

IN-VIVO MICRO PARTICLE IMAGE VELOCIMETRY (μ -PIV) MESSUNGEN IN DEM HERZEN EINES HÜHNEREMBRYOS

R. Lindken (1), P. Vennemann (1), K.T. Kiger (2), B.P. Hierck (3), N.T.C. Ursem (4),
S. Stekelenburg-de Vos (4), T.L.M. ten Hagen (5), R.E. Poelmann (3), J. Westerweel (1)

(1) Laboratory for Aero- and Hydrodynamics, Delft University of Technology, The Netherlands

(2) Department of Mechanical Engineering, University of Maryland, USA

(3) Department of Anatomy and Embryology, Leiden University MC, The Netherlands

(4) Department of Obstetrics and Gynaecology, Erasmus MC Rotterdam, The Netherlands

(5) Department of Surgical Oncology, Erasmus MC Rotterdam, The Netherlands

Abstract

In dieser Arbeit stellen wir ein Mikro Particle Image Velocimetry (μ -PIV) System für mikroskopische in-vivo Blut Geschwindigkeitsmessungen vor und zeigen die Anwendbarkeit der Meßtechnik für Messungen der Geschwindigkeitsverteilung im Herzen eines Hühnerembryos. Aus einem Geschwindigkeitsprofil wird die Wandschubspannung im embryonalen Herzen bestimmt.

Das μ -PIV System für die medizinisch-biologische Forschung wird mit Hilfe eines Ultraschall-Dopplers auf den Herzschlag des Embryos synchronisiert. Die Geschwindigkeitsmessungen erfolgen mit fluoreszierenden Tracer Partikeln in der Blutströmung.

Einleitung

Es gibt Anhaltspunkte, daß bestimmte Strömungszustände im embryonalen Herzen die Entwicklung des kardiovaskulären Systems auslösen (Hogers et al., 1999; Howe et al., 2003). Insbesondere sprechen erste Forschungsergebnisse dafür, daß ein Teil der physiologischen Regulation durch Schubspannungs-sensitive Gene erfolgt (Topper und Gimbrone Jr., 1999). Diese Gene wurden im embryonalen Hühnerherzen durch Genexpressionsexperimente identifiziert (Groenendijk, 2004).

Eine direkte Korrelation zwischen einem bestimmten Strömungszustand und einer Genexpression ist allerdings nicht möglich, da die Genexpressionsexperimente nur eine Aussage über Schubspannungsbelastungen gemittelt über einen Zeitraum von ungefähr 3 Stunden zulassen.

In-vivo PIV Messungen sollen einen Beitrag dazu leisten, den Zusammenhang zwischen der Genexpression und der Strömung im embryonalen Hühnerherzen zu begreifen. Hierzu muß aus den experimentellen Geschwindigkeitsdaten die Wandschubspannungsverteilung im schlagenden Herzen bestimmt werden. Da es sich bei dem Herzen um ein System mit bewegten Wänden handelt, ist es notwendig, sowohl die Geschwindigkeitsverteilung als auch die Position der bewegten Wand zu bestimmen. Hier ist ein bildgebendes Meßverfahren wie PIV vorteilhaft.

Die experimentelle Bestimmung der Wandschubspannung aus dem Geschwindigkeitsfeld erfolgt durch Bestimmung der Geschwindigkeitsgradienten normal zu Wand

$$t = h \frac{du}{dn} \quad (1)$$

wobei h die wandnormale Koordinate ist und η die dynamische Viskosität des Blutes an der Wand. Die dynamische Viskosität des Blutes kann entweder als bekannt vorausgesetzt oder auf Grund von örtlichen Stoff- und Strömungsparametern, wie z.B. Hämatokritwert und Scherrate, abgeschätzt werden.

μ -PIV für Blutgeschwindigkeitsmessungen

PIV ermöglicht die Messung momentaner Geschwindigkeitsfelder mit hoher räumlicher Auflösung, wenn ein optischer Zugang zu der Meßstelle möglich ist. Alternative Verfahren wie Magnet Resonance Imaging (MRI), die keinen transparenten Zugang zur Meßstelle benötigen, erreichen nicht die zur Bestimmung der Wandschubspannung notwendige räumliche Auflösung. In den letzten Jahren haben mehrere Gruppen Experimente an Bluströmungen in-vivo und in-vitro mit PIV-ähnlichen Methoden ausgeführt.

Hitt et al. (1996) benutzen eine Korrelationstechnik mit Videobildern der in-vivo Blutströmung in der Vene eines Hamstermuskels. Tsukada et al. (2000) und Sugii et al. (2002a,b) nutzen PIV, um in-vivo die Blutgeschwindigkeitsprofile in den Mesenterialgefäßen (Innereien) einer Ratte zu bestimmen. Sie vergleichen die Ergebnisse mit in-vitro Messungen. Howe et al. (2004) verfolgen die Bahn von Erythrozyten durch das Herz eines Zebrafischembryos. Alle hier genannten Experimente haben gemeinsam, daß sie Erythrozyten als Tracer benutzen, so daß die gemessene Strömungsgeschwindigkeit der Geschwindigkeit der Erythrozyten entspricht. Typischerweise haben rote Blutkörperchen einen Durchmesser von 8 –10 μm , ihr Volumenanteil ist ca. 20 % im hier interessanten embryonalen Stadium, gegenüber 40 bis 60% im voll entwickelten Blut. Die Geschwindigkeit der Erythrozyten kann sich von der des Blutplasmas unterscheiden. Um die Wandschubspannungen zu bestimmen, benötigen wir die Plasmageschwindigkeit nahe der Wand. Darum benötigen wir Tracerpartikeln, die kleiner sind als die roten Blutkörperchen. Smith et al. (2003) injizieren Tracerpartikeln mit einem Durchmesser von 400 nm in den Blutkreislauf einer Maus um das wandnahe Geschwindigkeitsprofil in einer Vene zu bestimmen. Dazu werden einzelne Partikel verfolgt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Genauigkeit von in-vivo PIV Messungen zu verbessern, indem fluoreszierende Tracer genutzt werden. Diese Tracer haben mehrere Vorteile gegenüber Erythrozyten. Tracer mit geringerem Durchmesser folgen der Plasmaströmung. Das kleine Teilchenvolumen erlaubt eine hohe Anzahldichte bei geringer Volumendichte, so daß auch für sehr hohe räumliche Auflösung eine für PIV ausreichende „source density“ (Keane und Adrian, 1993) gewährleistet ist. Außerdem ist für μ -PIV die Dicke der Korrelationsebene, die Tiefe des Meßvolumens, eine Funktion der Partikelgröße. Kleinere Partikeln reduzieren die Tiefe des Meßvolumens (Olsen und Adrian, 2000). Gemäß den Betrachtungen von Olsen und Adrian beträgt die Tiefe der Korrelation („depth of correlation“) für 400 nm Tracerpartikeln in unserem Aufbau 15 μm , während für rote Blutzellen mit einem Durchmesser von 8 μm die Tiefe der Korrelation 60 μm beträgt. Des weiteren erhöhen fluoreszierende Partikeln in Verbindung mit einem Epi-Fluoreszenz Mikroskop das Signal–zu-Rausch-Verhältnis der Rohdaten beträchtlich. Fluoreszenz erlaubt es, daß Signal der Tracer von dem des Lichts, das von Erythrozyten und umgebenden Gefäßwänden reflektiert wird, zu trennen. Ein höheres Signal–zu-Rausch-Verhältnis der Rohdaten resultiert in einer besseren Korrelation und damit weniger Fehlmessungen.

Versuchsaufbau und Experiment

Im folgenden werden die Vorbereitung des Hühnerembryos, das μ -PIV System, die Synchronisierung des Meßsystems mit dem Herzschlag des Embryos und die Auswertemethoden beschrieben.

Medizinische Vorbereitung

Befruchtete weißschalige Eier werden inkubiert bis sie die Entwicklungsstufe 15, nach den Entwicklungskriterien von Hamburger und Hamilton (1951) erreichen. In unseren Experimenten entsprach dies einer Verweilzeit im Brutkasten von ca. 60 Stunden. Das Embryo verweilt einige Stunden in der Entwicklungsstufe 15. Bild 1 zeigt das Hühnerembryo im umgebenden Eidotter. In dieser Entwicklungsstufe ist das Embryo noch transparent und eignet sich so für optische Messungen. Ausserhalb des Embryos im Eidotter sind deutlich Vitellingefäße sichtbar, die vergleichbar der Placenta eines Säugetiers, das Embryo mit Nährstoffen versorgen. Hogers et al. (1999) und Stecklenburg-De Vos et al. (2003) haben diese Versorgung teilweise blockiert, indem sie das Gefäß mit einem Clip verschliessen. Obwohl sich die Versorgung des Embryos innerhalb kurzer Zeit über andere Gefäße wiederherstellte, konnten als Resultat der Behandlung schwere kardiovaskulare Fehlentwicklungen festgestellt werden. Es wird vermutet, daß diese Entwicklung mit einer Veränderung der Strömungsstruktur im sich entwickelnden Herzen und daraus folgend einer veränderten Wandschubspannungsverteilung im Zusammenhang steht. Das Herz des Embryos ist in dieser Entwicklungsstufe ca. 1 mm groß und besteht aus einem dreidimensional u-förmig gebogenen Gefäß (ventricle in Abb. 1), welches das Blut mit peristaltischer Kontraktion pumpt.

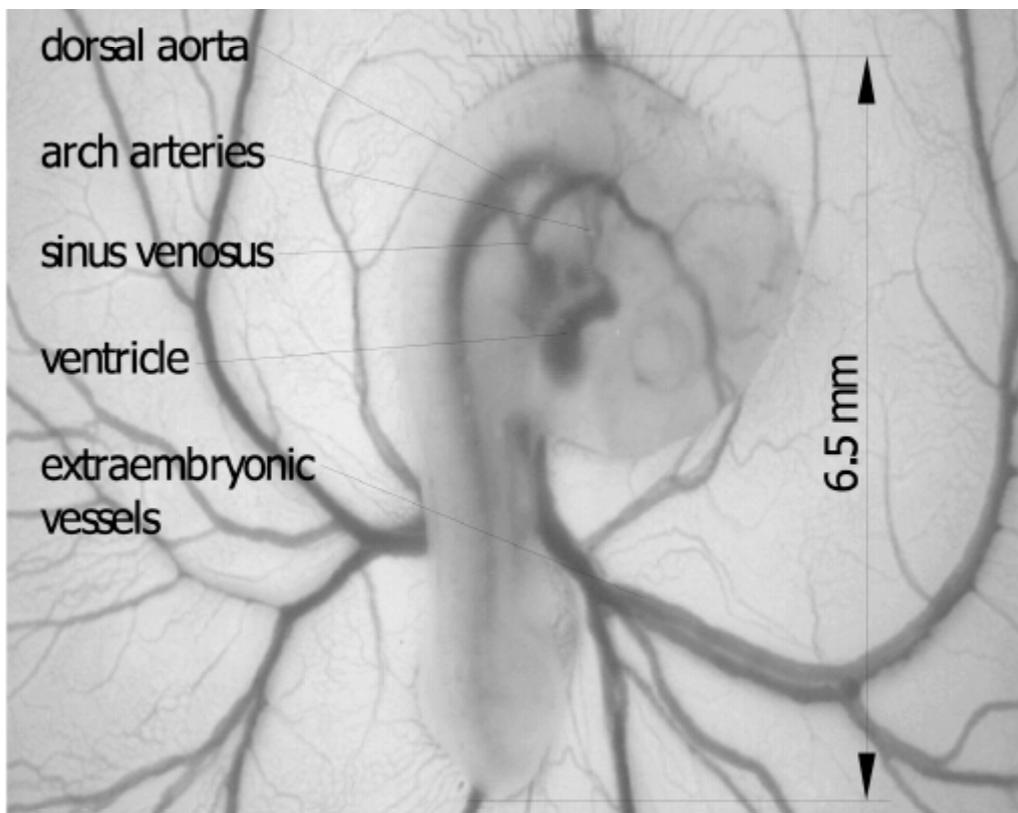


Abb. 1: Bild des Hühnerembryos in der Entwicklungsstufe 15

Um optischen Zugang zu dem Embryo zu erhalten, werden ein Teil der Eierschale und die Membran des Eidotters entfernt. Das Embryo schwimmt im Eidotter auf, so daß es optisch gut zugänglich ist und sich in der Fokusebene des Mikroskops befindet. Um ein Austrocknen durch Verdunsten zu verhindern, wird die gesamte vaskuläre Oberfläche mit einem Ölfilm (Paraffinum Subliquidum) bedeckt. Um die Temperatur des Embryos während der PIV-Messungen auf konstant 37°C zu halten, befindet sich das Ei in einem beheizten Wasserbad.

Die Tracer Partikeln werden vor der Messung mit Hilfe einer 10 µm dicken Glasnadel in ein Dottergefäß eingespritzt. Die Tracerpartikel sind in einer Wasser-Serum (bsa - bovine serum albumine) Mischung aufgelöst. Wir schätzen die Menge eingespritzten Serums auf 10 bis 20 % der Blutmenge des Embryos. Diese große Menge zusätzlichen Volumens scheint das Embryo innerhalb kurzer Zeit zu kompensieren. Eventuell diffundiert das Serum in das Eiweiß.

Meßaufbau

Abbildung 2 zeigt schematisch den Versuchsaufbau. Das Hühnerembryo befindet sich im Ei unter dem Mikroskop. Die Blutströmung im Herzen des Embryos wird durch ein 10x vergrößerndes apochromatisches Objektiv mit einer numerischen Apertur NA von 0,4 beobachtet. An ein Epi-Fluoreszenz Mikroskop mit einem Filtersatz für 532 nm Anregungswellenlänge und 560 nm Hauptemissionswellenlänge sind ein frequenzverdoppelter Doppelpuls-Nd:YAG Laser und eine Doppel-Bild CCD-Kamera mit optimierter Quanteneffizienz montiert.

Der Laser liefert ungefähr 0,5 mJ pro Puls, die in den Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt werden. Um Speckle Rauschen zu minimieren ist eine diffuse Platte in den Strahlengang montiert. Die Synchronisation von Laser, Kamera und Datenaufnahme erfolgt durch eine digitale Steuerung. Im wesentlichen entspricht der µ-PIV Aufbau dem von Meinhart und al. (1999) vorgestellten Prinzip.

Synchronisation mit dem Herzschlag

Meinhart und al. (2000) zeigen, daß bei niedriger Signaldichte („Image Density“ in Keane and Adrian, 1993), wie sie in µ-PIV Messungen prinzipbedingt vorkommt, die Verlässlichkeit der PIV-Auswertung signifikant erhöht werden kann, indem die Korrelationsebenen mehrerer Messungen aufsummiert werden („sum of correlation“). Voraussetzung für dieses Auswerteverfahren sind identische Bedingungen in allen Messungen, die zu einer Summation beitragen.

Um sicherzustellen, daß die Messungen der pulsierenden Blutströmung unter identischen Bedingungen ausgeführt werden, ist es notwendig die Messungen phasenfest mit dem Herzkreislauf des Embryos zu synchronisieren. Hierzu wird das Mikrofon eines 20-MHz Ultraschall-Dopplers nahe der dorsalen Aorta (am Rücken des Embryos) angesetzt. Die Blutzellenströmung reflektiert ein frequenzverschobenes Echo, das aufgenommen und auf einem PC demoduliert, tief-pass-gefiltert und digitalisiert wird. Mit Hilfe eines LabView Programmes wird in Echtzeit das Signal bispektral gefiltert und dann mittels FFT analysiert (Ursem et al., 2001), um die maximale momentane Geschwindigkeit zu ermitteln. Die Kamera und Laser Triggerung erfolgt auf Grund eines Grenzwert- und Gradientenkriteriums sowie einer variabel einstellbaren konstanten Verzögerung. Leichte Phasenschwankungen aufgrund der Ungleichförmigkeit eines individuellen Herzschlages kann zu den Meßzeitpunkten festgestellt werden, an denen sich die Herzwand sehr schnell bewegt. Darum ist für diese Messungen eine visuelle Kontrolle und eventuelles Aussortieren von einzelnen Messungen notwendig bevor die verbleibenden Messungen ensemble-korreliert werden.

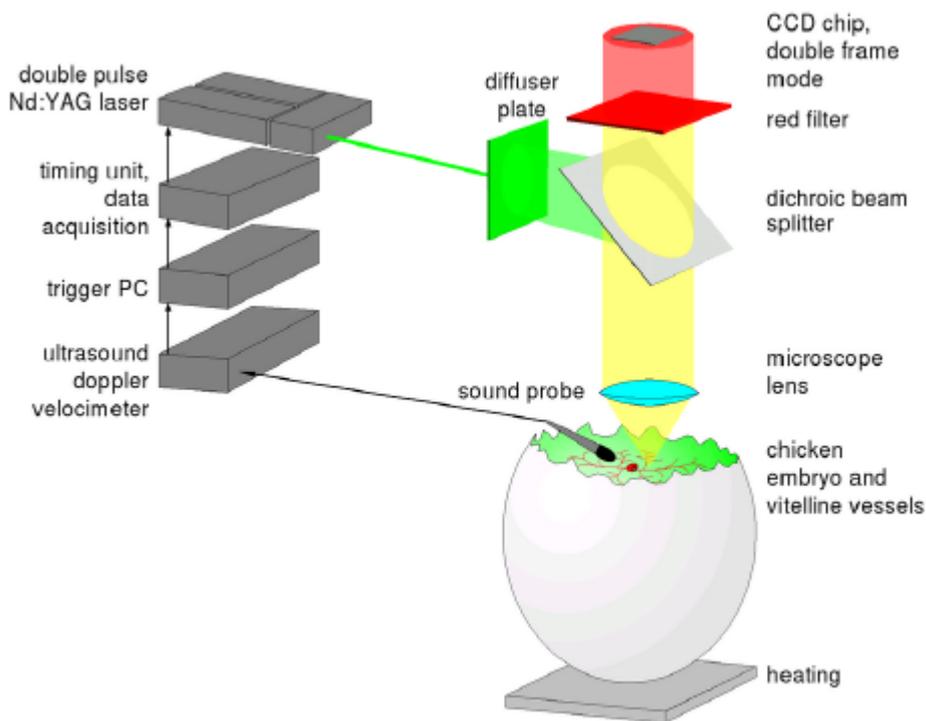


Abb. 2: μ -PIV Versuchsaufbau nach dem Prinzip von Meinhart et al. (1999). Die Messungen erfolgen phasenfest mit dem Herzschlag durch Synchronisation mittels Ultraschall-Doppler

Exemplarisches Ergebnis

Um die Möglichkeiten dieser Meßmethode zu demonstrieren, haben wir μ -PIV Messungen in den Vitellingefäßen eines Hühnerembryos durchgeführt. Die Vitellingefäße befinden sich außerhalb des Embryos im Eidotter. Die Messungen erfolgen phasenfest durch Synchronisation auf das Signal des Ultraschall-Dopplers. Entgegen den oben genannten Angaben sind die hier vorgestellten Messungen nicht an Tracerpartikeln sondern an den Blutzellen ausgeführt. Auch sind die Messungen nicht ensemble-korreliert, sondern aus 200 phasenfesten Messungen gemittelt. Messungen mit fluoreszierenden Tracer Partikeln im Herzen des Embryos werden wir in dem Konferenzvortrag zeigen.

Abbildung 3 zeigt die Strömung in der Verzweigung zweier Vitellingefäße. Diese Gefäße weisen eine dreidimensionale Krümmung aus der Bildebene heraus auf. Deutlich sind einzelne Blutzellen zu erkennen. Diese werden dunkler als der Hintergrund abgebildet, da Blutzellen grünes Licht stärker absorbieren als umgebendes Gewebe. Von oben links und oben rechts strömen Blutzellen und Plasma ein. Unten links strömt das Blut nach hinten aus der Meßebene heraus. Die Strömung wurde mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Das Blutgefäß hat an seiner dicksten Stelle einen Durchmesser von 277 μm .

Abbildung 4 zeigt die Geschwindigkeitsverteilung in der Verzweigung. Auf Grund der Dreidimensionalität der Strömung scheint in der zweidimensionalen Schnittenbene der dreidimensionalen Strömung der Massenerhalt nicht erfüllt zu sein. Ein Geschwindigkeitsvektor stellt den Mittelwert aus 200 phasenfesten Messungen dar. Die Meßfrequenz lag synchronisiert mit dem Herzschlag bei gemittelt 1,8 Hz. Der Abstand von 2 aufeinanderfolgenden Bildern eines PIV-Aufnahmepaares beträgt 8 ms.

Die Auswertefenstergröße beträgt 32x32 Pixel mit einer Überlappung von 50%. Die Größe eines Auswertefensters ist entsprechend 20,6 x 20,6 μm . Der Vektorabstand ist 10 μm .



Abb. 3: μ -PIV Aufnahme der roten Blutzellen im Vitellingefäß. Die Blutzellen absorbieren das Laserlicht, während die Gefäßwand reflektiert.

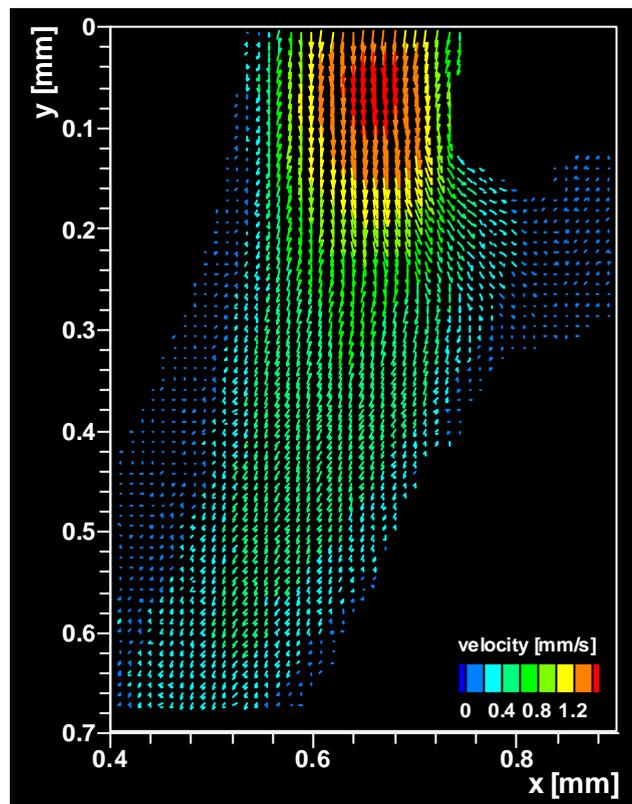


Abb. 4: μ -PIV Messung der Geschwindigkeitsverteilung der roten Blutzellen in der Bifurkation eines Vitellingefäßes.

Zusammenfassung und Ausblick

Ein μ -PIV System wurde durch den Einsatz von fluoreszierenden Tracern und durch die Synchronisation der PIV Messungen mit dem Herzkreislauf für in-vivo Messungen im Herzen erweitert. Die Funktionsfähigkeit des Meßsystems wurde an exemplarischen Messungen in den Vitellingefäßen im Dotter demonstriert.

In dem Vortrag werden wir Messungen mit fluoreszierenden Tracern im Herzen des Hühnerembryos zeigen und diese Tracer im Detail vorstellen. Diese Messungen geben einen Einblick in die Veränderung der Strömung im Herzen während eines vollen Herz-Zyklus. Aus den Messungen kann eine erste grobe Abschätzung der Wandschubspannungsverteilung im schlagende Herzen erfolgen.

Dankesworte

Diese Forschung wird von der Stichting Toegepaste Wetenschappen (STW) finanziert.

Literatur

- BC Groenendijk, BP Hierck, AC Gittenberger-De Groot, RE Poelmann (2004): Development-related changes in the expression of shear stress responsive genes KLF-2, ET-1, and NOS-3 in the developing cardiovascular system of chicken embryos. *Dev Dyn*; 230(1):57-68.
- DL Hitt, ML Lowe, JR Tincher, JM Watters (1996): A new method for blood velocimetry in the microcirculation. *Microcirculation*, 3(3):259-263.
- B Hogers, MC DeRuiter, AC Gittenberger-de Groot, RE Poelmann (1999): Extraembryonic venous obstructions lead to cardiovascular malformations and can be embryolethal. *Cardiovascular Research*, 41:87-99.
- JR Hove, RW Köster, AS Forouhar, G Acevedo-Bolton, SE Fraser, M Gharib (2003) Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature*, 421:172-177.
- RD Keane, RJ Adrian (1993): Theory of Cross-Correlation analysis of PIV images. *Appl.Sci.Res.* 49:191-215.
- CD Meinhart, ST Wereley, JG Santiago (1999): Piv measurements of a microchannel flow. *Exp Fluids*, 27:414-419.
- CD Meinhart, ST Wereley, JG Santiago (2000): A piv algorithm for estimating time-averaged velocity fields. *Journal of Fluids Engineering*, 122:285-289.
- MG Olsen, RJ Adrian (2000): Out-of-focus effects on particle image visibility and correlation in microscopic particle image velocimetry. *Experiments in Fluids*, 29(7):166-174.
- ML Smith, DS Long, ER Damiano, K Ley (2003): Near-wall piv reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venulus in vivo. *Biophysical Journal*, 85:637-645.
- S Stekelenburg-de Vos, NTC Ursem, WCJ Hop, JW Wladimiroff, AC Gittenberger-de Groot, RE Poelmann (2003): Acutely altered hemodynamics following venous obstruction in the early chick embryo. *J. Exp. Biol.* 206, 1051-1057.
- Y Sugii, S Nishio, K Okamoto (2002a) In vivo piv measurements of red blood cell velocity field in microvessels considering mesentery motion. *Physiological Measurement*, 23:403-416.
- Y Sugii, S Nishio, and K Okamoto (2002b): Measurement of a velocity field in microvessels using a high resolution piv technique. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 972:331-336.
- JN Topper, MA Gimbrone Jr. *Blood* (1999): Flow and vascular gene expression: Fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Molecular Medicine Today*, 5(1):40-46.
- K Tsukada, H Minamitani, E Sekizuka, and C Oshio (2000): Image correlation method for measuring blood flow velocity in microcirculation: correlation 'window' simulation and in vivo image analysis. *Physiological Measurement*, 21:459-471.
- NTC Ursem, PC Struijk, RE Poelmann, AC Gittenberger-de Groot, JW Wladimiroff (2001): Dorsal aortic flow velocity in chick embryo of stage 16 to 28. *Ultrasound Med. Biol.* 27(7):919-924.