



Metod för blodflödesmätningar med fluorescerande mikrosfärer

DANIEL JOHANSSON, VICTORIA HELDESTAD,
ANN GÖRANSSON NYBERG

FOI är en huvudsakligen uppdragsfinansierad myndighet under Försvarsdepartementet. Kärnverksamheten är forskning, metod- och teknikutveckling till nytta för försvar och säkerhet. Organisationen har cirka 1350 anställda varav ungefär 950 är forskare. Detta gör organisationen till Sveriges största forskningsinstitut. FOI ger kunderna tillgång till ledande expertis inom ett stort antal tillämpningsområden såsom säkerhetspolitiska studier och analyser inom försvar och säkerhet, bedömning av olika typer av hot, system för ledning och hantering av kriser, skydd mot och hantering av farliga ämnen, IT-säkerhet och nya sensorers möjligheter.



FOI
Totalförsvarets forskningsinstitut
NBC-skydd
901 82 Umeå

Tel: 090-10 66 00
Fax: 090-10 68 00

www.foi.se

FOI-R--1637--SE
ISSN 1650-1942

Metodrapport
December 2005

NBC-skydd

Daniel Johansson, Victoria Heldestad,
Ann Göransson Nyberg

Metod för blodflödesmätningar med fluorescerande mikrosfärer

Utgivare FOI - Totalförsvarets forskningsinstitut NBC-skydd 901 82 Umeå	Rapportnummer, ISRN FOI-R--1637--SE	Klassificering Metodrapport
	Forskningsområde 3. Skydd mot NBC och andra farliga ämnen	
	Månad, år December 2005	Projektnummer A 438
	Delområde 32 B- och C-forskning	
	Delområde 2	
Författare/redaktör Daniel Johansson Victoria Heldestad Ann Göransson Nyberg	Projektledare Ann Göransson Nyberg	
	Godkänd av	
	Uppdragsgivare/kundbeteckning Fö	
	Tekniskt och/eller vetenskapligt ansvarig	
Rapportens titel Metod för blodflödesmätningar med fluorescerande mikrosfärer		
Sammanfattning <p>Principen bakom blodflödesmätningar med mikrosfärer är enkel och genial. Genom att injicera mikrosfärer direkt in i hjärtat hos försöksdjuret kan man sprida dessa med cirkulationen. Eftersom sfärerna har en något större diameter än de finaste kapillärerna ute i kroppens olika vävnader kommer dessa att fastna när de försöker passera kapillärbädden. Om man utgår från att mikrosfärerna är homogent blandade när de lämnar hjärtat, kan man i ett senare skede preparera fram vävnad och mäta hur många mikrosfärer som sitter fast i kapillärbädden i den vävnadsbiten. Antalet mikrosfärer som har fastnat är direkt proportionellt mot mängden blod som passerade den aktuella vävnaden vid tidpunkten just efter injektionen. Tidigare har man använt sig av radioaktiva sfärer för att mäta hur mycket som har fastnat i en vävnad. Om mikrosfärer märkta med olika isotoper används är det möjligt att mäta blodflödet till samma vävnader vid olika tillfällen i ett och samma försöksdjur. Problemet med radioaktiva sfärer är kort halveringstid, kostnaden och risken för personalen. Därför har man tagit fram en ny metod med olika fluorescerande mikrosfärer som markörer. Dessa måste dock friprepareras från vävnaden innan en kvantifiering kan ske, vilket inte var fallet för de radioaktiva mikrosfärerna som kunde kvantifieras där de satt i vävnaden. Syftet med denna studie är att på FOI NBC-skydd etablera metoden för mätning av blodflöde med fluorescerande mikrosfärer vid tre olika tidpunkter i ett och samma djur.</p>		
Nyckelord Fluorescerande microsfärer, blodflöde, cerebralt, regionalt		
Övriga bibliografiska uppgifter	Språk Svenska	
ISSN 1650-1942	Antal sidor: 27 s.	
Distribution enligt missiv	Pris: Enligt prislista	

Issuing organization FOI – Swedish Defence Research Agency NBC Defence SE-901 82 Umeå	Report number, ISRN FOI-R--1637--SE	Report type Methodology report
	Programme Areas 3. NBC Defence and other hazardous substances	
	Month year December 2005	Project no. A 438
	Subcategories 32 Biological and Chemical Defence Research	
	Subcategories 2	
Author/s (editor/s) Daniel Johansson Victoria Heldestad Ann Göransson Nyberg	Project manager Ann Göransson Nyberg	
	Approved by	
	Sponsoring agency Department of defence	
	Scientifically and technically responsible	
Report title (In translation) Method for blood flow measurements with fluorescent microspheres		
Abstract <p>The principle of blood flow measurements using microspheres is simple and ingenious. By injecting microspheres directly into the heart of experimental animals, the spheres will be spread through blood circulation. Since the spheres have a larger diameter than the smallest capillaries in the different tissues of the body, they will be captured when trying to get through the capillary bed. Assuming that microspheres are mixed homogenously when they leave the heart, the spheres that are trapped within different tissues will be in proportional relation to the blood flow in that tissue at the time of the injection. Previously, radioactive spheres have been used to measure how much is trapped in the tissue. It is possible to measure blood flow at different times in the same animal, if different isotopes are used. The problems associated with radioactive microspheres are short half-life, high costs and risks for the users. Today, different fluorescent microspheres can be used as markers with advantages such as long validity, low costs and safety. The disadvantage is that the spheres have to be prepared from the tissue prior to quantification. The purpose of the present study is to establish a method to measure blood flow using fluorescent microspheres, in experimental animals, at FOI NBC Defence in Umeå.</p>		
Keywords Fluorescent microspheres, blood flow, cerebral, regional		
Further bibliographic information	Language Swedish	
ISSN 1650-1942	Pages 27 p.	
	Price acc. to pricelist	

INNEHÅLL

Inledning	5
Bakgrund – cerebralt och regionalt blodflöde	5
Blodflödesmätningar med hjälp av mikrosfärer	6
Material och metod	7
Apparatur	7
Kemikalier	7
Djurhantering	7
Preparering av djur	7
Tracheostomi	8
Kärlkateterisering	8
Hjärtkateterisering	8
Suprapubiskateterisering	8
Preparering av FMS för injektion	9
Injektion av FMS	9
Fysiologiska parametrar och blodprover	10
Experimentets avslutande	10
Analys av FMS i vävnader och blod	10
Optimering av excitations- och emmisionsvåglängder	10
Standardkurvor för FMS	10
Dag 1 – Digestion av vävnad	11
Dag 2 – Extraktion av fluorescens	12
Dag 2 – Fluorescensmätning av prover	12
Resultat	13
Optimering av instrumentinställningar	13
Generering av standardkurvor	13
Blodflödesmätningar	14
Diskussion	15
Referenser	17
Bilaga I: Description of the Sample Preparation tube set	19
Introduction	19
Preparation protocol for tissue samples	20
Preparation protocol for lung tissue samples	23
Preparation protocol for bone tissue samples	23
Preparation protocol for blood samples	24
Bilaga II: Protokoll för hantering av FMS	25
Construction of Standard Curves	25
Making Control Solutions	25
Method for Reference Blood Flow Sampling	27

Inledning

Bakgrund – cerebralt och regionalt blodflöde

Organofosfatföreningar, som nervgaser och vissa insektsbekämpningsmedel, utövar sin effekt främst genom att hämma enzymet acetylkolinesteras (AChE). Detta leder till att acetylkolin (ACh), som normalt bryts ner av AChE, ökar. En ökad koncentration av signalsubstansen ACh leder till en ökad signalöverföring i nervsystemet och kan i slutändan mynna ut i kramper, andningsstillestånd och död (McDonough and Shih, 1993; Taylor, 1996).

För att studera så väl effekterna av nervgaser som effekterna av deras motmedel, är det viktigt att även registrera fysiologiska parametrar i organismen. Bland dessa kan nämnas blodflöde, blodtryck, EEG, EKG och andning. Resultat från morfologiska och fysiologiska studier tyder på att kolinerga mekanismer spelar en betydelsefull roll i kontrollen av cerebralt och regionalt blodflöde. Acetylkolin, som är den huvudsakliga neurotransmittorn i det kolinerga nervsystemet, är en viktig regulator för det lokala blodflödet (Elhousseiny et al., 1999). En förändring i blodflödet kan vara avgörande för olika funktioner i kroppen. T ex kan ett ökat blodflöde i lever och njure leda till en ökad metabolism och utsöndring av olika ämnen, såväl läkemedel som giftiga substanser (Maxwell et al., 1987). Vidare kan ett ökat eller minskat blodflöde till hjärnan förändra flera centralt styrda mekanismer som t ex andning, blodtryck och hjärtfrekvens. Hjärnans naturliga skydd för främmande substanser, blod-hjärnbarriären, kan öka respektive minska sin genomsläpplighet vid förändrat blodflöde vilket kan leda till förödande konsekvenser.

Vi har i en tidigare studie visat att nervgasen som dramatiskt påverkar blodflödet till hjärnan och att detta kan motverkas om motmedel ges som förbehandling eller inom en minut efter påbörjad förgiftning (Göransson Nyberg & Cassel, 2001). Vilka mekanismer som ligger bakom denna effekt är ännu inte klarlagda. Mycket tyder på att hormonet TRH (thyroidea releasing hormone) är involverat (Koskinen 1989; Kubek 1997), även signalsubstanserna acetylkolin och noradrenalin har nämnts som kandidater (el-Etri et al., 1992).

Vidare studier inom detta område är nödvändigt och kan på sikt leda till förbättrade behandlingsmetoder vid förgiftningar. Även sjukdomar som Alzheimers och epilepsi kan dra fördel av denna kunskap, då mekanismer som är involverade i dessa tillstånd till stora delar även är involverade vid en nervgasförgiftning (Takeuchi et al., 1999).

Blodflödesmätningar med hjälp av mikrosfärer

Det finns olika metoder för att mäta blodflöde i djur. Vi har använt oss av mikrosfärsteknik som innebär att man injicerar mikrosfärer direkt in i hjärtat hos försöksdjuret. Dessa sprids då ut i vävnaderna med cirkulationen. Eftersom sfärerna har en något större diameter än de finaste kapillärerna ute i kroppens olika vävnader kommer dessa att fastna när de försöker passera kapillärbädden. Om man utgår från att mikrosfärerna är homogent blandade när de lämnar hjärtat, kan man i ett senare skede preparera fram vävnad och mäta hur många mikrosfärer som sitter fast i kapillärbädden i vävnadsbiten. Antalet mikrosfärer som har fastnat är direkt proportionellt mot mängden blod som passerade den aktuella vävnaden vid tidpunkten just efter injektionen. Tidigare har man använt sig av radioaktiva sfärer för att mäta hur mycket som har fastnat i en vävnad. Problem associerade med radioaktiva sfärer är kort halveringstid, hög kostnad och att radioaktiviteten innebär en risk för personalen. Därför har man tagit fram en ny metod med fluorescerande mikrosfärer som markörer (Glenny et al., 1993; Prinzen et al., 1994, van Oosterhout et al., 1995). Dessa måste friprepareras från vävnaden innan en kvantifiering kan ske, vilket inte var fallet för de radioaktiva mikrosfärerna som kunde kvantifieras där de satt i vävnaden. Extraktionen av de fluorescerande mikrosfärerna från vävnaden sker genom att vävnaden löses upp med koncentrerad kaliumhydroxid vid en temperatur av 60°C. Lösningen filtreras sedan genom ett filter som är finmaskigare än mikrosfärernas diameter. Den fluorescerande färgen som finns inuti mikrosfärerna extraheras sedan ut genom att ett organiskt lösningsmedel löser upp plasten som sfärerna är gjorda av. Därefter kan en kvantifiering av fluorescensen göras i en fluorometer. Man kan utnyttja möjligheten att mäta blodflödet vid flera tidpunkter hos samma djur genom att injicera sfärer med olika fluorescerande färger vid olika tidpunkter. Efter att djuret avlivats kan man då för varje vävnad läsa av blodflödet efter den första injektionen då till exempel en gulgrön sfär sprutades in, efter den andra injektionen då en orange sfär sprutades in och så vidare. Det finns exempel då upp till 15 olika sfärer har använts i ett och samma djur, men då måste man korrigera för att vissa färger kan ha delvis överlappande excitations- och emissionstoppar. Detta kan undvikas när man väljer att studera färre tidpunkter om man väljer att använda färger vars excitations- och emissionstoppar är tydligt skilda från varandra.

Den här studien syftade till att, här på FOI, etablera metoden för mätning av blodflöde i råttor vid tre olika tidpunkter i samma djur.

Material och metod

En utförligare beskrivning av hela metoden kan fås på:

<http://fmrc.pulmcc.washington.edu/fmrc.shtml>

Apparatur

Gould P2310 transducer (Gould Inc., Cal., USA). ABB SE 120 recorder (ABB Goerz AG, Wien, Österrike). ABL 520 (Radiometer, Köpenhamn, Danmark). MacLab (ADInstruments Pty Ltd). Temperature controller, CMA/150 (Microdialysis, Solna, Sverige). Infusionspump (Kd Scientific Inc., Holliston, USA). Vortex, Reax 2000 (KEBO-Lab, Spånga, Sverige). Värmeskåp EHRET (Labor und pharmatechnik, Schönwalde, Tyskland). Fluorometer Fluoromax-2 (Instruments S.A, Inc, Edison, New Jersey, USA). Centrifug Allegra 25R(Beckman Coulter, Inc, Palo Alto, Kalifornien, USA).

Kemikalier

Inactin[®], 1g/ml (SIGMA). Polythene Tubing, non sterile (SIMS Portex Ltd, CT21 6JL, UK). Ringer Acetat, NaCl, Pentobarbitalnatrium, 96-% Etanol och Heparin 5000 IE (Apoteket). FluoSpheres[®] (Molecular Probes, Inc). Tween80 (Fluka). K₂HPO₄ och KH₂PO₄ (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, Spanien). Kaliumhydroxid (EKA Chemicals, AKZO Nobel, bohus, Sverige). Metanol (MERCCK). Isopropanol (SIGMA). Filtreringsenheter för mikrosfärer (Kunststoff u. MetallProdukte Kappel-Grafenhausen, Tyskland). Mikrosfärer (Molecular Probes, Inc).

Djurhantering

Wistar råttor (B & K, Sollentuna, Sverige). Djuren är placerade tre per bur med fri tillgång av pellets och vatten. Rumstemperaturen är 22 ± 2°C med 50 ± 5 % relativ luftfuktighet och en 12 h ljus/mörker cykel med ljus på vid 06.00. Råttorna acklimatiseras minst en vecka innan experimentet startas. Djurexperimenten är godkända av den lokala etiska kommittén enligt nationella lagar (SFS 1988:539, LSFS 1989:41).

Preparering av djur

Wistar råttor, vikt 300-400 g. Djuren sövs med Inactin[®], dos 120 mg/kg kroppsvikt (spädning 100 mg/ml), vilket injiceras intraperitonealt (i.p). Råttorna placeras därefter på en värmedyna för att bibehålla kroppstemperaturen, ca 37-38°C.

Tracheostomi

Råttorna försäkras fria luftvägar genom att ett plaströr förs in ca 1 cm via ett hål i trachea. Kortfattat; huden på halsen klipps upp, musklerna dras isär, trachea friläggs försiktigt och trådar placeras distalt och proximalt. Ett snitt görs mellan två broskringar, ca halva omkretsen. Plaströret förs in och förankras. (Vid försäkran om fria luftvägar får plaströret inte föras in för långt, det kan täppa till bronkerna, röret måste dessutom vara rakt avklippt).

Kärlkateterisering

För att kunna bibehålla normal vätskebalans hos djuret ges kontinuerlig infusion av ringeracetat via v. femoralis. Djuret rakas i ljumsken, huden klipps upp och kärnen friläggs. Alla hinnor tas bort. Distalt om infusionsstället knyts kärlet av med en tråd och en annan knut förbereds proximalt. Venen sträcks och ett litet hål klipps i kärlet. Med hjälp av en urmakarpincett förs katetern in ca 4 cm. Därefter sätts en tryckkateter in (vä femoralisartär) samt en kateter för att ta referensblod/blodgas (hö femoralisartär). Detta görs med ett liknande tillvägagångssätt som med venkatetern förutom att en klämma används för att strypa blodflödet proximalt om artärsnittet.

Hjärtkateterisering

För att komma ner i vä kammare sätts en kateter in i hö carotis. Halsen rakas, huden klipps upp och musklerna dras försiktigt isär. Carotis dissekeras fram försiktigt, kärlet friläggs från hinnor och separeras från N. Vagus. Kärlet uppåt mot huvudet knyts åt ordentligt. En knut nedåt förbereds. En artärklämma sätts bakom den förberedda (men ej knutna) knuten. Ett litet hål klipps med en kärlsax. En urmakarpincett används för att hålla upp hålet. Snöret runt kärl/kateter knyts åt lagom hårt och katetern¹ förs in. Via en tryckmätare följs trycket i katetern och när trycket faller samt att ett typiskt ”pulserande” ljud hörs vet man att man ligger i vänster kammare.

Suprapubiskateterisering

Därefter sätts en urinkateter in (suprapubiskt) för att kunna samla urin. Huden ovan urinblåsan klipps upp, musklerna i bukhålan ovan urinblåsan klipps/drags försiktigt isär. Urinblåsan tas fram genom buksnittet och en peang fästes i toppen på blåsan. En knut längst ner på blåsan förbereds med

¹ För att underlätta att veta ungefär hur långt katetern ska föras in kan man märka ut 35mm (till råttor på ca 300-400 g).

ett snöre som inte är alltför vasst. Man klipper ett hål mitt på toppen av urinblåsan. Urinkatetern (med flens) förs in nästan ända mot botten av urinblåsan och snöret knyts åt. Sist limmas huden igen så att inte såret ligger öppet.

Preparering av FMS för injektion

FMS (fluorescerande mikrosfärer) från olika partier ska inte blandas eftersom "färgningarna" kan skifta. Supernatanten i flaskan ska vara klar och ren i färgen när den tas ut från kylskåpet. Sfärerna skall göras i ordning strax före injektionen.

Först virvlas sfärerna (flaskan) ca 5-15 sekunder. Därefter placeras flaskan i ultraljudsbad under 2-10 min för att lösa upp mikrosfärerna. Precis före injektionen virvlas flaskan igen och beräknad volym dras upp i sprutan. Sedan man dragit upp sfärerna i sprutan får de inte klumpas ihop. Om injektionen blir fördröjd, skaka/virvla igen.

Injektion av FMS

Ungefär 10 sekunder före själva injektionen av sfärerna startas, börjar man ta referensblodet. Blodet får droppa ut av sig själv från den kateter där referensprovet tas. Det är viktigt att referensprovet tas under exakt en minut eftersom referensvärdet används för att räkna fram blodflöden i respektive organ. Hjärtkatetern kortas så mycket som möjligt och en peang används för att förhindra att blod ska läcka från katetern. Strax före mikrosfärintjektionen sätts sprutan med sfärerna till katetern så att blod från hjärtat får komma upp i den. Innan sprutan sätts till får blod komma ytterst ut till kateterns slut, viktigt är att förhindra att luft kommer emellan. (Dessutom har blodtrycket en chans att stabilisera sig). Sfärerna injiceras sakta och stadigt (detta ger en uniform mixning av sfärerna, en bolusinjektion ger ofta en nivåuppdelning av sfärerna). Vänster-hjärt injektionen tar ca 15 sekunder.

Efter injektionen spolas katetern igenom (minimum 2 ggr volymen av det döda rummet). Referensblodprovet måste vara klart innan katetern spolas igenom (även detta ska göras sakta för att inte påverka cirkulationen). Nya sprutor tas för varje mikrosfärintjektion. Referensblodet samlas upp i förvägda filter (Figur 1).

Fysiologiska parametrar och blodprover

Fysiologiska parametrar såsom medelartärblodtryck (MAP), respirationsfrekvens (RF) [/min], hjärtfrekvens (HF) [/min] och temperatur [°C] registreras kontinuerligt. Följande blodprover tas enligt schema (pH, pCO₂, PO₂, Hb [g/l], Hct [%]), dessutom tas ett referensprov för varje färg (mikrosfär) som injiceras.

Experimentets avslutande

Djuren avlivas med en överdos av pentobarbitalnatrium. Därefter dissekeras råttan och man plockar ut de organ där man vill mäta regionalt blodflöde. I den här studien valdes följande organ; höger och vänster hjärnhalva, lillhjärnan, hjärta, lever, mjälte, lungor (höger och vänster), njurar (höger och vänster), diafragma och bukspottskörtel. Vävnadsbitarna placeras i förvägda filterhållare.

Analys av FMS i vävnader och blod

Optimering av excitations- och emmissionsvåglängder

Fem µl 0.2% FluoSpheres® (Molecular Probes, Inc), vilket motsvarar ~5,000 fluorescerande mikrosfärer, sätts till 10 ml organiskt lösningsmedel (vi använder 2-(2-ethoxyethoxy) etyl acetat). Detta ger en koncentration på ~500 fluorescerande mikrosfärer/ml för vilken fluorescensintensiteten mäts.

En emissionsscanning med en fast excitationsvåglängd utförs (den våglängd som rekommenderas på flaskan används). Den bästa emissionsvåglängden noteras och en excitationsscanning med denna optimerade emissionsvåglängd körs. Det kontrolleras att excitationstoppen och emissionstoppen inte överlappar och att de färger som ska användas i försöket inte heller överlappar. Bandpassfiltren varieras för excitation och emission för att uppnå optimalt signalbrusförhållande.

Standardkurvor för FMS

Den mängd mikrosfärer som behövs sättas till 10ml lösningsmedel för att mätta detektorn hos instrumentet beräknas. Denna stocklösning används för att göra en spädningsserie. Pipetteringen görs mycket noggrant! Sfärkoncentrationen för varje spädning beräknas. När standardkurvan konstrueras plottas intensiteten på y-axeln mot koncentrationen sfärer på x-axeln.

Dag 1 – Digestion av vävnad

Färska digestionslösningar blandas på morgonen. 222,44 g KOH löses i 1000 ml vatten varefter 10 ml 2 % Tween80 tillsätts under lagom kraftig omrörning (alltför kraftig genererar skum). För digestion av lungorna löses 5,56 g KOH i 96 % etanol och ingen tween80 tillsätts. Fosfatbuffert blandas genom att lösa 29,90 g Dikaliumväte-fosfatrihydrat i 800 ml avjoniserat vatten. 5,88 g kaliumdivätefosfat löses i 200 ml avjoniserat vatten. Därefter blandas de båda fosfatlösningarna.

Organen vägs i de filter de ligger innan digestionen initieras. Filtren sätts ned i plastburkar och 15 ml digestionslösning tillsätts till varje burk. Till lungorna tillsätts den etanolbaserade digestionslösningen. Ovanpå digestionslösningen sätts 1,5 ml 100 % isopropanol. Ingen isopropanol sätts till filtren med lungvävnad. Locken sätts på burkarna och filtren inkuberas över natt i 60°C i värmeskåp.

Dag 2 – Extraktion av fluorescens

Filterburkhållare och provuppsamlare (Figur 1) monteras ihop och märks upp. Digestionslösning avlägsnas med hjälp av vakuumfiltrering. Insidan på filterburken sköljs noggrant med 15 ml fosfatbuffert. Utsidan av burken tvättas genom att doppa ned denna i en bägare med fosfatbuffert. Filterburkarna placeras i 50 ml slask-Falconrör och centrifugeras vid 4000 varv/min i 3 minuter. Filterburkarna flyttas över till provprocessorenheten och exakt 1,5 ml lösningsmedel tillsätts och provet vortexas omedelbart. Efter 5 minuter tillsätts ytterligare exakt 1,5 ml lösningsmedel. Efter ytterligare ett par minuter centrifugeras provet vid 4000 varv/min i 3 minuter.



Figur 1.
Filtreringsenheten består av filter, filterhållare, provuppsamlare och skruvlock till filterhållaren och provuppsamlaren

Dag 2 – Fluorescensmätning av prover

Lampan på Fluorometern tänds innan strömbrytaren till instrumentet slås på. Därefter loggas datorn på. När instrumentet är redo startas mjukvaran via "Instrument control center". När meddelandet "Bring hardware to last positions" kommer upp klickar man på "OK". Real-time-Display-programmet öppnas och slit width sätts till 2 nm (1,9950 nm) för både excitation och emission. Constant Wavelength Application öppnas och inställningarna för de aktuella sfärerna laddas. Först mäts ett blankprov med enbart lösningsmedel för att korrigera för bakgrunden. Därefter mäts fluorescens på 2,7 ml prov. Om intensitetsvärdet är så pass högt att det riskeras att ligga utanför den linjära delen av standardkurvan späds provet tio gånger och läses om. Mellan varje mätning tvättas kyvetten med metanol.

Ett blodprov med känd flödes hastighet från femoralisartären tas vid tidpunkten för injektion, för att kunna använda som referens vid beräkningar av flödet till respektive vävnad. Om fluorescensen som extraherats från ett vävnadsprov betecknas f_{li} där i är provnumret, f_{lref} är referensprovets fluorescens, och R är flödes hastigheten från referensprovet i ml/min, så kan flödet till vävnadsprov i , Q_i , räknas fram med ekvationen:

$$Q_i(\text{ml/min}) = (f_{li}/f_{lref}) \cdot R(\text{ml/min}).$$

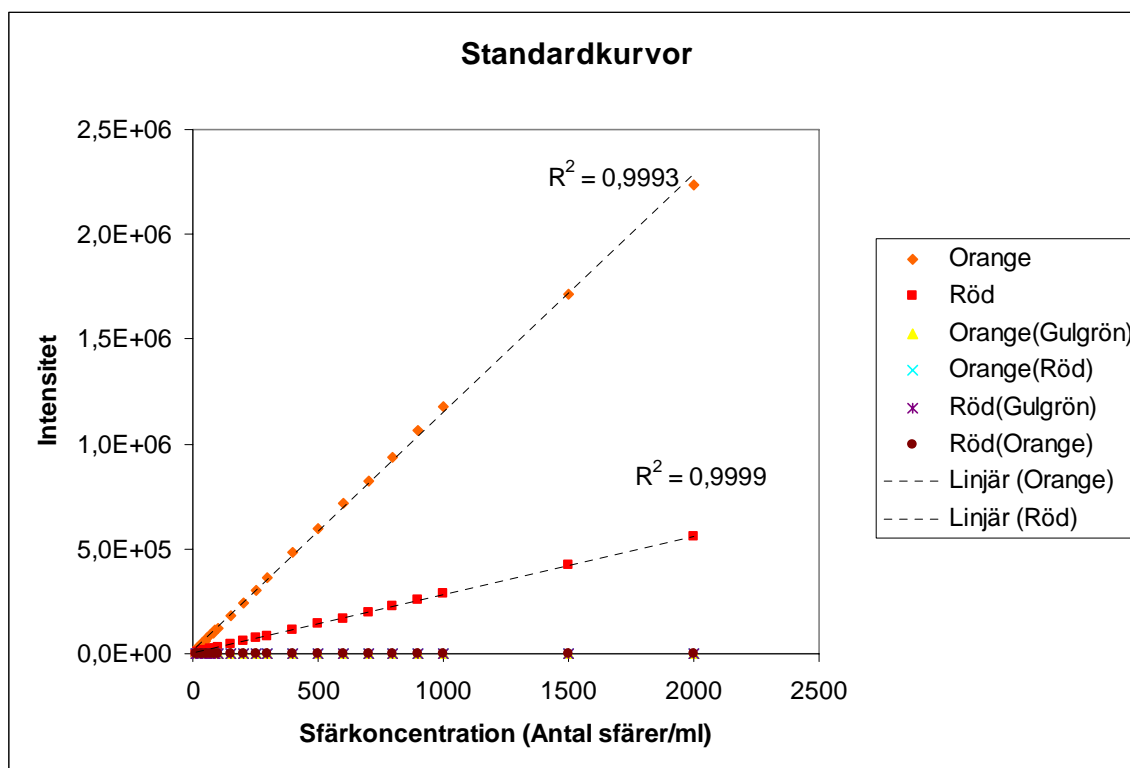
Resultat

Optimering av instrumentinställningar

Excitations- och emissionsvåglängderna för de fluorescerande mikrosfärer som skulle användas för blodflödesmätningarna optimerades. Dessa våglängder användes för att etablera en standardkurva för respektive färg (gulgrön, orange och röd). För optimalt signalbrusförhållande användes bandpass på 2 nm för både excitation och emission.

Generering av standardkurvor

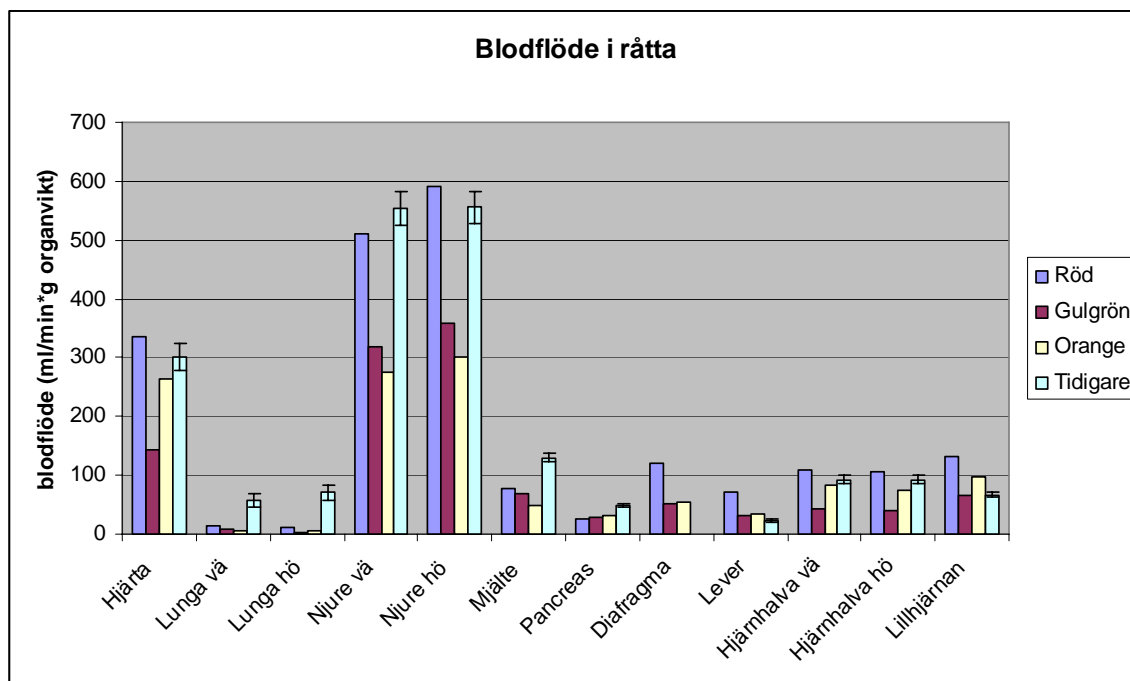
Standardkurvorna visade att ett linjärt samband mellan koncentrationen av fluorescerande mikrosfärer och fluorescensintensitet kunde observeras upp till ca 2000 sfärer/ml. Vidare kunde man se att inga problem med överlappande toppar mellan de olika färgerna förelåg (Figur 2).



Figur 2. Standardkurvor för två av mikrosfärerna, orange och röd. Övriga serier representerar spädningsserie med orangea sfärer avlästa vid gulgrön våglängd "Orange (Gulgrön)", avlästa vid röd våglängd "Orange (Röd)" och så vidare.

Blodflödesmätningar

Resultaten från ett av dessa försök illustreras i figur 3.



Figur 3. Blodflödesvärden från ett djur vid tre olika tidpunkter; Tidpunkt 1 där röda sfärer injicerades (Röd), Tidpunkt 2 (Orange) och Tidpunkt 3 (Gulgrön). Serien ”Tidigare” är publicerade resultat från de Garavila et al. Inga resultat för normalflöde i Diafragma fanns tillgängliga.

Diskussion

Denna rapport visar att blodflöde i råttor, cerebralt och regionalt, på ett enkelt sätt kan mätas med hjälp av fluorescerande mikrosfärer. I jämförelse med radioaktiva mikrosfärer har fluorescerande sfärer längre hållbarhet, är billigare och även säkrare att arbeta med. Fortfarande finns fördelarna kvar med tekniken, d v s att varje djur är sin egen kontroll och att flera mätningar kan göras på samma djur.

Det finns dock några viktiga faktorer som måste säkerställas för att få tillförlitliga resultat från blodflödesmätningar med såväl fluorescerande mikrosfärer som radioaktiva. Nyckeln till fina blodflödesmätningar är att kontrollera dessa steg:

Kvantifiera mikrosfärerna

Det första som måste kontrolleras är att man kan kvantifiera mikrosfärerna på ett bra sätt. Detta görs enklast genom att konstruera standardkurvor som uppvisar ett linjärt samband mellan sfärkoncentration och fluorescensintensitet. Man måste även kontrollera att man inte har något överlapp mellan excitation- och emissionstoppar från de olika färger man har tänkt använda. När man kvantifierar är det viktigt att tänka på att koncentrationen av den fluorescerande färgen avgör hur stark signalen blir. Det är därför av yttersta vikt att den volym lösningsmedel som används är så exakt pipetterad som möjligt. Eftersom det organiska lösningsmedlet är väldigt visköst bör man kontrollera att allt lösningsmedel verkligen lämnar pipettspetsen.

Kontroll av fysiologiska parametrar

Det andra som måste fungera är att depositionen av mikrosfärerna sker på ett sätt som speglar blodflödet i råttan. Stora förändringar i blodtryck påverkar blodflödet till de olika organen olika. Man bör ha i åtanke att råttorna är känsliga när de sövs ned; fria luftvägar, bra kroppstemperatur och infusion av vätska så att cirkulationen inte påverkas i onödan är viktigt vid blodflödesmätningar.

God experimentell teknik

Vid injicering av mikrosfärerna är det extremt viktigt att man injicerar sakta och stadigt, samt väntar till dess att referensblodprovet är tagit innan man spolrar igenom det döda rummet. Detta för att mikrosfärerna ska kunna fördelas på ett bra sätt samt att cirkulationen inte ska påverkas på ett negativt

sätt (om man sprutar för stor volym på alltför kort tid). Dessutom krävs det att ett tillräckligt antal sfärer (storleksordningen 400) deponeras i den vävnad man undersöker för att få ett tillräckligt statistiskt underlag att jobba med. Vid de första experimenten plockade vi även ut hud från ansiktet och magen och vi delade även upp hjärnan i mindre delar (hippocampus, striatum, frontal cortex, hypothalamus). Tyvärr erhöles alltför få sfärer i dessa prover för att uppnå statistiskt signifikanta resultat.

Extraktionen av deponerade sfärer från vävnaden måste ske på ett korrekt sätt, vilket är ytterligare en viktig aspekt. Det har visat sig att lungorna kräver specialbehandling för att lösas upp ordentligt. Dessa har även en tendens att lämna kvar mycket "skräp" i filtren efter digerering. Detta kan påverka extraktionen av fluorescensen från mikrosfärerna negativt. Det är naturligtvis även mycket viktigt att referensprovet tas på ett korrekt sätt för att kunna beräkna blodflödet i de vävnader man är intresserad av.

Av resultaten att döma (se figur 3) verkar det som om preparationen av sfärer från lungvävnad inte är riktigt optimal. Vidare ser det ut som att den första färg som injiceras ger resultat som bäst stämmer överens med tidigare publicerade data. Detta beror troligen på att råttorna vid tidpunkten för den första injektionen har varit minst allmänpåverkade med avseende på blodtryck m.m. Det finns en viss risk att ju längre tid en råtta är nedsövd desto större risk är det att den blir allmänpåverkad.

Intravaskulär injektion av olika indikatorer för att mäta blodcirkulationen har utförts i flera decennier. Fasta partiklar har använts för att mäta distribution av blodflöde till olika organ, hjärtats slagvolym och flöden mellan organ. Problemet har varit att kunna märka dessa partiklar för att sedan kunna detektera och kvantifiera dem på ett smidigt sätt. På slutet av 70-talet kom de radioaktivt märkta sfärerna som gav ett starkt genombrott för blodflödesmätningar. Den historiska utvecklingen för användandet av dessa olika typer av mikrosfärer summeras i ett arbete av Wagner et al. (1969). Nu 30 år senare har metoden ytterligare förbättrats med hjälp av fluorescerande mikrosfärer, och som slutsats kan sägas att generellt kan exakta mätningar göras med dessa partiklar om metoden följs strikt. Som med alla biologiska metoder leder dålig teknik och ouppmärksamhet för detaljer till ospecifika, missledande resultat.

Referenser

de Garavilla L, Dalsey W, Clas D, Eynon CA. Inter- and intra-animal variability in baseline organ blood flow in rats as measured with fluorescent microspheres.

Abstract, Third International Conference on fluorescent microsphere methods 1996, Seattle, Washington.

el-Etri MM, Nickell WT, Ennis M, Skau KA, Shipley MT. (1992). Brain norepinephrine reductions in soman-intoxicated rats: association with convulsions and AChE inhibition, time course, and relation to other monoamines. *Exp Neurol.* Nov;**118**(2):153-63.

Elhusseiny A, Cohen Z, Olivier A, Stanimirovic' DB, Hamel E. (1999). Functional Acetylcholine Muscarinic Receptor Subtypes in Human Brain Microcirculation: Identification and Cellular Localization. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**: 794-802.

Glenny, R. W., S. Bernard and M. Brinkley.(1993). Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol.* **74**:2585-97.

Göransson Nyberg A, and Cassel G. (2001). Cardiopulmonary effects of HI 6 treatment in Soman intoxication. *J Appl Toxicol*, **21**, 79-81.

Koskinen, L-O.D. (1989). Cerebral and peripheral blood flow effects of TRH in the rat-A role of vagal nerves. *Peptides.* **10**, 933-938.

Manual for Using Fluorescent Microspheres to Measure Regional Organ Perfusion

<http://fmrc.pulmcc.washington.edu/fmrc.shtml>

Maxwell, D.M., Lenz, D.E., Groff, W.A., Kaminskis, A., Froehlich, H.L., (1987). The effects of blood flow and detoxification on in vivo cholinesterase inhibition by soman in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **88**, 66-76.

McDonough JH, Shih TM. (1993). Pharmacological modulation of soman-induced seizures. *Neurosci Biobehav Rev* **17**:203-215.

Prinzen, F. W. and R. W. Glenny. (1994). Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement. *Cardiovasc Res.* **28**:1467-75.

Takeuchi Y, Matsushita H, Kawano H, Sakai H, Yoshimoto K, Sawada T. (1999). TRH increases cerebrospinal fluid concentration of kynurenine. *Neuroreport.* Nov **26**, 10(17):3601-3.

Taylor, P. Anticholinesterase agents. In: The Pharmacological basis of therapeutics Goodman Gilman ed. by A, Rall TW, Nied AS, Taylor P Pergamon Press, New York (1990).

van Oosterhout, M. F., H. M. Willigers, R. S. Reneman and F. W. Prinzen.(1993). Fluorescent microspheres to measure organ perfusion: validation of a simplified sample processing technique. *Am J Physiol.* **269**:H725-33.

Wagner HN Jr, Rhodes BA, Sasaki Y, et al: (1969). Studies of the circulation with radioactive microspheres. *Invest Radiol* **4**:374-386.

Bilaga I: Description of the Sample Preparation tube set

Introduction

The Sample Processing tube system, which was designed and validated by the Institute for Surgical Research at the Uni-Klinik Großhadern in Munich, contains a set of parts (Figure 1) which can be used for all of the sample preparation steps for blood flow measurement.

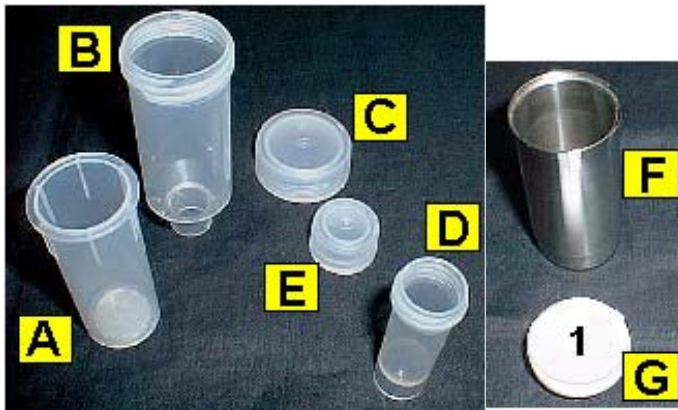


Figure 1. The Sample Preparation tube set (B0511133) consists of the filter (A), the filter holder (B), screw-top cap for the filter holder/centrifuge tube (C), screw-top cap for the measurement tube (D) and measurement tube (E).

Figure 2. The stainless steel digestion tube (F) and delrin cap (G).

Also delivered with the Blood flow system (but not included in the Sample Preparation tube set) are the stainless steel sample preparation tube (F B801-8081, included with the heater block) and the delrin cover (G, B801-8098, pack of 40):

The central part of the set is the filter, which has a polyamide membrane permanently fixed into its base.

This membrane allows the vacuum filtration of digested tissue samples and arterial reference samples. The 7 micron pore size of the filter guarantees the complete retention of all of the 15 micron fluorescence microspheres which are extracted from the tissue and blood samples.

Tissue samples remain in the same filter tube throughout the complete sample preparation procedure, eliminating the possibility of loss of microspheres.

Preparation protocol for tissue samples

Reagents

Aqueous potassium hydroxide (4N)

222,44 g KOH pellets are dissolved in 1000 ml deionised water, this solution is stirred and 10 ml 2% Tween 80 added.

Isopropanol (100% !!!)

Phosphate buffer

29.90 g dipotassium hydrogen phosphate trihydrate is dissolved in 800 ml deionised water. 5,88 g potassium hydrogen phosphate is dissolved in 200 ml deionised water.

The two solutions are mixed together.

Method

After weighing, each tissue sample is added to a filter tube. The filter tube is then inserted into the stainless steel sample preparation tube:

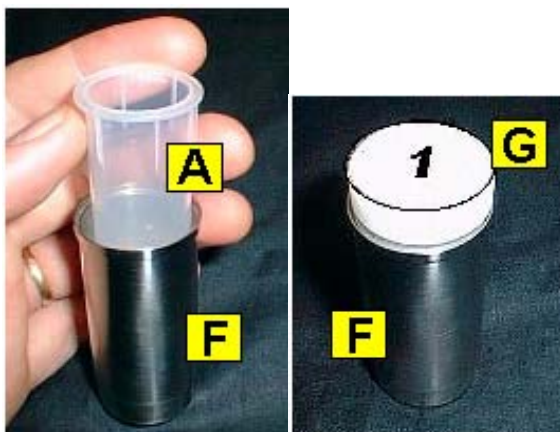


Figure 3. Insertion of the filter (A) into the stainless steel digestion tube (F).

Figure 4. The delrin cover (G) placed onto the stainless steel digestion tube (F).

15 ml of aqueous potassium hydroxide reagent is then pipetted into the filter tube. To this mixture 1.5 ml isopropanol (100% !!!) is added, then the delrin cover is placed over the tube to minimise evaporation during digestion:

Digestion is carried out in the heater block (B801-8064) at 60C. Digestion of tissue samples takes 6 hours to completion, although samples with a weight of less than 3 g are typically completely dissolved within 4 hours.

The chemical and physical properties of the Sample Preparation tube set also allow the preparation of strongly lipophilic tissue such as brain.

Following digestion, the filter is removed from the stainless steel digestion tube and placed onto the vacuum station (B801-8061). After a few seconds, the KOH is removed by the action of the vacuum. All remaining traces of KOH are then removed by thoroughly washing the filter with 30 ml phosphate buffer, which is applied in a circular motion over the whole surface and round the edges of the filter. This is done with the filter's in and outside.

The filter is then centrifuged at 2.800 r.p.m. for 1-2 minutes to ensure that the filter is dry.

Note that if the filter is not thoroughly dry, then problems may occur with solution of the spheres and collection of the fluorescent marker solution, due to the immiscibility of water and the solvent. The filter tube can be placed directly in a polypropylene centrifuge tube. Using the filter holder cap will prevent leakage of (corrosive) KOH into the centrifuge:

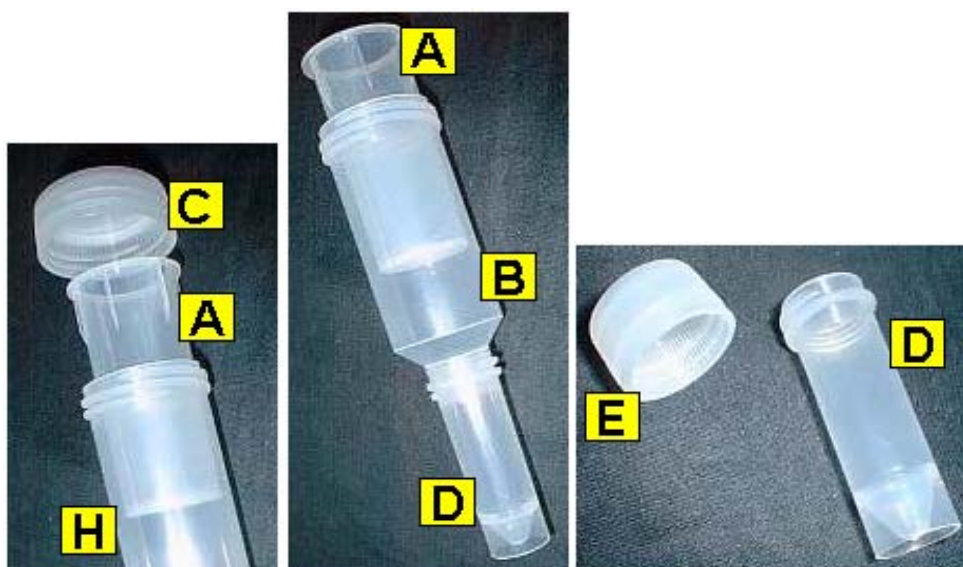


Figure 5. Inserting the filter (A) into a polypropylene centrifuge tube (H) and fixing the screw cap (C). Note that the standard Perkin-Elmer 50 ml polypropylene tube and screw-top cap (B0193234) are compatible with the filter system.

Figure 6. The filter (A) is inserted into the holder (B) and the measurement tube (D) attached. 2 ml of solvent is added to the filter tube, solution of the microspheres is then assisted by mechanical shaking and vortexing gently for 1-2 minutes. The solvent is collected in the measurement tube by centrifuging the whole tube system at 2,800 r. p. m. for 2 minutes. It is then ready for placing onto the auto sampler tray for measurement.

Figure 7. Note that if it is not possible to carry out measurement immediately, then the cap must be fixed onto the tube.

Failure to do this could lead to evaporation of solvent, which causes an increase in dye concentration and correspondingly false results.

The filter is then removed from the centrifuge tube and inserted into the filter holder, the measurement tube is then fixed to the filter holder.

Preparation protocol for lung tissue samples

Reagents

Ethanolic potassium hydroxide (2N).

112.22 g KOH pellets are dissolved in 1000 ml 96% ethanol.

Phosphate buffer (see above).

(No isopropanol !!!)

Methods

The preparation protocol for lung samples is similar to that described above, except that ethanolic KOH is used instead of aqueous KOH, and the addition of isopropanol must not take place.

Preparation protocol for bone tissue samples

Reagents

1N HCl.

Aqueous potassium hydroxide (4N, see above).

Isopropanol (100% !!!), 3 ml

Phosphate buffer (see above).

Methods

Preparation of bone samples differs from other samples in that the crystalline matrix of the bone must be dissolved with 1N HCl before digestion with KOH is carried out.

Bone samples are inserted into a polypropylene tube and are treated with acid for 1 week followed by washing with phosphate buffer. The samples are then inserted into the filters. Thereafter the method is identical to the procedure outlined in “(2) Preparation protocol for tissue samples”.

Preparation protocol for blood samples

Reagents

Isotonic saline, 0.9% w/v, containing 0.5% v/v tween 80

CPDA-1 anticoagulation stabilisor.

26,3 g sodium citrate dehydrate, 3.27 g citric acid monohydrate, 31.9 g glucose monohydrate, 2.51 g sodium dehydrogenate phosphate dehydrate and 0.275 g adenine are dissolved in 1000 ml water for injection.

OR!!! Na-Citrate: 1 ml of Na-Citrate for 2 ml of blood

Alternatively the reference blood samples can be anticoagulated by adding Citrate (1 part Citrate : 2 parts blood) to the collecting syringe prior to blood withdrawal.

Aqueous potassium hydroxide (4N, see above).

Isopropanol (100% !!!)

Phosphate buffer (see above).

Methods

The syringe to be used for withdrawal of the reference blood sample must contain CPDA-1 anticoagulation stabilisor, 1:5 v/v stabilisor: blood, prior to withdrawal of the reference sample.

After withdrawal of the sample, the contents of the entire withdrawal system (syringe and catheter) are filtered through the filter system using the vacuum station. Following this, the withdrawal system is washed with excess isotonic saline or phosphate buffer (see above), and the washing solution is filtered again through the filter using the vacuum station.

The samples are then treated as described above in “(2) Preparation protocol for tissue samples”.

Bilaga II: Protokoll för hantering av FMS

Construction of Standard Curves

- 1) Take 5 μl of 0.2% FluoSpheres® (5,000 fluorescent microspheres) and add it to 10 mls of solvent (we use 2-(2-ethoxyethoxy) ethyl acetate). This yields the fluorescence intensities for ~ 500 fluorescent microspheres/ml. Make an emission scan with a fixed excitation wavelength (use the wavelength recommended on the bottle). Note the best emission wavelength and perform an excitation scan with a fixed optimal emission wavelength. Make sure that the excitation peak and emission peak can be distinguished and do not interfere with the other colors used. Play around with the bandpasses to get a decent strength of your signal.
- 2) Depending on the range of your fluorimeter (based on the manufacturer's recommended operating range), calculate the number of μl required to add to 10 mls solvent to yield a fluorescent microsphere concentration that will be just above the upper intensity limit for your fluorimeter.
- 3) Using this high-stock solution, make multiple serial dilutions of microspheres with very accurate pipetting. Calculate the number of microspheres per ml for each dilution.
- 4) The fluorescence intensities per number of microspheres per ml are plotted to yield a standard curve for that lot of microspheres.

Making Control Solutions

When making an appropriate set of control solutions, it is important to consider the number of fluorescent microspheres per volume of solvent being used and their "typical" intensities.

- 1) Control solutions should have a fluorescent signal that is approximately the mean signal for each color in your sample, and be on the linear part of the standard curve, as described earlier.
- 2) Take 5 μl of 0.2% FluoSpheres® (5,000 fluorescent microspheres) and add it to 10 mls of solvent (we use 2-ethoxyethyl acetate). This yields fluorescence intensities of ~ 500 fluorescent microspheres/ml and gives a reference intensity for making your control solution.

3) Depending on the number of different colored microspheres being used ("n"), a stock solution is made by dissolving one color of microspheres in 2-ethoxyethyl acetate to yield an intensity that is the "n" times more concentrated than average intensities from an experimental sample.

4) Stock solutions are then combined to yield a control solution in the range of our "typical" sample intensities.

For example, if we use three fluorescent microsphere colors (blue-green, orange and crimson), and our "typical intensities" are 100 for blue-green, 200 for orange and 50 for crimson, we should make a stock solution 3 x 100, or 300 for blue-green, 3 x 200, or 600 for orange, and 3 x 50, or 150 for crimson. The three stock solutions are then combined to yield a 1:3 dilution to make a control solution that reads 100, 200 and 50, respectively, for blue-green, orange and crimson.

Method for Reference Blood Flow Sampling

There are 2 different anticoagulants that we routinely use: Heparin (syringe coated) and Citrate Phosphate Dextrose (10 cc per 30 cc syringe).

1. Using whole blood, calibrate the reference withdrawal pump at the predetermined withdrawal rate, including the catheters, extension tubing and matched anticoagulated glass syringes that will be used for the reference withdrawal. Have new stopcocks and flush syringes available.
2. Connect the matched glass anticoagulated syringes in the withdrawal pump to the catheters and the extension tubing so that everything is set up for withdrawing the reference sample. Do not turn the stopcock on the catheters until you are ready for injection (the blood will flux into the catheter dead space and may clot).
3. Once the microspheres have been drawn into the injection syringes, start the withdrawal pump and make sure blood is flowing freely into the extension tubing.
4. Inject the microspheres over the designated time period (sec or min) followed by a flush of warmed saline three times the volume of the catheter dead space.
5. A timer is set for 2 min after completion of injection for the reference blood withdrawal. At the end of the withdrawal, the pump is turned off, the stopcocks are opened and the blood remaining in the extension tubing is drawn into the syringe.
6. Transfer blood into labelled vials for further processing (see Digestion of Blood and Tissue, next page). Rinse syringes and extension lines with 2% Tween-80® (using approximately twice the volume of the blood) and add this rinse to the blood samples.
7. Flush the catheters again and change the stopcocks.