



Nieuwe aanpak voor herhaaldelijk arteriële bloed afname in PET studies bij ratten

Jürgen W. A. Sijbesma, Martin C. Houwertjes, Catriene M. A. Thuring, Hendrikus H. Boersma, Riemer H. J. A. Slart, Aren van Waarde.

*Afdeling Nucleaire Geneeskunde en Moleculaire Beeldvorming, Universitair Medisch Centrum Groningen.
j.w.a.sijbesma@umcg.nl*

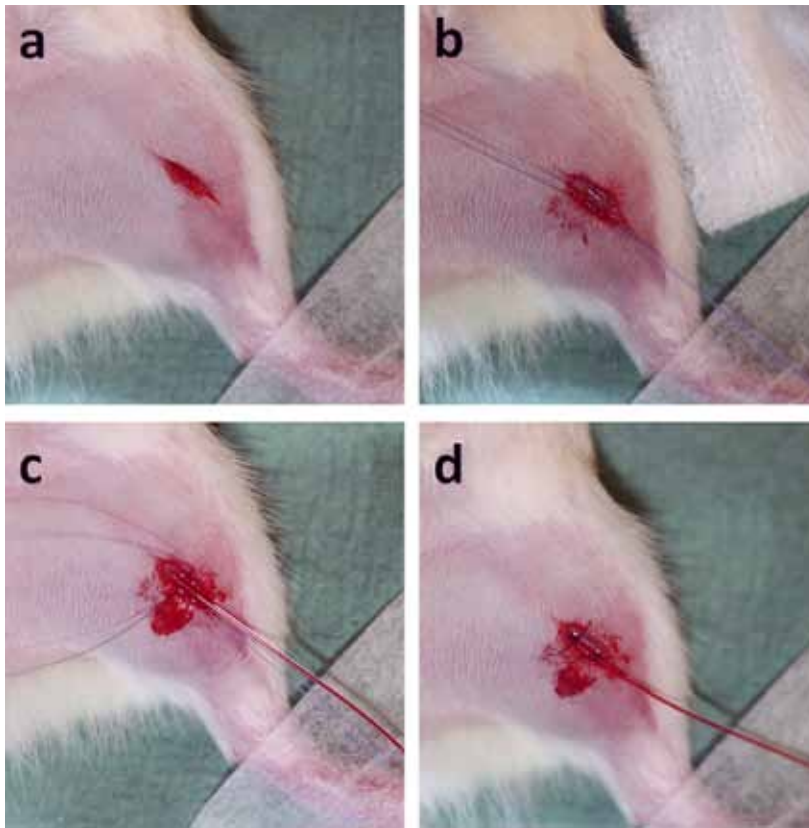
Introductie

Positron emissie tomografie (PET) is een beeldvormende techniek, waarbij met behulp van een radioactieve tracer diverse ziekteprocessen in mens en dier bestudeerd kunnen worden. Een belangrijke eigenschap van PET, ten opzichte van andere imaging technieken, is de mogelijkheid om de verkregen data te kwantificeren. Hiervoor is een bloed input curve nodig, die in veel gevallen verkregen wordt uit een serie snel genomen arteriële monsters tijdens de PET scan.

Voor afname van arterieel bloed in proefdieren wordt in ons instituut gebruik gemaakt van een katheter in de a. femoralis. De arteriën zijn eenvoudig en snel (totale ingreep duurt 10-15 minuten) te bereiken via de lies. De benodigde materialen voor het plaatsen van de katheter zijn goedkoop en de verstoorde bloedstroom als gevolg van de katheter heeft geen effect op belangrijke organen zoals de hersenen of de nieren (1-3). Echter, door de invasieve ingreep en de beschadigingen aan de arterie (schade aan de binnenwand van de arterie als gevolg van het inbrengen van de katheter) is het noodzakelijk om de dieren na afloop van het PET experiment te euthanaseren. Hierdoor zijn longitudinale studies met meerdere PET scans in combinatie met arteriële bloed monsters in hetzelfde dier niet mogelijk. Nu zijn juist deze studies erg interessant omdat ze informatie kunnen geven over de reproduceerbaarheid van de metingen. Dieren kunnen over een langere tijd gevolgd worden en bovendien kunnen aantallen benodigde proefdieren verminderd worden.

Vanwege deze redenen hebben wij een goedkope en eenvoudige techniek geïmplementeerd (gebruikt voor bloeddruk metingen), met dezelfde voordelen als een katheter in de a. femoralis, maar die minder invasief is. Hierdoor worden herhaaldelijke PET scans in combinatie met arteriële bloedafname in hetzelfde dier mogelijk.

In deze studie beschrijven en valideren wij de nieuwe techniek middels een test, re-test >>



Afbeelding 1.
Overzicht van de
katheterisatie procedure.

experiment. Hierbij ondergaan elf ratten de nieuwe katheterisatie techniek en een eerste PET scan (test) gecombineerd met arteriële bloedafname. Exact één week later wordt de gehele procedure herhaald (re-test). Wij kijken of de herhaaldelijke PET scans, inclusief bloedafname, praktisch uitvoerbaar zijn en of de resultaten van de eerste meting (test) vergelijkbaar zijn met die van de tweede (re-test) (reproduceerbaarheid). De techniek is succesvol wanneer er een hoge mate van reproduceerbaarheid is (verschillen tussen test en re-test resultaten zijn klein), de techniek praktisch uitvoerbaar is en de ratten weinig tot geen welzijnsproblemen ondervinden als gevolg van de ingreep.

Materiaal en methode

Katheterisatie

Elf mannelijke Wistar (HsdCpd:WU) ratten van 8 weken oud (+/- 2 weken) werden na levering gehuisvest in groepen in een 12 uur dag/nacht ritme met standaard chow dieet ad libitum en onbeperkte toegang tot drinkwater. Na een acclimatisatie periode van 7 dagen werd elke rat afzonderlijk 30 minuten voor de PET scan onder anesthesie gebracht met een mengsel van isofluraan en lucht. De ogen werden gezalfd tegen uitdroging. De rat werd op de rug op een elektronisch warmtematje gelegd, met een ingestelde temperatuur van 38 °C. Voor de tracer injectie werd een 26G katheter geplaatst in een staartvene. Na het scheren en schoonmaken van de linker achterpoot en lies werd een kleine incisie (1-1,5 cm) gemaakt ter hoogte van de knie (afb. 1a). Vervolgens werd een kleine zijtak van de a. femoralis (a. saphena) vrij geprepareerd. Twee ligaturen (mediaal en lateraal) werden aangebracht om de arterie op spanning te brengen en de bloedstroom te stoppen (afb. 1b). Met een gebogen 29G naald werd een gaatje geprikt waarna de katheter (polythene, 0,28 mm binnendiameter; 0,61 mm buitendiameter, REF800/100/100 Portex) via het gaatje werd ingebracht (afb. 1c). De ligaturen werden losge-

maakt en de katheter werd doorgeschoven tot aan de a. femoralis. Zodra de katheter op de goede plek zat, werd de canule gespoeld met een spoelvloeistof (mengsel van heparine en voorverwarmd fysiologische zout (0,01 ml/1 ml)). De twee ligaturen werden gebruikt om de katheter te fixeren (afb. 1d). De wond werd vervolgens afgedekt met een vochtig gaasje om uitdroging van de wond te voorkomen. De katheter werd regelmatig gespoeld met spoelvloeistof.

PET scan en bloedmonsters

De rat werd na het plaatsen van de katheter onder anesthesie op de rug in de PET camera (Focus 220, Siemens Medical Solutions USA) gelegd met de hersenen in het scan gebied. Temperatuur, zuurstofspanning en hartslag werden continu gemonitord. Na positionering onderging de rat een correctiescan van 10 minuten. Na de correctie scan werd 39 ± 18 MBq van een PET tracer (^{11}C JMPDX) in een oplossing van 1 ml met behulp van een infuuspomp (1 ml/60 seconden) via de staartvene geïnjecteerd. Tegelijk met de start van de injectie werd gestart met de PET scan voor een periode van 60 minuten. Tijdens de PET scan werden 15 arteriële bloedmonsters (0,1-0,15 ml) genomen op 0,17-0,33-0,5-0,67-0,83-1-1,5-2-3-5-7,5-10-15-30 en 60 minuten na de start van de scan. Tussen het nemen van de bloedmonsters werd regelmatig gespoeld met de spoelvloeistof om de katheter schoon te houden en te compenseren voor bloedverlies. Na de PET scan werden de katheters verwijderd en werd de a. saphena afgesloten. De wond werd gesloten met 3-5 hechtingen (V991H Ethicon). Bupivacaine (Marcaine 0,5 %; 2,5 mg/kg) werd subdermaal geïnjecteerd voor pijnstilling. Pijnstilling werd niet preoperatief toegepast, omdat zwellingen als gevolg van de injectie het hechten bemoeilijkt.

De rat werd na afloop bijgebracht en teruggeplaatst in een voorverwarmde (38 °C) thuishok. Om de wond goed te laten genezen, werden de ratten individueel gehuisvest. De ratten werden dagelijks gecontroleerd op gewichtsverlies, oncontroleerbare bloedingen en tekenen van infectie en verlamming.

Precies één week later werd de gehele procedure exact herhaald, met als enige verschil dat de katheter in de rechter a. saphena werd ingebracht en de rat na de PET scan werd geëuthanaseerd om organen te verzamelen voor verdere analyse.

PET analyse en reproduceerbaarheid

MicroPET Manager software werd gebruikt om de PET data te verwerken tot een afbeelding. De verschillende hersengebieden werden gelokaliseerd met behulp van een MRI (Magnetic resonance imaging) sjabloon van het rattenbrein (4). Data verkregen uit de arteriële bloedmonsters (plasma tijds-activiteits curve, radioactiviteit in het bloed en metabolietgegevens) werden gebruikt om uiteindelijk de verdeling van de tracer in de verschillende hersengebieden te berekenen. De tracer verdeling werd uitgedrukt als een distributievolume (VT). De parameter VT werd gebruikt om iets te kunnen zeggen over de mate van reproduceerbaarheid van de scan. Hierbij keken wij onder andere naar het verschil tussen de VT waarden van de eerste (test) en de tweede (re-test) PET scan. De reproduceerbaarheid is goed wanneer het verschil tussen beiden metingen klein is. Verder werd er gekeken naar de variatie van de VT waarden tussen de test en de re-test PET scan uitgedrukt als de test re-test variatie (TRV). De reproduceerbaarheid is beter naarmate de TRV lager is. Als laatste keken wij naar de betrouwbaarheid van het scanresultaat, aangeduid als de intraclass correlation coefficient (ICC) van de test en de re-test scan. De metingen worden beschouwd als zeer betrouwbaar (hoge reproduceerbaarheid) wanneer de waarde van de ICC dicht bij de 1 ligt (5).

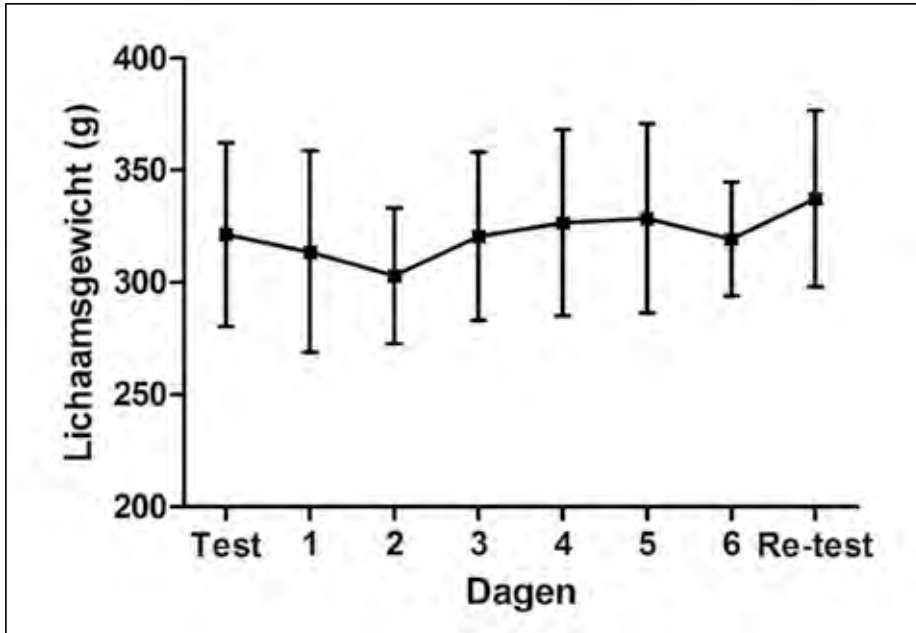
$$\text{Verschil} = 100 * (\text{Retest} / \text{Test}) - 100$$

$$\text{TRV} = 100 * [(\text{Test} - \text{Retest}) / ((\text{Test} + \text{Retest}) / 2)]$$

$$\text{ICC} = [\text{MSBS} - \text{MSWS}] / [\text{MSBS} + (n - 1) * \text{MSWS}]$$

$$(\text{MSWS mean square within subjects, MSBS mean square between subjects})$$

»



Afbeelding 2.
Gemiddeld
lichaamsgewicht
van de ratten
tussen de test en
de re-test
PET scan.



Afbeelding 3.
Wond op dag 2
na de ingreep.

Resultaten

Katheterisatie

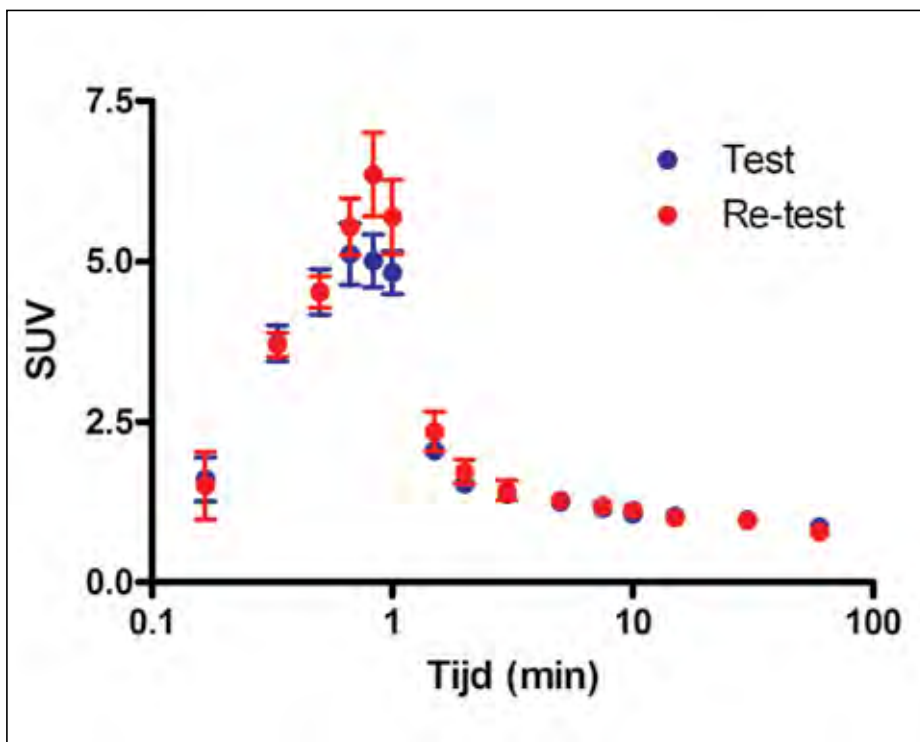
Het plaatsen van de katheter was in 82% (9 uit 11) van de gevallen in de test en 100% (9 uit 9) van de gevallen in de re-test scan succesvol. Bij twee ratten mislukte het inbrengen van de katheter, omdat de diameter van de katheter te groot was. Een kleinere diameter van de katheter was niet mogelijk omdat snelle bloedafname anders niet meer mogelijk was.

Dagelijkse inspectie van de ratten liet een gewichtsafname (4%) zien op dag 2 na de eerste PET scan mogelijk als gevolg van de ingreep, anesthesie, scan en bloedverlies. Na dag 2 keerde het gewicht terug naar de oorspronkelijk waarde, van voor de eerste PET scan (afb. 2). De ratten vertoonden geen tekenen van bloedingen, infecties en verschijnselen van verlamming. De wond had zich in de meeste gevallen twee dagen na de ingreep gesloten (afb. 3). In twee gevallen knaagden de ratten binnen 24 uur na de ingreep de aangebrachte hechtingen los. Deze ratten werden onder anesthesie met succes opnieuw gehecht. Omdat vanwege de extra anesthesie de re-test procedure van de test procedure afweek, zijn deze dieren niet meegenomen in de data analyse. Om dezelfde reden werd nog één rat geëxcludeerd. Bij dit dier trad er gedurende de re-test PET scan een ademhalingsstilstand op.

Arteriële bloedafname

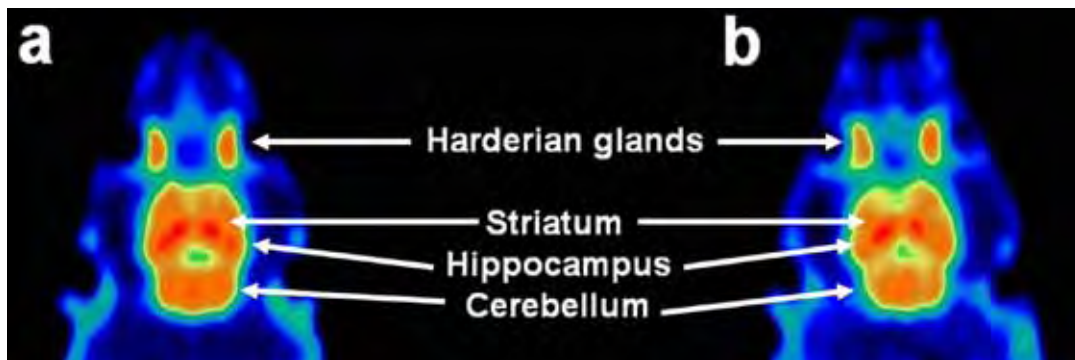
De katheter in de a. saphena was geschikt voor het snel afnemen van bloedmonsters. Monsters van 0,1 ml konden binnen 10 seconden afgenomen worden.

(Afb. 4) laat de tijds-activiteits curve van radioactiviteit in arterieel plasma zien. Beide curves lieten een piek zien 1 min. na de start van de injectie met de infuus pomp en vervolgens een langzame klaring, vergelijkbaar met resultaten die eerder werden verkregen (6). De plasma radioactiviteit was in scan 2 (re-test/rood) iets hoger dan in scan 1 (test/blauw), maar het verschil was niet significant.



Afbeelding 4. Gemiddelde plasma tijds-activiteits curve van de test (blauw) en re-test PET (rood) scan.

»



Afbeelding 5. Afbeeldingen van de hersenen van de rat tijdens de test (a) en re-test (b) scans.

PET afbeeldingen

Afb. 5 laat afbeeldingen zien van de hersenen van een rat tijdens de test (a) en re-test (b)scans. Beide afbeeldingen laten een hoge opname van radioactiviteit zien de in hippocampus, striatum en cerebellum en een lage opname in de cerebrale cortex en de bulbus olfactorius (6).

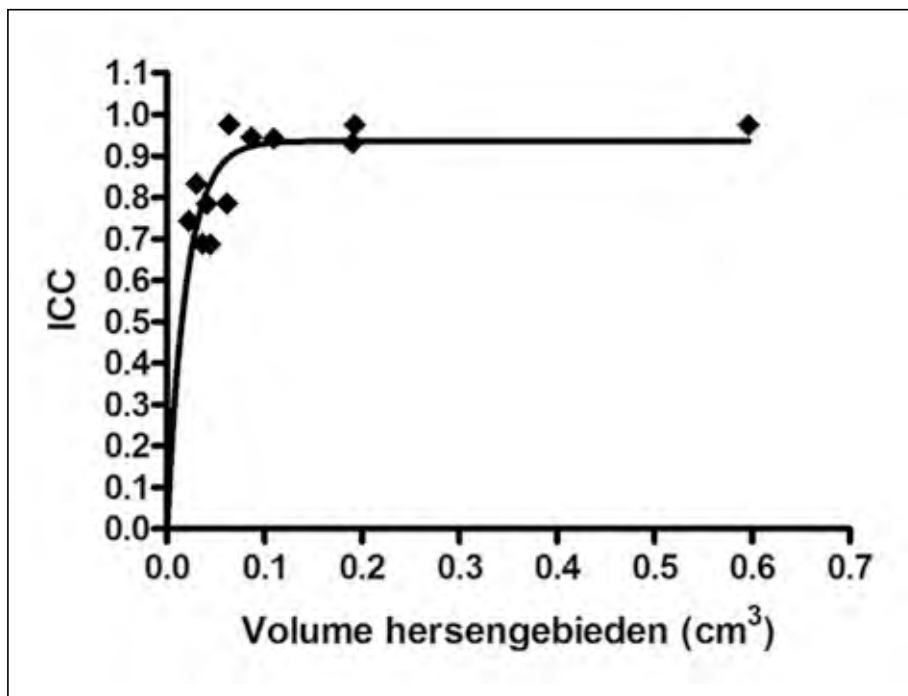
Reproduceerbaarheid

Er zijn geen significante verschillen gevonden tussen de VT data van de test en re-test scan. Het verschil tussen de test en re-test scan was in alle hersengebieden lager dan 5%. met uitzondering van olfactorische cortex, cortex, hypothalamus en bulbus olfactorius, waar verschillen werden gevonden kleiner dan 10% (tabel 1). De TRV was in alle hersengebieden lager dan 10% met een gemiddelde waarde van 6,1%. De ICC liet een hoge mate van betrouwbaarheid zien met een gemiddelde van 0,85. Voor de meeste hersengebieden was de betrouwbaarheid vrijwel excellent met waarden boven de 0,9. Afb. 6 laat zien dat de betrouwbaarheid onder andere afhangt van het volume van de hersengebieden. Een gebied met volume 0,02 cm³ of

Tabel 1

Hersengebied	Test	Retest	% relatief verschil	TRV	ICC
Totale hersenen	1.11±0.13	1.14±0.14	2.28±4.69	3.7±3.2	0.96
Amygdala	0.90±0.08	0.94±0.09	4.58±7.61	6.1±5.4	0.79
Caudatus putamen	1.29±0.17	1.35±0.22	3.76±6.25	4.7±4.9	0.95
Mesencephalon	1.09±0.10	1.13±0.15	3.40±8.63	6.9±5.2	0.83
Pons	0.97±0.07	1.00±0.10	3.59±8.46	7.1±4.9	0.69
Medulla	0.90±0.08	0.93±0.09	3.21±7.57	6.5±3.9	0.79
Cerebellum	1.17±0.14	1.18±0.12	1.33±4.12	2.8±2.9	0.98
Bulbus olfactorius	0.66±0.10	0.70±0.14	7.06±13.15	9.2±9.3	0.84
Cortex	1.09±0.14	1.10±0.14	1.41±4.69	3.0±3.4	0.98
Hippocampus	1.26±0.12	1.28±0.13	2.13±4.77	3.8±3.1	0.94
Hypothalamus	0.94±0.07	1.01±0.12	7.82±8.60	9.2±5.3	0.69
Thalamus	1.41±0.18	1.42±0.17	0.60±4.29	2.9±2.8	0.98
Olfactorische cortex	0.97±0.11	1.06±0.17	9.09±12.37	10.3±8.8	0.74
Overige gebieden	1.21±0.14	1.24±0.16	2.88±6.55	4.9±4.4	0.93
Gemiddelde ± SD			3.80±2.54	5.8±2.5	0.86±0.11

Tabel 1. Overzicht van de tracerverdeling (VT), test, verschil, TVR en ICC.



Afbeelding 6. Correlatie tussen volume van de hersengebieden en de ICC.

meer vertoonde een hoge betrouwbaarheid, bij zeer kleine hersengebiedjes was de betrouwbaarheid kleiner.

Conclusies en discussie

De nieuwe techniek maakt PET scans in combinatie met arteriële bloed afname in dezelfde rat mogelijk, inclusief een hoge reproduceerbaarheid en betrouwbaarheid. Toepassing van de techniek kan leiden tot vermindering van het aantal ratten dat voor PET onderzoek benodigd is.

Om de negatieve effecten van de nieuwe techniek op het welzijn van het dier te bestuderen hebben wij gekeken naar: gewichtsverlies, oncontroleerbare bloedingen, tekenen van infectie en verlamming. De ratten bleken op basis van deze observaties beperkt last te hebben van de ingreep. Wij hebben in deze studie echter niet gekeken naar de effecten van de techniek op de fysiologie en het metabolisme. Zulke parameters moeten in vervolgstudies onderzocht worden. Hoewel de nieuwe techniek longitudinale experimenten met meerdere PET scans in combinatie met arteriële bloedafname mogelijk maakt, is er een limiet aan de frequentie. Omdat de a. saphena na de ingreep en PET scan wordt afgesloten, kunnen er maximaal 3 PET scans in combinatie met bloedafname worden verricht. De canule kan tweemaal in de a. saphena worden geplaatst (één maal links en één maal rechts) en tenslotte nog éénmaal in een a. femoralis. Een recente publicatie beschrijft een techniek voor het plaatsen van een permanente katheter in de a. femoralis, om continu bloeddruk en hartslag metingen te kunnen doen (7). Die techniek is mogelijk een goed alternatief wanneer arteriële bloedafname vaker dan drie maal vereist is. Hoewel de techniek waardevol kan zijn, moet het effect van de ingreep en de permanente katheter op een PET scan (reproduceerbaarheid en betrouwbaarheid) nog uitgezocht worden.

»

Dankwoord

Met dank aan de Centrale Dienst Proefdieren van de Rijksuniversiteit Groningen, de artikel 14 functionarissen en alle betrokkenen van de afdeling Nucleaire Geneeskunde en Moleculaire Beeldvorming van het UMCG.

Key note

Originele publicatie: Sijbesma JW, Zhou X, et al. (2016) Novel Approach to Repeated Arterial Blood Sampling in Small Animal PET: Application in a Test-Retest Study with the Adenosine A1 Receptor Ligand [(11)C]MPDX. *Molecular Imaging and Biology* 18(5): 715-723.

Literatuurlijst

1. Weeks JR, Jones JA (1960) *Routine direct measurement of arterial pressure in unanesthetized rats*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 104: 646-648.
2. Buckingham R.E (1976) *Indwelling catheters for direct recording of arterial blood pressure and intravenous injection of drugs in the conscious rat*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 28: 459-461.
3. Arts THM, Bertens APM (1980) *Verzamelde experimentele technieken*. Gemeenschappelijke dienst Sint Radboudziekenhuis & Faculteit der Geneeskunde en Tandheelkunde, Nijmegen.
4. Schwarz AJ, Danckaert A, Reese T et al. (2006) *A stereotaxic MRI template set for the rat brain with tissue class distribution maps and co-registered anatomical atlas: application to pharmacological MRI*. *Neuroimage* 32: 538-550.
5. Landis JR, Koch GG (1977) *The measurement of observer agreement for categorical data*. *Biometrics* 33(1): 159-174.
6. Paul S, Khanapur S, Sijbesma JWA et al. (2014) *[11C]-MPDX and PET to study adenosine A1 receptor occupancy by non-radioactive agonists and antagonists*. *Journal of Nuclear Medicine* 55: 315-320.
7. Jespersen B, Knupp L, Carrie A (2012) *Femoral arterial and venous catheterization for blood sampling, drug administration and conscious blood pressure and heart rate measurements*. *Journal of Visualized Experiments* 10.3791/3496.

