

Elemental analysis of ischemic and reperfused rat heart tissue using the proton microprobe

Citation for published version (APA):

Verhoef, B. A. W. (1997). *Elemental analysis of ischemic and reperfused rat heart tissue using the proton microprobe*. Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/1997

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Impaired perfusion of the heart readily results in irreversible damage of cardiac muscle cells (cardiac infarct). To date in cardiology the mechanism of ischemic cell death is still incompletely understood. A hypothesis for this mechanism is that cell injury is caused by impaired activity of ion pumps, followed by alterations in the cellular concentrations of ions, such as Na^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} . The aim of the present thesis was to explore the possibilities of the Eindhoven proton microprobe set up to study the alterations in elemental concentration of healthy and damaged rat hearts at the cellular level. To this end freeze-dried tissue sections from normoxic, ischemic and reperfused rat hearts were analyzed.

In Chapter 2 the basic theory of the three most commonly used techniques in proton microprobe analysis, i.e., PIXE, RBS and STIM, are presented. The calculation of the elemental concentration and the lowest detectable mass fraction obtainable with a combination of these techniques are also discussed in this chapter. It was shown that even in biological samples with a thickness of several μm for several elements of interest, such as Na and Mg, thick-target effects have to be taken into account. Calculations indicated that for samples with an areal mass density of 0.6 mg/cm^2 neglecting thick target effects would even result in an underestimation of the Na concentration by a factor of 2. An experimental validation of these calculations was obtained by proton microprobe analysis of samples with a known and homogeneous concentration distribution of Na and K. In addition it was shown that the matrix composition of the sample has a minor influence on the elemental concentrations as determined from proton microprobe experiments. As a result in most cases it is sufficient to determine the (local) thickness of the specimen and to use a mean matrix composition for the calculation of the concentration of trace elements present in the sample.

Since the electron microprobe is widely used, playing an important role in analyses in the biomedical field, a practical comparison between the proton and electron microprobe is given in Chapter 3. To this end the minimum detectable Ca content was determined experimentally using both PIXE and EPMA by analysis of the same set of standards in biologically relevant matrices. It appeared that the use of both sucrose droplets and dialyzed BSA as a matrix material was not satisfactory, due to either non-reproducible results or too high contamination levels, respectively. However, the results obtained with polyethylene glycol (PEG) matrices indicated that the minimum detectable mass fraction for calcium is about two orders of magnitude better for PIXE than for EPMA. In addition it was shown that for Ca contents down to about $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ no significant influence of high K levels on the quantitative detection of Ca was found.

An extensive description of the adaptations and improvements in experimental procedures and instrumentation of the Eindhoven proton microprobe is provided in Chapter 4. The most important improvement was the introduction of the STIM technique. Making use of test specimens it was shown that a spatial resolution of about $1 \mu\text{m}$ can be obtained with STIM. STIM analysis of a $3 \mu\text{m}$ thick freeze-dried cryosection of a rat heart showed that the myocardial cells and their boundaries were clearly visible. This result implies that the STIM technique enables one to visualize individual cells. The combination of PIXE/RBS and STIM thus makes it possible to

determine the elemental content of different cells and thus to perform a cell-to-cell comparison within the same tissue section.

In Chapter 5 the preliminary results of proton microprobe analysis of control, normoxic, ischemic and reperfused rat hearts are presented. This study was mainly performed to gain insight into the possible artefacts introduced during the complete process of sample preparation and to verify whether the measured values for the elemental content correspond with values from literature. Isolated, ejecting rat hearts were used to study the influence of ischemia and reperfusion on the content distribution of the heart.

Electron microscope analysis of ultrathin tissue sections showed that a number of artefacts can be easily introduced during the preparative steps. Firstly in several cases in the outer region of the samples serious tissue damage, probably induced during the excision of the biopsies from the ventricular wall, could be observed. Secondly, storage of the biopsies at -70°C for a long period of time as well as the use of warm backing foils to pick up frozen cryosections resulted in altered elemental contents. Finally, utmost care is required to prevent rehydration of the freeze-dried specimens and consequently possible element migration prior to proton microprobe analysis.

Proton microprobe analysis showed that in ischemic and reperfused tissue sections alterations in Na, Mg, K and Ca contents can be followed with a spatial resolution in the order of the beam diameter ($\sim 3\ \mu\text{m}$). After reperfusion the K levels decreased as compared to ischemic tissue, whereas an appreciable increase in Ca content was observed. After reperfusion the Ca content showed large gradients, which implies that locally large Ca levels were present. These local variations in Ca content became visible by mapping of the Ca content. It is suggested that these locally elevated Ca levels are caused by the precipitation of calcium phosphate crystals in the mitochondrial compartment of the reperfused myocardial cells.

The maximum alterations in cardiomyocytal ion contents that are to be expected under severely damaging conditions were assessed in Chapter 6. To this end rat hearts were subjected to the calcium paradox. In addition to the proton microprobe, which was used to determine the alterations in elemental content, light microscopy, STIM and electron microscopy were used to study the histological and morphological changes following the calcium paradox. Light microscope analysis of stained tissue sections revealed severe damage, i.e., the tissue showed no regular structure and cells were not connected anymore and seemed to be torn asunder. Electron microscope analysis showed that the mitochondria contained dense granules. X-ray microanalysis of tissue sections using both the proton and electron microprobe showed dramatic alterations in the cellular elemental content in tissue sections from hearts subjected to the calcium paradox. In addition, EPMA analysis showed that the mitochondria contained very high levels of Ca and P. It is believed that this can be attributed to the massive accumulation of calcium in the mitochondria of the injured cell, since the mitochondria serve as calcium scavengers in case of intracellular Ca overload. It was also found that the calcium paradox created a comparable alteration in elemental content in all analyzed cells, suggesting that all cells were damaged to approximately the same extent. This finding was supported by the observation that 70-90% of the myocardial muscle cells had lost their LDH content during the calcium paradox, indicating that the cell membranes of the majority of cardiomyocytes were severely damaged.

In Chapter 7 a more advanced study of hearts subjected to prolonged ischemia followed by reperfusion is described. Just like the previous results presented in Chapter 5, the most considerable alterations in mean elemental content of the different cells were observed in tissue sections from reperfused rat hearts. In some cases values for the elemental content were observed that were comparable with values found in hearts subjected to calcium paradox experiments. However, for some elements, such as P and S, no substantial changes were observed after ischemia and reperfusion. The combined use of PIXE/RBS and the STIM technique revealed that intercellular heterogeneity in elemental content was found, especially in reperfused tissue. For some elements, such as K, this heterogeneity was also found at the end of the ischemic period. This can be explained by the well-known fact that some parts within the myocardial wall are damaged due to ischemia and reperfusion, whereas other parts remain unaffected. Again this result was supported by the finding that only about 5% of all cells had lost their LDH content.

In conclusion, it was shown in this thesis that the Eindhoven proton microprobe is a valuable tool to study the changes in elemental content due to ischemia and reperfusion at the cellular level. The spatial resolution of about 3 μm obtainable during PIXE/RBS experiments does not allow to determine the elemental content of subcellular structures. However, the combined use of PIXE/RBS and the STIM technique makes it possible to determine the mean cellular content of different cells. This enables one to study cellular heterogeneity in healthy and damaged myocardial tissue.

Samenvatting

Een verstoorde doorbloeding van het hart (ischemie) leidt snel tot een onherstelbare beschadiging van hartspiercellen (hartinfarct). Tot op heden is niet volledig duidelijk welk mechanisme ten grondslag ligt aan celdood ten gevolge van ischemie. Een hypothese is dat beschadiging van de cel wordt veroorzaakt door een verstoorde activiteit van ionenpompen, gevolgd door veranderingen in de cellulaire concentraties van verschillende ionen, zoals Na^+ , K^+ , Mg^{2+} en Ca^{2+} . Het doel van het huidige proefschrift was om te onderzoeken welke mogelijkheden de Eindhovense proton microbundel opstelling biedt om op cellulair niveau veranderingen in elementconcentraties in gezond en beschadigd hartspierweefsel te bestuderen. Daartoe zijn met deze opstelling dunne plakjes gevriesdroogd weefsel, afkomstig van normoxische, ischemische en gereperfundeerde rattehartjes, geanalyseerd.

In het algemeen worden tijdens proton microbundel analyses drie verschillende technieken gebruikt, te weten PIXE, RBS en STIM. De basistheorie van deze technieken wordt behandeld in Hoofdstuk 2. In dit hoofdstuk worden tevens de berekening van elementconcentraties en de laagst detecteerbare massafractie, die met een combinatie van de bovenstaande technieken kan worden bepaald, behandeld. Het werd aangetoond dat men zelfs in biologische preparaten met een dikte van enkele μm voor sommige elementen, zoals natrium en magnesium, rekening moet houden met dikke-target effecten. Berekeningen lieten zien dat in preparaten met een massadikte van 0.6 mg/cm^2 een tweemaal te lage Na concentratie wordt gevonden indien men geen rekening houdt met dikke-target effecten. Een experimentele validatie van deze berekeningen werd verkregen door preparaten met een bekende, homogeen verdeelde Na en K concentratie te analyseren in de proton microbundelopstelling. Daarnaast werd aangetoond dat de concentraties van de hoofdbestanddelen van het preparaat nauwelijks van invloed zijn op de berekende concentratiewaarden voor de andere elementen die een veel lagere concentratie hebben. Teneinde de concentratie van de spoorelementen te bepalen is het daarom meestal voldoende om de lokale dikte van het preparaat te bepalen en uit te gaan van een gemiddelde samenstelling van het preparaat.

In Hoofdstuk 3 wordt een vergelijking gemaakt tussen de proton microbundel en de elektronenmicroscop, daar deze laatste veelvuldig wordt gebruikt en een belangrijke rol speelt in biomedische analyses. Daartoe werd in dezelfde set ijkpreparaten met zowel PIXE als EPMA de laagst detecteerbare calciumconcentratie bepaald. Deze ijkpreparaten bestonden uit een op biologisch materiaal lijkende matrix, te weten sucrose, gedialyseerd BSA of polyethyleen glycol (PEG), waarin verschillende hoeveelheden Ca en K waren opgelost. Ten gevolge van respectievelijk een slechte reproduceerbaarheid of een te hoog verontreinigingsgehalte voldeden sucrose en BSA niet als matrixmateriaal. De resultaten met PEG als matrixmateriaal toonden echter aan dat de laagst detecteerbare calciumconcentratie voor PIXE twee ordes van grootte lager is dan voor EPMA. Tevens werd aangetoond dat de detectie van lage concentraties calcium (tot ongeveer $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) niet significant wordt beïnvloed door de aanwezigheid van grote hoeveelheden K.

In Hoofdstuk 4 wordt een uitgebreide beschrijving gegeven van de aanpassingen die zijn

aangebracht aan de Eindhovense proton microbundelopstelling. De belangrijkste verbetering die is aangebracht is de introductie van de STIM techniek. Met behulp van testpreparaten werd aangetoond dat met STIM een plaatsresolutie van ongeveer 1 μm kan worden bereikt. STIM analyse van 3 μm dikke gevriesdroogde cryosecties van een rattehartje toonde aan dat de afzonderlijke hartspiercellen duidelijk zichtbaar waren. De combinatie van PIXE/RBS en STIM maakt het dus mogelijk om de elementconcentratie van verschillende cellen te bepalen en aldus verschillende cellen binnen dezelfde weefselcoupe met elkaar te vergelijken.

De eerste resultaten van proton microbundelanalyse van controle, normoxische, ischemische en gereperfundeerde rattehartjes worden gepresenteerd in Hoofdstuk 5. Deze studie werd voornamelijk uitgevoerd om inzicht te verkrijgen in de mogelijke artefacten die worden geïntroduceerd tijdens de preparatie van het weefsel en om te verifiëren of de gemeten concentratiewaarden overeenkomen met literatuurwaarden. Teneinde de invloed van ischemie en reperfusie op de concentratieverdeling van verschillende elementen te bepalen werd gebruik gemaakt van een opstelling waarin geïsoleerde, werkende rattehartjes aan gecontroleerde omstandigheden, zoals ischemie, kunnen worden blootgesteld.

Analyse van zeer dunne plakjes weefsel met behulp van de elektronenmicroscopie toonde aan dat tijdens de preparatie gemakkelijk een aantal artefacten kunnen worden geïntroduceerd. Ten eerste bleek in een aantal gevallen de buitenste rand van de weefselcoupe ernstig beschadigd te zijn. Deze schade wordt waarschijnlijk toegebracht tijdens de excisie van het biopt uit de hartwand. Tevens bleek dat zowel het langdurig opslaan van weefselbiopten bij een temperatuur van -70°C als het gebruik van ongekoelde dragerfilms om bevroren weefselcoupes op te vangen kan leiden tot veranderde elementconcentraties. Tenslotte moet men uiterste zorg betrachten om te voorkomen dat het gevriesdroogde weefsel weer vocht opneemt, omdat hierdoor de elementen mogelijk reeds voorafgaand aan de proton microbundelanalyse gaan migreren.

Met behulp van de proton microbundel konden veranderingen in Na, Mg, K en Ca concentraties worden bepaald in ischemisch en gereperfundeerd weefsel met een spatiele resolutie ongeveer ter grootte van de bundeldiameter ($\sim 3 \mu\text{m}$). In vergelijking met ischemisch weefsel zakte de K concentratie na een periode van reperfusie, terwijl de Ca concentratie sterk toenam. In gereperfundeerd weefsel liepen de Ca waarden sterk uiteen. Door de Ca concentratie als functie van de plaats in het weefsel uit te zetten bleek dat er lokaal sterke Ca ophopingen aanwezig waren. Deze lokale ophopingen worden waarschijnlijk veroorzaakt door de neerslag van calciumfosfaat kristallen in de mitochondriën.

Hartjes kunnen zeer zwaar worden beschadigd door ze bloot te stellen aan de zogenaamde calcium paradox. De resultaten van dit experiment verschaffen daarom inzicht in de maximale veranderingen in elementconcentratie die kunnen optreden als het hart minder zwaar beschadigd wordt, zoals gebeurt tijdens reperfusie na een periode van ischemie. In Hoofdstuk 6 werd met behulp van lichtmicroscopie, STIM en elektronenmicroscopie aangetoond dat de histologie en de morfologie van het hartweefsel ernstig wordt aangetast ten gevolge van de calcium paradox. Elementanalyse met behulp van zowel de proton microbundel als de elektronenmicroscopie liet tevens zien dat de calcium paradox in alle geanalyseerde cellen een sterk gewijzigde elementconcentratie had veroorzaakt. Dit suggereert dat alle cellen eenzelfde mate van beschadiging hebben opgelopen tijdens de calcium paradox. Deze bevinding werd ondersteund

door de waarneming dat 70-90% van de totale LDH inhoud van het hart werd uitgestoten, wat er op duidt dat de celmembranen van de meerderheid van de hartspiercellen ernstig waren beschadigd.

In Hoofdstuk 7 wordt beschreven hoe PIXE/RBS en STIM gecombineerd kunnen worden om de gemiddelde elementconcentratie te bepalen van verschillende cellen in ischemisch en gereperfundeerd hartspierweefsel. De grootste veranderingen in elementconcentratie werden opnieuw waargenomen in weefselcoupes afkomstig uit gereperfundeerde hartjes. In sommige gevallen werden waarden voor de cellulaire concentratie gevonden die vergelijkbaar waren met waarden die werden gevonden in hartjes die waren blootgesteld aan de calcium paradox. In andere gevallen werden echter geen substantiële veranderingen in elementconcentratie waargenomen. Voor sommige elementen werd deze heterogeniteit ook waargenomen aan het eind van de ischemische periode. Dit kan worden verklaard door het feit dat sommige delen van de hartwand beschadigd raken ten gevolge van ischemie en reperfusie, terwijl andere delen niet worden aangetast.

Deze thesis heeft geleid tot de conclusie dat het mogelijk is om met behulp van de Eindhovense proton microbundel op cellulair niveau veranderingen in elementconcentraties te bestuderen in ischemisch en gereperfundeerd hartweefsel. Beperkingen in de spatiale resolutie en de bundelstroom verhinderen de bepaling van elementconcentraties in subcellulaire structuren. Echter, daar men de gemiddelde cellulaire concentratie van verschillende cellen kan bepalen, is het mogelijk om cellulaire heterogeniteit te bestuderen in gezond en beschadigd hartspierweefsel.