

Ingri Margrethe Haugen & Berfin Gülistan
Boyaci

Kvantifisering av infarktstørrelse i rottehjerter

Quantification of infarct size in rat hearts

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Mai 2019

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet som en avsluttende del av Bioingeniørutdanningen ved det naturvitenskapelige fakultet, Norges teknisk- naturvitenskapelige Universitet (NTNU). Oppgaven er gitt av Postdoktor Anne Berit Johnsen og Senioringeniør Ragnhild Røsbjørgen ved forskningsgruppen Cardiac Exercise Research Group (CERG), ved Institutt for sirkulasjon og bildediagnostikk, Det medisinske fakultet, NTNU. Formålet med oppgaven er å optimalisere en metode for kvantifisering av infarktstørrelse i rottehjerter, og ble utført i perioden 11.03.19 til 20.05.19 ved Hjerte- og lungesenteret, St. Olavs hospital.

Det rettes en stor takk til CERG for en hyggelig velkomst og mulighet til lån av laboratorier og kontorplasser. En spesiell stor takk til veilederne Anne Berit Johnsen og Ragnhild Røsbjørgen for utmerket engasjement, både rundt det praktiske og skriftlige arbeidet som har formet denne oppgaven. En stor takk rettes til daglig leder Bjørnar Sporsheim ved Cellular & Molecular Imaging Core facility (CMIC), NTNU, for datateknisk hjelp til bildetaking. En stor takk til Fagansvarlig bioingeniør Lili Bævre ved Avdeling for Patologi, St. Olavs hospital for hjelp til spesialfarging av histologiske snitt. En siste takk rettes til prosessveileder Randi Anny Utne Holt, for tilbakemeldinger under skriveprosessen.

Trondheim, 2019

Ingri Margrethe Haugen

Berfin Gülistan Boyaci

Sammendrag

Blant pasienter som overlever hjerteinfarkt og utvikler hjertesvikt, er det årlig mange dødsfall knyttet til arytmier. Selv om behandling av arytmier er kjent, er det lite kunnskap om hvordan det kan forebygges. Forskningsmiljøet Cardiac Exercise Research Group (CERG) på NTNU ønsker å øke kunnskap om trening hos sviktpasienter med arytmier, og bruker derfor dyremodeller for å se på mekanismene til arytmier. Hensikten med denne oppgaven var å optimalisere en metode for å kvantifisere infarktstørrelse hos rottehjerter.

Etter preparering av hjertevev fra rotter ble det tatt bilder av histologiske snitt farget med spesialfargen Massons's Trichrome for kollagene fibre. Bildene ble analysert i et dataprogram kalt Fiji. Det ble utarbeidet og optimalisert to metoder for kvantifisering av infarktstørrelse i rottehjertene, Color Threshold og Polygon Selections. Polygon Selections ble kun brukt til måling av infarktstørrelse, mens Color Threshold ble brukt til både areal-, lengde- og tykkelsesmålinger.

Protokoller for Fiji-metodene Color Threshold og Polygon Selections ble det endelige resultatet, i tillegg til estimering av infarktstørrelse. Protokollene ble brukt for å analysere infarktstørrelse oppgitt som rådata, og ble videre brukt til å visualisere infarktstørrelsene i grafer for å få en forståelse av infarktets utbredelse, form og størrelse.

Fiji metoden Color Threshold var best egnet da den ga flere muligheter for å standardisere optimalisering av denne metoden, noe som gjorde den mindre subjektiv. For å få et bedre statistisk grunnlag angående resultatvurderinger, er det nødvendig å analysere flere rottehjerter.

Abstract

Among patients who survive heart attacks and develop heart failure, there are many deaths annually associated with arrhythmias. Although the treatment of arrhythmias is known, there is little knowledge about how it can be prevented. The research community Cardiac Exercise Research Group (CERG) at NTNU wants to increase knowledge about the training of heart failure patients with arrhythmias, and therefore uses animal models to look at the mechanisms of arrhythmias. The purpose of this task was to optimize a method for quantifying infarct size in rat hearts.

After preparation of rat heart tissues, histological sections were stained with the special color method Massons's Trichrome for collagen fibers and were then imaged. The images were analyzed in a computer program called Fiji. Two methods for quantifying infarct size in the rat hearts, Color Threshold and Polygon Selections were developed and optimized. Polygon Selections were used only for infarct size measurement, while Color Threshold was used for both area, length and thickness measurements.

Protocols for the Fiji methods Color Threshold and Polygon Selections became the final result in addition to estimating infarct size. The protocols were used to analyze infarct size given as raw data and were further used to visualize infarct sizes in graphs to gain an understanding of the infarct's extent, shape and size.

The Fiji method Color Threshold was best suited as it provided more opportunities to standardize the optimization of this method, making it less subjective. In order to obtain a better statistical basis for performance assessments, it is necessary to analyze many rat hearts.

Forkortelser

MI	Myokardialt Infarkt
RA	Right Atrium
LA	Left Atrium
RV	Right Ventricle
LV	Left Ventricle
EF	Ejection Fraction
CERG	Cardiac Exercise Research Group
CMIC	Cellular & Molecular Imaging Core facility

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Sammendrag	ii
Abstract	iii
Forkortelser	iv
1. Innledning	1
1.1 Hjerterets Anatomi.....	1
1.1.1 Hjerterets kretsløp	2
1.2 Hjerteretsvikt/infarkt/patologi	3
1.3 Hjerterehistologi	4
1.4 Masson's Trichrome spesialfargemetode	4
1.5 EVOS FL Auto 2	5
1.6 ImageJ - Fiji.....	6
1.7 Studiedesign.....	7
1.8 Mål for oppgaven.....	8
2. Materiale og metode	9
2.1 Preparering av vev	9
2.2 Bildetaking.....	11
2.3 Bildeanalyse	12
3. Resultater	13
3.1 Fiji.....	13
3.1.1 Protokoll: Color Threshold.....	13
3.1.2 Protokoll: Polygon Selections	18
3.2 Kvantifisering av infarktstørrelse	20
3.2.1 Bearbeidelse av rådata.....	22
4. Diskusjon	26
4.1 Fiji-protokoller.....	26

4.2 Bruk av Fiji til målinger	27
5. Konklusjon.....	29
6. Referanse.....	30
7. Vedlegg.....	33
Vedlegg 1.....	33
Vedlegg 2.....	36
Vedlegg 3.....	38

1. Innledning

Cardiac Exercise Research Group (CERG) er en forskningsgruppe ved NTNU i Trondheim som studerer hjerte- og livsstilsrelaterte sykdommer, for å prøve å finne egnet trening til nevnte sykdommer – som en erstatter for medisin. Forskningsgruppen ble etablert i januar 2008, og ledes av Professor Ulrik Wisløff (1) (2).

Hjerte- og karsykdommer forårsaker mange dødsfall årlig, og kommer oftest som en konsekvens av svikt i hjertet forårsaket av hjerteinfarkt, altså myokardialt infarkt (MI). Blant de pasientene som overlever MI er det fortsatt mange dødsfall knyttet til hjerterytmeforstyrrelser (arytmier), da MI øker risikoen for det. I dag er det kjent hvordan arytmier kan behandles, men det er lite kunnskap om hvordan det kan forebygges. Det har blitt vist svært gode effekter av utholdenhetstrening på prognose og livskvalitet hos hjertesviktpasienter. CERG har vist at utholdenhetstrening reverserer skadelige effekter i hjertet etter infarkt (3) (4). Forskningsmiljøet ønsker videre å øke kunnskap om trening hos sviktpasienter med arytmier.

Kunnskap om hjertesykdom fra dyrestudier er ikke direkte overførbart til hjertesykdom hos menneske, likevel vil det gi en grunnforståelse som senere kan bli bekreftet ved kliniske studier (5). Ved å bruke en veletablert treningsmodell hos rotter med hjertesvikt ønskes det å kartlegge hvordan utholdenhetstrening påvirker induserbarheten av arytmier (6)

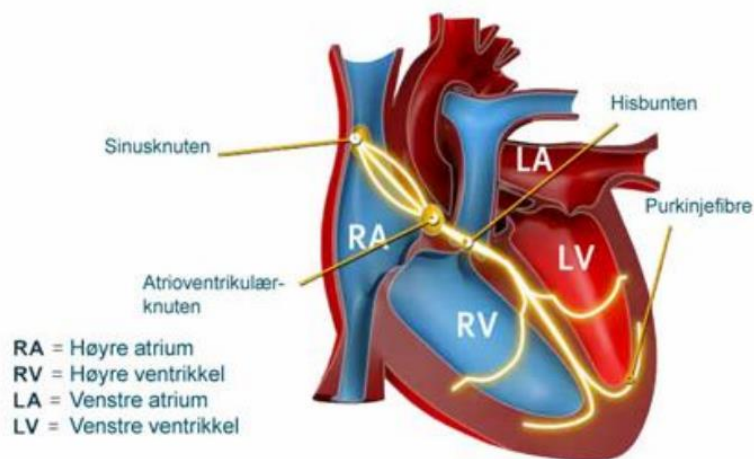
Målet med denne bacheloroppgaven er å kvantifisere infarktstørrelse hos rottehjerter. Det er viktig at rotter som inkluderes i studien har infarkter som er så store at det utvikles hjertesvikt.

1.1 Hjertets Anatomi

Oversiden av hjertet (base) har binding til store blodkar. Den nederste delen av hjertet ender i en oval spiss (apex), vendt mot kroppens venstre side (7). Rundt hele hjertet er det to tynne hinner som tilsammen utgjør perikard. Venstre og høyre side av hjertet er skilt av en tykk vegg som kalles septum, mens atriene og ventriklene er skilt av en plate som kalles anulus fibrosus. Mellom atriene og ventriklene er det hjerteklaffer som sørger for en enveisventilering der blodstrømmen styres i riktig retning. Atriene som mottar blod før det videreføres til tilhørende ventrikler, er relativt tynne i forhold til ventriklene som pumper blod mot høyere motstand i det systemiske kretsløp.

Hjerteveggen består av tre lag; endokard, myokard og epikard. Endokard omslutter innsiden av hjertevæggen, og epikard utsiden. Myokard består av hjertemuskelceller, altså myocytter

bundet sammen med innskuddsplater. Disse koblingene mellom myocytene er viktig for rask spredning av elektrisk signal ved kontraksjon. Dette elektriske signalet starter i sinusknuten i høyre forkammer. Signalet brer seg deretter utover atriene, så gjennom atrioventrikulærknuten, his-bunten og purkinjefibrer før det brer seg raskt gjennom ventriklene som vist i figur 1. Dette systemet fører til synkron og kraftig kontraksjon i en frisk hjertemuskel (8) (9) (10).

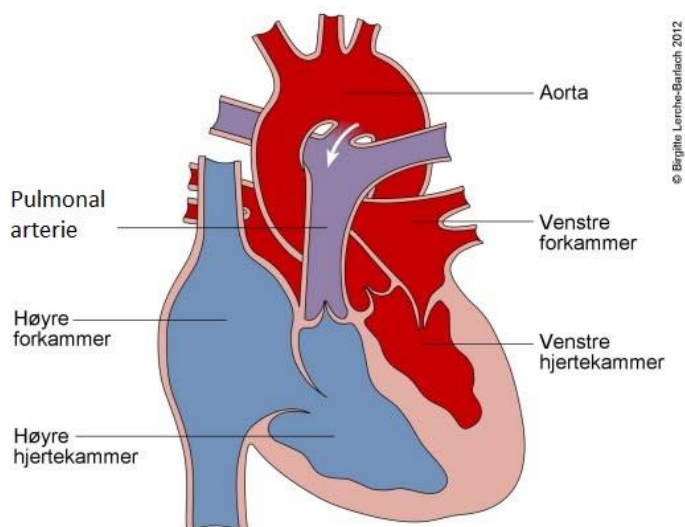


Figur 1: Skisse over hjertets inndelinger, og ledningssystemet som sprer elektrisk signal fra Sinusknuten, via atrioventrikulærknuten, His-bunten og gjennom purkinjefibrene. Hentet fra: <http://www.telma.no/wp-content/uploads/2018/02/TELMA-hjertets-anatomi-og-fysiologi.pdf>

Hjertemuskelen trenger kontinuerlig tilførsel av oksygen for nydannelse av ATP samtidig som ATP blir brukt under kontraksjon (8). Dette skjer ved at hjertet forsynes med blod via kranspulsårer, som mottar blodet fra aorta og omgir hjertet gjennom epikard (11).

1.1.1 Hjertets kretsløp

Hjertet er en muskel som pumper blodet rundt i kroppen, og sammen med blodkar utgjør sirkulasjonssystemet, det kardiovaskulære systemet. Hjertets høyre side styrer oksygenfattig blod, og venstre side fører oksygenrikt blod. Blod fra høyre ventrikel (RV) sendes til lungene via den pulmonære arterie, der O_2 og CO_2 konsentrasjoner justeres under gassutveksling i lungekretsløpet. Venstre atrium (LA), mottar dette oksygenrike blodet og pumper det ut via venstre ventrikel (LV) og gjennom hovedpulsåren (aorta) til alle kroppsvev i systemkretsløpet. Dette kretsløpet ender i høyre atrium (RA), hvor oksygenfattig blod returnerer som vist i figur 2 (8).



Figur 2: Oversikt over hjertets forkamre og hjertekamre, der oksygenfattig blod (blå) og oksygenrikt blod (rød) strømmer gjennom hjertet. Modifisert fra: <https://nhi.no/kroppen-var/funksjoner/endringer-av-sirkulasjonen-til-det-nyfodte-barnet/>.

Hjertets arbeid deles hovedsakelig inn i to faser, systolen og diastolen. Systolen er kontraksjon der oksygenrikt blod fra LV pumpes ut i kroppsvevet, og blod fra RV pumper oksygenfattig blod til lunger. Diastolen er hvilefasen, der blodet renner passivt inn i ventriklene fra atriene (9).

1.2 Hjertesvikt/infarkt/patologi

I Norge er det omtrent 80.000-100.000 personer som har hjertesvikt, noe som utgjør 1-2% av befolkningen, der ca. 10% av disse er over 75 år (12). Årsaken til minst 5% av alle akutte sykehusinnleggelser i medisinsk avdeling, er hjertesvikt (13). De respektive verdiene er økende, og iskemisk hjertesykdom eller hypertensjon er de vanligste årsakene til hjertesvikt, da 75% av hjertesvikt skyldes dette (12). Hjertesvikt kan oppstå akutt, som for eksempel etter MI, eller så kan det være en mer tiltagende prosess som utvikler seg over et lengre tidsrom. Generelt er MI hovedårsaken til at hjertesvikt oppstår (14).

Etter MI vil det utsatte området med myocytter ta skade i form av nekrose, på grunn av oksygenmangel i vevet. Cellemembranene ødelegges, og blant annet kjemiske forbindelser lekker ut i vevet. Dette vil starte en akutt betennelsesreaksjon i vevet, hvor granulocytter vil strømme til og fjerne de nekrotiske cellene og vevet. Etter MI med påfølgende betennelsesreaksjon, vil hjertevevet som har blitt skadet av infarkt etter en tid bli erstattet av fast bindevev (15). Fast bindevev består nesten helt og holdent av kollagene fibre (16).

MI påvirker hovedsakelig den venstre ventrikulære muskelen (17). Dersom infarkt er så stort at hjertesvikt utvikles, vil ventrikkelen miste evne til å kontrahere normalt, og evnen til å pumpe nok blod ut i kretsløpet reduseres. Et tydelig tegn på hjertesvikt er at ventrikkelen dilateres, og veggen blir tynn og svak (18). Ejeksjonsfraksjon (EF) er et mål på pumpeevne og beskriver prosentandel av ventrikkelens fyllingsvolum som pumpes ut ved hvert hjerteslag. Ved hjertesvikt er EF normalt under 40% (19).

Endret strukturelle og elektrofysiologiske egenskaper i hjertevevet etter MI, er en av hovedårsakene til hjerterytmeforstyrrelser som for eksempel den dødelige arytmien ventrikkelflimmer. Dette fordi endringer i de tidligere friske myocytene og tilstedeværelse av arrvev forårsaker at den elektriske impulsen ikke spres synkront, og i riktig retning gjennom hjertemuskelen (6).

1.3 Hjertehistologi

Hjerteveggen består mest av myokard, samt annet bindevev av ulike fibre (elastiske og kollagene fibre). Histologi av hjertemuskulatur viser tydelig det mikroskopiske karakteristiske utseende, med tverrstripete celler jevnt fordelt med lysere og mørkere områder. Myocytene er bundet i endene som likner et nettverk (20). Ved bruk av 10x objektiv vil ikke selve myocytene være så tydelige, men et helhetlig bilde av hjertet vises (19). Hjertets base har uregelmessig form, da det har mange forbindelser med store blodkar (7).

Arrvev i infarktområdet hos MI-hjertet består av fast bindevev og inneholder mest kollagene fibre. I fast uregelmessige bundet bindevev ser de kollagene fibre litt rotete ut i mikroskop da de peker i ulike retninger, som kan være vanskeligere å se i både lengde, - og tverrsnitt. I infarkt område av hjertets histologi, er det tydelige kollagene fiberbunter (20) (21). I tillegg er den ytterste perikardhinnen forsterket med en fibrøs bindevevshinne, og endokard inneholder også bindevev samt endotel (8) (9).

1.4 Masson's Trichrome spesialfargemetode

Masson's Trichrome spesialfargemetode er en syre/base-kjemisk metode, hvor det brukes tre ulike fargestoffer som vil differensiere vevet, som i dette tilfellet er hjertet. Mindre porøst vev farges av det minste fargemolekylet, og når et fargestoff med større molekylstørrelse trenger inn i vevet, vil det erstatte det minste molekylet (22). De tre fargestoffene som brukes er 1) Weigert's hematoksylin, jernhematoksylin, 2) Biebrich Scarlet Acid Fuchsin og 3) Anilin blå (23). Protokoll for fargemetoden ligger som vedlegg 1.

Først brukes en løsning kalt Bouin's løsning, som vil fungere som et bindingsmiddel mellom fargestoffene og de aktuelle vevskomponentene. Weigert's hematoksylin er et kationsfargestoff og vil derfor binde seg til anioner i vevet, som finnes i fosfatgruppene i cellekjernene (24). Cellekjernene farges mørkebrune. Selv om Weigert's hematoksylin er et kationfargestoff, så vil ikke kjernene avfarges av anionfargestoffene som brukes senere. Dette fordi Weigert's hematoksylin er resistent mot avfarging (23).

Biebrich Scarlet Acid Fuchsin, er som det fremkommer av navnet, et anionfargestoff. Denne fargen vil derfor binde seg til vevskomponenter med kationer, som er cytoplasma, erythrocytter, myocytter og kollagen (24). Disse komponentene vil farges røde.

Videre brukes en syre kalt Phosphomolybdic Acid, som vil avfarge de kollagene fibre slik at de ikke lenger er røde av Biebrich Scarlet Acid Fuchsin. Deretter kan den siste fargeløsningen brukes, anionfargestoffet anilin-blå. Dette fargestoffet vil farge de kollagene fibre blå. Helt til slutt brukes det 1% eddiksyre, som har som hensikt å differensiere de ulike vevskomponentene (23). På den måten kan en ved hjelp av mikroskopi klare å se hvor stor del av hjertet som har tatt skade av infarkt. Dette fordi det skadde vevet, som har utviklet seg til bindevev med mye kollagene fibre, vil farges blått mens det friske vevet vil i all hovedsak farges rødt.

1.5 EVOS FL Auto 2

EVOS FL Auto 2 er et fullt automatisert, høyoppløselig bildetakingssystem som er koblet til en datamaskin. Instrumentet er produsert av Thermo Fisher Scientific (25).

For denne oppgaven er EVOS2 det mest hensiktsmessige instrumentet å bruke, av flere årsaker. Først og fremst er det et veldig letthåndterlig instrument med minimal opplæringstid, noe som er gunstig under et relativt kort prosjekt som en bachelor. Videre har en de samme mulighetene til forstørrelse og justering som på et vanlig mikroskop, da instrumentet har et revolverfeste med alt fra 4x-40x objektiv og manuell innstilling av fokus. På denne måten får en velge hvor detaljerte bildene skal være, enten det er et oversiktsbilde eller et bilde ned på cellenivå. Det er mulig å lagre innstillingene en har brukt i bildene som en protokoll, slik at om det skal tas flere bilder ved en senere anledning, kan den tidligere protokollen åpnes. På den måten unngås det å måtte gjøre nye innstillinger hver gang instrumentet benyttes til den samme oppgaven.

Til slutt er det to årsaker til valg av instrument som veier tyngre enn de nevnte over, og det er hvordan bildene blir tatt og bildehåndtering før bildeanalyse. EVOS2 tillater skanning av

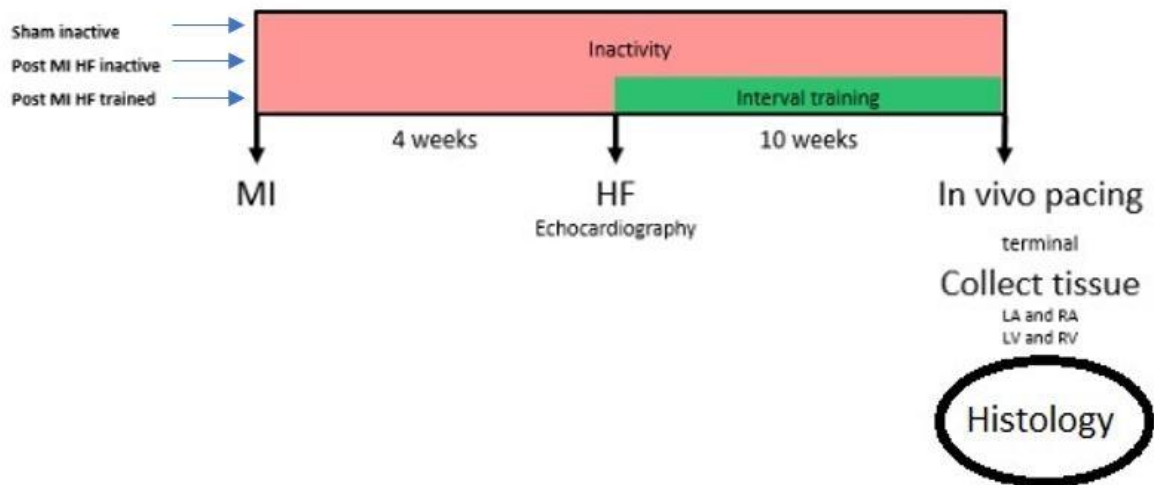
det ønskede området som er valgt ut, ved at instrumentet tar mange små bilder som til slutt settes sammen til et helhetlig bilde. Når denne filen lagres har en tilgang til både det store, helhetlige bildet samt de små bildene som blir brukt til å sy sammen det store bildet. Dette er hensiktsmessig dersom en skulle ønske å gå inn på veldig små detaljer. Det benyttes også Z-stabling; en funksjon som tar en serie med bilder langs Z-aksen, som kombinert til en stablingprojeksjon vil gi større dybdeskarphet i bildene (25). Når det gjelder bildeanalyseringen ble EVOS2 mest hensiktsmessig å benytte, da programmet som blir benyttet til kvantifisering av infarktstørrelse godtar TIFF-format, noe EVOS2-bildene blir lagret som. På den måten unngås det å måtte konvertere filene i et annet format.

1.6 ImageJ - Fiji

ImageJ er et behandlingsprogram for bilder, laget opprinnelig for å kunne analysere vitenskapelige bilder på ulike måter (26). Programmet er enkelt å ta i bruk, da det kan brukes som både en applikasjon på internett eller som et nedlastet program på ønsket datamaskin (27). Fiji er en distribusjon av ImageJ, med mange programvareutvidelser som skal gjøre analysering av vitenskapelige bilder enda lettere (28).

For kvantifisering av infarktstørrelse på rottehjerter er ImageJ, med versjonen Fiji, det mest optimale programmet å benytte seg av. Årsakene til dette er blant annet at det er lett tilgjengelig; det kan nedlastes på egen datamaskin og brukes hvor som helst, uten å måtte ha tilgang til internett, i tillegg til at det er brukervennlig og lett håndterbart. Programmet tilbyr mange ulike verktøy for bildeanalyse, som blant annet å manuelt eller automatisk markere områder for å differensiere de ulike fargene som er i området, slik at en kan måle for eksempel areal, lengde, vinkel og bildene kan beskjæres etc. For å kunne ha virkelige mål og verdier på parametere som lengde og areal, så må det være mulighet for romlig kalibrering, noe Fiji tilbyr. På den måten kan en velge å få ut analyseresultater som lengde i mikrometer (μm) eller millimeter (mm), alt ettersom hva som er ønskelig (27).

1.7 Studiedesign

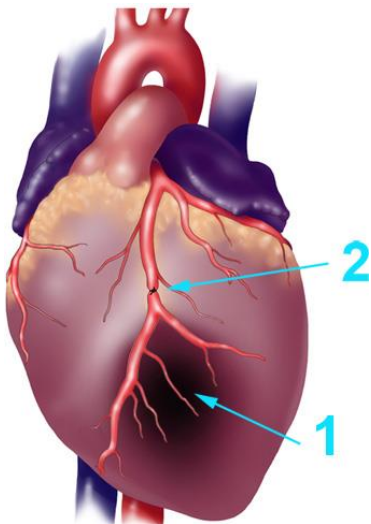


Figur 3: Enkel Flowchart over studiedesign, som viser de tre randomiserte gruppene; Sham, MI-Sedat og MI-Trent gjennom prosjektet "Kan trening forebygge eller redusere MI-induserte arytmier?" hos CERG. Det siste leddet "Histology" omhandler denne oppgaven.

Det overordnede prosjektet "Kan trening forebygge eller redusere MI-induserte arytmier?" hos CERG, har et studiedesign som består av flere ledd som vist i figur 3. Disse leddene er som følger:

1. Induksjon av hjerteinfarkt – Det settes et sting rundt som avsnører venstre kranspulsåre, se figur 4. Dette fører til at en del av hjertemuskelen ikke får blodtilførsel, og dermed nekrose og påfølgende iskemi. Rotter med store infarkt (EF<40%) utvikler hjertesvikt etter 4 uker (19).
2. Ekkokardiografi – For å undersøke om rottene har utviklet hjertesvikt etter 4 uker undersøkes hjerte ved hjelp av ekkokardiografi. Dette gjøres mens rottene er i anestesi. Hjertets evne til å kontrahere bestemmes, og utfra disse tallene kan EF estimeres (3).
3. Randomisering – Dyr med EF< 40% randomiseres til en treningsgruppe (MI-Trent) eller en gruppe som ikke trener (MI-Sedat). I tillegg er det en kontrollgruppe med friske rotter (Sham), som har vært gjennom samme operasjon som infarktdyrene, men venstre kranspulsåre ble ikke avsnørt.
4. VO₂ Maks test– For å få et mål på rottenes kondisjon ble det testet VO₂-maks på alle gruppene (Sham, MI-Sedat, MI-Trent) før og etter treningsperioden. Rottene løper i et lukket kammer som er koblet til sensorer for måling av O₂ og CO₂ (29).

5. HI-trening – Høyintensitetstrening er en aerob intervalltrening. Rottene i MI-Trent gruppen gjennomfører 4x10 intervaller på 85-95% av VO_2max , med 2 minutters aktiv pause mellom hvert drag på 50% av VO_2max (29) (30).
6. In vivo pacing – Induksjon av ventrikulære arytmier utføres in vivo ved hjelp av elektrisk stimulering i hjerte. På denne måten kan en studere om terskelen for arytmier økes ved intensiv trening (6).
7. Ex vivo – Elektrofysiologiske målinger utføres ex vivo for å studere om det er forskjeller i elektrisk aktivitet i et trent infarkthjerte i forhold til et hjerte som ikke har hatt intensiv trening (6).
8. Histologi – Kvantifisering av infarktstørrelse i histologiske snitt av rottehjerter. Hjertene kuttes i flere deler som fikseres, fremføres, støpes i parafin, snittes og spesialfarges før bildene analyseres i et dataprogram (6).



Figur 4: Skjematisk diagram over MI-induksjon. 1 viser infarktsområdet, og 2 viser ligering av venstre kranspulsåre.

Hentet fra

<https://www.jove.com/video/2464/acute-myocardial-infarction-in-rats>

1.8 Mål for oppgaven

Hovedmålet med oppgaven er å optimalisere kvantifisering av infarktstørrelse i rottehjerter.

Delmål:

1. Studere korrelasjon mellom ekkokardiografisk EF og histologisk infarktstørrelse.
2. Beskrivelse av infarkt (lengde, tykkelse, og hvor infarkt ligger i myokard)
3. Sammenligning av veggtykkelse mellom MI-induserte og Sham-rottehjerter.
4. Undersøke forskjell mellom to metoder utført av to personer.

2. Materiale og metode

Som en del av studiedesignet «Kan trening forebygge eller redusere MI-induserte arytmier?» hos CERG, tilhører denne metode-beskrivelsen det siste leddet i studiedesignet, altså «Histologi»-leddet.

For kvantifisering av infarktstørrelse i rottehjerter, og for senere analysering av forskjeller mellom de tre ulike randomiserte gruppene av rotter (MI-Sedat, MI-Trent, og Sham) med tre rotter per gruppe, krevde prosessen flere preanalytiske trinn. Denne prosessen omhandler hovedsakelig standardisering, som sammen med bildeanalysing representerer optimalisering. Den preanalytiske prosessen hadde flere trinn, som beskrevet under 2.1.

2.1 Preparering av vev

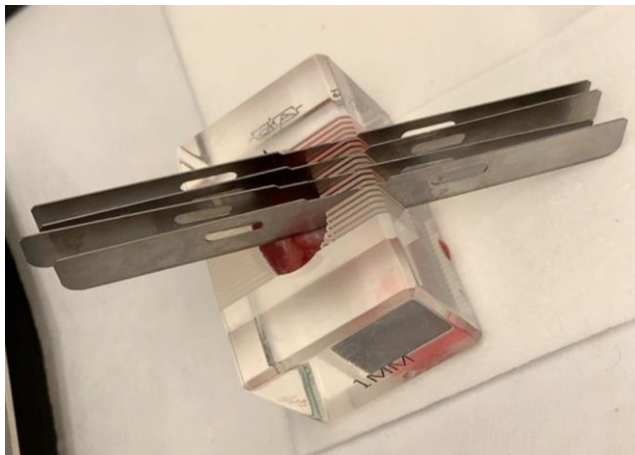
Kutting av hjertet

Alle hjertene ble veid på analysevekt, og deretter lagt på millimeter-ark for bildetaking. Dette for å dokumentere rottehjertene, samt den makroskopiske størrelsen på MI i forhold til friskt vev. Protokoll for preparering av hjertetvev ble modifisert fra Valentin J, et. al (2016) (31). Denne protokollen har flere trinn, der første punktet forklarer håndtering av hjertet etter uttak. Hjertet ble lagt i tyrodøløsning (fysiologisk løsning). Dette ble utført på alle rottehjertene før vevet ble levert til videre preparering.

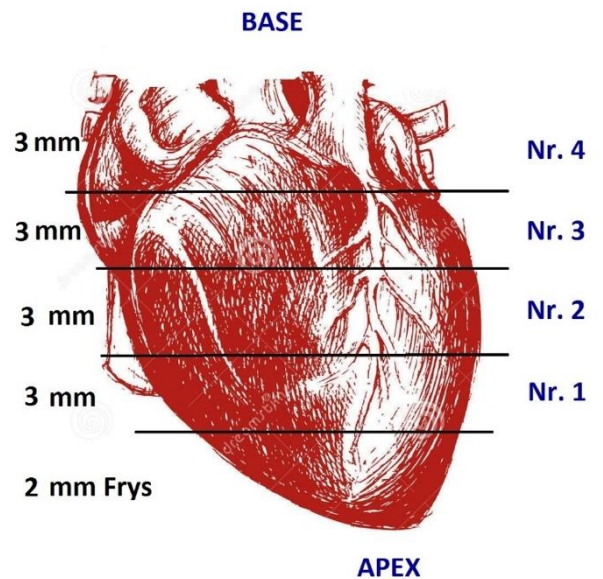
Neste steg var kutting av hjertet for videre histologisk undersøkelse. Først ble LA og RA kuttet av ved hjelp av en pinsett og kirurgisksaks. Deretter ble hjertet lagt på langs i en akrylform (figur 5), med infarktområdet pekende oppover, og 2 mm fra apex ble kuttet av ved hjelp av et knivblad. Apex og atriebitene ble hurtigfrost i flytende nitrogen før de ble lagt videre i -80 °C fryser for oppbevaring til senere undersøkelser. Deretter ble akrylformen med hjertet frost i -20 °C i 40-45 minutter. Når hjertet legges til frys i akrylformen opprettholder den hjertets naturlige form uten at hjertet får en flat side. Akrylformen tillater knivblad å trenge igjennom med 1 mm lengdes mellomrom for hvert knivblad.

Etter frysing ble rottehjertet kuttet i 3 mm deler slik at flere sjikt i hele hjertet ble analysert senere for infarktstørrelse (figur 5). Delene ble løftet med en pinsett, og lagt i kassetter med basesiden ned. Dette for standardisering av metoden, der alle histologiske snitt senere viser samme områder i hvert hjerte. Det ble da endt opp med 4-6 hjertedeler for hvert rottehjerte, avhengig av hjertets størrelse. Alle kassettenes ble merket med ID, dato og nummer fra 1-6

avhengig av hvor mange kassetter det var. Nummer 1 representerte hjertedelen nærmest apex, og siste nummer for hjertedelen av hjertets base som vist i figur 6.



Figur 5: Studentbilde av akrylform med knivblad, under kutting av et rottehjerte



Figur 6: Skisse over hvordan rottehjertet kuttes under preparering av vev. Modifisert fra: <https://es.dreamstime.com/stock-de-ilustraci%C3%B3n-l%C3%ADnea-humana-trabajo-del-dibujo-del-coraz%C3%B3n-image56626558>

Kassetten ble lagt i formalin (ca. ei uke), og alt arbeid med formalin ble utført i avtrekkskap. Bruk av formalin er en kjemisk fikseringsmetode, og forbereder vevet til senere histologisk farging ved at det biologiske materialet er bevart og vevet er mer mottakeliggjort for farge. Etter fikseringsprosessen ble kassetten levert til fremføring og innstøping i parafin (32).

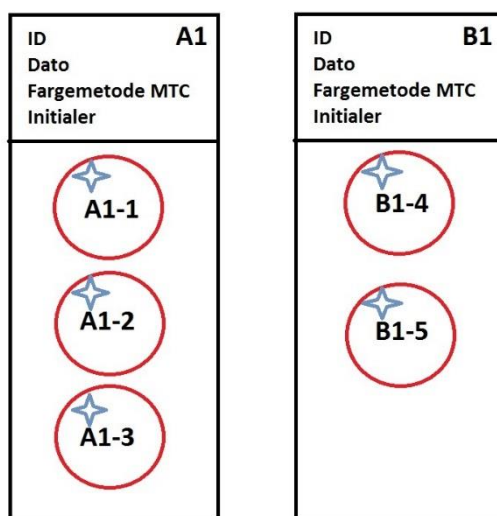
Fremføring og innstøping i parafin

Omtrent 20 kassetter av gangen ble levert til histologilaboratorium ved CMIC, og lagt i fremførings-maskin (ThermoFisher Excelsior AS) over natt. Fremføringsprosessen er dehydrering av vevet, slik at det tilslutt kan impregneres med parafin. Dehydrering skjer ved at vevet utsettes for stigende konsentrasjon av etanol, da det igjen er blandbart med TissueClear (TC) som er et bindeledd mellom etanol og parafin (33).

Etter fremføring ble vevet innstøpt i parafin ved hjelp av en innstøpningsovn (Leica EG1160). Vevsbiten ble lagt i flytende parafin og avkjølt slik at vevet ble innkapslet i parafin og klar til videre behandling. Vevsbiten ble konsekvent støpt inn med base-siden ned, på samme måte som de var blitt orientert i kassetten.

Snitting

Parafinblokkene med hjertevevet var nå klar for snitting ved hjelp av en mikrotom (Leica RM2234). 1-6 vevsblokker per hjerte ble snittet av gangen, i riktig rekkefølge. Snittene ble trimmet med 10µm til hele vevsbiten ble med i snittet. Det ble snittet 4 µm tykke snitt. Objektglassene ble merket med ID, dato, fargemetode, A1 eller B1 og initialer som i figur 7. Hvert hjerte hadde to objektglass, A og B, der snittene var plassert i riktig rekkefølge. A står for «Apex», da de snittene på dette objektglasset er nærmest apex, og B for «base» da snittene her er nærmest hjertets base. Objektglassene ble kalt A1, A2 osv. og B1, B2 osv. ettersom det ble laget flere paralleller som en sikkerhet. Snittene ble lufttørket over natt og oppbevart i romtemperatur frem til de ble levert til Avdeling for Patologi ved St. Olavs Hospital etter avtale, for spesialfarging med Massons Trichrome (Artisan Link instrument, vedlegg 2). Etter farging ble snittene montert med dekkglass, ved bruk av monteringsmiddelet Tissue Mount. Ved bildetaking i neste steg, var det nødvendig å flytte dekkglasset inntil skrivefeltet av tekniske årsaker ved bruk av instrumentet EVOS2. Etter dekkglasset ble forskjøvet, ble snittene inkubert i varmeskap (60°C) i 10 min.



Figur 7: Illustrasjon av merking, og snitt-orientering på objektglass. Blå stjerne indikerer at infarktområdet i hvert snitt (rød ring) peker i samme retning.

2.2 Bildetaking

Etter farging av snittene ble det tatt bilder av de. Her stod det mellom 2 ulike skanning-instrumenter, Hamamatsu Nanozoomer S360 og EVOS2. Hamamatsu er en skanner som

brukes hos St. Olavs hospital ved Avdeling for Patologi, den samme avdelingen som farget de histologiske snittene i denne oppgaven, og EVOS2 er en skanner som kan lånes hos CMIC. Etter mye uttesting ble det bestemt at Hamamatsu ikke egnet seg til denne oppgaven, da filstørrelse og filtype var uegnet. Det ble derfor gått videre med EVOS2, se vedlegg 3 for utarbeidet fremgangsmåte. Snittene ble skannet i løpet av flere dager, og lagret på ekstern harddisk.

2.3 Bildeanalysering

Etter bildetaking ble infarktstørrelse på snittene analysert ved hjelp av Fiji. Her ble også 2 alternativer vurdert, ImageJ med distribusjonen Fiji og QuPath. Begge er dataprogrammer som kunne nedlastes på egen datamaskin. Det ble gjort utallige utprøvinger for å finne det programmet som egnet seg mest, og for denne oppgaven falt valget på Fiji da QuPath ikke klarte å åpne filene.

Ettersom oppgaven gikk ut på å optimalisere en metode for å kvantifisere infarktstørrelse på rottehjerter, inkluderte det målinger som areal, tykkelse og epikardial og endokardial lengde av MI. For målinger som kun gikk på areal av MI ble det utarbeidet to ulike metoder, hvor de resterende lengdemålingene som er nevnt over kun ble gjort på én måte. Se underkapittel 3.1.1.

Color Threshold-metoden setter en terskel på lysstyrke for å differensiere friskt vev og infarktvev, mens Polygon Selections-metoden benytter punktmarkeringer. Color Threshold ble benyttet på alle snittene fra MI-Sedat og MI-Trent, og Polygon Selections ble kun benyttet på snitt nr. 3, altså de snittene som kom fra kutt nr. 3, hos begge MI-gruppene, se figur 6. Hos Sham-gruppen ble det kun gjort målinger på LV frivegg-tykkelse.

Før analyseringen måtte RV bli beskåret bort fra alle bildene, da det ikke skulle være med i analyseringen. Dette ble utført av en og samme person. Videre ble det første hjertet (MI-Sedat 1) analysert av to personer. De resterende 8 rottehjertene ble analysert av begge personene med 4 hjerter hver. Alle målingene ble lagret i et regneark i Excel for videre bearbeidelse av resultatene. I Color Threshold-metoden er LV-arealet hele snittet (etter RV ble beskåret), inkludert infarktområdet. I Polygon Selections er total LV hele snittet (etter RV ble beskåret), inkludert infarktområdet og lumen.

3. Resultater

Hensikten med oppgaven var å optimalisere en metode for kvantifisering av infarktstørrelse i rottehjerter. Dette ble gjort ved å standardisere alle ledd i prosessen av metoden, fra og med preparering av vev til bildetaking og bildeanalysering. Det ble utarbeid Fiji-protokoller, som senere ble brukt til å kvantifisere infarktstørrelse oppgitt som rådata og grafer.

I protokoll 3.1.1 benyttes Color Threshold for kvantifisering av infarktstørrelse, mens i protokoll 3.1.2 benyttes Polygon Selections. I tillegg til protokollene, er det oppnådd resultater fra kvantifisering av infarktstørrelse hos MI-Trent og MI-Sedat. Protokollen for bildetaking (EVOS2) er lagt som vedlegg 3, da dette kun ble brukt til å nå bildeanalyseringsleddet, og ikke er et optimalisert resultat av metoden.

3.1 Fiji

Under bildeanalysering ble protokoller for to metoder utarbeidet og testet i Fiji-programmet; Color Threshold og Polygon Selections. Dette ble ansett som et nødvendig steg i optimalisering av metoden, da det var ønsket å finne ut hvilken metode som var best egnet.

3.1.1 Protokoll: Color Threshold

Protokoll for kvantifisering av infarktstørrelse ved hjelp av Fiji; Color Threshold metode.

Forutsetningen for å bruke denne metoden, er at bildene er tatt ved hjelp av instrumentet EVOS2 med 10x objektiv. Se vedlegg 3.

For å kunne benytte programmet optimalt har det blitt laget en Fiji-makro som klargjør bildedataene (34). Makroen kalibrerer pikselstørrelsen i μm og skalerer ned bildefilene uten at de fysiske dimensjonene forandres. Makroen setter altså scalebar korrekt (pikselstørrelsen) og skalerer bildene til 20% (0.2) av originalen.

For å kunne gjøre dette må det lages to fil-mapper (kalt for eksempel: EVOS2 Input og EVOS2 Output). De originale TIFF-filene overføres til input-mappen før programmet åpnes.

1. Åpne programmet ImageJ (Fiji)
2. Velg "Process" fra hovedmenyen → "Batch" → "Macro". Det vil nå komme opp et nytt vindu, kalt "Batch Process". Trykk på "Input" og velg EVOS2 input-mappen som ble opprettet tidligere. Repeter prosessen for output; trykk på "Output" og velg EVOS2 Output-mappen. Kopier makro-beskrivelsen under, og lim den inn i "Batch

Process”-tekstfeltet. Trykk deretter “Process”. De komprimerte bildene ligger nå i Output-mappen, og er klare til analysering.

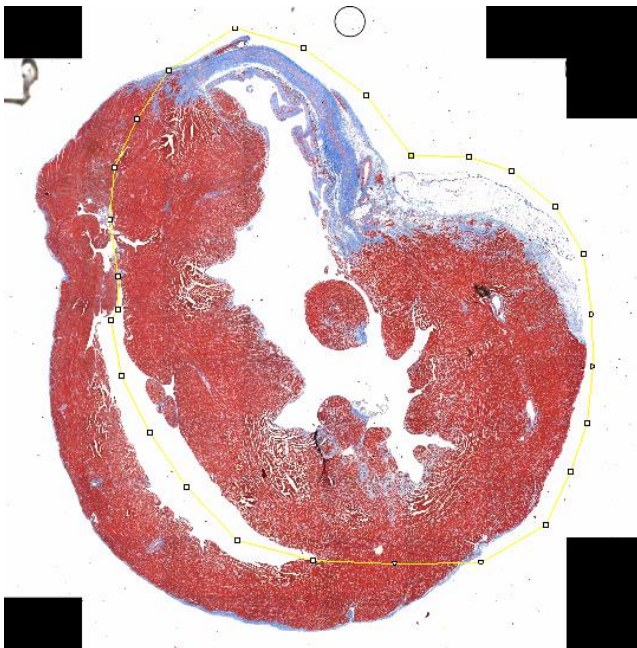
```
//Scales a stitched image from EVOS 2 where 10x objective and brightfield (color camera) was used.
```

```
//Bjørnar Sporsheim, CMIC, 05.04.2019
```

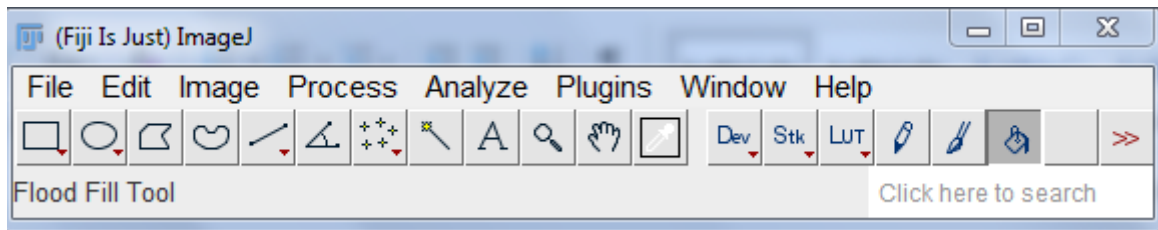
```
run("Set Scale...", "distance=703 known=500 pixel=1 unit=µm");
```

```
run("Scale...", "x=0.2 y=0.2 interpolation=Bilinear average create");
```

3. Dra bildet du skal bruke fra Output-mappen over til Fiji. Et nytt vindu av bildet vil komme opp. Skisser rundt hele LV ved hjelp av “Polygon Selections” fra verktøylinjen, som vist i figur 8. Velg “Edit” fra hovedmenyen → “Clear Outside”. Hele bildet utenom LV vil bli svart. Velg deretter “Flood Fill Tool” fra verktøylinjen, som vist i figur 9, og trykk på det svarte området på bildet. Hele bakgrunnen vil nå bli hvit, og bildet kan benyttes til neste punkt. Dette for at ikke andre elementer enn LV skal tas med i analyseringen.



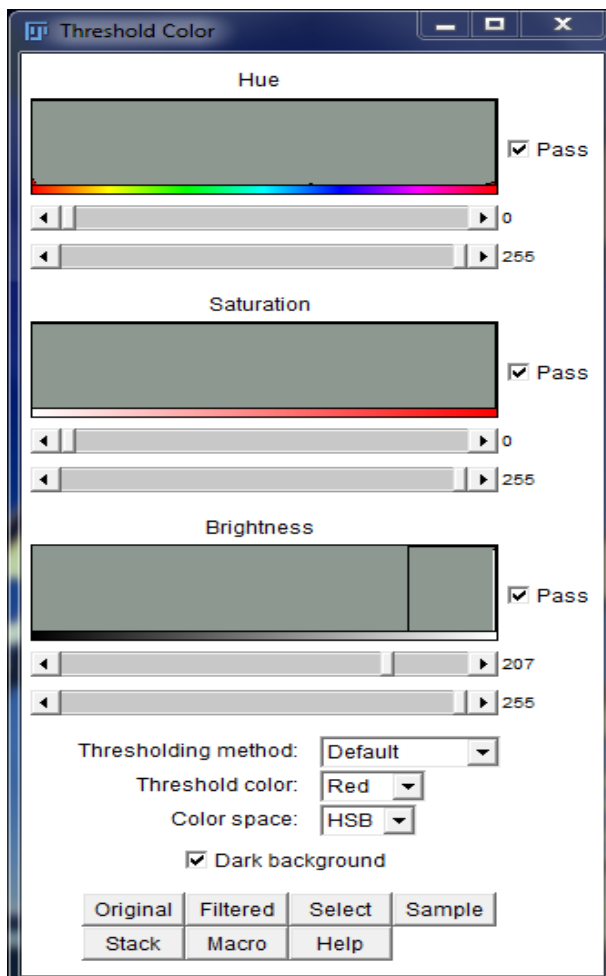
Figur 8: LV i rottehjerte markert ved hjelp av polygon selections (gul linje), for å klippe ut RV som utelukkes til videre analysering.



Figur 9: Bilde av verktøylinjen i Fiji, med «Flood Fill Tool» valgt til høyre.

4. Velg "Image" fra hovedmenyen → "Adjust" → "Color Threshold". Et nytt vindu vil komme opp, med tre felt kalt "Hue", "Saturation" og "Brightness". Se figur 10. Den øverste rullegardinen under "Brightness" dras helt til venstre (0), og den nederste rullegardinen nesten helt til høyre (eksempelvis 254). Hele hjertet er nå markert og farget rødt. Trykk "Select", slik at hjertets omriss markeres med en gul linje. Velg "Analyze" fra hovedmenyen → "Measure", og et nytt vindu vil da komme opp, se figur 11. Arealet av hele det markerte området i hjerte vil da oppgis i μm^2 .

Obs! Verdien på «Brightness» (254) kan variere noe fra hjerte til hjerte.



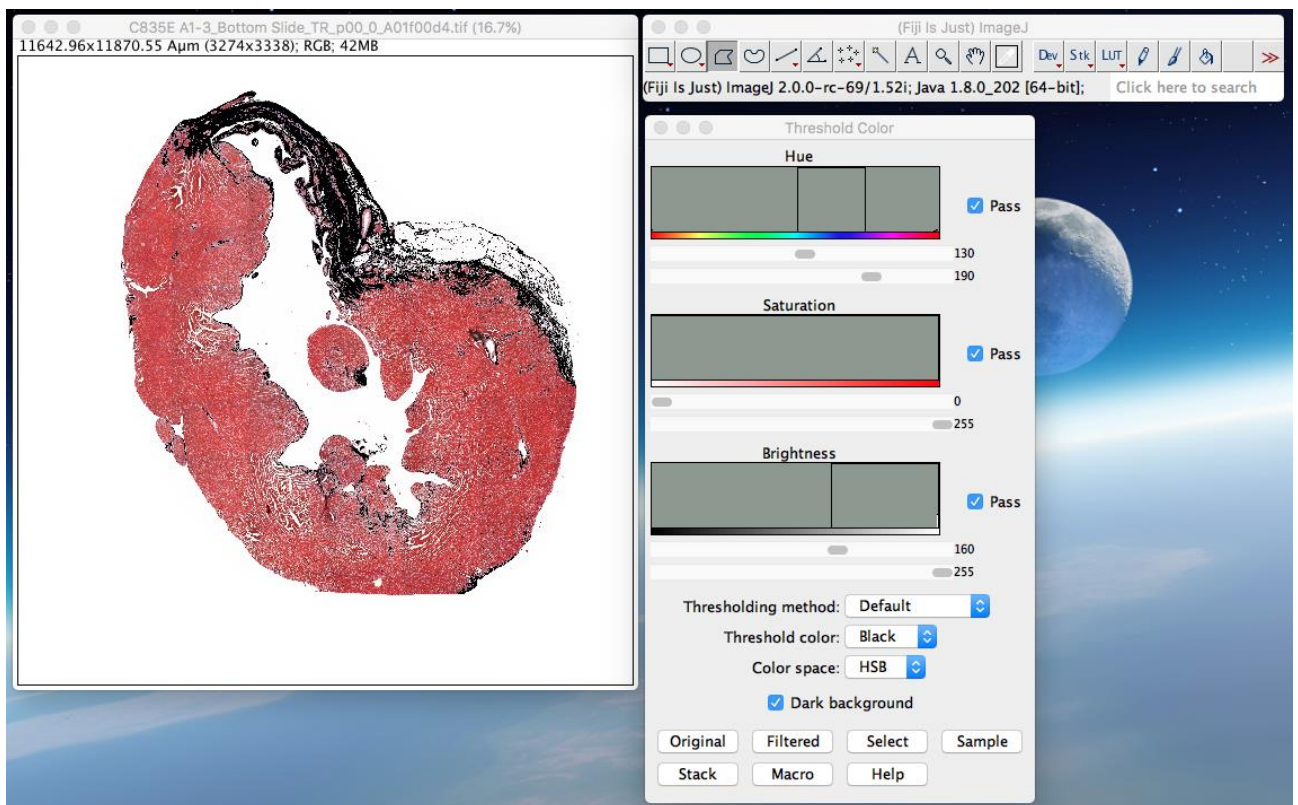
Figur 10: Color Threshold fanen i Fiji, med de tre feltene «Hue», «Saturation», og «Brightness».

Results					
	Area	Mean	Min	Max	
1	46939212.459	143.393	6	253	

Figur 11: «Results» fanen i Fiji, med arealmåling oppgitt i μm^2 .

- Gå tilbake til “Color Threshold”, og sett den øverste rullegardinen under “Hue” på 130, og den nederste rullegardinen på 190 som vist i figur 12. Dette for å få med alle nyanser av blå. Sett “Threshold color” til “Black”, dette for at det skal bli lettere å skille det markerte området fra det friske, røde vevet. Juster deretter den øverste rullegardinen under “Saturation” til hele infarktområdet er markert svart. Ved å trykke på “Original” eller “Filtered” kan du skifte mellom det opprinnelige bildet og det markerte området. Dette for å lettere kunne se om alt det nekrotiske vevet er markert. Trykk deretter “Analyze” fra hovedmenyen → “Measure” for å få opp arealet av infarktområdet.

Obs! «Brightness» verdiene under punkt 4 skal ikke endres på, innad i ett snitt.

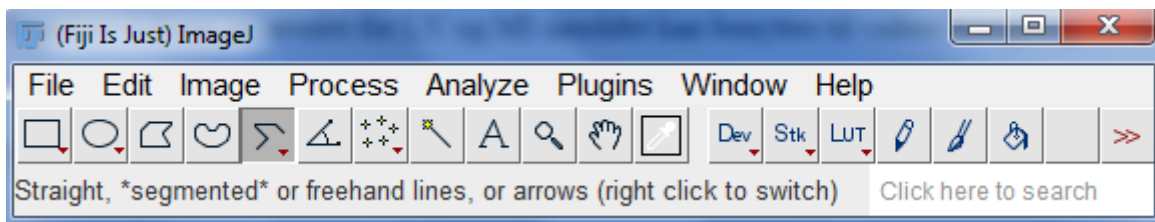


Figur 12: Skjermbilde av fanen «Threshold Color», der rullegardinene under «Hue»-feltet er valgt til 130 og 190, slik at infarktsonområdet på snittet er markert svart.

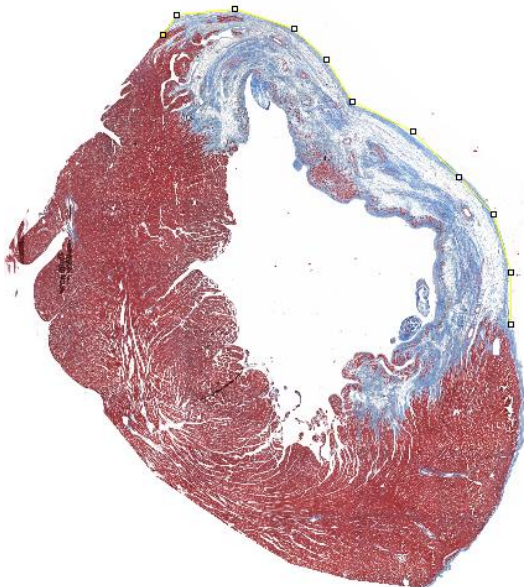
Resultatverdiene av arealet for LV og MI-området kan benyttes til videre beregning av infarktstørrelse (%), ved bruk av formel 1.

$$\text{Infarktstørrelse (\%)} = \frac{\text{MI,område (areal)}}{\text{LV (areal)}} * 100 \quad (\text{Formel 1})$$

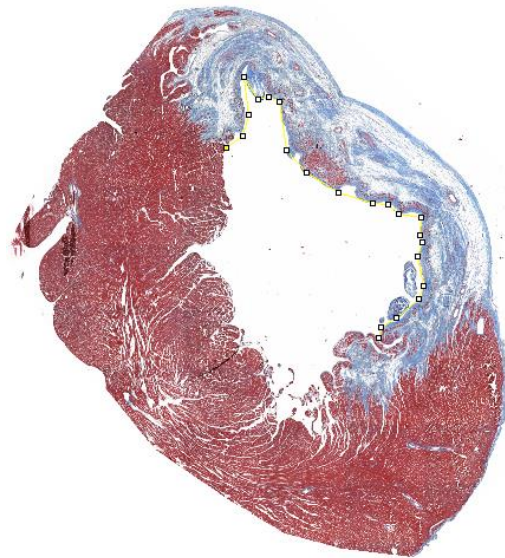
6. For lengdemålinger, benyttes «Straight, *segmented* or freehand lines, or arrows» ved å høyreklikke på den fra verktøylinjen for å velge «Segmented Lines». Se figur 13. Marker så epikardial-lengde ved å klikke langs ytre omriss av infarkt, og avslutt med høyreklikk som i figur 14. Trykk deretter “Analyze” fra hovedmenyen → “Measure” for å få opp lengdemålinger. Repeter dette for endokardial-lengdemåling av infarkt i snittet, som vist i figur 15. For måling av MI-tykkelse og eventuelt friveggtykkelse, benyttes samme teknikk ved å klikke på startpunktet, og avslutt med høyreklikk etter en rett linje, som illustrert i figur 16. Flere paralleller kan tas enkeltvis.



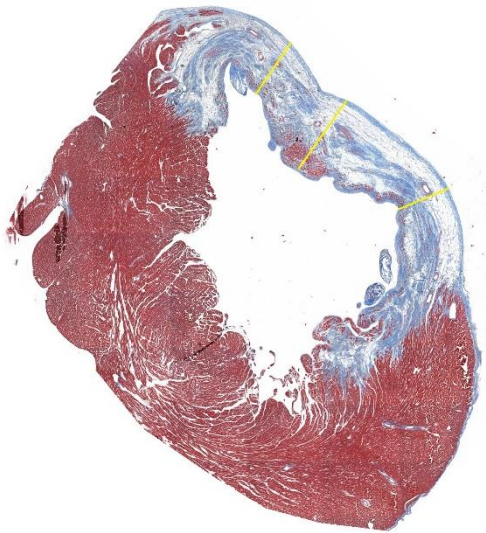
Figur 13: Bilde av verktøylinjen i Fiji, der «Straight, *Segmented* or freehand lines, or arrows» er valgt femte rute fra venstre.



Figur 14: Epikardial-lengde av MI i rottehjerte snitt er markert (gul linje med ruter langs) i Fiji.



Figur 15: Endokardial-lengde av MI i rottehjertesnitt er markert (gul linje med ruter langs) i Fiji.



Figur 16: Illustrasjon av parallellmålinger av MI-tykkelse i rottehjertesnitt.

3.1.2 Protokoll: Polygon Selections

Kvantifisering av Infarktstørrelse ved hjelp av Fiji; Polygon Selections metode.

Forutsetning for å bruke denne metoden, er at de mikroskopiske bildene er tatt med EVOS2-instrumentet med 10x objektiv. Se vedlegg 3.

For å kunne benytte programmet optimalt, har det blitt laget en Fiji-makro som klargjør bildedataene (34). Makroen kalibrerer pikselstørrelsen i μm og skalerer ned bildefilene uten at de fysiske dimensjonene forandres. Makroen setter altså scalebar korrekt (pikselstørrelsen) og skalerer bildene til 20% (0.2) av originalen.

For å kunne gjøre dette må det lages to fil-mapper (kalt feks: EVOS2 Input og EVOS2 Output). De originale TIFF-filene overføres til input-mappen før programmet åpnes.

1. Åpne programmet ImageJ (Fiji)
2. Velg "Process" fra hovedmenyen \rightarrow "Batch" \rightarrow "Macro". Det vil nå komme opp et nytt vindu, kalt "Batch Process". Trykk på "Input" og velg EVOS2 input-mappen som ble opprettet tidligere. Repeter prosessen for output; trykk på "Output" og velg EVOS2 Output-mappen. Kopier makro-beskrivelsen under, og lim den inn i "Batch Process"-tekstfeltet. Trykk deretter "Process". De komprimerte bildene ligger nå i Output-mappen, og er klare til analysering.

```
//Scales a stitched image from EVOS 2 where 10x objective and brightfield (color camera) was used.
```

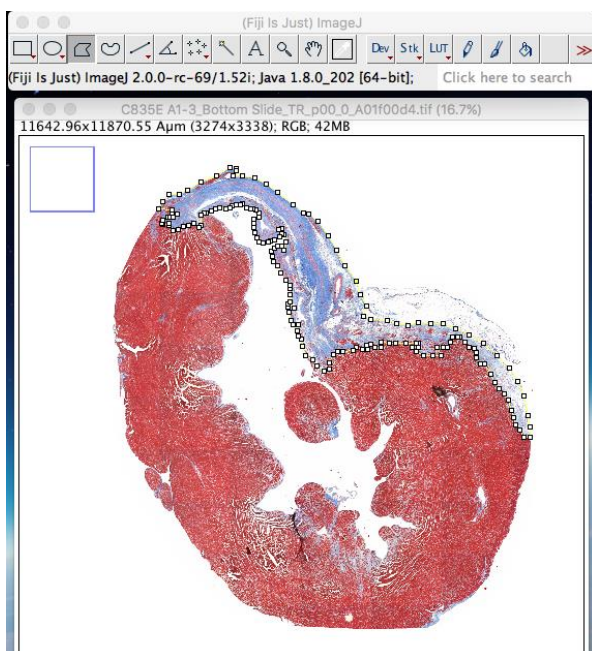
```
//Bjørnar Sporsheim, CMIC, 05.04.2019
```

```
run("Set Scale...", "distance=703 known=500 pixel=1 unit=µm");
```

```
run("Scale...", "x=0.2 y=0.2 interpolation=Bilinear average create");
```

3. Dra bildet du skal bruke fra Output-mappen over til Fiji. Et nytt vindu av bildet vil komme opp. Skisser rundt hele LV ved hjelp av "Polygon Selections" fra verktøylinjen, som vist i figur 8. Velg "Edit" fra hovedmenyen → "Clear Outside". Hele bildet utenom LV vil bli svart. Velg deretter "Flood Fill Tool" fra verktøylinjen som vist i figur 9, og trykk på det svarte området på bildet. Hele bakgrunnen vil nå bli hvit, og bildet kan benyttes til neste punkt. Dette for at ikke andre elementer enn LV skal tas med i analyseringen.
4. Videre brukes "Polygon Selections" fra verktøylinjen, for å lage omriss rundt de områdene en ønsker å måle. Det innebærer hele LV, lumen og infarktområdet. Målingene må gjøres hver for seg, som følgende: Skisser rundt ønsket området ved hjelp av "Polygon Selections" fra verktøylinjen, se figur 17. Velg "Analyze" fra hovedmenyen → "Measure", og et nytt vindu vil da komme opp, se figur 11. Arealet av hele det markerte området i hjerte vil da oppgis i μm^2 .

Obs! For å få riktig areal for LV, må arealet av lumen trekkes fra det totale LV arealet.



Figur 17: Infarktområdet i hjertesnitt markert ved hjelp av «Polygon Selections».

Resultatverdiene av arealet for LV som ble beregnet, og MI området kan benyttes til videre beregning av infarktstørrelse (%), ved bruk av formel 1.

3.2 Kvantifisering av infarktstørrelse

Tabell 1: Målinger av LV-areal, MI-areal og gjennomsnittlig infarktareal av MI-Sedat og MI-Trente rottehjerter ved bruk av Color Threshold i Fiji. (Sed=MI-Sedat, Trent=MI-Trent)

ID	LV-areal (μm^2)	MI-areal (μm^2)	Infarktstørrelse per snitt (%)
Sed 1 A1-1	26514465,54	13010866,86	49,07
Sed 1 A1-2	12524546,80	2716942,63	21,69
Sed 1 A1-3	52518962,12	6656710,52	12,67
Sed 1 B1-4	50130890,98	2134180,58	4,26
Sed 1.1 A1-1	26138233,02	12927261,04	49,46
Sed 1.1 A1-2	12338453,97	2684681,48	21,76
Sed 1.1 A1-3	52518962,12	6656710,52	12,67
Sed 1.1 B1-4	50014239,93	2100844,48	4,20
Sed 2 A1-1	36815345,33	8973898,19	24,38
Sed 2 A1-2	11436697,33	2890616,62	25,27
Sed 2 A1-3	45021779,75	3288474,61	7,30
Sed 3 A2-1	31903468,47	6382674,13	20,01
Sed 3 A2-2	49877139,53	8613081,71	17,27
Sed 3 A2-3	46876119,21	7494286,32	15,99
Sed 3 B1-4	44535055,01	1558449,97	3,50
Trent 1 A1-1	39323735,00	8544588,42	21,73
Trent 1 A2-2	57409023,81	8610552,42	15,00
Trent 1 A1-3	50047019,58	4729805,61	9,45
Trent 2 A1-1	33599018,84	13980636,23	41,61
Trent 2 nr 2	43816899,83	15248457,64	34,80
Trent 2 A1-3	60158834,62	4564301,24	7,59
Trent 3 A1-1	34445902,44	8710611,30	25,29
Trent 3 A1-2	8481027,26	1790575,95	21,11
Trent 3 nr.3	12783065,97	5165691,54	40,41
Trent 3 B1-4	16297735,37	2290111,57	14,05

Tabell 2: Innhentede EF-verdier og beregnet gjennomsnittlig infarktstørrelse per rottehjerte. (Sed=MI-Sedat, Trent=MI-Trent).

ID	EF (%)	Gjennomsnittlig infarktstørrelse per hjerte (%)
Sed 1	24.87	21,92
Sed 2	31.67	18,98
Sed 3	40.88	14,19
Trent 1	24.88	15,39
Trent 2	31.56	28,00
Trent 3	17.19	25,22

Tabell 3: Målinger av endokardial og epikardial lengde, infarkttykkelse-paralleller av MI-Sedat og MI-Trente rottehjerter og beregnet gjennomsnittlig infarkttykkelse. Utført ved hjelp protokollen Color Threshold (Sed=MI-Sedat, Trent=MI-Trent).

ID	Endolengde (µm)	Epilengde (µm)	Infarkttykkelse (µm)			Gjennomsnitt
			1	2	3	
Sed 1 A1-1	18524,43	14479,42	467,96	832,42	1283,07	861,15
Sed 1 A1-2	5554,89	5068,00	334,83	553,64	834,61	574,36
Sed 1 A1-3	1376,54	6632,64	336,23	1232,18	2825,04	1464,48
Sed 1 B1-4	x	x	X	x	x	x
Sed 1.1 A1-1	17992,23	14488,33	512,34	764,87	1347,42	874,87
Sed 1.1 A1-2	5168,73	4949,92	319,68	523,20	840,38	561,09
Sed 1.1 A1-3	1375,79	6406,42	331,93	1165,95	2907,92	1468,60
Sed 1.1 B1-4	x	7357,84	127,23	708,67	1207,10	681,00
Sed 2 A1-1	14992,25	11312,52	526,51	821,84	1162,78	837,04
Sed 2 A1-2	4835,13	4649,25	471,46	501,36	788,83	587,22
Sed 2 A1-3	x	3416,49	X	x	x	x
Sed 3 A2-1	9911,23	8301,74	252,06	750,89	1287,64	763,53
Sed 3 A2-2	12700,97	10455,90	428,28	1743,16	3028,40	1733,28
Sed 3 A2-3	3939,71	8178,42	1113,26	1653,62	2982,76	1916,55
Sed 3 B1-4	231,13	2886,57	105,01	278,20	722,60	368,60
Trent 1 A1-1	9471,77	8814,14	603,51	1160,87	1891,95	1218,77
Trent 1 A2-2	7995,43	8978,46	900,47	1346,95	1979,30	1408,90
Trent 1 A1-3	1757,76	5805,96	473,71	694,69	976,96	715,12
Trent 2 A1-1	16401,48	16078,59	392,28	1093,83	1789,52	1091,88
Trent 2 nr 2	10824,31	14846,28	746,50	1059,36	1412,93	1072,93
Trent 2 A1-3	x	x	X	x	x	x
Trent 3 A1-1	28845,97	15648,96	433,86	1030,88	1494,55	986,43
Trent 3 A1-2	10557,21	4609,52	192,50	599,51	987,57	593,19
Trent 3 nr.3	7987,90	5345,46	108,16	533,43	999,61	547,07
Trent 3 B1-4	2029,60	4994,45	71,57	394,34	962,42	476,11

Tabell 4: Parallellmålinger av ventrikulær frivegg-tykkelse fra Fiji med beregnet gjennomsnittstykkelse. Utført ved hjelp av protokoll for Color Threshold.

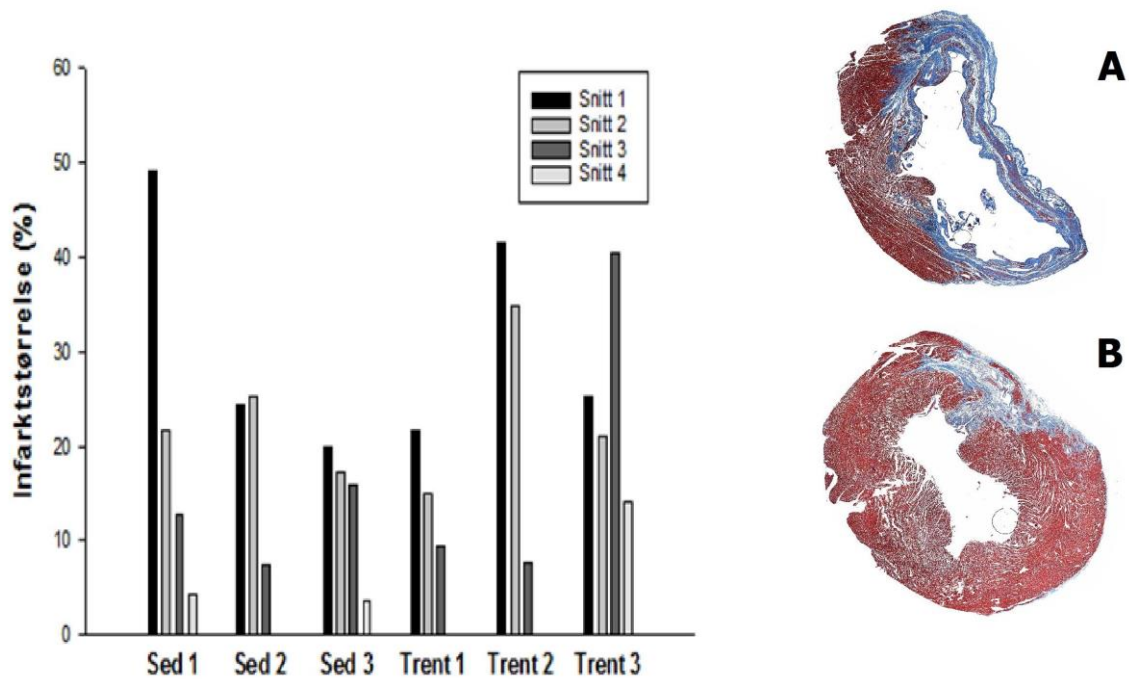
Ventrikulær frivegg-tykkelse (μm)				
ID	1	2	3	Gjennomsnitt
Sham 1 A1-1	605,68	998,78	1480,47	1028,31
Sham 1 A1-2	820,65	1446,29	1935,98	1400,97
Sham 1 A1-3	935,01	1422,16	1916,37	1424,51
Sham 1 B1-4	2092,02	2839,84	3736,98	2889,61
Sham 2 A1-1	1408,25	2793,94	3343,67	2515,29
Sham 2 A1-2	1620,08	3499,87	4047,82	3055,92
Sham 2 A1-3	2613,69	3063,35	3484,23	3053,75
Sham 3 A1-1	799,79	1793,97	2844,33	1812,69
Sham 3 A2-2	1067,07	2511,08	4008,49	2528,88
Sham 3 A2-3	1432,13	2089,84	2625,25	2049,07

Tabell 5: Arealmålinger av total LV, lumen og MI avskrevet fra Fiji, og beregnet infarktstørrelse per snitt. Utført ved hjelp av Polygon Selections. (Sed=MI-Sedat, Trent=MI-Trent).

ID	Total LV-areal (μm^2)	Lumen-areal (μm^2)	MI-areal (μm^2)	Infarktstørrelse per snitt (%)
Sed 1 A1-1	37931699,95	11244243,33	15702731,54	58,84
Sed 1 A1-2	17364300,83	4793935,87	3515061,44	27,96
Sed 1 A1-3	68111087,62	9834553,80	8490297,12	14,57
Sed 1 B1-4	60092567,11	6917708,40	2286052,06	4,30
Sed 1.1 A1-1	38164521,49	11328114,73	15967187,47	59,50
Sed 1.1 A1-2	17260043,32	4803129,85	3361368,87	26,98
Sed 1.1 A1-3	68282169,08	9818126,04	7966062,94	13,63
Sed 1.1 B1-4	60666628,39	6414239,72	1038755,87	1,91
Sed 2 A1-3	55900059,49	8384117,35	3157153,65	6,64
Sed 3 A2-3	63830573,20	10816451,14	8823759,28	16,64
Trent 1 A1-3	64799925,23	7654517,12	6031127,52	10,55
Trent 2 A1-3	70506784,58	4955380,72	5524674,28	8,43
Trent 3 nr 3	14224346,38		4038233,32	28,39

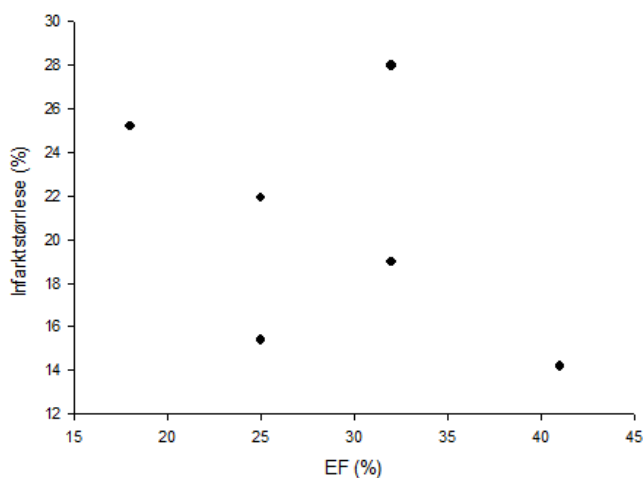
3.2.1 Bearbeidelse av rådata

Tabell 1 viser verdier for LV- og infarktareal målt med Color Threshold i Fiji. Dette ble gjort for hvert snitt for å beregne infarktstørrelsen i prosent. Arealet av infarkt per histologiske snitt er illustrert i figur 18, som gir informasjon om hvordan infarkt brer seg utover i hjertet.



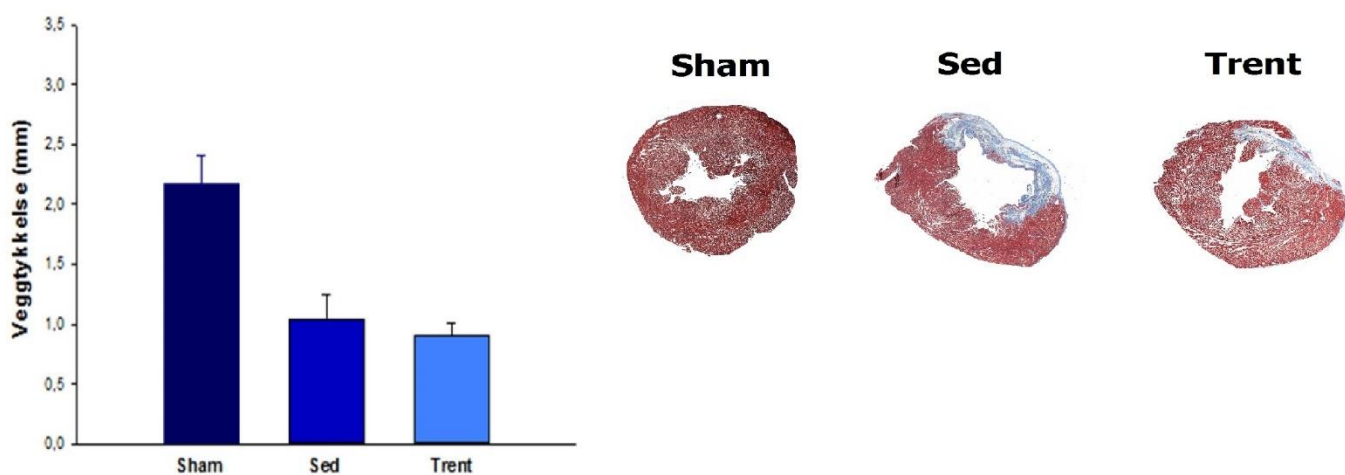
Figur 18: Graf som viser infarktstørrelse per histologiske snitt fra de 6 MI-induserte rottehjertene. A viser histologisk snitt 1 av Sed 1 og B viser histologisk snitt 3 av samme hjerte. (Sed=MI-Sedat, Trent=MI-Trent).

Gjennomsnittlig infarktstørrelse ble benyttet til å studere korrelasjon mellom infarktstørrelse estimert ved hjelp av histologi og EF som ble benyttet til å bedømme infarktstørrelse in vivo, se tabell 2. Denne korrelasjonen ble gjort for å se om bedømmelse av infarktstørrelse in vivo stemmer overens med estimat ex vivo, altså Color Threshold. Korrelasjon mellom gjennomsnittlig infarktstørrelse og EF-verdier i de 6 MI-induserte hjertene er illustrert i figur 19.



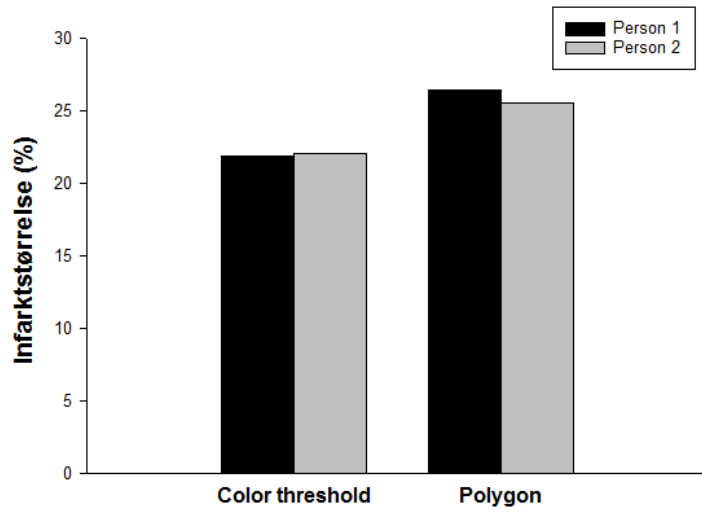
Figur 19: Graf over korrelasjon mellom gjennomsnittlig infarktstørrelse per hjerte og de respektive EF-verdier.

Det ble gjort lengdemålinger av infarktomsråde per snitt i MI-induserte rottehjerter (3.1.1.). Lengdemålinger ble utført for å få informasjon om utseende på infarkt, og forståelse av hvordan infarkt ligger i vevet, se tabell 3. Frivegg-tykkelse ble målt i alle snitt for alle grupper (MI-Sed og MI-Trent tabell 3, Sham tabell 4). Figur 20 viser frivegg-tykkelse i de 3 gruppene og en kan tydelig se at friveggen er tykkest hos Sham. Dette stemmer med teori som tidligere har vist at hjerteveggen blir tynnere etter infarkt (18). For Sham-hjerter, altså hjerter uten MI, ble frivegg-tykkelsen målt per snitt og er ført opp i tabell 4.



Figur 20: Graf over fri-veggykkelse i Sham-hjerter, og infarkttykkelse i MI-induserte hjerter, med histologiske snitt til høyre. (Sed=MI-Sedat, Trent=MI-Trent).

Ved hjelp av Polygon Selections i (3.1.2) ble arealmålinger av total LV, lumen og MI utført. Disse målingene ble gjort for å beregne infarktstørrelse per snitt, som ført opp i tabell 5. For sammenligning mellom metodene i Fiji, samt å se forskjell mellom to personer som utfører samme metode, se figur 21. Det ble funnet at Polygon Selections gir et jevnt høyere resultat enn infarktstørrelser målt med Color Threshold, i ett hjerte.



Figur 21: Graf som sammenlikner infarktstørrelse målt av to personer, utført ved bruk av begge metodene.

4. Diskusjon

4.1 Fiji-protokoller

For å kunne bruke Fiji til å optimalisere kvantifisering av infarktstørrelse i rottehjerter, ble det utarbeidet to protokoller som deretter ble testet gjentatte ganger. Før standardisering av Color Threshold var det nødvendig å utføre en rekke tiltak, slik at en i det hele tatt kunne analysere bildene. Det ble laget en Fiji-makro som klargjorde bildedataene ved at pikselstørrelsen ble kalibrert i μm og bildefilene ble skalert ned uten at de fysiske dimensjonene ble forandret. Opprinnelig benytter applikasjonen seg av piksler eller tommer for målinger, noe som var ugunstig for denne oppgaven. Skalering var nødvendig fordi de originale filene var så store at datamaskinene ikke klarte å håndtere de.

Standardisering av Color Threshold begynte med at én person klippet ut RV på alle bildene og sikret like betingelser hver gang. Videre ble det bestemt å ha en fastsatt verdi på “Brightness” både ved måling av LV-areal (hele snittet) og infarktareal innad i samme snitt, også dette for å sikre like betingelser. “Brightness” justerer hvor mye av hjertet som markeres, eksempelvis dersom LV-areal markeres mer enn infarktareal vil dette gi en falsk for lav beregnet infarktstørrelse senere, og derfor er det viktig at den samme verdien blir brukt innad i ett snitt.

Color Threshold brukes på grunn av muligheten til å gjøre målinger basert på farge. Snittene ble farget slik at det friske vevet ble rødfarget, mens infarktområdet med kollagene fibre ble farget blått. Dermed var det mulig å differensiere disse områdene i Fiji, siden applikasjonen innstilles til å markere områder med ulike farger. Ved måling av LV-areal ble hele fargeskalaen tatt i bruk slik at hele snittet ble markert. For måling av infarktområdet derimot, måtte kun blåtoner velges fra fargeskalaen. For å markere de samme nyansene av blå ved hver analysering, ble det fastsatt to verdier.

I motsetning til resten av protokollen ble lengdemålingene gjort manuelt og subjektivt, da det ikke var en automatisert måte å utføre det på. Lengdemålingene kunne dermed ikke standardiseres, da det var opp til analytiker å markere ønsket område til måling.

For å kunne starte bildeanalyseringen ved bruk av Polygon Selections, var det også her nødvendig å innføre en makro for å nedskalere bildene og kalibrere applikasjonen for å få

målingene ut i riktig enhet, og deretter standardisere metoden ved å klippe ut RV. Dette er felles for begge metodene i Fiji. Utenom dette har ikke Polygon Selections noen parametere med fastsatte verdier som kan sikre en mer objektiv metode.

4.2 Bruk av Fiji til målinger

Funnene i tabell 1 viser Color Threshold-verdier av LV-areal, MI-areal og beregnet gjennomsnittlig infarktareal i prosent for MI-Sedat og MI-Trente rottehjerter. Fra tabell 1 og figur 18 kan en se at hos 5 av 6 MI-induserte rottehjerter ligger hovedtyngden av infarkt nær apex. Dette samsvarer med figur 4, som viser at det nekrotiserte vevet er lokalisert under stinget som ble satt under infarktoperasjon. Dette gjelder ikke rottehjertet med ID Trent 3, noe som kan skyldes av at stinget ble satt for høyt opp på kranspulsåren mot basen. Siden stinget fører til iskemi i det omkringliggende vevet, vil det i dette tilfellet føre til at infarktområdet befinner seg lengre opp mot basen. En annen mulig årsak til at snitt nr. 3 har den største infarktstørrelsen i forhold til de andre snittene i Trent 3, kan komme av feil opplegging av vevsbiten under innstøping. Ved overføring av vevsbiten fra kassett til form kan den ha vært lagt med apex-siden ned i stedet for base-siden ned. Dette kunne i så fall ha ført til en falsk forhøyet målt infarktstørrelse, da det er forventet at det skadde område blir mindre desto nærmere en kommer basen.

For å studere korrelasjon mellom ekkokardiografisk EF og histologisk infarktstørrelse, ble det laget et korrelasjonsdiagram. Resultatet fra tabell 2 og figur 19 gir indikasjon på om det er samsvar mellom innhentede EF-verdier og målte verdier på MI-størrelse fra Fiji ved bruk av Color Threshold. En trend kan ses ut ifra figur 19, der 4 av 6 rottehjerter er ganske lineære. De 4 lineære verdiene indikerer god korrelasjon mellom infarktstørrelse og EF verdier og antyder at ekkokardiografi på rotter har vært en god måte å bedømme infarktstørrelse. Trenden tyder på at jo lavere EF, desto større infarktstørrelse. De to avvikende rottehjertene fører til en helhetlig dårligere korrelasjon mellom alle punktene, da de ligger spredt fra de punktene som ligger lineært. Det helhetlige resultatet kan da ikke kommenteres som forventet. For å sikkert kunne si noe om korrelasjonen mellom EF-verdiene og infarktstørrelsen i rottehjertene, burde flere rottehjerter analyseres for å ha et større statistisk grunnlag. Mulige årsaker til observerte «Outliers» i figur 19 kan skyldes at ekkokardiografiske bilder kan være utydelig på enkelte MI-rotter og gi unøyaktige EF-målinger, eller unøyaktighet under bildeanalysingen av histologiske snitt.

For å beskrive infarktets lengde- og tykkelsemålinger gjort. Selv om lengdemålingene ikke er direkte kvantifisering av infarktstørrelse, viser det at tyngden av infarkt ligger nærmest apex, basert på figur 4 og det oppnådde resultatet fra tabell 1. Dette ses i tabell 3, hvor lengden på infarktets epikardialt og endokardialt blir jevnt kortere desto nærmere en kommer basen. Lengdemålingene forteller noe om hvordan infarktets utformet i myokard. Et eksempel er MI-sedat 2, snitt A1-3 i tabell 3, som kun viser måling av epikardial lengde, da infarktets ikke var transmuralt, og hadde friskt vev endokardialt.

Det ble gjort en sammenligning av veggtykkelse mellom MI-induserte- og Sham-rottehjerter. Det er tykkere frivegg hos Sham-rottehjerter i forhold til frivegg hos MI-rottehjerter, veggens blir altså tynnere der infarktets sitter (tabell 4 og figur 20). Dette stemmer med teorien som ble nevnt innledningsvis, om at hjerter som hadde utviklet hjertesvikt på grunn av MI hadde tynnere, svakere og dilatert LV (18).

Siden det er to ulike metoder (3.1.1 og 3.1.2) i Fiji var det interessant å se hvilken av de som var best egnet. Tabell 5 viser Polygon Selections-målingene av infarktstørrelse, og ut ifra figur 21 kan en se at metoden gir et høyere måleresultat av MI-areal i forhold til Color Threshold. Dette kan komme av at Polygon Selections er basert på øyemål, og er dermed en mer subjektiv måling av infarktstørrelse. Ved manuell markering av ulike areal er det større mulighet for å markere hvit bakgrunn og eventuelt friskt rødt vev ved infarktarealmålinger. Dette forårsakes av at bildene inneholder så mange detaljer som er uungåelig å ekskludere, noe som gir dårligere nøyaktighet. Dette støtter tidligere påstand om Color Threshold-metodens objektivitet i forhold til Polygon Selections. På figur 21 kan en også se at de individuelle forskjellene mellom analytikerne er større ved bruk av Polygon Selections sammenlignet med Color Threshold. Dette er kun basert på ett hjerte, og for å sikkert kunne si at det er en signifikant forskjell, så må det gjøres statistikk basert på flere analyserte rottehjerter.

5. Konklusjon

Ut ifra resultater oppnådd ved optimalisering av kvantifisering av infarktstørrelse i rottehjerter, har en fått en indikasjon på at protokoll for Color Threshold-metoden er mer standardisert og objektiv i forhold til protokoll for Polygon Selections-metoden. Color Threshold ble derfor ansett som best egnet metode. Color Threshold har noen fastsatte parametre og verdier, med kun en innstilling som er justerbar. Metodens egnethet kommer også frem i figur 21, der det er mindre differanse mellom målinger utført av to ulike personer ved bruk av Color Threshold. Likevel kan det ikke konkluderes med forskjell i metodene, da begge metodene kun ble benyttet på ett hjerte ved metodesammelingning.

Korrelasjon mellom ekkokardiografiske EF-verdier og histologiske infarktstørrelsesmålinger i rottehjerter kan midlertidig ikke fastslås, da en kun har data fra 6 hjerter (få målepunkter). Forslag til videre arbeid blir derfor å benytte Color Threshold til å analysere alle de resterende rottehjertene i prosjektet “Kan trening forebygge eller redusere MI-induserte arytmier?” hos CERG. Dette for å oppnå et bedre statistisk grunnlag og i tillegg en bedre metodesammenligning.

6. Referanse

1. *Om CERG (Cardiac Exercise Research Group)* [Internett]. Tilgjengelig på: <https://www.ntnu.no/cerg/om-gruppen> [Hentet: 2. april 2019]
2. *Cardiac Exercise Research Group (CERG)* [Internett]. Tilgjengelig på: <https://www.ntnu.no/cerg> [Hentet: 2. april 2019]
3. Johnsen A-B, Høydal M, Røsbjörgen R, Stølen T, Wisløff U. *Aerobic Interval Training Partly Reverse Contractile Dysfunction and Impaired Ca²⁺ Handling in Atrial Myocytes from Rats with Post Infarction Heart Failure* [Internett]. 2013 Tilgjengelig på: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0066288> [Hentet: 7. mai 2019]
4. Wisløff U, et al. *Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study* [Internett]. 2007 Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548726> [Hentet: 7. mai 2019]
5. Marit Øilo. *Translasjonsforskning* [Internett]. 2005 Tilgjengelig på: (<https://www.tannlegetidende.no/i/2005/10/dntt-158076>) [Hentet: 3. april 2019]
6. Johnsen A-B. *Prosjektbeskrivelse til Forskningsrådet « Can exercise training prevent or reduce MI induced arrhythmias»*. 2014.
7. Arnesen H. *SML Hjertet* [Internett]. 2019 Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/hjertet> [Hentet: 10. april 2019]
8. Sand O, V. Sjaastad Ø, Haug E, Jan G. Bjålie. *Menneskekroppen, Fysiologi og anatomi*. 2. utg. Oslo: Gyldendal Norsk Forlag AS; 2006.
9. Sjaastad I, Taraldsen T. *Anatomi og fysiologi, NA 1*. 5. utg. Oslo: Medisinsk basislitteratur; 2001.
10. NHI *Hjertets ledningssystem - animasjon* [Internett]. 2014 Tilgjengelig på: <https://nhi.no/animasjoner/hjerte-og-kar/hjertets-ledningssystem/> [Hentet: 12. april 2019]
11. R. Marks A. *52 - Cardiac Function and Circulatory Control* [Internett]. 2012 Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/coronary-artery> [Hentet: 12. april 2019]
12. Norsk legemiddelhåndbok. *T8.6 Hjertesvikt* [Internett]. 2017 Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/T8.6/Hjertesvikt> [Hentet: 15. april 2019]
13. NHI. *Kronisk hjertesvikt* [Internett]. 2018 Tilgjengelig på: <https://nhi.no/sykdommer/hjertekar/ulike-sykdommer/hjertesvikt-kronisk/> [Hentet: 15. april 2019]
14. Forfang K. *Hjertesvikt* [Internett]. 2016 Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/hjertesvikt> [Hentet: 15. april 2019]

15. Roald B. *Nekrose* [Internett]. 2018 Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/nekrose> [Hentet: 16. april 2019]
16. Holck P. *Bindevev* [Internett]. 2018 Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/bindevev> [Hentet: 20. april 2019]
17. Bunag R. *Myocardial Infarction* [Internett]. 2008 Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/myocardial-infarction> [Hentet: 21. april 2019]
18. American Heart Association. *Heart Failure* [Internett]. 2019 Tilgjengelig på: https://watchlearnlive.heart.org/CVML_Player.php?moduleSelect=hrtflr [Hentet: 7. mai 2019]
19. American Heart Association. *Ejection Fraction Heart Failure Measurement* [Internett]. 2017 Tilgjengelig på: <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-failure/diagnosing-heart-failure/ejection-fraction-heart-failure-measurement> [Hentet: 16. mai 2019]
20. Nastic D, Wagner J. *Histologi : en översikt*. 1. utg. Lund, Sverige: Studentlitteratur; 2013.
21. Bhagavan NV, Ha C-E. *Conective Tissue* [Internett]. 2012 Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/connective-tissue> [Hentet: 30. april 2019]
22. Loganathan K. *MASSONS Trichrome Principle* [Internett]. Tilgjengelig på: <https://www.scribd.com/document/86721736/MASSONS-Trichrome-Principle> [Hentet: 15. mai 2019]
23. LabCE. *Masson's Trichrome Staining - Chemistry* [Internett]. Tilgjengelig på: https://www.labce.com/spg531613_massons_trichrome_staining___chemistry.aspx [Hentet: 20. april 2019]
24. Spitalnik DrP. *Cells, Organelles: Basic and Acid Stains* [Internett]. Tilgjengelig på: http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/sbpm_histology_old/lab/lab01_acid_stains.html [Hentet: 24. april 2019]
25. ThermoFisher SCIENTIFIC. *EVOS™ FL Auto 2 Imaging System* [Internett]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/AMAFD2000> [Hentet: 30. april 2019]
26. ImageJ. *ImageJ Welcome* [Internett]. 2018 Tilgjengelig på: <https://imagej.net/Welcome> [Hentet: 30. april 2019]
27. ImageJ. *Introduction* [Internett]. Tilgjengelig på: <https://imagej.nih.gov/ij/docs/intro.html> [Hentet: 30. april 2019]
28. *Fiji* [Internett]. Tilgjengelig på: <https://fiji.sc/> [Hentet: 30. april 2019]
29. Wisløff U et al. *Intensity-controlled treadmill running in rats: VO(2 max) and cardiac hypertrophy*. - *PubMed - NCBI* [Internett]. 2001 Tilgjengelig på: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11179077> [Hentet: 16. mai 2019]

30. Kemi O et al. *Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy*. - *PubMed - NCBI* [Internett]. 2002 Tilgjengelig på:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12235029> [Hentet: 16. mai 2019]
31. Valentin J, Frobert A, Ajalbert G, Cook S, Giraud MN. *Histological Quantification of Chronic Myocardial Infarct in Rats* [Internett]. 2016 Tilgjengelig på:
<https://www.jove.com/video/54914/histological-quantification-of-chronic-myocardial-infarct-in-rats> [Hentet: 3. mai 2019]
32. Røsbjørgen R. *Histologiske teknikker – fra vev til mikroskopering*. HBIO2006 Medisinsk laboratorieteknologi 4 2BIO; 2018 Vår.
33. *Fremføring av histologiske preparater* [Internett]. Tilgjengelig på:
<http://ss.prod.fpl.nhn.no/SiteCollectionDocuments/Medisinsk%20serviceklinikk/Laboratoriene/Pr%C3%B8vens%20gang%20Ingvill%20100111.pdf> [Hentet: 11. mai 2019]
34. ImageJ. *Macro Language* [Internett]. Tilgjengelig på:
<https://imagej.nih.gov/ij/developer/macro/macros.html> [Hentet: 18. mai 2019]

Hurtig Masson Trichrome

Forfatter: Gudrun Hovstein Erikstad
Godkjent av: Harald Aarset

Gyldig fra: 01.02.2010
Ble utfaset: 04.01.2013

Revisjon: 1.3
ID: 4739

Det finnes uleste brukerkommentarer for dette dokumentet. Gå til brukerkommentarer.

Hensikt

Hurtig Masson Trichrome er en fargemetode for kollagene fibre. Den skiller mellom muskulatur og bindevev.

Omfang

Prosedyren omfatter farging av histologiske snitt med Hurtig Masson Trichrome.

Arbeidsbeskrivelse**Ansvar**

Prosedyren utføres av Bioingeniører ved seksjon for biopsi og obduksjon, Avdeling for patologi og medisinsk genetik, St. Olavs Hospital.

Fiksering

Formalin eller Zenkers væske.

Snitt

3 µm.

Framgangsmåte

1. Snittene avparafineres og rehydreres.
2. Celestine blue i 5 min. Glasstav.
3. Skylls i rennende vann.
4. Hematoxylin i 5 min.
5. Skylls i lunkent rennende vann i 5 min.
6. Syrefuksin-Ponceau i 2 min. (20.sek. hvis Zenker fiksert).
7. Skylls i vann.
8. 1 % Wolframfosforysyre i 5 min. Glasstav. Sjekk i mikroskop. Kollagene fibre skal være helt avfarget, muskulatur rød.
9. Rett i Metylblått i 4 min. Glasstav.
10. Skylls i 1% eddiksyre for å fjerne overskudd av Metylblått.
11. Dehydreres, klares og monteres.

Resultat

Muskel: Rød
Kollagen: Blå

Løsninger**Celestine blue**

Celestine blue	0,25g
Jemalun	2,50g

RO-vann	50 mL
---------	-------

Kokes i 3 minutter, avkjøles og filtreres, tilsatt

Glycerol	7 mL
----------	------

Holdbar 2-3 måneder.

Bruk reagens fra MSB (Lendrum)

Hematoxylin

Se egen prosedyre.

Syrefuksin-Ponceau

Syrefuksin	0,3g
Ponceau S	0,7g
Kons. Eddiksyre	1 mL
RO-vann	99mL

Metylblått

Metylblått	0,5g
Kons. Eddiksyre	1 mL
RO-vann	99 mL

Bruk reagens fra MSB.

1 % Wolframfosforye i RO-vann (100 mL)

Bruk reagens fra MSB.

1% eddiksyre i RO-vann (100 mL)

Reagenser

Syrefuksin (Fuchsin acid, Rubin S)	s	C.I nr. 42685
Poncau S	s	C.I nr. 27195
Eddiksyre	l	CH ₃ COOH (C ₂ H ₄ O ₂)
Metylblått (Methyl Blau)	s	C.I.nr. 42780
Celestine blue	s	C.I nr. 51500
Jernalun (Ammoniumjern(III)sulfat-12-hydrat)	s	NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O
Glycerol (Glycerin) 85 %	aq	C ₃ H ₈ O ₃
Wolframfosforye (Wolframetophosphosaltre, Tungstophosphoric acid hydrate, Phosphotungstic acid)	s	H ₃ [P(W ₃ O ₁₀) ₄]·xH ₂ O

Grunnlagsinformasjon

Prinsipp

Det er flere forslag vedrørende fargeprinsipp for trichrome fargene. Den mest brukte er at anionfargestoffene i denne fargemetoden trenger inn i forskjellig vev på grunnlag av størrelse og fester seg til positivt ladete molekyler i vevet. Se for øvrig prosedyre for MSB (Lendrum).

Kritiske punkt

- Viktig med riktig fiksering. Ubuffrede formaldehydløsninger og løsninger med glutaraldehyd må unngås, da dette gir forskjellige kryssbindinger og dermed annen tetthet i vevet enn nøytralbufferet formalin.

Forandringer på prosedyren

- Det har vært problem med kjernefargen. Opprinnelig ble det brukt bare Celestine Blue, men med en påfølgende farging med Hematoxylin ble resultatet bedre.
- Det har vært problem med Blåfargen for bindevev. Tidligere ble brukt Anilinblå (0,5 % løsning i 2 % Eddiksyre), og blåfargen ble veldig blek. Forsøk med Metylblått gav bedre resultat.

Kilder

- J.A.Kieman: Histochemical & Histochemical Methods: Theory and Practice, 2.utgave Pergamon Press 1990 s.121-124
- Bancroft & Stevens Theory and Practice of Histopathological Techniques, 4.utgave Churchill Livingstone, s.125-131

Vedlegg

- ☐ Kortfattet oppskrift Hurtig Masson Trichrome

Artisan Link Procedure Report

MASTRI

Connective Tissue Stain

Date modified
 20.05.2010 16:21:49

Author
 Dako

Dispense - Fluid	Volume (µl)	Time	Heater	Mixes	Aspirate	Waste
1 None	0	0	Off	0	<input checked="" type="checkbox"/>	Water soluble
2 Reagent - Masson's (1/8) - Bouin's Solution	1000	720	50	1	<input type="checkbox"/>	None
3 Bulk fluid - Wash solution	2000	0	Off	2	<input type="checkbox"/>	None
	Bulk fluid		Volume	Aspirate	Waste	
	1 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	2 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
4 Bulk fluid - Wash solution	3000	360	42	1	<input type="checkbox"/>	None
	Bulk fluid		Volume	Aspirate	Waste	
	1 Wash solution		2000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	2 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
5 Bulk fluid - Wash solution	3000	360	42	1	<input type="checkbox"/>	None
	Bulk fluid		Volume	Aspirate	Waste	
	1 Wash solution		2000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	2 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
6 Reagent - Masson's (2/8) - Weigert's A	1000	0	Off	0	<input type="checkbox"/>	None
7 Reagent - Masson's (3/8) - Weigert's B	1000	360	Off	2	<input type="checkbox"/>	None
	Bulk fluid		Volume	Aspirate	Waste	
	1 Wash solution		2000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	2 Wash solution		2000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	3 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
8 Bulk fluid - Wash solution	3000	360	Off	0	<input type="checkbox"/>	None
	Bulk fluid		Volume	Aspirate	Waste	
	1 Wash solution		2000	<input checked="" type="checkbox"/>	Water soluble	
	2 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Water soluble	
9 Reagent - Masson's (4/8) - Biebrich Scarlet Acid Fuchsin	1000	0	Off	2	<input type="checkbox"/>	None
10 Bulk fluid - Wash solution	1000	315	40	0	<input type="checkbox"/>	None
	Bulk fluid		Volume	Aspirate	Waste	
	1 Wash solution		2000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	2 Wash solution		2000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	3 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	4 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	5 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
11 Reagent - Masson's (5 or 6/8) - Phos/Phas Acid	2000	750	40	1	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye
12 Bulk fluid - Wash solution	1500	0	Off	0	<input type="checkbox"/>	None
13 Reagent - Masson's (7/8) - Aniline Blue	500	840	35	4	<input type="checkbox"/>	None
	Bulk fluid		Volume	Aspirate	Waste	
	1 Wash solution		2000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	2 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	3 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
14 Bulk fluid - Wash solution	1500	0	Off	0	<input type="checkbox"/>	None
15 Reagent - Masson's (8/8) - Acetic Acid	500	155	Off	3	<input type="checkbox"/>	None
	Bulk fluid		Volume	Aspirate	Waste	
	1 Wash solution		2000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	2 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Combined dye	
	3 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Water soluble	
	4 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Water soluble	
	5 Wash solution		3000	<input checked="" type="checkbox"/>	Water soluble	

Artisan Link Procedure Report

MASTRI

Connective Tissue Stain

Date modified
20.05.2010 16:21:49

Author
Dako

Fremgangsmåte for EVOS2

1. Logg inn på PC med samme brukernavn og passord som på innsida
2. Slå på instrumentet (bak på høyre side)
3. Trykk inn på programmet "Auto 2"
4. Sett inn objektglasset i instrumentet, med skrivefelt til høyre og preparatet vendt nedover.
5. Trykk på capture og deretter vessel, velg **slides**.
6. Fra Holder, velg "Double slide – AMEP-VH021". Top slide og bottom slide – velg "slide facing down, generic". Trykk done.
7. Fra bildet som kommer opp på skjermen, velg den posisjonen du har objektglasset i, i instrumentet.
8. Velg 10x objektiv og Trans som light source.
9. Trykk på tannhjulet (ved siden av light) for Brightness and camera settings, og velg mode **actual** og camera **color**. Trykk deretter på Light-knappen.
10. Juster følgende punkter (varierer litt for hvert preparat):
 - Light: 2.2
 - Exp: 0.0253
 - Gain: 1
 - Coarse (grovjustering): -56,9
 - Fine (finjustering): -56,9
11. Trykk på 2x objektiv for å få et oversiktsbilde. **IKKE** juster light, exp, gain og coarse selv om bildet blir utydelig på 2x objektiv, for da vil bildet bli utydelig når du bruker 10x objektiv. «Capture» så 2/3 av bildet, og capture deretter resten av bildet slik at du får opp bildet av hele snittet. Deretter, velg **Locations** og velg hvilken form du vil bruke for å markere bildet. Noen ganger er ellipse god å bruke, andre ganger er freeform god å bruke. Dette kan variere. Marker så området du vil ha bilde av. Før pilen til "Bottom Slide Area", og trykk **Set Z**. Deretter done.
12. Gå deretter til fanen **Automate**.
 - Trykk Review på hardware, og velg 10x objektiv og trans på channels. Trykk done.
 - Trykk Review scan area. Trykk på location, "bottom slide area" og **add selected**. Kryss av for stiching. Trykk done.
 - Trykk review image save settings. Trykk på More options, og kryss av for Tiled Images og huk av for formatet TIF. Color: pseudocolor. På displayed image-merged

view: single field. Kryss av Tiled per location. Skriv inn prøveID på prefix, og velg location, altså hvor du vil at de ferdigscannede bildene skal havne. Velg Done.

- Dersom du vil lagre protokollen du nå har stilt inn, slik at du kan bruke den en annen gang du skal analysere samme type bilder uten at du må stille inn alt på nytt, trykk save.
- Trykk RUN.

Alle bildene som blir scannet vil nå havne i den mappen du har valgt ut, og bildeanalyse kan starte.