



Uit

NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Det helsevitenskapelige fakultet

Merking av nevroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i
Long Evans rotter.

En metodereproduksjon

Håvar Marsteen

Masteroppgave i Medisin, August 2019



Forord

I denne Masteroppgaven viser jeg hvordan vi gikk frem for å reproducere en tidligere publisert protokoll med bruk av den histologiske markøren Fluoro-jade C. Protokollen ble utført hos Nevrobiologisk forskningsgruppe ved, UiT, under veiledning av Kirsten Kjelstrup og Vegard Brun. Hensikten med å etablere prosedyren var å ha en metode for å kvantifisere eventuell nevronskade ved dyp nedkjøling og påfølgende gjenoppvarming i en rottemodell. Oppgaven er en del av et større samarbeidsprosjekt med Akuttmedisinsk og anesthesiologisk forskningsgruppe som har som overordnet mål å undersøke hvilken effekt nedkjøling har på hjernen.

Gruppen finansierte også oppgaven gjennom innkjøp av reagenser og lån av utstyr.

Histologi er et svært viktig redskap for å skape data innen nevrobiologi. Dette fordi det i mange tilfeller er viktig å knytte adferd til histologiske forandringer. Histologiske funn kan bidra til å styrke konklusjoner og teorier. Derfor er metoder for å kunne detektere, lokalisere og kvantifisere skade viktig.

Jeg vil takke Nevrobiologisk forskningsgruppe, UiT, som gjorde det mulig for meg å gjennomføre denne oppgaven. I tillegg vil jeg rette en stor takk til min veileder Kirsten Kjelstrup for hjelp til planlegging av prosjektet, strukturering av både prosjektet og oppgaven samt korrekturlesing og tålmodighet med en student med litt for mange baller i luften på en gang. Takk til Andreas Lande for hjelp med å finne og utarbeide protokoll fra litteraturen. En stor takk til min kjæreste Fanny Stette som har tilrettelagt driften hjemme og bidratt med uvurderlig hjelp og kunnskap om fluorescens mikroskopering. Og til slutt takk til min mor Åshild K. Andreassen for tilbakemeldinger på oppgaven gjennom sommeren. Alt det praktiske arbeidet, slik som avliving, perfundering, fiksering og snitting av hjerner, farging, mikroskopering og bildeanalyse, er utført av meg selv.

Innholdsfortegnelse

1	Sammendrag.....	iv
2	Innledning.....	1
2.1	Fluorokromer.....	1
2.2	Verifisering av Fluorokromprotokoller.....	1
2.3	Fluoro-jade C.....	2
2.3.1	Kaliumpermanganat.....	2
2.4	Hvordan dør og skades nevroner.....	3
2.4.1	Hypotermiens effekt.....	3
2.5	Vannlabyrint (Morris water maze).....	4
2.6	Nevrobiologisk forskningsgruppe.....	4
3	Metoder.....	5
3.1	Etiske forhold knyttet til oppgaven.....	5
3.2	Studiedesign.....	6
3.3	Rottene.....	6
3.4	Humane endepunkter.....	6
3.5	Eksperimenter rottene har vært utsatt for.....	7
3.5.1	Vannlabyrint.....	7
3.5.2	Anestesiprotokoll.....	8
3.6	Rotter med sikker hjerneskade.....	9
3.7	Nevrologisk testing.....	9
3.8	Fiksering av hjernen.....	9
3.9	Histologisk prosedyre.....	10
3.9.1	Hjernesnitt/frysesnitt.....	10
3.9.2	Fluoro-jade C protokoll.....	10
3.9.3	Negative fargekontroller.....	11
3.10	Mikroskopering.....	11

3.10.1	Bildeanalyser.....	12
3.11	Statistiske analyser.....	12
4	Resultat.....	12
4.1	Hovedfunn	12
4.2	Artefakter.....	15
5	Diskusjon.....	16
5.1	Funn.....	16
5.1.1	De negative kontrollene	16
5.1.2	Kaliumpermanganats rolle i protokollen.....	16
5.2	Feilkilder.....	17
5.2.1	Bakgrunnssignal	17
5.2.2	Positive kontroller	17
5.2.3	Montering	18
5.2.4	Dekkglass	18
5.2.5	Gamle snitt	18
5.2.6	Fryseartefakter.....	19
5.2.7	Mekaniske skader	19
5.3	Oppfølging av forsøkene	19
6	Konklusjon:	20
7	Kilder.....	21
8	Grading av artikler	1

1 Sammendrag

Å kunne lokalisere induisert skade i hjernen er et svært viktig verktøy i nevrobiologi. I 1997 utviklet Schmued sitt Fluoro-jade fargestoff som spesifikt merket døende og skadde nevroner i histologiske snitt. I 2005 produserte han den tredje generasjonen av fargestoffet, nemlig Fluoro-jade C (FJC). Å innføre nye laboratorieprosedyrer krever at man har gode protokoller og verifiserer at metoden faktisk virker. Denne oppgaven gikk ut på å etablere en protokoll for å farge hjernesnitt med FJC.

Hjernene som ble brukt kom fra seks rotter som var benyttet til hukommelsestesting. Av disse ble ett dyr nedkjølt til 24 grader under anestesi. Fire dyr ble lagt i narkose, men ikke nedkjølt, og ett dyr ble verken nedkjølt eller lagt i narkose. Etter at dyrene var avlivet, ble hjernene snittet i 40 μm tykke snitt og farget med FJC. Under utprøving av protokollen varierte vi tiden snittene var lå i fargebad. Snittene ble fotografert med et fluorosens mikroskop og bildene analysert med bildeprogramvare.

Vi så indirekte tegn til at snittene ble farget med FJC, men vi kunne ikke påvise noen skadde/døde nevroner i noen av hjernene. Antakelig skyldes dette at behandlingen som dyrene ble utsatt for; hypotermi og/eller anestesi, ikke kunne indusere noen skade. Vi planla å lage positive kontroller med kjemisk hjerneskade for å verifisere protokollen, men det lot seg ikke gjennomføre før dyrestallen ble stengt (april 2017, ennå ikke åpnet).

2 Innledning

Deteksjon av lesjoner (skader) som induseres i deler av hjernen har vært svært viktig i utviklingen av neurobiologien. I denne type forskning er det viktig å kunne studere effekt av hjerneskade forårsaket av kjemiske eller fysiske påvirkninger hos forsøksdyr. Ved å dokumentere hvilke egenskaper dyret mister kan man si noe om funksjonssløyfen denne skadde delen av hjernen er en del av. Det har ikke alltid vært like enkelt å dokumentere nøyaktig hvor skaden er. For å detektere skadde celler og vev er fluorescensdeteksjon med bruk av fluorokromer et nyttig redskap (1, 2).

2.1 Fluorokromer

FJC er et fluorokrom. Disse stoffene benytter seg av lysets evne til å løfte elektroner opp i høyere valensbånd, kalt eksitasjon. Det påfølgende fallet tilbake til elektronets hvilebånd avgir lys med en lengre bølgelengde enn lyset som eksiterte elektronene, emisjon.

Eksitasjons- og emisjonsbølgelengdene til fluorokromer er spesifikke. Lysfiltre som slipper gjennom et smalt spekter av bølgelengder tillater en å kontrollere bølgelengden på det eksiterende lyset samt det lyset en ønsker detektere (2). Men for at et fluorokrom skal være av nytte må det enten selv eller ved hjelp av et bærermolekyl binde spesifikt til det man er ute etter å merke. FJC er kjent fra litteraturen å binde til døende og skadde nevroner (3). Dette gjør at det er enkelt å kvantifisere antall nevroner som har tatt skade og kvalitativt angi hvilke deler av hjernen som er affisert.

2.2 Verifisering av Fluorokromprotokoller

Når en benytter fluorokromer er det viktig å kontrollere for autofluorescens og uspesifikk binding. Dette er faktorer som gir bakgrunnssignal som både kan være med på å vaske ut det positive signalet og skape falske positive signaler. Autofluorescens kommer ofte av at det er stoffer i vevet, eller tilført fra protokollen, som reflekterer eller avgir lys innen den samme bølgelengden som fluorokromet. Uspesifikk binding derimot kommer av at bærermolekylet/ fluorokromet binder til utilsiktede strukturer. For å verifisere at protokoller med fluorokromer fungerer som ønsket er det viktig å kontrollere for nettopp uspesifikk binding og autofluorescens. Det er da viktig med positive kontroller hvor man med stor sikkerhet kan si at det man ønsker å detektere er tilstede. Det er også viktig med negative kontroller, altså snitt som har fulgt fargeprotokollen, men hvor en hopper over fargestoffet. I tillegg har man

vanlige kontroller der snittene er farget, men det som skal detekteres er ikke tilstede. Ved å sammenligne negative og vanlige kontroller, kan en si noe om graden av farge som tilføres av protokollen. Hvis det tilføres lite farge betyr det at det er mye autofluorescens. Dette betyr at vevet innehar (eller protokollen tilfører) noe som oppfører seg på samme måte som fluorokromet når en ser på det i mikroskopet. Ved å sammenligne positive kontroller mot vanlige kontroller, kan en si noe om hvor mye farge som tilføres av skaden. Tilføres det lite farge betyr det at det har vært mye uspesifikk binding eller at fargeprotokollen ikke har fungert(4).

2.3 Fluoro-jade C

C-en i navnet benevner FJC som den tredje generasjon av det originale Fluoro-jade fargestoffet. Det første stoffet, Fluoro-jade, ble rapportert av Larry Schmued i 1997. Suksessen lå i en enklere og mer spesifikk deteksjon av skadde nevroner. Crezyl fiolett som i seg selv var en veldig enkel prosedyre som lett lot seg reproducere, var vanskelig og tidkrevende og analysere. Supprimerte sølvfarge-metoder på den andre siden var svært enkel å analysere, men bestod i en vanskelig reproducerbar prosedyrer som inneholdt mange giftige stoffer. Fluoro-jade hadde svært spesifikk binding til døende nevroner, men den hadde lav oppløsning og mye bakgrunnsstøy. Fluoro-jade B hadde høyere affinitet enn den foregående generasjonen Fluoro-jade og presenterte høyere oppløsning og mindre bakgrunnsstøy. Tredje generasjonen Fluoro-jade hadde selvmotsigende nok mye lavere signal i seg selv enn begge de to foregående fluorokromene. Men den høye affiniteten for bindingsmolekylet sørget for at mer av fluorokromet kunne binne seg, som resulterte i høyere oppløsning og bedre støy til signal ratio. Fluoro-jade C har også vist mindre avblekning over tid enn de to foregående generasjonene. Man kjenner enda ikke til hva Fluoro-jade stoffene binder seg til. Det har vært undersøkt om det kan være spesifikke molekyler som kun aktiveres ved nevrondød, men flere teoretiserer at det nok er multiple aspekter ved døende nevroner som tillater bindingen (3, 5).

2.3.1 Kaliumpermanganat

Eksposeringstiden for Kaliumpermanganat spiller en svært viktig rolle for resultatet av Fluoro-jade C protokollen. Ettersom en ikke helt vet hva FJC binder til er det vanskelig å bestemme nøyaktig hva dens rolle i protokollen er. Men basert på at kaliumpermanganat er en sterk oksidant kan en anta at dens oppgave er å denaturere proteiner. I friske nevroner er enten ikke disse proteinene tilstede (som nevnt i avsnittet over). Eller så sørger skaden for at cellens

Merking av nevroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i Long Evans rotter.

membran er mer permeabelt og kaliumpermanganaten kommer derfor til proteiner som den ikke når i like stor grad i de friske nevronene. Det som er sikkert er at eksponeringstiden et snitt har for kaliumpermanganat korrelerer sterkt med bakgrunn til støy ratioen observert i de fargede snittene (6).

2.4 Hvordan dør og skades nevroner

En av de alvorligste hendelsene i en hjerne er tap av blodtilførsel og traume. Hvis blodårer blir revet over eller går tett vil det være områder som ikke får blodtilførsel. Dette fører til oppbygning av laktat og etter hvert endring av ionebalansen mellom cellens indre og cellens ytre. Disse endringene er nok til å ta livet av et nevron. Når nevronet dør brytes cellemembranen og nevronets cytoplasma trenger ut i det ekstra cellulære rom. Dette fører til markant endring i miljøet rundt nevronene i nærheten og kan føre til at skaden øker i omfang (7).

I tilfeller hvor glutamat produserende nevroner dør vil konsentrasjonen av glutamat i tillegg til pH og ionebalanse rundt de resterende nevronene øke. Glutamatet fører til en hyperaktivering av nevronene. Som igjen fører til en ukontrollert kalsiuminfluks styrket av ione-ubalansen. Dette tar til slutt tar livet av nevronet. Denne typen skademekanisme hvor glutamaterg hyperaktivering tar livet av nevroner kalles excitotoksisitet og er en av de vanligste måtene å skape kontrollerte skader i hjernen på (7). Ofte benyttes intracerebrale injeksjoner med nevrotoksiner, men også intraperitoneale injeksjoner kan brukes. Et eksempel på en slik nevrotoksisk substans er glutamatanalogen kainsyre. Syren isoleres fra sjøgresset *Digenea Simplex* som gror utenfor kysten av Japan (8). Ved injeksjon i hjernen fører stoffet til langvarig hyperaktivering av nevroner. Den påfølgende kalsiuminfluksen fører til slutt til nevrondød lokalisert rundt injeksjonsstedet (9).

2.4.1 Hypotermiens effekt

Under hypotermi synker hjernens energiforbruk med omentrent 5% per grad celsius. Dette gjør at cellene kan overleve lengre med lavere tilgang på karbohydrater og oksygen før de må begynne å produsere laktat. På denne måten hjelper hypotermien hjernen å opprettholde pH-homeostasen i vevet lengre enn ved normo- eller hypertermi (10). Hypotermi fører også til lavere akkumulasjon av og frigjøring av excitotoksiske aminosyrer som f.eks. glutamat. En hypotese går ut på at dette hovedsakelig er fordi den senkede energiomsetningen fører til at

ATP- lagrene ikke tømmes, ettersom nevronenes energiomsetning er senket. ATP kan istedenfor brukes til å opprettholde ionehomeostasen og på denne måten hindre den ekstreme kalsiuminfluksen og celledøden som ville ført til excitotoksitet (11).

2.5 Vannlabyrint (Morris water maze)

Morris water maze er en vannlabyrinttest for romlig hukommelse hvor rottene lærer å finne en plattform som er skjult to centimeter under vannflaten i et sirkulært basseng, to meter i diameter, med blakket vann. Gjennom navigering ut ifra visuelle landemerker plassert slik at de er synlige fra bassenget, skal rotten først lære å finne plattformen. Når en så senker plattformen helt kan en måle tiden rotten bruker i området hvor plattformen var tidligere, dette kalles en Atlantis test (12). Den beste analogien til Morris water maze er å tenke på hvordan sjømenn navigerte tilbake til fiskebankene uten bruk av kart og kompass. Testen er spesielt god for å skille ut skader i Hippocampus, et område som er svært viktig for læring og spesielt romlig orientering (13).

2.6 Nevrobiologisk forskningsgruppe

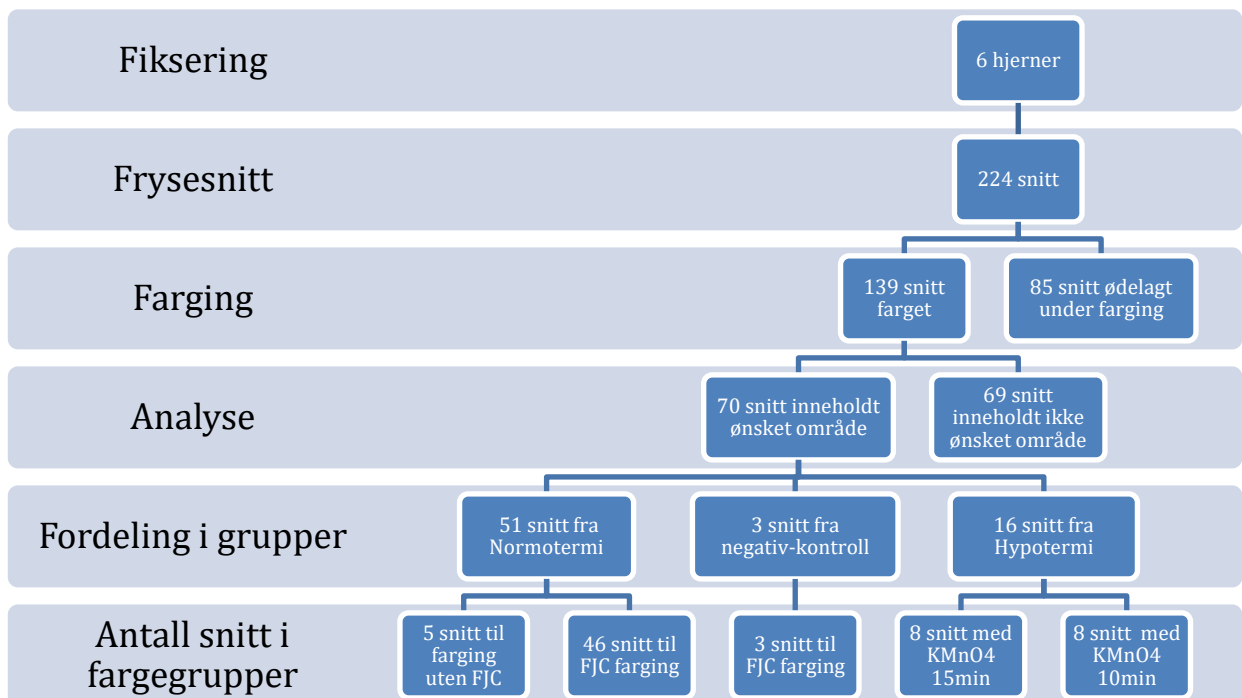
I Nevrobiologisk forskningsgruppe ved UIT var det behov for en metode for å detektere og kvantifisere skade på hjerner. Prosjektet som går ut på å undersøke om dyp hypotermi gav skade på nevroner kunne vanskelig la seg utføre uten en slik protokoll. Valget falt på FJC fordi det er en godt dokumentert fluorescerende markør for nettopp døende og skadde nevroner. Analysen er enkel i form av fluorescens mikroskopi og protokollen er kort og inneholder svært få skadelige stoffer. Det er også mer spesifikt, gir høyere oppløsning og har lavere støy til signal ratio enn mange andre fargemetoder. I denne oppgaven vil vi ta for oss hvordan en gikk frem for å reprodusere protokollen fra Schmued et al sin originalartikkel fra 2005 på snitt fra det ovenfor nevnte hypotermiprojektet (3).

I denne Masteroppgaven presenteres det hvordan en gikk frem for å reprodusere en fungerende protokoll for bruk av den histologiske markøren Fluoro-jade C (FJC) på rottehjerner. Prosedyren er tiltenkt å skulle brukes for å detektere nevronskade på hjerner fra rotter utsatt for hypotermi.

3 Metoder

3.1 Etske forhold knyttet til oppgaven

I denne oppgave er det brukt hjerner fra forsøksdyr. Det er tatt svært strenge etiske regler for når og hvordan det er lov å benytte seg av dyr i forskning. I Norge er bruken av dyr i forskning regulert gjennom «Forskrift om bruk av dyr i forsøk» (14) fra 2015 som forvaltes av Mattilsynet, samt Dyrevelferdsloven fra 2009 (15). Mange land, også Norge, har gjennom lover og forskrifter adoptert konseptet Russel og Burch presenterte i sin bok fra 1959 ”The principles of humane experimental technique”, de tre R-ene: Replace, Reduce, Refine. I et hvert tilfelle hvor det finnes alternativer til å bruke dyr skal man avstå fra dette (Replace). Finnes det ingen alternativer skal en søke å bruke så få individer som mulig (Reduce). En skal også maksimere dyrevelferden, samt mengden og robustheten i informasjonen en henter ut av dyrene (Refine). I søknadsprosessen til Mattilsynet er disse hensynene sterkt vektlagt (16). Denne studien er en del av et større prosjekt som omhandler effekt av hypotermi på rottehjerner. Studien av rottehjernene er godkjent av mattilsynet gjennom fotssøknad id 8169 og er utført i samsvar med den norske Forskrift om forsøk med dyr 18.6-2015 §6.



Figur 1 viser arbeidsflyten fra hjernene ble snittet til antall snitt i hver fargegruppe. Totalt var 154 snitt ubrukelige enten fordi de ikke inneholdt Hippocampus eller fordi de ble ødelagt i fargeprosessen.

3.2 Studiedesign

Studiedesignet er en protokollutviklings studie. Seks hjerner ble hentet fra en pseudo-randomisert kontrollert studie bestående av 23 dyr som ved ble allokert til enten hypotermi (24 °C), normotermi (37°C) eller negativ kontroll (kun Morris water maze). I denne studien er det valgt ut seks dyr hvorav ett dyr fra hypotermigruppen, fire dyr fra normotermigruppen, et dyr negativ kontrollgruppen. I tillegg var det planlagt to positiv kontroll hjerner - altså hjerner med sikker nevronevne. Hver av rottehjernene i dette forsøket er snittet i 32 snitt som gir totalt 192 snitt, se figur 1.

3.3 Rottene

Long Evans hannrotter (Charles River, Wilmington, Massachusetts) ble brukt i denne studien. Rottene var alle seks uker gamle ved ankomst og ble akklimatisert én uke i karantene før de kunne tilvennes mennesker. Alder på dyrene varierte mellom syv uker og 12 uker ved hypotermigruppen og mellom syv uker og 14 uker for normotermi gruppene, mens negativ kontrollgruppen var alle 11 uker. Dyrene ble veiet hver dag, ved eksperimentstart var snittvekten på 361g og ved eutanasi var snittet 380g. Ingen rotter opplevde mer enn 10% vekttap. Dyrene ble oppstallet i sammen to eller tre per bur som var beriket med et rødt gjennomskiktig plast rør, pappspan for redelagning og sagflis i bunnen. De fikk mat og vann ad.lib. Normotermi- og hypotermigruppen ble etter intervensjon, dag seks, plassert alene i 48 timer. De ble monitorert med vekt, observasjon av matinntak, stress-skåret og skåret for neurologisk dysfunksjon daglig. Samt smertelindret med 0.05 mg/kg buprenorfin (Temgesic) hver 12 time og 2.00 mg/kg meloxicam (Metacam) hver 24 time.

3.4 Humane endepunkter

Så lenge dyrene var oppstallet gjaldt det at en uventet ytre hendelse som påførte dyrene synlig stress vil føre til eksklusjon og avliving. Under oppstalling definerte vi at 10% vekttap eller samlet stress-skår over en gitt terskel skulle føre til avliving. Under selve anestesi gjaldt det at dersom spontan ventilasjon opphørte eller dyrene ble påført en stor blødning skulle forsøket avsluttes og dyret avlives.

I etterkant av intervensjonen gjaldt det at ved en Neurologic deficit score (NDS) fall i neurologisk funksjon over en gitt terskelverdi (20 av totalt 80 poeng), måtte dyret avlives snarest. Dersom dyret viste tegn til stress eller neurologisk påvirkning postoperativt uten å

Merking av nevroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i Long Evans rotter.

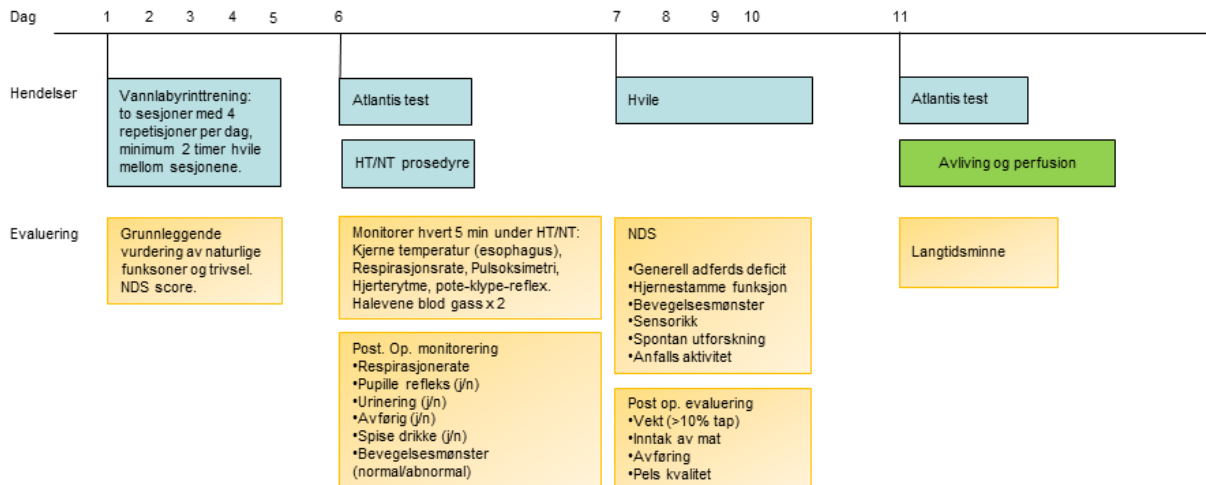
komme over terskelverdi ble det gitt smertestillende og tettere observasjon, til symptomene ble normalisert eller terskelverdi ble nådd. Ingen av dyrene som inngikk i studien nådde kriterier for humane endepunkter.

3.5 Eksperimenter rottene har vært utsatt for

3.5.1 Vannlabyrint

Vannlabyrinten bestod i et sylindrisk basseng to meter i diameter og en halv meter høyt. Plattformen (On-Demand Water Maze Platform for Mouse, Med Associates, Inc, Fairfax . Virginia, USA) var festet til bunnen med en brakett som tillot at den ble flyttet og alltid havnet på samme sted. Vannet var blakket med hvit vannfarge og vanntemperaturen ble holdt på 23 °C for å motvirke nedkjøling. Dyrene ble trent i fire forsøk per sesjon, med to sesjoner på dag én til fem. Hvert forsøk varte maksimalt 120 sekunder før dyret ble ledet til plattformen for hånd. Dyrene ble så tørket før ny svømmetur og fikk hvile i 30 min under varmelampe etter endt sesjon. Det ble gitt minst to timers hvile mellom sesjonene. Monitorering med videokamera og posisjonssporing programvare ble brukt for å kvantitativt måle hukommelse,

Eksperiment design



Intervensjons grupper

Hypotermi (HT)	Normotermi (NT)	Negativ kontroll
Nedkjøling til 24 grader C, 1 time	Tidsmatchet anestesi. Måltemperatur 36.5 grader C	Ingen anestesi. Kun trening og testing i Vannlabyrint.
8 hannrotter	8 hannrotter	3 hannrotter

Figur 2 Eksperimentdesignet rottene har vært gjennom før histologi.

gjennom akkumulert avstand til plattform og tid i plattformkvadranten. Atlantis test for hukommelse etter hypotermi ble gjort på to testdager: dag 6 (før intervensjon) og dag 11 (fjerde dagen etter hypotermi) se figur 2. Plattformen ble da senket, og dyrene fikk søke etter plattformen i 60 sekunder før den ble tilgjengelig. På denne måten kunne en måle tiden rotten oppholdt seg i området plattformen skulle være.

3.5.2 Anestesiprotokoll

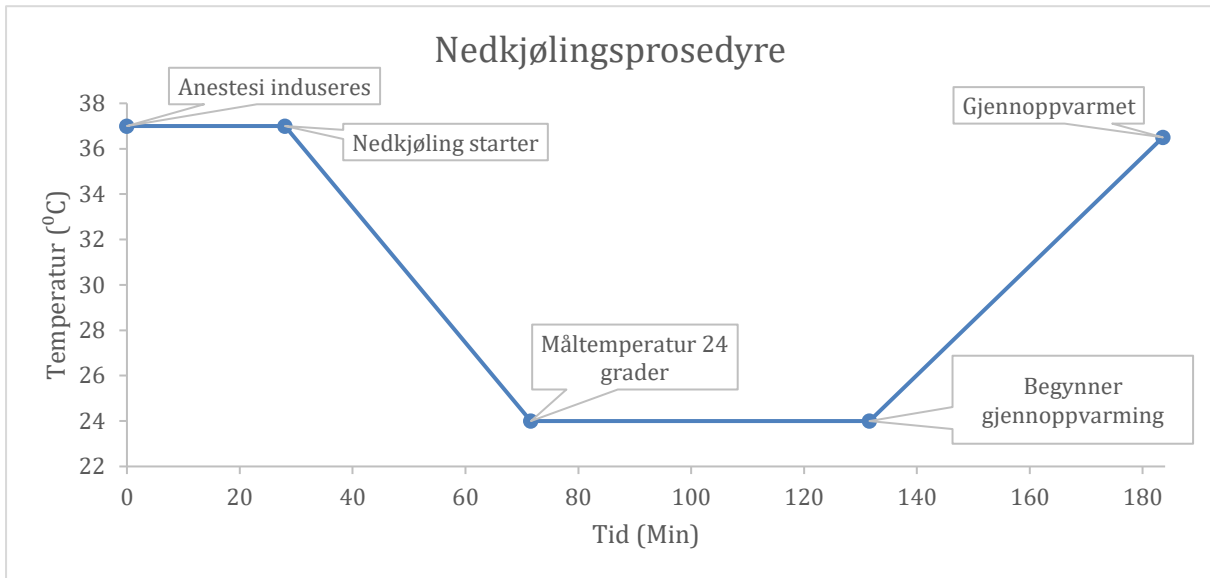
For både hypotermi- og normotermigruppen ble anestesi induisert i induksjonskammer med 5% isofluran administrert av en sprøytepumpe (Univentor 410 Anesthesia unit, Zejtun, Malta). Sprøytepumpen ble så koplet over fra induksjonskammeret til en anestesimaske for videre anestesi av rotten. Gassfløde og konsentrasjon av isofluran ble videre styrt basert på rottens respirasjonsrate og oksygen saturasjon. Profylaktisk smertelindring i form av 0.05 mg/kg buprenorfin og 2.00 mg/kg meloxicam ble gitt subkutant i nakkehuden etter induksjon. Simplex øye salve (Tubilux Pharma S.p.A, Pomezia, Italia) ble påført rottens øyne for å hindre at de tørket ut. Anestesidybde ble evaluert ved å bedømme spontan ventilasjon og fravær av pinch-refleks (smertestimuli). Monitorering av vitale parametre ble gjort gjennom temperaturmåler i øsofagus (Thermalert Th-5 thermocouple controller, Bailey Instruments, England), pulsoksymeter på høyre fram pote (Physiosuite, Kent Scientific, Torrington, USA) og manuell måling av respirasjonsrate. Verdiene ble journalført hvert femte minutt.

Rottene i normotermi gruppen ble lagt i mageleie på en mikrobølgevarmematte (Physitemp MTC-1, Agnathos; 37 °C, New Jersey, USA) med en termometerprobe rektalt som sørget for stabil temperatur. Anestesilengden ble matchet til gjennomsnittlig anestesilengde for hypotermigruppen. Rottene i hypotermigruppen ble lagt i mageleie på en aluminiumsplate som ble kjølt ned ved hjelp av sirkulerende vann fra et RTE-110 termostatisk vannbad (Neslab Instruments, USA) med temperaturregulering, satt til ti °C. Det ble også brukt en u-formet probe rektalt med sirkulerende vann fra samme Pumpe som aluminiumsplatene, for å hjelpe nedkjøling. Da rotten nærmet seg måltemperatur (24°C) ble temperaturen regulert manuelt slik at kjernetemperaturen var stabil og aldri lavere enn måltemperatur. Etter én time ved måltemperatur ble rotten varmet opp etter samme prinsipp som ved nedkjølingen. Men ikke raskere enn 0.25 °C pr min (17) som i publikasjoner har vist seg å være skadelig. Rotten ble heller ikke vekket før kjernetemperatur var 36,5 °C. På bakgrunn av en pilotstudie utført ved Nevrobiologisk forskningsgruppe, UIT, ble det forventet forlenget postoperativ døsigthet hos nedkjølte dyr. Dyrene ble derfor observert tett i dagene etter prosedyren. Den siste

Merking av nevroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i Long Evans rotter.

gruppen med rotter var negativ kontroll, for å kunne kontrollere for effekten av anestesi.

Disse ble ikke anestesert og hvilte i oppstillingsburet fra dag seks til 11.



Figur 3 Hypotermiprosedyre, med nedkjøling, én time ved måltemperatur og gjenoppvarming.

3.6 Rotter med sikker hjerneskade

For å produsere positive kontrollsnitt var det tenkt at to rotter, skulle gis en intraperitoneal injeksjon med ti mg/kg kainsyre. De skulle så oppstalles i to dager før avlivning og fiksering. Det var tenkt å observere med samme observasjonsskjemaer og humane endepunkter som beskrevet for de andre gruppene. Rottene skulle avlives, perfunderes, hjernene fikseres og frysesenittes på samme måte som de andre gruppene.

3.7 Nevrologisk testing

En Neurologic deficit score (NDS), ble brukt for å teste for endring i nevrologisk dysfunksjon i dagene før og etter intervensjon. Testingen ble gjennomført i oppstillingsrommet samt i rottens hjembur og bestod i å teste rottens hjernenerver og perifere reflekser.

3.8 Fiksering av hjernen

Rotten ble indusert med 5% isofluran gass i induksjonskammer før det ble injisert intraperitonealt 100mg/kg pentobarbital. Når respirasjonen hadde stanset ble epigastriet åpnet og diafragma kuttet. En 19 gauge nål koplet til en peristaltisk pumpe (Peri-Star Pro, World Precision Instruments) ble ført gjennom apeks og inn i venstre ventrikel og høyre atrium ble klippet over og. Rotten ble så perfundert gjennom nålen, først med 0.1M PBS (pH 7.4) for å

skylle ut blodet og deretter fiksert med 4% Formaldehyd i 0,1M PBS. Skallen ble åpnet med en bensaks og hjernen tatt ut og lagt på 4% formaldehyd i 0,1M PBS i to døgn før den ble overført til en løsning med 1% DMSO i 0,1M PBS for videre lagring ved -20°C.

3.9 Histologisk prosedyre

3.9.1 Hjernesnitt/frysesnitt

På en Leica M1950 Cryostat (Buffalo Grove, USA) ble kammertemperatur og skoholder satt til -20 °C. Skoen hjernen festes på ble satt på en hurtigfryseplate innstilt på -50 °C. Hjernen ble så tatt ut av lagermedium og tørket forsiktig på tørkepapir. Et skalpellblad ble brukt til å fjerne cerebellum og de første to millimeterne av frontale korteks. Fryselim (Fargeløs Neg-50, Ricgard-Allan Scientific) ble lagt på skoen fra hurtigfryseplaten. Hjernen ble så montert i limet vertikalt med frontal korteks ned mot skoen. Ekstra fryselim ble lagt rundt den nedre delen av hjernen for støtte under snitting. For å minske fryseartefakter ble kuldespray (PRF101, Nordic) brukt for å fryse hjernen raskt. Etter 30 min på hurtigfryseplaten ble hjernen snittet i 40 µm tykke snitt. Hvert tiende snitt ble med en gang montert på Superfrost pluss glass for så å lufttørke over natten i mørket. Glassene ble før montering merket med nummer på dyret, dato, glassnummer og fargegruppe. Etter én dags luft tørking ble snittene lagret mørkt i fryser frem til farging. For å kunne skape negative kontroller samt reservesnitt, ble snitt nr ni og én også tatt vare på. Disse ble lagt i 2ml 1% DMSO i 0,1M PBS-løsning og lagret i fryser.

3.9.2 Fluoro-jade C protokoll

Protokoll tilpasset fra Schmued (2005) og Ehara (2009) (3, 6).

3.9.2.1 Tillagning av FJC lagerløsning og bruksløsning:

Lagerløsningen av FJC ble laget ved å blande ut FJC tørrstoff i destillert vann til en konsentrasjon på 0.01 masseprosent. Fra 30mg FJC tørrstoff ble 5.7mg veiet ut og løst opp i 57 ml destillert vann. Den ble så lagret kjølig på 2-8 °C og pakket i aluminiumsfolie. Ved farging av snittene ble lagerløsningen (0.01% FJC-løsning) fortynnet til en fersk 0.0001% FJC bruksløsning (1 ml lagerløsning blandet med 99 ml 0.1% eddiksyre til et totalvolum på 100ml). Denne ble brukt innen én time etter tillagning og deretter kastet.

Merking av nevroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i Long Evans rotter.

3.9.2.2 *Kaliumpermanganatløsning:*

Tillaging av kaliumpermanganat ($KMnO_4$) ble gjort gjennom å løse 150 mg $KMnO_4$ tørrstoff i 250 ml destillert vann med resulterende masseprosent på 0.06 %. Løsningen ble pakket inn i aluminiumsfolie frem til den skulle brukes.

3.9.2.3 *Fargeprosedyre*

Tolv objektglass med fire snitt tilsvarende en og en halv hjerne ble plassert i et stativ og farget samtidig. Det tok fire omganger for å farge de seks hjernene. Løsningene ble oppbevart i spesielle fargebrønner med lokk som hindret lyseksposering mellom fargestegene. Stativet med de 12 objektglassene ble flyttet mellom brønnene. Den første løsningen bestående av 1% $NaOH$ og 80% etanol i fem min, 70% etanol i to min for så å skylles i destillert vann i to min. Deretter ble glassene flyttet til 0.06% $KMnO_4$ løsning i ti min, det ble brukt en bordrører (VWR Standard Orbital Shaker, Model 1000) på lav hastighet. Etter dette steget ble lyseksposering holdt til et minimum. Objektglassene ble så flyttet over i destillert vann i to min før de ble overført til 0.0001% FJC fargeløsning i ti min. Etter dette ble glassene skylt i tre omganger a to min i destillert vann før gjenværende væske ble fjernet ved å dytte dem forsiktig mot et stykke papir. Glassene ble tørket ved 50 °C i fem min.

3.9.2.4 *Forlenget kaliumpermanganat eksponering*

Hypotermihjernesnittene fulgte de samme stegene som i den beskrevne fargeprotokollen, men man endret fra ti min til 15 min eksponering for $KMnO_4$ -løsning.

3.9.3 *Negative fargekontroller*

Ekstrasnittene fra en hjerne i normotermigruppen (snitt nr én eller ni) ble valgt ut som negativ kontroll. Snittene ble romtemperert, helt ut i et basseng med fysiologisk PBS løsning og deretter montert på Superfrost pluss glass. Disse hjernesnittene fulgte deretter de samme stegene som i den beskrevne fargeprotokollen, men ikke behandlet med FJC-løsningen.

3.10 *Mikroskopering*

Mikroskopering av de fargede snittene ble gjort på et Carl Zeiss Axio zoom V16 fluoresens mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). Innstillingene som ble brukt var 500ms lukkertid, 60 ganger zoom, Carl Zeiss filter sett nr 38 (eksitasjon: 470 ± 20 nm, emisjon 525 ± 25 nm) og lyskilden på minimum lysstyrke. Zen Pro (Carl Zeiss Microscopy

GmbH, Jena, Germany) programvaren ble brukt til fotografering av hilus av Dentate Gyrus i Hippocampus i snittene.

3.10.1 Bildeanalyser.

Analyse av bildene ble gjort ved bruk av den åpne programvaren ImageJ (Rasband, 1997/2019). For å kvantifisere forskjellene i de positive og negative kontrollsnittene ble gjennomsnittlig emisjon fra hilus av Dentate Gyrus brukt. Gjennom bruk av threshold funksjonen i ImageJ produserte man et binært bilde av hvert enkelt bilde av hilus i dentate gyrus. Deretter ble partikkelanalyse-funksjonen brukt, noe som gav totalt antall fargede pixler som så kunne deles på arealet (i piksler) som bildet dekket fikk man en konsentrasjons verdi av FJC positive celler. Analysen av ti min og 15 min $KMnO_4$ ble gjort kvalitativt i ImageJ.

3.11 Statistiske analyser

De statistiske analysene som var tenkt brukt var uavhengig T-test ($P \leq 0.05$).

4 Resultat

4.1 Hovedfunn

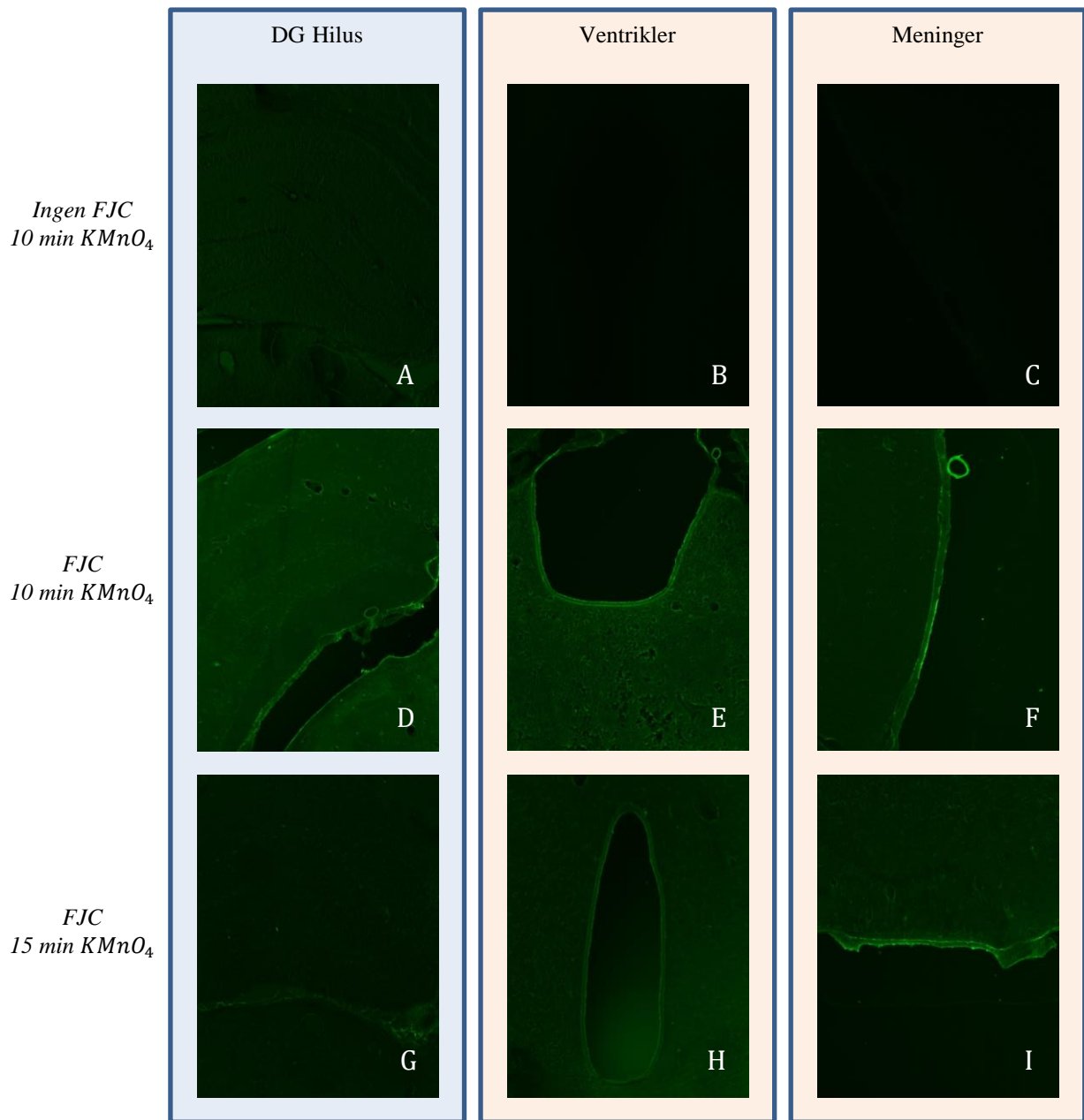
Ut i fra vår kjennskap er dette den første studien av den skadelige virkningen av hypotermi under anestesi på rotters hjerne. Fra seks rottehjerner ble det produsert totalt 56 glass med fire hjernesnitt hver, totalt 224 snitt. Av disse var 154 snitt enten ødelagt i fargeprosessen (85) eller inneholdt ikke Hippocampus (72) og ble derfor ikke analysert. Av de resterende 70 hjernesnittene var 51 hjernesnitt fra normotermi gruppen, hvorav 46 snitt ble farget med FJC og fem snitt var uten farge. Fra de negative kontrollrottene som kun fikk trening i Vannlabyrint, var tre snitt farget med FJC. Fra hypotermigruppen ble 16 snitt eksponert for kaliumpermanganat henholdsvis ti og 15 min med åtte snitt i hver av gruppene. Totalt ble 65 hjernesnitt farget med FJC og fem farget som kontroller uten FJC (se 4.2 Studiedesign, Figur 1).

Det var ikke mulig å skaffe rotter med induisert hjerneskade ettersom dyrestallen ble stengt. Vi fant ingen FJC positive celler i hilus av Dentate Gyrus i noen av de 65 fargede snittene (figur 4, D). Dermed var det heller ikke mulig å gjøre statistiske analyser på resultatene.

Merking av nevroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i Long Evans rotter.

Snittene fra både ti og 15 min $KMnO_4$ -gruppen har betydelig bakgrunnssignal, samt at der er oppladning i meninger (figur 4, F og I) og i choroide plexus i ventrikler (figur 4, E og H). Snittene som ikke var eksponert for FJC (figur 4, henholdsvis A, B og C) har i praksis ingen bakgrunnssignal og ingen oppladning i Choroide plexus i ventrikler eller meninger.

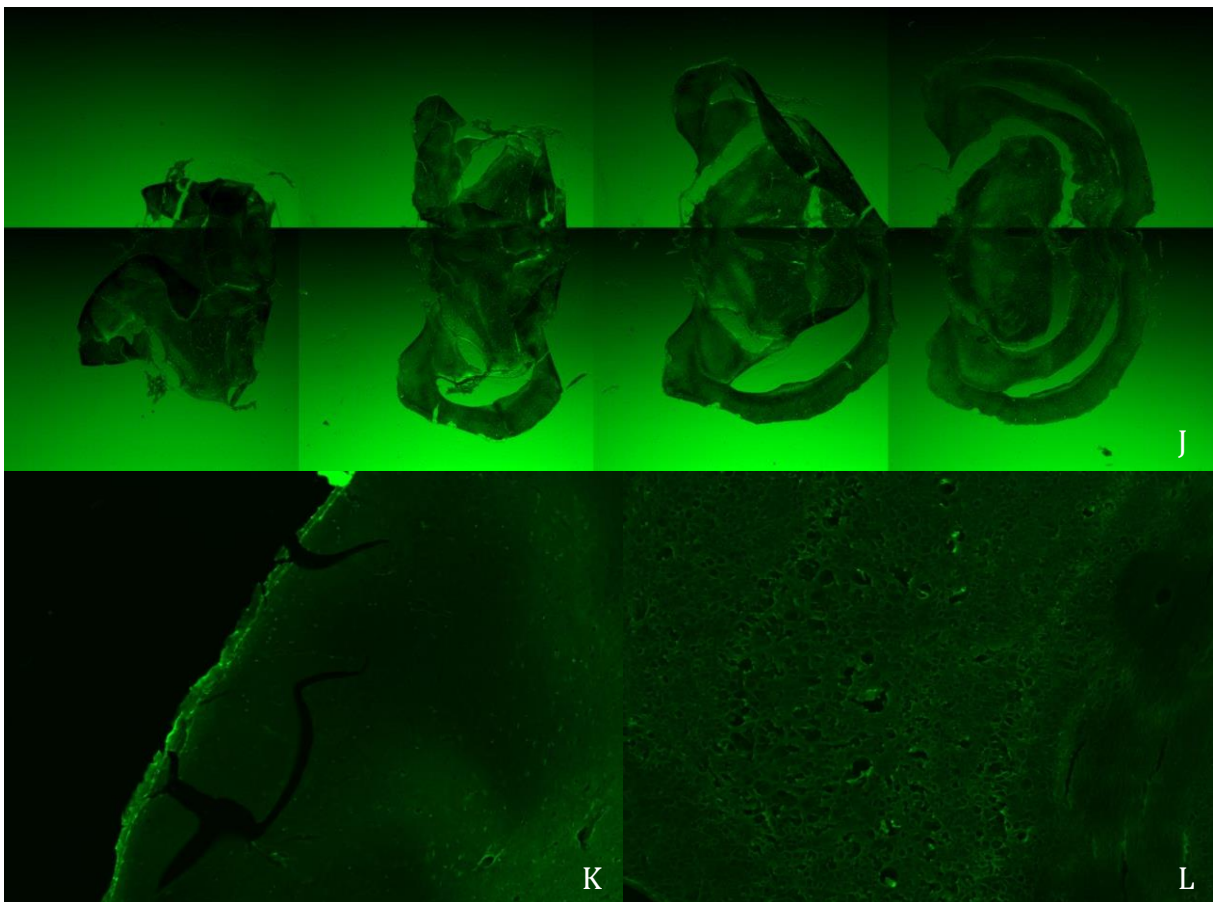
Det er forskjell mellom ti og 15 min $KMnO_4$ -eksponering. På bildet av ventriklene (figur 4, E og H) er det lite bakgrunnsstøy i snittet med 15 min $KMnO_4$ (figur 4, F), snittet med hilus av Dentate Gyrus er nesten like mørkt som snittet uten FJC. Det er tydeligere bakgrunnsstrukturer i snittene med ti min $KMnO_4$ (figur 4, E).



Figur 4 Figuren viser effekt av FJC farging i Hilus av Dentate Gyrus (A, D og E), ventrikler (B, E og H) og meninger (C, F og I) samt effekten av Kaliumpermanganats eksponering i ti min (D, E og F) og 15 min (G, H og I) sammenlignet med ingen FJC (A, B og C). Øverste rad er bilder av snitt uten FJC, f.v. Hilus av Dentate Gyrus, ventrikler og meninger. Andre rad viser bilder med samme fordeling fra venstre, men av FJC med ti min KMnO₄, disse er også representative for alle de 46 FJC snittene fra normotermigruppen. Tredje rad viser bilder med samme fordeling fra venstre, men av FJC med 15 min KMnO₄. Bildene i Blå ramme er hovedfunnene, bildene i beig ramme er bifunn. Bildene vist her er repressentative. Som en ser av D er det ingen FJC positive celler, dette var sant for alle snittene. Det er i midlertid oppladning i meninger (F) og choroide plexus i ventrikler (E). Dette er ikke skadde celler, men heller artefakter. I tillegg ser en at det tydelig er stor forskjell i farge mellom FJC med ti min KMnO₄ og snittene med 15 min KMnO₄. Det er mindre forskjell mellom FJC med 15 min KMnO₄ og snittene uten FJC, men det er tydelig at det fortsatt er fargeopptak i snittene med FJC. Det er også svært lite autofluorescens i snittene uten FJC.

4.2 Artefakter

I enhver histologisk protokoll vil det være artefakter. I figur 5 er tre eksempler på artefakter som oppstod. Bilde J, viser hvordan snittene krøllet seg og i enkelte tilfeller falt av objektglassene. Snittene som løsnet, men ikke falt av kunne fange dråper med FJC-løsning under seg. Totalt mistet vi 85 snitt enten ved at de falt av, brettet seg eller fikk større dråper med FJC-løsning fanget i mellom snittet og objektglasset. Bilde K, viser artefakter som oppstod under monteringen av snittene på objektglass rett etter de var kuttet på microtomen. Dette er mekanisk skade fra penselen som ble bruk til å montere snittene. Bilde L, viser sveitserost-lignende artefakter. Dette er fryseartefakter og er tydelige tegn på at nedfrysning har gått for sakte. Ingen snitt ble utelukket på bakgrunn av mekaniske- eller fryseartefakter.



Figur 5. Figuren viser eksempler på artefakter som oppstod. J, viser eksempel på folding som oppstod under fargingen av snittene. Snittet til venstre er helt knørvet sammen og så blir det gradvis bedre i snitt to og tre fra venstre, før det siste snittet fra venstre er normalt. K, viser mekanisk skade i ytterkanten av et snitt. Legg merke til de store fissurene som sees. L, her sees (i likhet med bilde E i figur 4) fryseartefakter.

5 Diskusjon

I dette prosjektet har vi forsøkt å reprodusere en protokoll for bruk av FJC på rottehjerner i vår lab. Dette fordi protokoller beskrevet i publisert litteratur er komprimert og kan mangle små viktige punkter som forfatterne har ansett som for gitt. Dette gjør at det er viktig å reprodusere og verifisere at en protokoll fungerer før man bruker den på dyrebare forskningsdata.

5.1 Funn

Målet var å reprodusere og verifisere protokollen for bruk av FJC på snitt fra rottehjerner. Vi har reprodusert protokollen, men vi kan ikke verifisere den. Vi har heller ikke funnet noen positive celler i noen av snittene. Det har ikke latt seg gjøre å komplementere med positive kontroller ettersom dyrelaben stengte. Uten disse kontrollene kan vi ikke konkludere om fraværet av fargede celler er fordi det ikke er skadde celler tilstede i hjernene, eller at protokollen ikke har fungert.

5.1.1 De negative kontrollene

I den originale artikkelen til Schmued et al. fra 2005, beskrives det at fargingen også farger aktiverte astrocytter, røde blodceller, choroide plexus i ventriklene og kollagenfibriller i meningene. Det kan derfor argumenteres for at om en kan utelukke at signalet i disse strukturene stammer fra artefakter, stammer signalet med sannsynlighetsovervekt fra fargesteket i protokollen. Dette er nettopp det vi ser i figur fire. Begge snittene med FJC har opptak i choroide plexus i ventriklene og i meningene, men dette gjenfinnes ikke i kontrollene uten FJC. Dette betyr at signalet trolig stammer fra FJC tilført gjennom protokollen. Det utelukker derimot ikke at det kan være noe i protokollen som hindrer farging av eventuelle skadde nevroner. Ettersom dette er det en positiv kontroller ville verifisert.

5.1.2 Kaliumpermanganats rolle i protokollen

I Ehara et al sin artikkel fra 2009, har de blant annet eksperimenterte med forskjellige i forbehandlingstider med $KMnO_4$. Og hvordan dette påvirket bakgrunnssignalet når FJC ble kombinert med immunofluorescens. Det viktigste å trekke fra artikkelen er at lengre tid i $KMnO_4$, resulterer i lavere bakgrunnssignal, uten at signalstyrken fra de merkede cellene affiseres like mye. Ehara et al fant i sin artikkel at "[...] forbehandling [med $KMnO_4$] i ti min resulterte i veldig klart identifiserbare FJC fargede celler med lav bakgrunnstøy [...]" (6). De

Merking av nevroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i Long Evans rotter.

Konkluderte derimot med at ettersom det førte til stor svekkelse av immunofluorescens signalet var fem minutter forbehandling bedre for å bevare immunofluorescens signalet. Det må bemerkes at Ehara et al brukte samme protokoll som i originalartikkelen av Schmued et al, men i en dobbeltfargingsprotokoll i med immunofluorescens. Dette betyr at konklusjonen deres ikke direkte kan overføres til vår enkeltfarge-protokoll. Ut ifra det vi ser i figur fire gir 15 min eksponering for $KMnO_4$ forbehandling lavere bakgrunn signal enn ti min eksponering, men oppladningen i meningene og ventriklene er ikke like påvirket. Ehara et al sine resultater virker derfor overførbare.

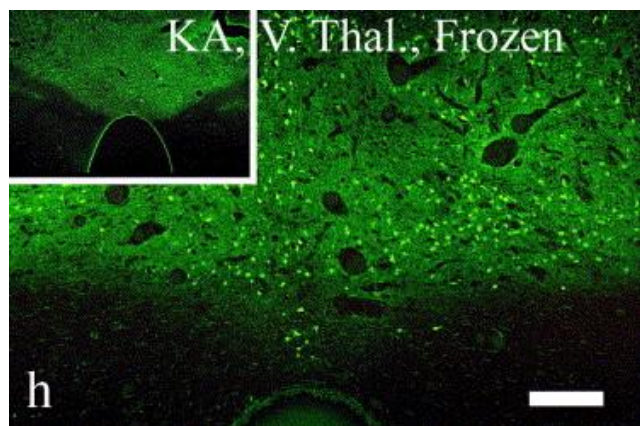
5.2 Feilkilder

5.2.1 Bakgrunnssignal

Selv om bakgrunnssignalet er med på å vaske ut det positive signalet, er den også viktig for å kunne orientere seg i snittet. Uten bakgrunnssignalet vil en ikke vite hvor i snittet en finner det reelle positive signalet. Derfor er det en balansegang mellom bakgrunnssignalet på den ene siden og det positive signalet på den andre siden. Som vi ser av Figur fire gav 15 min forbehandling i $KMnO_4$ bakgrunnssignal som var så svakt at det var vanskelig å orientere seg i snittet. Men ti min $KMnO_4$ forbehandling gav nok bakgrunnssignal til at det var enkelt å orientere seg uten at det druknet oppladningen vi så i ventriklene og meningene.

5.2.2 Positive kontroller

Som nevnt over er positive kontroller nødvendig for å verifisere at FJC-protokollen farger døende nevroner og ikke binder uspesifikt. Disse kontrollene vil være rotter/hjerner med lesjoner som tidligere er verifisert at farges av FJC. Figur 6 er hentet fra originalartikkelen og viser hvordan Schmued et al sine positive kainsyre kontroller så ut (18). Som nevnt tidligere stengte dyrestallen før vi fikk laget kontrollene og vi kunne derfor ikke skaffe positive kontroller.



Figur 6. Bildet er hentet fra original artikkelen fra 2005 og viser «Kainsyre» induisert lesjon i ventrale thalamus og zona incerta. Det lille bildet viser skaden som lyser opp ved lav forstørrelse. Det store bildet viser hvordan de døende enkeltnevronene lyser opp. Legg merke til skillet mot det friske vevet i bunnen av begge bildene (19).

5.2.3 Montering

Under fargingen var det et stort problem at snittene løsnet fra objektglasset. I figur 5, bilde J, ser en hvor galt det kunne gå med de som ikke falt helt av. Dråper med reagens kunne bli fanget under snitt, snitt brettet seg over seg selv eller snitt kunne løsne helt. Når dråper med reagens fanges under snitt eller i foldene påvirker det den videre fargingen på flere måter. Økte mengder reagens blir ført mellom brønnene samtidig som snittet blir ekstra eksponert for denne reagensen. Hvis det er fargestoffet som samles under snittet vil dette øke bakgrunnssignalet og kunne overdøve det positive signalet. Ettersom 12 glass med fire snitt hver ble farget i samme brønn per gang. Var det ikke mulig å vite hvilket objektglass de løsnete snittene hørte til og de måtte anses som tapt. Snittene som brettet seg over seg selv hindret innsyn til både området som brettet seg, men også til området det brettet seg over.

5.2.4 Dekkglass

Et avvik fra original protokollen er at det ikke ble benyttet dekkglass, og som følge av dette ble ikke snittene rehydrert i xylene heller. På grunn av dette er det en mulighet for at snittene har tørket ut mens de har vært oppbevart. Utørkede snitt trekker seg sammen og kan sprekke opp om de ikke sitter svært godt fast i glasset under. Som nevnt var nettopp det at snittene ikke satt veldig godt fast i objektglasset et problem, se bilde J i figur 5. Et dekkglass i samspill med limet hindrer at snittet tørker ut, det beskytter også mot støv og andre artefakter som kan legge seg på snittene, samt at snittene er beskyttet fra mekanisk skade. Det er ikke sett noen tydelige tegn på artefakter som følge av uttørking i snittene, men det ville øket både nøyaktigheten og preservasjonen av snittene om en hadde brukt dekkglass. Fotograferingen av snittene ville også vært lettere om en hadde brukt dekkglass ettersom snittene da blir presset flatt ned mot objektglasset. Uten dekkglasset blir ikke snittoverflaten flat og ørsmå forskjeller i avstand fra linsen utgjør derfor store forskjeller i fokuset mellom snittene. Dette øker tidsbruken betraktelig og nøyaktigheten synker.

5.2.5 Gamle snitt

Dyrene snittene er hentet fra ble avlivet sommeren 2016 og hjernene snittet og farget sommeren 2017. Dette betyr at i forkant av snitningen har snittene ligget i et år på DMSO løsning i fryser. Selv om dette ofte ikke er et problem, finnes det substanser som vaskes ut av vevet lettere enn andre. Ettersom det er verifisering/reproduksjon av protokoll som er målet i oppgaven er faren for at dette skal påvirke resultatet liten, men dette er noe som bør forbedres.

Merking av nevroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i Long Evans rotter.

5.2.6 Fryseartefakter

Det er vanskelig å unngå fryseartefakter når en bruker cryotom/frysesnitting. Artefaktene kommer av at hjernene ikke fryses ned raskt nok. Det dannes da iskrystaller inne i cytoplasma i cellene, som gjør at cellene sprekker og det dannes strukturer som ligner på en sveitserost i vevet. En måte vi unngikk dette på var ved å bruke fryserspray. Denne sprayen holder $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ når den kommer ut av munnstykket og siden den fordamper raskt øker den varmetapet ytterligere. Det er viktig at en er forsiktig når en sprayer slik at kjølevæsken ikke kommer ut som aerosol, men i dråpeform. Dette fordi hjernevevet er skjørt og trykket fra drivgassen med letthet kan lage stor skade. På figur 5, L, ser en et snitt som bærer tydelige merker etter fryseskader. Denne typen artefakter kan i tilfeller gjøre at hele hjerner blir ubrukelige (19).

5.2.7 Mekaniske skader

Figur 5, K, viser eksempel på mekanisk skade i et av snittene. Disse skadene kommer ofte under monteringen av snittene på objektglasset. Ofte er det da nødvendig å bevege på snittene for å rette ut bretter eller få dem på linje med de andre snittene. For å flytte på snittene bruker man en fin pensel og PBS. Dessverre skal det ikke mye til for å lage hull eller rifter i snittene. Dette er et problem som er vanskelig å unngå.

5.3 Oppfølging av forsøkene

Det viktigste å hente fra dette prosjektet er at før protokollen brukes til å detektere skade på hjerner utsatt for hypotermi må den verifiseres med bruk av positive kontroller. Dette er nødvendig for å kunne stole på resultatene en oppnår.

Det vil også være viktig å korte ned på tiden mellom avliving av dyr og farging, samt forsøke unngå fryseartefakter, mekanisk skade samt å bruke dekkglass for å forhindre uttørking og videre skade av snittene. Dette vil øke kvaliteten på snittene og dataene en vil kunne hente ut fra dem. Det vil også være nødvendig å undersøke grunnen til at en så stor del av snittene løsnet fra objektglasset. Dette fordi problemer knyttet til at deler eller hele snitt løsnet under farging, var den største faktoren til tap av data.

Det vil også være interessant i fremtiden å kombinere fargeprotokollen med andre farger, som f.eks. Dapi som farger cellekjerner. Dette vil kunne gjøre det lettere å skille artefakter fra positive FJC-celler og på denne måten styrke eventuelle funn (3).

6 Konklusjon:

I denne oppgaven har en forsøkt reprodusere en allerede publisert protokoll for farging av skadde og døende nevroner med Fluoro-jade C. Denne protokollen er basert på original forfatterens protokoll, men en har også testet med forlenget immersjon i $KMnO_4$ (15min vs ti min). Det ble funnet at protokollen med ti min $KMnO_4$ -immersjon gav mer bakgrunnsstøy, men tillot bedre orientering i snittet uten å overdøve det positive signalet. Det er tydelig forskjell mellom de ikke-fargede og fargede snittene og det er oppladning i strukturer som også er beskrevet i original artikkelen. Men ettersom en mangler positive kontroller kan en ikke verifisere reproduksjonen av protokollen.

7 Kilder

1. Schmued LC, Albertson C, Slikker W. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain research*. 1997;751(1):37-46.
2. Fish KN, Davidson MW. Fluorescent Biomarkers in Neurons. In: Squire LR, editor. *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press; 2009. p. 261-71.
3. Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain research*. 2005;1035(1):24-31.
4. Webb DJ, Brown CM. Epi-fluorescence microscopy. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2013;931:29-59.
5. Schmued LC, Albertson C, Slikker W, Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain research*. 1997;751(1):37-46.
6. Ehara A, Ueda S. Application of Fluoro-Jade C in acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences. *Acta histochemica et cytochemica*. 2009;42(6):171-9.
7. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nature Reviews Neuroscience*. 2012;13:267.
8. Ben-Ari Y. Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: Mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience*. 1985;14(2):375-403.
9. Levesque M, Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2013;37(10 Pt 2):2887-99.
10. Erecinska M, Thoresen M, Silver IA. Effects of hypothermia on energy metabolism in Mammalian central nervous system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2003;23(5):513-30.
11. Zhao H, Steinberg GK, Sapolsky RM. General versus specific actions of mild-moderate hypothermia in attenuating cerebral ischemic damage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007;27(12):1879-94.
12. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*. 2006;1(2):848-58.

13. Moser MB, Rowland DC, Moser EI. Place cells, grid cells, and memory. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(2):a021808.
14. Forskrift av 2015-06-18 nr 761 om bruk av dyr i forsøk m.v. www.lovdata.no: Landbruks- og matdepartementet; 2015.
15. Dyrevelferdsloven. Lov av 2009-06-19 nr 97 om dyrevelferd m.v. www.lovdata.no: Landbruks- og matdepartementet; 2009.
16. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique*: London: Methuen & Co. Ltd.; 1959. xiv + 238 pp. p.
17. Alva N, Carbonell T, Palomeque J. A model of deep experimental hypothermia and rewarming in rat. *Journal of Thermal Biology*. 2004;29(4):259-64.
18. Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. In: 1-s2.0-S0006899304018499-gr1, editor. *Brain Research*: Elsevier; 2005. p. Fig. 1. (h) Reveals extensive kainic acid induced lesion of the ventral thalamus and zona incerta seen in insert at low magnification (4×). In contrast, virtually no damage is seen in the underlying hypothalamus. Higher magnification reveals the presence of degenerating cells and terminals. Mag. bar = 250 µm.
19. Taqi SA, Sami SA, Sami LB, Zaki SA. A review of artifacts in histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018;22(2):279-.

Merking av nevroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i Long Evans rotter.

8 Grading av artikler

Referanse: Alva N, Carbonell T, Palomeque J. A model of deep experimental hypothermia and rewarming in rat. Journal of Thermal Biology. 2004;29(4):259-64			Studiedesign: RCT
			Grade - kvalitet God
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
Studere effekten av dyp hypotermi og gjenoppvarming på hepatisk regional blod strøm, syre-base ballanse, og nivået av plasma transaminase i rotter.	Populasjon: 42 mannlige Sprague-dawley rotter. Antall/Eksperimentell gruppe: 6/Baseline 6/Post surgery 6/Normoterm 6/Hypoterm	Hovedfunn Gjenoppvarming med 0.35 grader pr min gav dødelighet på 50% vs 0% ved 0.25 grader. Temperatur vs portal vene flowen nådde statistisk signifikans.	Sjekkliste: Er formålet klart formulert? JA Hvem er inkludert/ekskludert? (seleksjon/generaliserbarhet) - Ingen rotter ble ekskludert. Var gruppene like ved starten? Gruppene var så like som en kan få det, men randomiseringsprosedyre er ikke beskrevet, trolig er rottene valgt vilkårlig. Dette betyr dåg at det kan ha vært forskjell i for eksempel compliance ovenfor tekniker slik at de første rottene var mest compliant og de siste minst. Ble gruppene behandlet likt utover «intervensjonen»? – JA Ble deltakerne gjort rede for på slutten av studien? (attrition/follow-up bias) JA, selv de som døde Kan resultatene overføres til praksis? Ikke direkte, men styrker viktigheten av å gjøre undersøke i større dyr. Er fordelene verdt ulemper/kostnader? JA, en må anta at kunnskapen en fikk fra denne studien er verd offeret av de 42 rottene. Hva diskuterer forfatterne som: -styrke – de har tatt for seg mange av svakhetene ved andre studier og adressert dem.
Konklusjon	6/Gjenoppvarmet 0.25 C/min 6/Gjenoppvarmet 0.35 C/min Kronisk vs akutt forsøk: Akutt Datainnsamling: - Kanylert høyre karotidarterie for blodprøver - Flow probe rundt portalvenen - Termistorer ved Karotidarterie og bak lever		
Gjenoppvarmings raten er viktig å kontrollere for å unngå dødelig utfall. 0.35 grader celsius/min var assosiert med høy dødelighet, mens 0.25 grader/min var tryggere.	Nedkjølings metode: - Vanngjennomstrømmet temperaturregulert operasjonsbord		
Land	Utfall (outcome) validering (for eks. diagnose)		
Spania	Feilkilder: kun undersøkt Alfa-stat, kunne også undersøkt pH-stat Statistiske metoder: Students T-test og ANOVA+Student-Newman-Keuls		
År data innsamling			
Ikke angitt i artikkel. Men før 2004			

Av Håvar Marsteen

<p>Referanse: 1. Ehara A, Ueda S. Application of Fluoro-Jade C in acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences. Acta histochemica et cytochemica. 2009;42(6):171-9.</p>		<p>Studiedesign: RCT</p>	
		<p>Grade - kvalitet</p>	<p>God</p>
<p>Formål</p>	<p>Materiale og metode</p>	<p>Resultater</p>	<p>Diskusjon/kommentarer/sjekkliste</p>
<p>Referanse: 1. Ehara A, Ueda S. Application of Fluoro-Jade C in acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences. Acta histochemica et cytochemica. 2009;42(6):171-9.</p>	<p>Populasjon: Mannlige homozygote zitter mutant (zi/zi) rotter og mannlige Sprague Dawley (SD). Alders matchet med grupper på 1, 4 og 12 måneder (M). Antall/Eksperimentell gruppe: Dyr: Rekkefølge FJC/IF: - SD Kontroll - SD Kainic syre Degenertive vs akutte modeller: - SD 6-OHDA - ZI/ZI rotter (Alle grupper med 1, 4 og 12M) Histologi: - IF så FJC - FJC så IF - KMnO4 2, 8 og 10 min - Fotoavblekning 0, 3, 5 og 10 min Kronisk vs akutt forsøk: Kronisk Datainnsamlings metode: Olympus DP72 system og prossesert med DP2-BSW software (Olympus) og Adobe Photoshop version 6.0 software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). Gradering av intensitet: Fra bakgrunnsintensitet: -, +; ++; +++; ++++</p>	<p>Hovedfunnet i artikkelene er ”Forskjellen mellom astrocytter og nevroner under neurodegenerasjon, kan sørge for forskjellene i akumulasjonsraten av substanser som binder FJC. Dette kan resultere i forskjellen mellom FJC som colokaliserer med en forskjellige cellulære markører. Vi kan derfor ikke utelukke muligheten for at substansen som binder til FJC kan være ulik i fargede Astrocytter og fargede Nevroner.” Bifunn – andre viktige endepunkter 1- IF før FJC, avbleking av IF etter 5 min så mikroskoper før dette, KMnO4 forbehandling burde kortes ned til 5 min ved dobbelfarging. 2- Thyroksin hydroxylase og FJC dobbeltopptak kan være et tegn på fremtidig celledød.</p>	<p>Sjekkliste:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Er formålet klart formulert? • Nei • Hvem er inkludert/ekskludert? (seleksjon/generaliserbarhet) • - Ingen rotter ble ekskludert. • Var gruppene like ved starten? • - gruppene var like ved start med unntak av at ZI/ZI gruppen som hadde en mutasjon • Ble gruppene behandlet likt utover «intervensjonen»? – JA • Ble deltakerne gjort rede for på slutten av studien? (attrition/follow-up bias) • Ikke nevnt i artikkelen • Kan resultatene overføres til praksis? • Ja, de kommer med konkrete forslag til endringer i dobbelfargeprotokoll, samt at de har vist at FJC også fungerer på degenerative prosesser. • Er fordelene verdt ulemper/kostnader? • JA, en må anta at kunnskapen en fikk fra denne studien er verd offeret av rottene. Dette er forutsetningen for å gjøre dyreforsøk <p>Hva diskuterer forfatterne som: styrke/svakhet – forfatterne diskuterer ikke styrker og svakheter ved studien.</p>
<p>Konklusjon</p>			
<p>Artikkelen konkluderer med at Fluoro-jade C fungerer godt for å detektere kronisk degenerative nevroner og at dette betyr at den intracellulære substansen den binder til kan akkumulere i cellekroppene saktere i kroniske enn akutte modeller.</p>			
<p>Land</p>			
<p>Spania</p>			
<p>År data innsamling</p>			
<p>Ikke angitt i artikkel. Men før 2004</p>			
		<p>Studiedesign: RCT</p>	

Merking av nevroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i Long Evans rotter.

Referanse: I. Jerman TS, Kesner RP, Lee I, Berman RF. Patterns of hippocampal cell loss based on subregional lesions of the hippocampus. Brain research. 2005;1065(1-2):1-7.		Grade - kvalitet	God
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
Formålet med studien er å undersøke spesifisiteten til lesjoner skapt av ibotensyre i områder som CA1 og CA3, samt kolkisin lesjoner i dorsale dentate gyrus.	Populasjon: 18 Long-Evans rotter Antall/Eksperimentell gruppe: 6/CA1 gruppe 6/CA3 gruppe 6/Dentate Gyrus (lesjoner kun på ene hjerne halvdel, andre halvdel var kontroller) For histologien var det to fra hver gruppe som ble avlivet på dag 2, 4 og 7. Kronisk vs akutt forsøk: Kronisk Datainnsamlings metode: Nikon Eclipse E600 mikroskop med epifluorescens (Nikon, Inc. Garden City, NY 11530) med en FITC fluorescence filter cube (Nikon B-2A, Tokyo, Japan). 40x og 100x forstørrelse.	Hovedfunn Lesjon rettet mot CA1 gav tydelig lesjon i CA1, varierende i CA3 og tydelig i DG, ingen forskjell i antall dager etter lesjon. Lesjon rettet mot CA3 gav ved dag to lesjon i CA1, CA3 og DG. Dag 4 varierende i CA1, tydelig i CA3 og DG. Dag 7 tydelig i CA1, CA3 og DG. Lesjon rettet mot DG gav ved alle dager lite skade i CA1, ingenting i CA3 og noe i DG.	Sjekkliste: <ul style="list-style-type: none"> • Er formålet klart formulert? • Nei • Hvem er inkludert/ekskludert? (seleksjon/generaliserbarhet) • - Ingen rotter ble ekskludert eller døde • Var gruppene like ved starten? • - gruppene var like ved start • Ble gruppene behandlet likt utover «intervensjonen»? – JA • Ble deltakerne gjort rede for på slutten av studien? (attrition/follow-up bias) • Ja, alle rottene ble gjort rede for. • Kan resultatene overføres til praksis? • Ja, dette er en metodeutvikling studie. De har funnet gode måter å skape lokaliserte lesjoner med ibotensyre og dokumentert hvor lenge etter lesjonering en bør avlive dyrene for å hindre lidelse og perfeksjonere dataene. • Er fordelene verdt ulemper/kostnader? • JA, en må anta at kunnskapen en fikk fra denne studien er verd offeret av rottene. Dette er forutsetningen for å gjøre dyreforsøk <p>Hva diskuterer forfatterne som: styrke/svakhet – forfatterne diskuterer ikke styrker og svakheter ved studien</p>
Konklusjon			
Lesjonene i subregionene til hippocampus var høyst lokalisert til hippocampus og for det meste lokalisert til den ønskede subregionen.			
Land			
USA			
År data innsamling			
Ikke spesifiser, men før september 2005			

Av Håvar Marsteen

Referanse: 1. Schmuied LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. Brain research. 2005;1035(1):24-31.		Studiedesign: RCT	
		Grade - kvalitet	God
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
Formålet med studien var å presentere fordelene med Fluoro-jade C som tredje generasjon Fluoro-jade farge.	Po Populasjon: 22 Sprague Dawley rotter Antall/Eksperimentell gruppe: 10/kainic syre 10/3-nitropropionic syre 2/saltvann Halvparten av hver gruppe ble frysesnittet og halvparten parafinsnittet. For å sammenligne ble noen av snittene farget med Fluoro-jade B. Histologisk gruppe med dobbel farging FJC+DAPI og FJC+GFAP	Hovedfunn FJC farger med høyere oppløsning og høyere signal til støy ratio. Fargingen er robust for beståling og det holder seg godt over tid. Både Kainic syre og 3-NPA lesjoner lot seg farge med FJC Multipel farging var ikke noe problem med FJC. Bifunn – andre viktige endepunkter - Fant at i kontroll snittene så farges røde blodceller, meningene og choroide plexus.	Sjekkliste: <ul style="list-style-type: none"> • Er formålet klart formulert? • Nei • Hvem er inkludert/ekskludert? (seleksjon/generaliserbarhet) • - Ingen rotter ble ekskludert. • Var gruppene like ved starten? • - gruppene var like ved start • Ble gruppene behandlet likt utover «intervensjonen»? – JA • Ble deltakerne gjort rede for på slutten av studien? (attrition/follow-up bias) • Ikke nevnt i artikkelen • Kan resultatene overføres til praksis? • Ja, de kommer med konkrete forslag til protokoll og bruksområde • Er fordelene verdt ulemper/kostnader? • JA, en må anta at kunnskapen en fikk fra denne studien er verd offeret av rottene. Dette er forutsetningen for å gjøre dyreforsøk <p>Hva diskuterer forfatterne som: styrke/svakhet – forfatterne diskuterer ikke styrker og svakheter ved studien.</p>
Konklusjon			
Alle FJ fargene farget skadde nevroner som følge av Kainic syre og 3-NPA, men FJC er kvalitativt bedre med høyere oppløsning og høyest signal til bakgrunnsratio			
Land			
Spania	Kronisk vs akutt forsøk:		
År data innsamling	Kronisk		
Ikke spesifisert, men før 2005.	Datainnsamlings metode: Mikroskopnavn ikke oppgitt.kun at fluorescein eller FITC filter systemer ble brukt.		

Merking av neuroncelledød med Fluoro jade C etter hypotermi og oppvarming i Long Evans rotter.

Referanse: Schmued LC, Albertson C, Slikker W, Jr. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. Brain research. 1997;751(1):37-46.			Studiedesign: RCT
			Grade - kvalitet God
Formål	Materiale og metode	Resultater	Diskusjon/kommentarer/sjekkliste
Vise at Fluoro-jade farger døende og skadde nevroner og at det er bedre enn tidligere metoder for å påvise skade.	Dyr: -Ukjent antall Sprague-Dawley rotter og ukjent antall c-57 mus.	Hovedfunn Konvensjonelle histologiske metoder - H&E farging gjorde det vanskelig å skille skadde nevroner og friske. Det var her viktig med å morfologiske forandringer. - De Olmos' cupric-silver resulterte i selektiv farging av en subgruppe av hippocampale nevroner. Men det var artefakter og spesielt i ved postfiksert minder enn én måned.	S Sjekkliste: <ul style="list-style-type: none">• Er formålet klart formulert?• Nei, Artikkelen spenner seg mer som en fremvisning av Fluoro-jade• Hvem er inkludert/ekskludert?• Dette er ikke veldig aktuelt i Dyreforsøkssammenheng.• Var gruppene like ved starten?• Gruppene var så like som en får dem ved start.• Randomiseringsprosedyre?• Dyrene ble ikke randomisert.• Ble gruppene behandlet likt utover «intervensjonen»?• Ja• Ble deltakerne gjort rede for på slutten av studien? (attrition/follow-up bias)• Ikke nevnt i artikkelen, men en må anta at alle dyr ble gjort rede for ved slutten av studien.• Kan resultatene overføres til praksis?• Ja, de kommer med konkrete forslag til protokoll og bruksområde for fluoro-jade, samt kompatibilitet med andre velutprøvde metoder.• Er fordelene verdt ulemper/kostnader?• JA, en må anta at kunnskapen en fikk fra denne studien er verd offeret av rottene. Dette er forutsetningen for å gjøre dyreforsøk Hva diskuterer forfatterne som styrke/svakheter – forfatterne diskuterer ikke styrker og svakheter ved studien.
Konklusjon	Antall/Eksperimentell gruppe: -Kainic syre -Domoic syre -Ibogaine -Phencyclidine -MK-801 -3-NPA -MTPT	Fluoro-jade farging - Ligner en ideel undertrykt sølv farging, - Farger både celle kropp, akson og dendritter og akson terminaler på degenererende nevroner. - Meningene og choroide plexus har affinitet for Fluoro-jade	
Land		Multi farging	
Spania		- Fluorescent nissel var ikke kompatibel med KMnO4, derfor mye bakgrunnsstøy. DAPI fungerte bedre.	
År data innsamling	-Kronisk vs akutt forsøk: -Kronisk	- Immunofluorescence og FJ fungerte, men KMnO4 supprimerte lysstyrken på immunofluorescensen.	
Ikke angitt i artikkel. Men før 2004	Datainnsamlings metode: Ikke oppgitt.	Bifunn – andre viktige endepunkter - Kainic syre resulterte i god fluoro-jade farging. - Domoic syre kunne etter bare fire timer sees endring i hjernene. - Ibogaine behandling gav farging av purkinjeceller i Cerebellum - MK-801behandling gav spesifikk farging av små stellate celler dypt i retrosplenial og cingulate cortex. - 3-NPA -> basal ganglia, thalamus, CA1, cerebellum og cholea kjernene. - Eucleasjon gav god farging i kontralaterale optiske trakt fra chiasma. - kontroller: kun Choroide plexus og meninger var FJ positive.	