbeelding is ook voornamelijk leverparenchym zichtbaar. Ook is er een galweg en een vene aanwezig. Het lymfocytair infiltraat is bij gezond leverweefsel afwezig.

Het leverweefsel zichtbaar in **figuur 12 en 13** is gekleurd met behulp van de H&E-kleuring. De celkernen zijn blauw gekleurd en het cytoplasma roze.

4.1.2. Vergelijking H&E-kleuring en keratine kleuring



Figuur 14: Leverweefsel gekleurd met H&E-kleuring



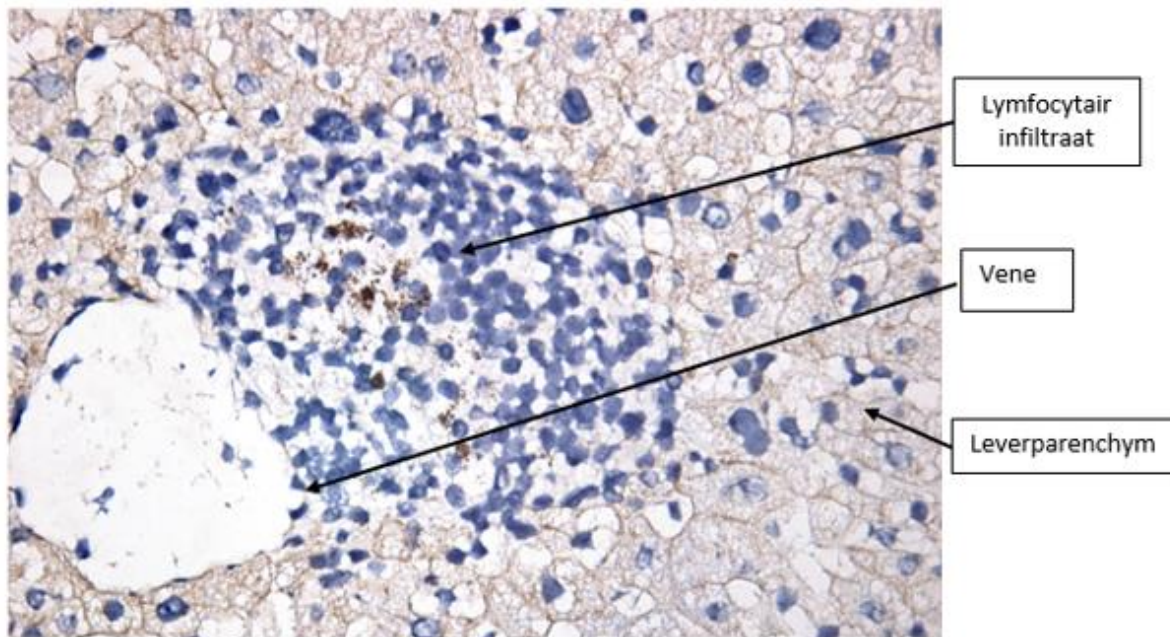
Figuur 15: Leverweefsel gekleurd met keratine kleuring

In **figuur 14** is leverweefsel zichtbaar dat gekleurd is met de H&E-kleuring. De celkernen zijn blauw aangekleurd en het cytoplasma roze.

In **figuur 15** is leverweefsel zichtbaar dat gekleurd is met de immunohistochemische keratine kleuring. De galwegen zijn bruin gekleurd en de celkernen blauw.

Op beiden afbeeldingen zijn de drie structuren van interesse zichtbaar, namelijk het lymfocytair infiltraat, de galwegen en de venen (portaveld). Het lymfocytair infiltraat is bij beide kleuringen duidelijk zichtbaar als kleine, ronde, dikke cellen met een grote celkern en weinig cytoplasma. Bij de H&E-kleuring is het moeilijk om venen te onderscheiden van galwegen. Wat typerend is bij de venen is het plat endotheel. Galwegen worden gekenmerkt door uitlopers van cellen aan de wand, deze cellen staan in voor het afvoeren van de gal. De galwegen worden bij de keratine kleuring bruin aangekleurd wat het makkelijk maakt om deze te onderscheiden van de venen of van eventuele scheurtjes, artefacten in het weefsel. Met behulp van de keratine kleuring kan er een onderscheid gemaakt worden tussen de verschillende structuren op basis van de vorm van de cellen en de aan kleuring van de verschillende structuren. Bij de H&E-kleuring kunnen de structuren enkel onderscheiden worden van elkaar op basis van de vorm van de cellen.

4.1.3. Microscopische afbeelding van vene met lymfocytair infiltraat

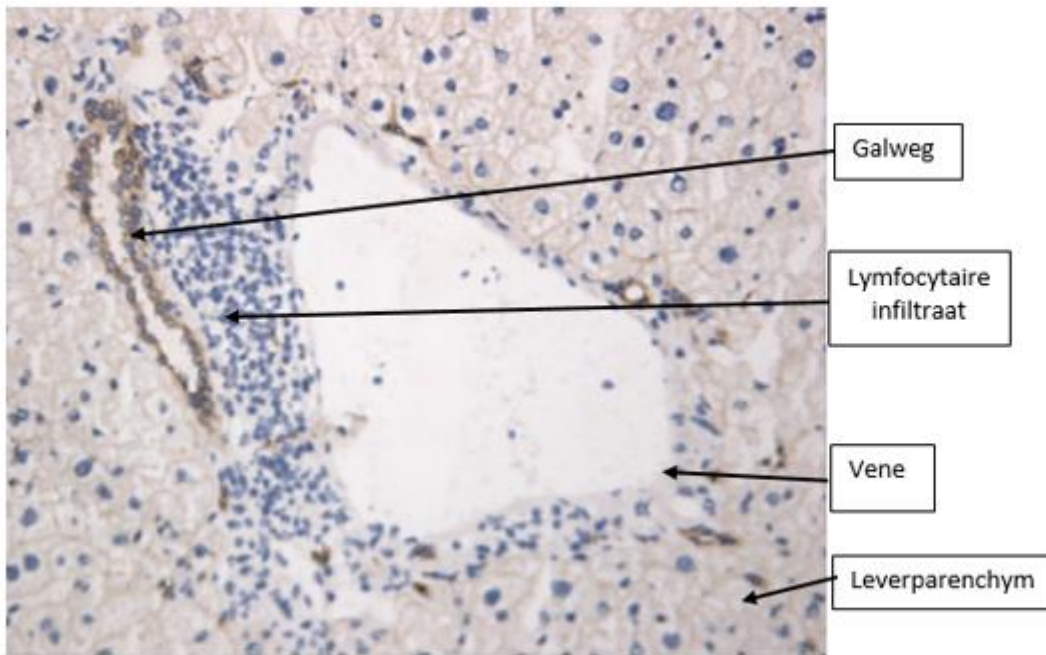


Figuur 16: Leverweefsel met vene en lymfocytair infiltraat

In **figuur 16** wordt een microscopische weergave getoond van een muismodel met primaire biliare cirrose. De coupe werd gekleurd met de immunohistochemische keratine kleuring om de verschillende structuren te kunnen onderscheiden.

Het lymfocytair infiltraat is duidelijk zichtbaar wat wijst op een ontsteking van de lever namelijk levercirrose. Op de afbeelding is ook duidelijk een vene zichtbaar. Deze vene is de vena portae en zorgt voor het transport van bloed van de darmen naar de lever. In de lever wordt het bloed gezuiverd en vervolgens verlaat het gezuiverde bloed de lever via de vena cava inferior (de onderste holle ader). Verder is er op deze afbeelding leverparenchym zichtbaar.

4.1.4. Microscopische afbeelding van het actief ziekteproces van PBC

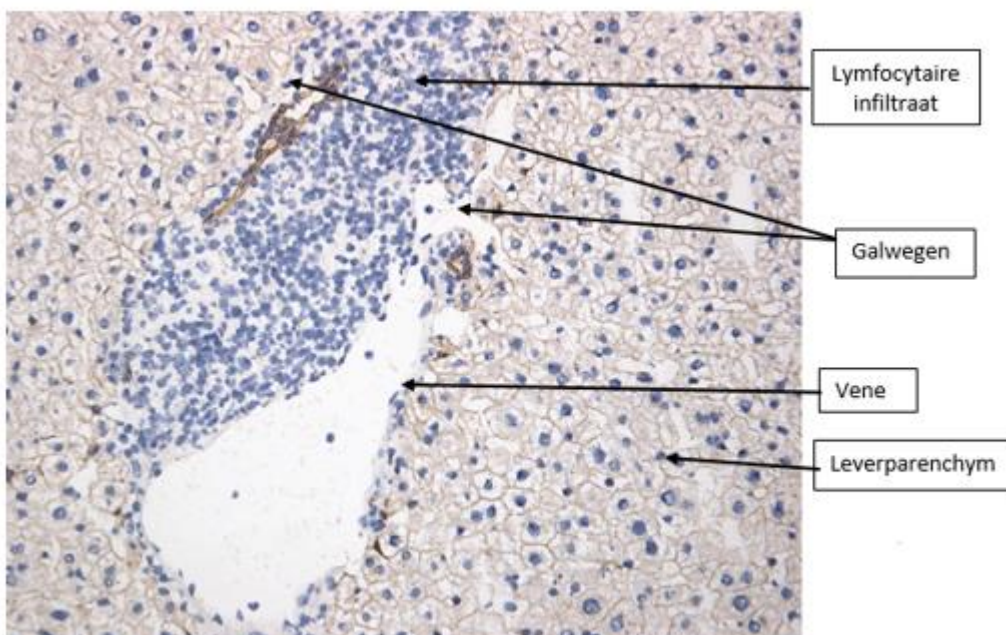


Figuur 17: Actief ziekteproces van PBC

In **figuur 17** wordt het actief ziekteproces weergegeven. Deze coupe werd aangekleurd door middel van de immunohistochemische keratine kleuring. De galweg is zichtbaar in het bruin. Bij de galweg zijn er uitlopers van cellen zichtbaar aan de wand. Deze cellen staan in voor het afvoeren van de gal.

Op deze afbeelding is er ook een vene zichtbaar en een lymfocyttaire infiltraat. Het lymfocyttaire infiltraat verdringt als het ware de galweg. Het verdringen van de galweg wijst op het actief ziekteproces. Hoe meer de galwegen verdrongen worden, hoe verder de ziekte gevorderd is en hoe erger de symptomen zullen zijn.

4.1.5. Microscopische afbeelding van ver gevorderd ziektestadium bij PBC



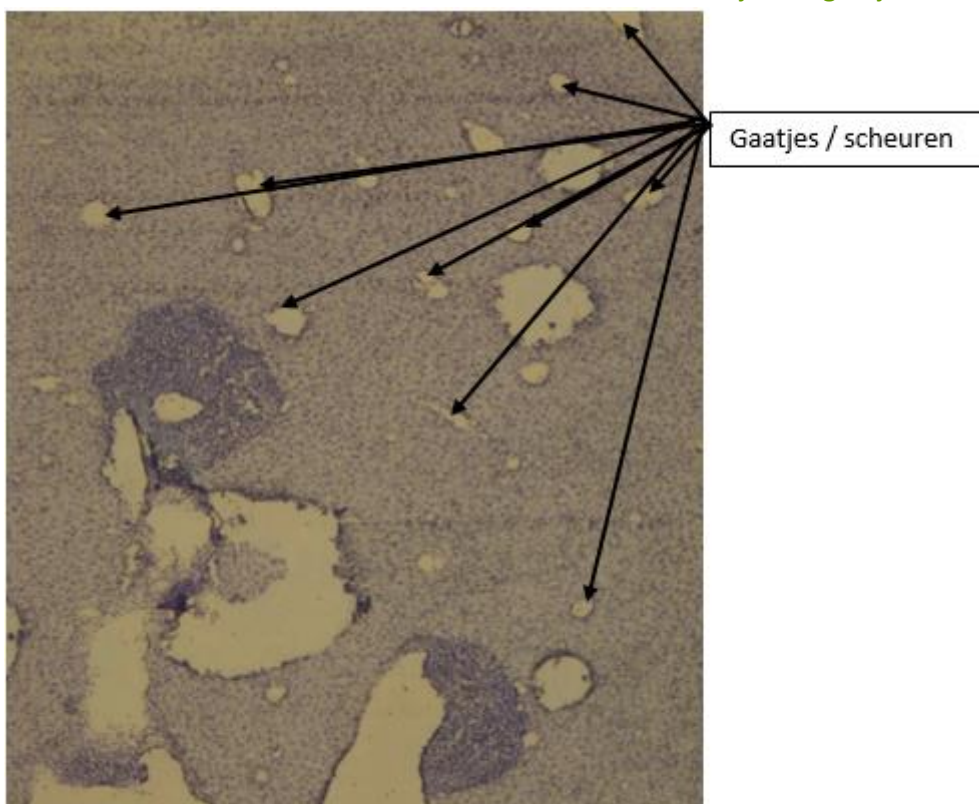
Figuur 18: Vergevoerd ziektestadium bij PBC

In **figuur 18** is een vergevorderd ziektestadium zichtbaar. De coupe werd aangekleurd met behulp van de immunohistochemische keratine kleuring. De galwegen worden bijna volledig verdrongen door het lymfocyttaire infiltraat. De galwegen kunnen hun functie zo niet meer uitoefenen. De gal zal ophopen en de levercellen zullen ontsteken, dit veroorzaakt primaire biliare cirrose.

4.2. Resultaten lasermicrodissectie

Voor de lasermicrodissectie worden de coupes gekleurd met behulp van de cresyl violet kleuring. Voor deze kleuring wordt er gebruik gemaakt van een alcoholreeks van ethanol met verschillende concentraties (100%, 95%, 75% en 50%) en van kristalviolet. De weefsels worden zo zichtbaar voor lasermicrodissectie. Het is de bedoeling om de drie gebieden (populaties) van interesse te isoleren in afzonderlijke microtubes. Deze structuren zijn het lymfocyttaire infiltraat, de galwegen en de venen (portaveld). Er zullen enkele voorbeelden besproken worden van gebieden die geïsoleerd werden met behulp van lasermicrodissectie.

4.2.1. Resultaten van lasermicrodissectie van scheurtjes en gaatjes in het weefsel



Figuur 19: Leverweefsel met PBC - Overzicht weefsel

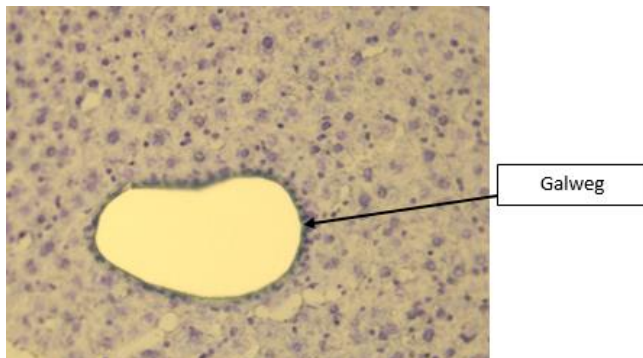
In **figuur 19** is leverweefsel zichtbaar dat gekleurd is met behulp van de cresyl violet kleuring. De afbeelding werd genomen bij 5 x vergroting om zo een overzicht te hebben van het weefsel.

Wat op deze afbeelding meteen opvalt zijn de lymfocyttaire infiltraten. Dit wijst erop dat het leverweefsel is van een muismodel met PBC. Er zijn vele “witte vlekken” aanwezig in het weefsel. Deze “witte vlekken” kunnen galwegen, venen of scheuren of gaatjes in het weefsel zijn. De gaatjes en scheurtjes zijn artefacten die in het weefsel terecht komen door het aansnijden van het weefsel. De cellen worden uit elkaar getrokken.

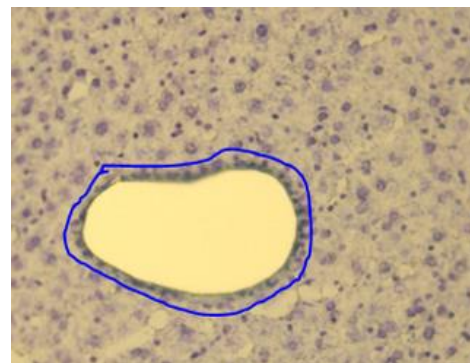
Zoals zichtbaar is in figuur 19 is het zeer moeilijk om de artefacten te onderscheiden van de andere structuren. Het is hierbij belangrijk om te kijken naar de vorm van de cellen rond de holtes. Bij venen zijn deze cellen plat endotheel. Bij galwegen daarentegen zijn er eerder kleine, ronde cellen aanwezig. Dit zijn uitlopers van cellen die instaan voor het afvoeren van de gal.

Met behulp van de pijlen op bovenstaande afbeelding worden er enkele structuren aangeduid waarvan er vermoed wordt dat het gaatjes en scheurtjes in het weefsel zijn. In sommige gevallen is het moeilijk om dit onderscheid te maken.

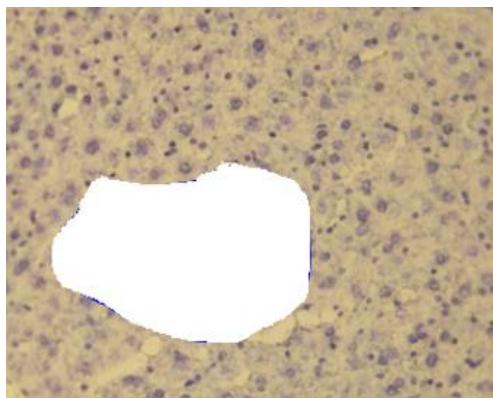
4.2.2. Resultaten van lasermicrodissectie van een galweg



Figuur 20: Leverweefsel met galweg - Voor lasermicrodissectie



Figuur 21: Leverweefsel met galweg - Snijlijn voor lasermicrodissectie



Figuur 22: Leverweefsel met galweg - Na lasermicrodissectie

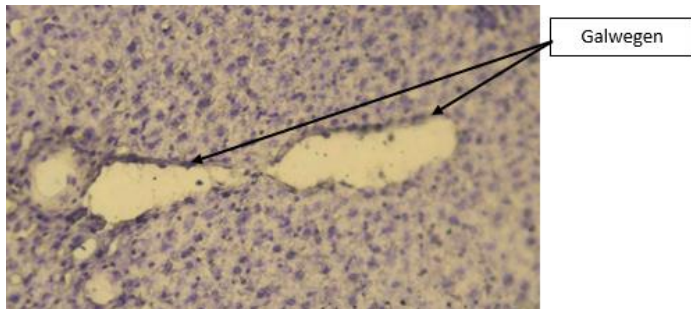
Het weefsel in figuur 20, 21 en 22 werd gekleurd met behulp van de cresyl violet kleuring. De afbeelding werd genomen bij 20 x vergroting.

In **figuur 20** is het leverweefsel van een muizenstaal met PBC zichtbaar. Centraal is een galweg zichtbaar. De galwegen zijn één van de drie structuren van interesse die met behulp van de lasermicrodissectie geïsoleerd dienen te worden.

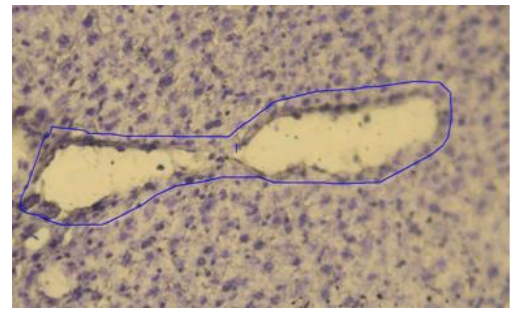
In **figuur 21** is de snijlijn zichtbaar rond de galweg. Deze snijlijn geeft aan waar de laser het weefsel zal beschieten. Met behulp van de snijlijn wordt er aangegeven welk gebied geïsoleerd zal worden. Bij het tekenen van de snijlijn met behulp van een software wordt er ook aangegeven in welke microtube het aangeduide gebied terecht moet komen.

In **figuur 22** is het weefsel zichtbaar na de lasermicrodissectie. Er is een witte vlek zichtbaar op de plaats waar het gewenste gebied geïsoleerd werd.

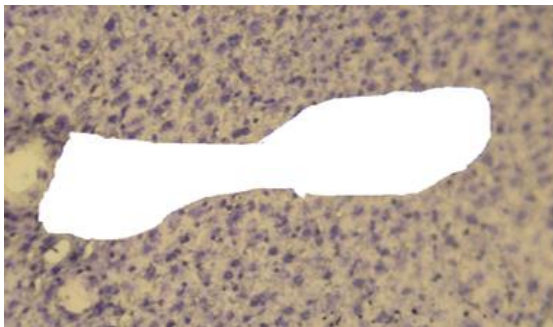
4.2.3. Resultaten van lasermicrodissectie van twee galwegen



Figuur 23: Leverweefsel met twee galwegen - Voor lasermicrodissectie



Figuur 24: Leverweefsel met twee galwegen - Snijlijn voor lasermicrodissectie



Figuur 25: Leverweefsel met twee galwegen - Na lasermicrodissectie

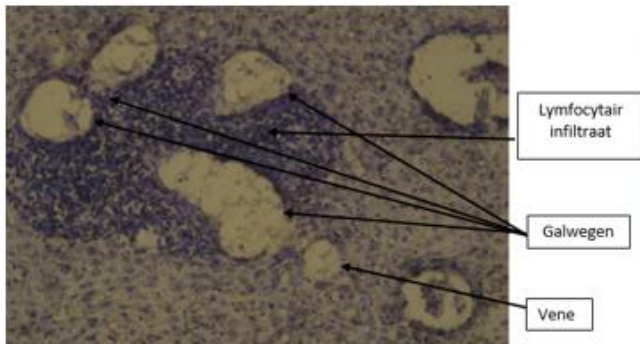
Het weefsel in figuur 23, 24 en 25 werd gekleurd met behulp van de cresyl violet kleuring. De afbeeldingen werden genomen bij 20 x vergroting.

In **figuur 23** is leverweefsel zichtbaar van een muismodel met PBC. In het midden van de afbeelding zijn twee galwegen zichtbaar. Het is de bedoeling om deze galwegen te isoleren met behulp van lasermicrodissectie.

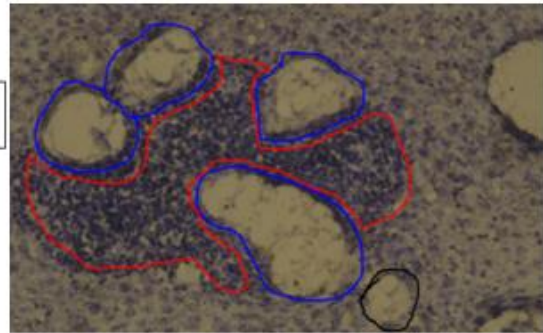
In **figuur 24** is de snijlijn zichtbaar die het gebied van interesse, namelijk de twee galwegen omlijnt, die gemicrodissecteerd zullen worden.

In **figuur 25** is het leverweefsel zichtbaar na lasermicrodissectie. Er is een witte vlek zichtbaar op de plaats waar de twee galwegen aanwezig waren.

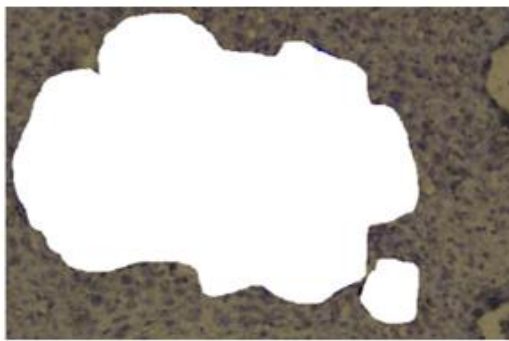
4.2.4. Resultaten van lasermicrodissectie van een lymfocytair infiltraat, vier galwegen en een vene



Figuur 26: Leverweefsel met lymfocytair infiltraat, vier galwegen en een vene - Voor lasermicrodissectie



Figuur 27: Leverweefsel met lymfocytair infiltraat, vier galwegen en een vene - Snijlijn voor lasermicrodissectie



Figuur 28: Leverweefsel met lymfocytair infiltraat, vier galwegen, een vene - Na lasermicrodissectie

Het weefsel in figuur 26, 27 en 28 zijn gekleurd met behulp van de cresyl violet kleuring. De afbeeldingen werden genomen bij 20 x vergroting.

In **figuur 26** is leverweefsel zichtbaar van een muismodel met PBC. Op het leverweefsel zijn vier galwegen, een lymfocytair infiltraat en een vene zichtbaar. Dit zijn de drie structuren van interesse.

In **figuur 27** zijn de snijlijnen aanwezig die aangeven welke gebieden geïsoleerd zullen worden uit het weefsel. De verschillende structuren hebben een andere kleur van snijlijn. De kleur van de snijlijn is dezelfde als de kleur van de cap van de microtube waarin het geïsoleerde stukje weefsel terecht zal komen.

In **figuur 28** is het leverweefsel zichtbaar na lasermicrodissectie. Op de plaatsen waar de geïsoleerde structuren aanwezig waren zijn nu witte vlekken zichtbaar.

5. Algemene discussie

5.1. Algemene discussie microscopische slides

De microscopische slides werden gemaakt om de lasermicrodissectie te vergemakkelijken. Met behulp van de slides kon er worden nagegaan waar de verschillende structuren van interesse gelegen zijn in het weefsel en of de stalen van goede kwaliteit zijn om mee te werken.

Een deel van de microscopische slides werden gekleurd met de H&E-kleuring, het andere deel met de immunohistochemische keratine kleuring. Uit de resultaten kan vastgesteld worden dat de verschillende structuren makkelijker te onderscheiden zijn bij de keratine kleuring vermits hier meerdere kleuren zichtbaar zijn in vergelijking met de H&E-kleuring. Bij de H&E-kleuring kan men de verschillende structuren onderscheiden op basis van de vorm van de cellen. Bij de keratine kleuring kan men de structuren onderscheiden op basis van kleur en vorm van de cellen.

Wanneer er gewerkt wordt met de lasermicrodissectie wordt de slide met leverweefsel die overeenkomt met het leverweefsel op de FrameSlide voor lasermicrodissectie onder een lichtmicroscopie bekeken om zo een idee te vormen waar er in het weefsel voor lasermicrodissectie gezocht moet worden naar de drie structuren. Dit is belangrijk vermits er op korte tijd veel cellen geïsoleerd dienen te worden.

5.2. Discussie lasermicrodissectie

Het is de bedoeling om met behulp van de lasermicrodissectie, de drie gebieden van interesse te isoleren in afzonderlijke microtubes. Deze structuren zijn het lymfocyttaire infiltraat, de galwegen en het portaveld. Het principe van de techniek is zichtbaar op de afbeeldingen bij de resultaten van de lasermicrodissectie.

De coupes voor lasermicrodissectie worden gekleurd met cresyl violet. Op deze coupes zijn deze structuren echter moeilijk van elkaar te onderscheiden. Een bijkomend probleem is dat er veel scheuren en gaatjes aanwezig zijn in het weefsel. Deze scheurtjes en gaatjes zijn ontstaan door het aansnijden van de coupe. De cellen zijn op deze plaatsen uit elkaar getrokken. Deze artefacten maken het moeilijk om bijvoorbeeld galwegen en venen te onderscheiden van deze artefacten. Bij de resultaten is er een afbeelding aanwezig waarin deze scheuren en gaatjes zichtbaar zijn in het leverweefsel. Er werd slechts één afbeelding genomen van deze artefacten wegens geheugenbesparing van het toestel, de zeer korte tijd voor het microdissecteren en vermits er enkel structuren geïsoleerd werden waarvan zeker was dat ze juist waren, maar dit waren er vrij weinig. In de resultaten zijn er dan ook enkel structuren besproken waarvan zeker is dat deze juist zijn.

Om minimale schade te bezorgen aan het weefsel en om RNA van goede kwaliteit te verkrijgen mag er bij leverweefsel maximaal 10 minuten gemicrodissecteerd worden. Bij lasermicrodissectie is het belangrijk om zuivere weefsels te isoleren vermits er weinig RNA terecht komt in de microtube en bijgevolg moet dit erg zuiver zijn om mee verder te kunnen werken.

Vermits de structuren zo moeilijk van elkaar te onderscheiden zijn en de tijd voor het microdissecteren zo kort is, konden er niet genoeg cellen geïsoleerd worden van de gewenste structuren uit het weefsel. Er werd gedurende 45 minuten gemicrodissecteerd maar binnen deze tijd werden er nog niet genoeg cellen verkregen. Er moesten ongeveer 1 miljoen cellen aanwezig zijn per microtube. De software telt hoeveel cellen er aanwezig zijn per microtube zodat de laborant een indicatie heeft wanneer er gestart kan worden met de RNA-extractie. Vermits het microdissecteren zo lang duurde, werd er RNA verkregen van slechte kwaliteit vermits het weefsel volledig verbrand en beschadigd werd.

Voor deze problemen zijn er twee verklaringen en/of oplossingen. In eerste instantie zou het kunnen dat de vriescoupes niet goed werden aangesneden waardoor de coupes een slechte kwaliteit hadden. Om een oplossing voor dit probleem te voorzien werd er aan een ervaren laborant gevraagd om enkele vriescoupes te snijden. Maar ook op deze coupes waren er veel scheurtjes en gaatjes zichtbaar. Er werd ook op verschillende diktes gesneden maar dit maakte ook geen verschil. In tweede instantie zou het ook kunnen dat de concentratie van de kristalviolet in de cresyl violet kleuring te laag was. Ter oplossing hiervoor werden er verschillende concentraties van kristalviolet aangemaakt van 0,5% tot 2%. Uiteindelijk bleek de concentratie van 1,5% het beste resultaat te geven. De verhoogde concentratie van kristalviolet kleurde het weefsel wel donkerder maar de verschillende structuren waren nog steeds moeilijk van elkaar te onderscheiden. De concentratie van de kristalviolet in de cresyl violet kleuring was 1,5% bij de leverweefsels die weergegeven worden bij de resultaten van de lasermicrodissectie. Van de andere concentraties werden er geen foto's genomen.

Er kan dus vastgesteld worden dat de stalen zelf van minder goede kwaliteit zijn om mee te werken. Een oplossing zou zijn om de techniek te optimaliseren om er zo voor te zorgen dat de structuren beter zichtbaar zijn waardoor dat de tijd voor het microdissecteren verkort en er RNA van goede kwaliteit verkregen wordt om mee verder te werken.

6. Conclusie

Op de microscopische foto's van het leverweefsel van muizenstalen met primaire biliaire cirrose gekleurd door middel van de keratine kleuring en hematoxyline-eosinekleuring zijn duidelijk de drie structuren van interesse zichtbaar namelijk het lymfocyttaire infiltraat, de galwegen en de venen. Deze drie gebieden van interesse zijn betrokken bij de ziekte primaire biliaire cirrose. Wat meteen opvalt is dat de gebieden makkelijker te onderscheiden zijn bij de coupes gekleurd met de keratine kleuring.

Voor de lasermicrodissectie wordt de coupe op de FrameSlide gekleurd met de Cresyl violet kleuring. Bij deze kleuring is het echter moeilijker om de drie gebieden van interesse te onderscheiden wat het moeilijk maakt om deze te microdissecteren. Het is bij lasermicrodissectie belangrijk om te werken met zuivere populaties vermits er gewerkt wordt met zeer kleine hoeveelheden RNA.

De kwaliteit van de stalen is onvoldoende om binnen de tijd van 10 minuten genoeg cellen te isoleren. De techniek zal geoptimaliseerd moeten worden zodat de structuren beter zichtbaar zijn wanneer deze gekleurd worden met de cresyl violet kleuring zodat de lasermicrodissectie sneller kan gebeuren en er zo RNA van goede kwaliteit verkregen wordt.

Leveronderzoek is erg boeiend maar ontzettend moeilijk. Zelf heb ik het volledige onderzoek niet kunnen afwerken maar ik ga het zeker blijven volgen van op afstand.

Ik heb het onderzoek uitgevoerd tot aan de RNA-extractie. De concentratie en zuiverheid van het RNA werden in een externe firma bepaald. De resultaten hiervan zijn niet tijdig ontvangen om te kunnen verwerken in deze bachelorproef.

Wanneer de techniek geoptimaliseerd is zal er opnieuw lasermicrodissectie plaatsvinden. Vervolgens zal er RNA geïsoleerd worden uit de geïsoleerde stukjes weefsel. Vervolgens wordt het RNA gesequenced om de volgorde van het RNA te bepalen. De RNA sequencing wordt ook in een externe firma uitgevoerd. Vervolgens wordt de sequentie van het uitgelezen RNA vergeleken met de humane sequentie via bioinformatica. Op die manier kan er bepaald worden of de genen bij de muismodellen overeenkomen met de humane genen en welke genen er tot expressie gebracht zullen worden. In een volgende stap worden er primers ontwikkeld voor de gewenste genen en tot slot volgt de effectieve genexpressiestudie met behulp van de kwantitatieve real-time PCR. Het besluit van dit onderzoek zullen bepaalde genen zijn die up of down gereguleerd worden bij de aandoening PBC in vergelijking met een gezonde controlegroep.

Bibliografie

- [1] „Wikipedia,” 8 December 2015. [Online]. Available: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/05/Hepatic_structure.png/220px-Hepatic_structure.png. [Geopend 22 Februari 2016].
- [2] D. E. Malarkey, K. Johnson, L. Ryan, G. Boorman en R. R. Maronpot, „Toxicologic pathology,” *SAGE journals*, 2016.
- [3] „Anatomie,” 2014. [Online]. Available: <http://www.stamcel.org/html/lever.htm>. [Geopend 16 Februari 2016].
- [4] „Gezondheidsplein - Lever,” Medical Media BV., 2016. [Online]. Available: <https://www.gezondheidsplein.nl/menselijk-lichaam/lever/item45056>. [Geopend 17 Februari 2016].
- [5] „Spijvertering.info - Lever,” [Online]. Available: <http://www.spijvertering.info/over-spijvertering/lever/>. [Geopend 19 Februari 2016].
- [6] UZ Leuven, „Lever en galwegen,” 7 Mei 2013. [Online]. Available: <https://www.uzleuven.be/mucocentrum/lever-en-galwegen>. [Geopend 11 April 2016].
- [7] W. V. Steenbergen, „Gal en galwegen,” [Online]. Available: <http://www.llt.be/sites/default/files/pdf/Gal%20en%20galwegen.pdf>. [Geopend 15 Maart 2016].
- [8] „Primaire biliaire cirrose,” Persoonlijk gezondheidsdossier, 2016. [Online]. Available: <https://www.patient1.nl/encyclopedie/primaire-biliaire-cirrose>. [Geopend 1 Maart 2016].
- [9] „Spijvertering.info - Functies van de lever,” [Online]. Available: <http://www.spijvertering.info/over-spijvertering/lever/functies-van-de-lever/>. [Geopend 15 Februari 2016].
- [10] Victorho, „Functies van de lever,” 2007. [Online]. Available: <http://mens-en-gezondheid.infonu.nl/diversen/12501-functies-van-de-lever.html>. [Geopend 15 Februari 2016].
- [11] W. V. Steenbergen, „Gal en galwegen,” UZ Gasthuisberg, [Online]. Available: <http://www.llt.be/sites/default/files/pdf/Gal%20en%20galwegen.pdf>. [Geopend 23 Februari 2016].
- [12] „Gezondheidsplein,” 13 Januari 2015. [Online]. Available: <http://www.gezondheidsnet.nl/cholesterol/onverzadigde-en-verzadigde-vetten>. [Geopend 22 Februari 2016].
- [13] R. Taub, „Nature reviews,” *Nature reviews*, vol. 2004, p. 11, October 2004.

- [14] „Stamcellen (cellula praecursoria),” [Online]. Available: <http://mens-en-gezondheid.infonu.nl/diversen/131459-stamcellen-cellula-praecursoria.html#wat-zijn-stamcellen>. [Geopend 12 Februari 2016].
- [15] „Wikipedia - stamcel,” 19 Oktober 2015. [Online]. Available: <https://nl.wikipedia.org/wiki/Stamcel>. [Geopend 19 Februari 2016].
- [16] T. G. Bird, S. Lorenzini en S. J. Forbes, „Activation of stem cells in hepatic diseases,” *SpringerLink*, vol. 2008, nr. Cell and tissue research, pp. 331-283, 29 November 2007.
- [17] „Netherlands institute of regenerative medicine,” [Online]. Available: <http://www.regeneratieve-geneeskunde.nl/paginas/5-stamcellen-en-regeneratie.html>. [Geopend 22 Februari 2016].
- [18] M. Irwin en G. Derek, „Pathologies of the liver,” [Online]. Available: http://biomed.brown.edu/Courses/BI108/BI108_2002_Groups/liver/webpage/Patholiver.htm. [Geopend 11 Maart 2016].
- [19] „MaagLeverDarm - Wat is levercirrose?,” [Online]. Available: <https://www.mlds.nl/chronische-ziekten/levercirrose/>. [Geopend 12 April 2016].
- [20] „Leverproblemen: symptomen, oorzaken en behandeling,” 17 Maart 2009. [Online]. Available: <http://mens-en-gezondheid.infonu.nl/aandoeningen/33502-leverproblemen-symptomen-oorzaken-en-behandeling.html>. [Geopend 11 April 2016].
- [21] „MaagLeverDarmstichting - Leververvetting,” [Online]. Available: <https://www.mlds.nl/ziekten/leververvetting/>. [Geopend 12 Februari 2016].
- [22] „Gezondheid.be - Hepatitis verschillende soorten,” 3 November 2015. [Online]. Available: http://www.gezondheid.be/index.cfm?fuseaction=art&art_id=69. [Geopend 22 Februari 2016].
- [23] „Stichting tegen kanker,” [Online]. Available: <http://www.kanker.be/alles-over-kanker/alle-types-kanker/leverkanker>. [Geopend 22 Februari 2016].
- [24] „Maag Lever Darm stichting - PBC,” [Online]. Available: <https://www.mlds.nl/chronische-ziekten/primaire-biliaire-cirrose-pbc/>. [Geopend 15 Februari 2016].
- [25] „Herstellen van lever en nieren,” 15 Maart 2008. [Online]. Available: <http://chronische-vermoeidheidssyndroom.pilliewillie.nl/cvs-me/cvs.me.ontgiftig.lever.7.php>. [Geopend 22 Mei 2016].
- [26] „Antimitochondriale antilichamen,” [Online]. Available: <http://www.mavicevap.com/medi/nl/855.html>. [Geopend 20 Mei 2016].
- [27] „Een MRI-scan,” Gezondheidsnet, [Online]. Available: <https://www.gezondheidsnet.nl/diagnostiek/help-een-mri-scan>. [Geopend 25 Mei 2016].

- [28] „Lithiasismiddelen,” Zorginstituut Nederland, 1 April 2016. [Online]. Available: <https://www.farmacotherapeutischkompas.nl/bladeren-volgens-boek/inleidingen/inlithiasismiddelen>. [Geopend 22 Mei 2016].
- [29] „Ursodeoxycholzuur,” dokterdokter, 2016. [Online]. Available: <http://www.dokterdokter.nl/medicijn/ursodeoxycholzuur-tabletten-generiek/>. [Geopend 22 Mei 2016].
- [30] „Ursodeoxycholzuur,” Apotheek.nl, 27 November 2015. [Online]. Available: <http://www.apotheek.nl/medicijnen/ursodeoxycholzuur?product=ursodeoxycholzuur#belangrijk-om-te-weten-over-ursodeoxycholzuur>. [Geopend 22 Mei 2016].
- [31] „TYROBP TYRO protein tyrosine kinase binding protein [Homo sapiens (human)],” NCBI, 13 Mei 2016. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7305>. [Geopend 22 Mei 2016].
- [32] „CCL5 C-C motif chemokine ligand 5 [Homo sapiens (human)],” NCBI, 15 Mei 2016. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6352>. [Geopend 22 Mei 2016].
- [33] „CTSL cathepsin L [homo sapiens (human)],” NCBI, 8 Mei 2016. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1514>. [Geopend 22 Mei 2016].
- [34] L. Zhang, D. Ma, X. Li, C. Deng, Q. Shi, X. You, X. Leng, M. Li, F. Tang en F. Zhang, „Gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells in primary biliary cirrhosis,” *SpringerLink*, pp. 409 - 416, 20 Augustus 2013.
- [35] „IHCWorld - Hematoxylin and Eosin (H&E) staining protocol,” 2011. [Online]. Available: https://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/h&e_ellis.htm. [Geopend 10 April 2016].
- [36] G. Avwioro, „Histochemical uses of haematoxylin - a review,” *JPCS*, p. 11, 2011.
- [37] „Histopathologie en (immuno)histochemie,” Universitair ziekenhuis Gent, [Online]. Available: <http://www.apd-uzg.be/nl/histopathologie-en-immunohistochemie-86.htm>. [Geopend 19 Februari 2016].
- [38] „Immunohistochemie,” Antikankerfonds, 2016. [Online]. Available: <http://www.anticancerfund.org/nl/glossary/term/6746>. [Geopend 25 Februari 2016].
- [39] „Immunohistochemie en het mastcelpanel,” Vetipath, 2015. [Online]. Available: <http://www.vetipath.nl/index.php/onderzoeken/immunohistochemie-en-het-mastcelpanel>. [Geopend 25 Februari 2016].
- [40] „Vriescoupe,” LABPON, 2016. [Online]. Available: <http://www.labpon.nl/algemene-informatie/histologie/vriescoupe>. [Geopend 24 Februari 2016].
- [41] „Vriescoupe-onderzoek,” UZA, [Online]. Available: <http://labogidspatana.uza.be/Pages/Details.aspx?testid=13>. [Geopend 24 Februari 2016].

- [42] „Laser Microdissection,” [Online]. Available: http://cf.gu.se/english/Centre_for_Cellular_Imaging/techniques/Laser_Microdissection___Pr essure_Catapulting. [Geopend 28 Maart 2016].
- [43] K. Leuven, „Onderzoeksproject - Laser microdissectie,” [Online]. Available: <http://www.kuleuven.be/onderzoek/onderzoeksdatabank/project/3M09/3M090181.htm>. [Geopend 3 Maart 2016].
- [44] C. Zeiss, „Laser capture microdissection: live cells and molecular analysis,” Zeiss.
- [45] „Histology-world,” [Online]. Available: <http://www.histology-world.com/stains/stains.htm>. [Geopend 4 Juni 2016].
- [46] S. Eeckelaerts, *Isolatie van DNA en RNA*, PXL: PXL-Tech, 2015.
- [47] S. Eeckelaerts, *Real-time PCR*, PXL: PXL-Tech, 2016.
- [48] Hepatic structure of liver lobule [Online]. Available: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/05/Hepatic_structure.png/220px-Hepatic_structure.png. [Geopend 22 Februari 2016].
- [49] „Gezondheidsfreaks,” [Online]. Available: <http://www.gezondheidsfreaks.nl/wp-content/uploads/2015/12/Verzadigd.png>. [Geopend 12 Februari 2016].
- [50] „Het blad - Celregeneratie,” [Online]. Available: <http://www.hetblad.be/2013/12/18/voeding-en-gezondheid/celregeneratie/>. [Geopend 23 Februari 2016].
- [54] „ConsuMed,” 2016. [Online]. Available: <http://www.consumed.nl/ziekten/leverontsteking>. [Geopend 12 Februari 2016].
- [55] „De wereld onder de microscoop,” [Online]. Available: <http://www.ronaldschulte.nl/weefsel-uitnemen-en-fixeren.html>. [Geopend 28 Februari 2016].
- [56] R. Ellis, „Hematoxylin and Eosin (H&E) staining protocol,” IHCWORLD , 2011. [Online]. Available: http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/h&e_ellis.htm. [Geopend 20 Februari 2016].
- [57] A. Zwijsen en D. Huylebroeck, „Muis in het ziekenhuis,” Academische stichting Leuven, [Online]. Available: <http://www.tijdschriftkarakter.be/muis-in-het-ziekenhuis/>. [Geopend 3 Maart 2016].
- [58] Designua, Artist, *Levercirrose en normale lever structuur van de lever vectordiagram*. [Art]. 2016.
- [59] „Gezonder leven - Hoe een "vette lever" genezen?,” [Online]. Available: <http://gezonderleven.com/hoe-vette-lever-genezen/>. [Geopend 12 April 2016].
- [60] „Primaire biliaire cirrose,” 2016. [Online]. Available: <https://www.patient1.nl/encyclopedie/primaire-biliaire-cirrose>. [Geopend 20 Maart 2016].

- [61] „Diagnostiek zwangerschaps-cholestase: galzure zouten,” Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium, [Online]. Available: <http://www.gkcl.nl/laboratoriumtesten/alfabetisch/galzure-zouten/>. [Geopend 9 Mei 2016].
- [62] „Menselijk lichaam - Lever,” [Online]. Available: <http://www.menselijk-lichaam.com/spijsvertering/lever/>. [Geopend 22 Mei 2016].
- [63] L. microsystems, Artist, *Lasermicrodissectie toestel met computerscherm*. [Art].

Figurenlijst

| | |
|---|----|
| Figuur 1: Morfologie van de lever [62]..... | 11 |
| Figuur 2: Structuur van een leverkwab [1]..... | 11 |
| Figuur 3: Invloed van gal op vetdruppels [61]..... | 13 |
| Figuur 4: Structuur verzadigd en onverzadigd vetzuur [49]..... | 13 |
| Figuur 5: Differentiatie van stamcellen [15]..... | 15 |
| Figuur 6: Pathologie leveraandoeningen [18]..... | 16 |
| Figuur 7: Levercirrose [58]..... | 17 |
| Figuur 8: Leververvetting [59]..... | 17 |
| Figuur 9: Principe lasermicrodissectie [42]..... | 23 |
| Figuur 10: Amplificatieplot [47]..... | 26 |
| Figuur 11: Ct-waarde [47]..... | 26 |
| Figuur 12: Leverweefsel van muismodel met PBC..... | 48 |
| Figuur 13: Leverweefsel van wildtype muismodel..... | 48 |
| Figuur 14: Leverweefsel gekleurd met H&E-kleuring..... | 50 |
| Figuur 15: Leverweefsel gekleurd met keratine kleuring..... | 50 |
| Figuur 16: Leverweefsel met vene en lymfocytair infiltraat..... | 51 |
| Figuur 17: Actief ziekteproces van PBC..... | 52 |
| Figuur 18: Vergevoerd ziektestadium bij PBC..... | 52 |
| Figuur 19: Leverweefsel met PBC - Overzicht weefsel..... | 53 |
| Figuur 20: Leverweefsel met galweg - Voor lasermicrodissectie..... | 54 |
| Figuur 21: Leverweefsel met galweg - Snijlijn voor lasermicrodissectie..... | 54 |
| Figuur 22: Leverweefsel met galweg - Na lasermicrodissectie..... | 54 |
| Figuur 23: Leverweefsel met twee galwegen - Voor lasermicrodissectie..... | 55 |
| Figuur 24: Leverweefsel met twee galwegen - Snijlijn voor lasermicrodissectie..... | 55 |
| Figuur 25: Leverweefsel met twee galwegen - Na lasermicrodissectie..... | 55 |
| Figuur 26: Leverweefsel met lymfocytair infiltraat, vier galwegen en een vene - Voor lasermicrodissectie..... | 56 |
| Figuur 27: Leverweefsel met lymfocytair infiltraat, vier galwegen en een vene - Snijlijn voor lasermicrodissectie..... | 56 |
| Figuur 28: Leverweefsel met lymfocytair infiltraat, vier galwegen, een vene - Na lasermicrodissectie..... | 56 |
| Figuur 29: Lasermicrodissectie toestel met computerscherm [63]..... | 39 |

Tabellenlijst

| | |
|--|----|
| Tabel 1: Overzicht besmetting, vaccin en genezing bij verschillende soorten hepatitis [22] | 18 |
| Tabel 2: Overzicht gebruikte glaswerk en disposables bij het maken van vriescoupes..... | 28 |
| Tabel 3: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen bij het maken van vriescoupes | 28 |
| Tabel 4: Overzicht gebruikte apparatuur voor het snijden van vriescoupes | 30 |
| Tabel 5: Overzicht gebruikte glaswerk en disposables voor het snijden van vriescoupes..... | 30 |
| Tabel 6: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor het snijden van vriescoupes..... | 30 |
| Tabel 7: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen bij hematoxyline - eosinekleuring | 32 |
| Tabel 8: Overzicht gebruikte apparatuur bij immunohistochemische kleuring op vriescoupes..... | 34 |
| Tabel 9: Overzicht gebruikt glaswerk en disposables bij immunohistochemische kleuring op vriescoupes..... | 34 |
| Tabel 10: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen bij immunohistochemische kleuring op vriescoupes..... | 35 |
| Tabel 11: Overzicht gebruikte glaswerk en disposables voor de cresyl violet kleuring | 37 |
| Tabel 12: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor cresyl violet kleuring | 37 |
| Tabel 13: Overzicht gebruikte apparatuur voor lasermicrodissectie | 39 |
| Tabel 14: Overzicht gebruikte apparatuur voor RNA-extractie | 47 |
| Tabel 15: Overzicht gebruikte glaswerk en disposables voor RNA-extractie..... | 47 |
| Tabel 16: Overzicht gebruikte stoffen en oplossingen voor RNA-extractie | 47 |

Bijlagen

/

