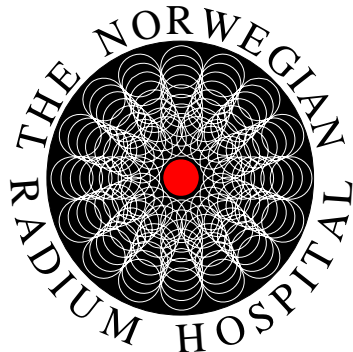


# Bioimpedans og monitorering på behandlingsrespons i kreftforskning

Svetlana Frantseвна Stoknes



Oppgave for graden Candidata Scientiarum

Fysisk Institutt  
Universitetet i Oslo

Oktober 2006



# Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven er utført på gruppen for Biofysikk ved Fysisk institutt, Universitetet i Oslo, på Avdeling for Medisinsk fysikk og Teknikk ved Det Norske Radiumhospital og i samarbeid med Bioimpedansgruppe ved Fysisk institutt, Universitetet i Oslo.

Jeg vil først og fremst takke alle mine veiledere, professor Dag Rune Olsen, professor Sverre Grimnes og professor Ørjan Grøttem Martinsen for konstruktive tilbakemeldinger og veiledningen underveis. Takk til alle for deres store engasjement, hjelpsomhet og lærerike kommentarer. En spesiell takk til min hovedveileder Dag Rune Olsen for et meget interessant og utfordrende temaforslag, samt for den store betydningen han har hatt for min faglige utvikling. Jeg er meget takknemlig for å ha gleden av å samarbeide med Bioimpedansgruppen ved Fysisk institutt. Sverre Grimnes takker jeg særlig for din forståelse av russisk humor! Jeg vil også takke Vidar Skulberg, avdelingsingeniøren ved MFTA, DNR for design av måleelektroder, mange spennende ideer og til dine "små skritt blir til store...". Spesiell takk til Kathrine Røe for samarbeid under eksperimenter og flere gode råd.

Tusen takk til Joe Aleksander Sanders og PhD student Therese Seierstad som har lest korrektur på oppgaven; til professor Erik Olai Pettersen og PhD student Nina F. Jeppesen Edin for mange kommentarer og tips. Ellers vil jeg takke alle ansatte og studenter på biofysikkgruppen som har vært behjelpelige med alt. Spesielt takk til Ingunn, Kristine, Siri og Ingerid for tålmodighet når dere var plaget av meg med mange spørsmål gjeldende den norske grammatikken.

En hjertelig takk rettes til alle som støttet og oppmuntret meg under "opphold"-saken. Uten hjelp av Einar Sagstuen, Eli Olaug Hule og Heidi Bruvoll hadde ikke vært mulig å fullføre dette arbeidet.

Med tårer i øyne vil jeg takke min lille Maria, som var den største grunnen til at mamma ikke ga opp!

And at least a couple words for my far Al... In my world of dead souls you gave me two wings of hope and showed me new horizons.

Svetlana Frantsevna Rudak Stoknes

## Bioimpedance and treatment response monitoring in cancer research

Bioimpedance monitoring *in vivo* is a non-invasive technique to examine changes in electrical conductivity. The electrical properties of tissue depend upon the structural organization of cells, cell shape, structure and orientation, integrity of cell membranes, relative proportions of intra- and extra-cellular fluids and ionic composition within the tissue. Non-invasive bioimpedance monitoring techniques, correlated with pathology, may be used to predict radiosensitivity of tumours. The aim of this study is to evaluate the ability of bioimpedance monitoring to describe morphology and physiology of non-treated cancerous tissue and mapping radiosensitivity of tumors with different type, size and pathobiology.

A model with xenografts established from the human colorectal cell line HT29 were grown from implanted tumor tissue into immune-deficient GBNIH nude mice. Laboratory animals of male sex were anaesthetized with katta-zoletilmix and tumor size monitored continuously. The mice were divided into three dose groups each given 0, 5, and 15 Gy with an  $^{60}\text{Co}$  source, respectively. Impedance measurements were performed with a 4-electrode probe. Tumor was compressed between the two electrodes to get full contact with surfaces. Impedances were recorded at frequencies between 1 Hz and 1 MHz with a Solartron 1260 gain-phase analyzer and Solartron 1294 impedance unit.

Electrical impedance monitoring, as applied in this study, was evaluated as a measurement technique for radiation response prediction. The preclinical study, conducted on nude mice implanted with a human colorectal cancer, revealed the ability of bioimpedance monitoring method to detect radiation-induced electrical changes of growing tumors on an individual subject basis. There are two components of our study, electrical impedance monitoring and histological assessment. Impedance results are presented as a function of time. Impedance and phase data for irradiated and non-irradiated tumour are plotted as a function of necrosis fraction and tumor volume.

Impedance and phase values at low frequencies show some response to radiation injury. There was found to be correlation in both cases: between impedance and necrosis fraction and between impedance and tumor volume. Our results suggest that non-invasive impedance monitoring technique is able to provide information useful in predicting radiosensitivity of tumors.

# Innhold

<b>1. Innledning.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Teori.....</b>	<b>7</b>
2.1 Tumorfysiologi.....	7
2.1.1 Endetarmskreft.....	7
2.1.2 Regulering av cellevekst og celledeling.....	8
2.1.3 Vaskularisering og hypoksi.....	9
2.1.4 Celledød.....	10
2.1.5 Tumormodellsystemer.....	12
2.2 Strålingsfysikk og biologi.....	12
2.2.1 Ioniserende stråling.....	12
2.2.2 Strålingens vekselvirkning med materie.....	13
2.2.3 Dosimetri.....	14
2.2.4 Termoluminescens dosimeter (TLD).....	15
2.2.5 Direkte og indirekte effekter av ioniserende stråling.....	15
2.2.6 Effekter av ioniserende stråling på kreftceller.....	16
2.3 Bioimpedansmonitorering i biologiske systemer /svulster.....	17
2.4 Elektriske egenskaper til biologiske vev.....	17
2.4.1 Elektrolytter.....	18
2.4.2 Makromolekyler: proteiner, karbohydrater og lipider.....	19
2.4.3 Cellemembranens oppbygning og transport.....	19
2.4.4 Dielektrikums.....	21
2.4.5 Elektrisk impedans.....	21
2.4.6 Wessel diagram og Bode plott.....	23
2.4.7 Polarisasjon.....	24
2.4.8 Impedansdispersjon.....	24
2.4.9 Ekvivalentkrets for biologisk materiale.....	26
2.5 Sensorer.....	28
2.6 Sensitivitetsfordeling.....	29
<b>3. Materialer og metoder.....</b>	<b>31</b>
3.1 Dyr og tumormodell.....	31
3.2 Anestesi og forberedelser.....	32
3.3 Bestråling og dosimetri.....	32
3.4 Forsøksprosedyren.....	33
3.4.1 Forberedelser før bioimpedansmonitorering.....	33
3.4.2 Bioimpedansmonitorering og fireelektrodesystem.....	34
3.4.3 Analyse.....	35
3.5 Histologi.....	36
<b>4. Resultater.....</b>	<b>37</b>

4.1 Kalibrering av elektroder.....	37
4.2 Bioimpedansmonitorering.....	39
4.2.1 Eksperiment 1-1: 0 og 15 Gy, 500 mV, fysiologisk saltvann.....	40
4.2.2 Eksperiment 1-2: 0 og 15 Gy, 100 mV, fysiologisk saltvann.....	43
4.2.3 Eksperiment 2-1: 15 Gy, 500 mV, tørr hud.....	45
4.2.4 Eksperiment 2-2: 5 Gy, 500 mV, spring vann.....	46
4.3 Volumbetraktninger.....	48
4.4 Histologisk undersøkelse.....	49
4.5 Oppsummering av resultater.....	52
4.5.1 Sammenligning av $ Z $ og nekrotisk fraksjon.....	52
4.5.2 Sammenligning av $ Z $ og tumorvolum.....	54
<b>5. Diskusjon.....</b>	<b>56</b>
5.1 Diskusjon av materialer og metoder.....	56
5.1.1 Tumormodell.....	56
5.1.2 Sikkerhet ved bioimpedansmonitorering.....	56
5.1.3 Feilkilder i forsøksprosedyrene.....	57
5.1.4 Andre feilkilder.....	58
5.2 Diskusjon av resultater.....	59
5.2.1 Diskusjon av resultater fra kalibreringstest.....	59
5.2.2 Diskusjon av resultater fra målinger på fuktete og tørre tumorer.....	59
5.2.3 Diskusjon av resultater fra målinger med 100 og 500 mV påført signal.....	60
5.2.4 Diskusjon av data fra bioimpedansmålinger på tumorer fra behandlede og kontroll dyr.....	61
5.3 Variasjon i tumorvolum.....	64
5.4 Betydningen av nekrose.....	64
5.5 Sammenligning av resultater fra bioimpedansmonitorering med resultater fra histologisk undersøkelse og tumorvolum.....	65
5.5.1 Sammenligning av $ Z $ og nekrotisk fraksjon.....	66
5.5.2 Sammenligning av $ Z $ og tumorvolum.....	67
5.6 Forslag til videre arbeid.....	68
<b>6. Konklusjon.....</b>	<b>69</b>
<b>Bibliografi.....</b>	<b>70</b>
<b>Vedlegg A: Søknad om tillatelse til dyreforsøk.....</b>	<b>76</b>
<b>Vedlegg B: Protokoll for bestråling av mus.....</b>	<b>84</b>
<b>Vedlegg C: Testing av TLD-brikker og fantom.....</b>	<b>85</b>
<b>Vedlegg D: Stråledoser til hver enkelt tumor.....</b>	<b>87</b>
<b>Vedlegg E: Eksperimentelle rådata fra bioimpedansmonitorering.....</b>	<b>92</b>
<b>Vedlegg F: Nekrotisk fraksjon.....</b>	<b>102</b>

# 1. Innledning

La simplicité c'est la plus grande sagesse. / Enkelhet er den største visdommen. (fransk) /

Kreft i kolon og endetarm er den hyppigste kreftformen nest etter prostatakraft hos menn og brystkreft hos kvinner i Norge (Stensvold *et al*, 1998). Antallet nye tilfeller har vært økende helt siden registreringen startet tidlig på 1950-tallet. I år 1995 utgjorde denne krefttypen samlet 15 % av alle nye krefttilfeller (Kreftregisteret). Kreft i kolon og rektum rammer stort sett de eldste aldersgruppene, men kan også forekomme i ung alder. Det gis ikke noe enkelt, entydig svar på hvorfor det oppstår kreft i endetarm. Vanligvis starter prosessen fra en adenomatøs polypp i tarmveggen som utvikler seg til adenocarcinom over en lang periode på 10-15 år (Stensvold *et al*, 1998), men det finnes mange faktorer som øker risikoen for utvikling av kreft i tykktarm, som for eksempel høyt fettinntak, høyt forbruk av alkohol og tobakk, fysisk inaktivitet, forhold i miljøet, osv.(Kreftforeningen).

Som behandlingen av endetarmskreft i de siste 15 år har det vært mye benyttet stråleterapi.(Playle *et al*, 2002) Nest etter kirurgi er strålebehandlingen en av de viktigste former for behandling av ondartede svulster i mennesker. Å få kontroll med svulsten gjennom å ødelegge kreftcellenes evne til proliferasjon, er en av de viktigste mål for stråleterapi. Et stort antall kreftpasienter med denne diagnosen dør pga manglende lokalregional tumorkontroll.

Mange cellulære og fysiologiske faktorer påvirker både tumorresponsen på stråleterapi og følgelig muligheten til å oppnå lokal kontroll med kreft. For det første, vil strålefølsomhet og reparasjonskapasitet av strålingsinduserte DNA-skader bestemme celleinaktivering. For det andre, vil proliferasjonsfaktorer, tumorsuppressorgener og fraksjon av klonogene celler bestemme tumorvekst. For det tredje, under tumorvekst utvikles det hypoksi som følge av dårlig forsyning med oksygen pga. unormal vaskulæringsarkitektur av tumorvevet. Optimalisering, individualisering og tilpasning av terapi forutsetter monitorering av tidlig respons etter behandling. Dose, doserate, stråletype, størrelse på strålefelt og strålefølsomhet er blant faktorene som har innflytelse på stråleresponsen. Det er ikke alltid like lett å samle nødvendig informasjon med disponible teknikker, som f. eksempel biopsi, CT, MRI, ultralyd osv under behandlingsprosessen. Av den grunn, kommer billige non-invasive målemetoder, korrelert med vevspatologi, som er i stand til å gi oss mye nødvendig

informasjon om strålerespons og som kan brukes fra pasient til pasient, til å bli populære i framtiden til prediksjon av strålefølsomheten.

Bioimpedansmålemetode gir oss informasjon om elektrokjemiske prosesser i vevet, om celleform, cellenes struktur, orientering, dens autonomi og forbindelser til omgivelsene, relative forhold av intra- og ekstracellulærvæske og ionesammensetning.

Det er påvist bioimpedansforandringer forårsaket av degradering av cellemembran (Foster *et al*, 1989); muskelatrofi, degenerasjon og nekrose (Osterman K *et al*, 2004); vevsseparasjon, inflammasjon, vaskularisering og ødema (Skourou Ch *et al*, 2004) .

Hensikten med oppgaven har vært å kartlegge:

- hvordan bioimpedans kan korreleres til morfologi og fysiologi for ubehandlet tumorvev og
- hvorvidt bioimpedans kan benyttes til tidlig monitorering av terapierespons

I oppgaven ble det brukt en xenograftmodell fra den humane kolorektale cellelinjen (HT29), dyrket ved passasje av tumorvev i immunsupprimerte GBNIH nakne mus.

Musene ble inndelt i tre dose grupper (0, 5, og 15 Gy) og bestrålt med  $^{60}\text{Co}$  kilden; stråledosen ble gitt som engangsdose. Bioimpedansmålinger ble utført med fireelektrodessystem. Tumor ble behandlet i forveien og etterpå ble impedans målt for frekvensområde mellom 1Hz og 1 MHz. Det ble foretatt histologisk studie av både behandlet og ubehandlet tumorvev for å se på fraksjon av nekrotiske vev.



## Kapittel 2 Teori.

Det er mer mellom himmel og jord, Horatio, enn i dine drømmers vildeste fantasi.

- William Shakespeare

### 2.1 Tumorfysiologi

Alle organismer i vår verden er satt sammen av forskjellige typer celler. En celle er en selvstendig fungerende enhet i organismen. Celler er også samlet i systemer: i vev og organer og som er i gjensidig kontakt med hverandre. Liv til hver ny celle starter fra en annen celle (lat. *"omnis cellula e cellula"*). Organismen vokser ved at cellene deler seg. Normale celler er velorganiserte, de holder god kontakt med sine naboceller og retter seg etter vekstkontroll mekanismer. Kreftceller er mer uavhengige av signaler fra normal vev. Mikromiljø i en kreftsvulst karakteriseres av suboptimale vekstforhold, dårlig blodtilførsel og som følge oksygen- og næringsmangel, forandringer i energitilstand. Indremiljø i tumorer kan inneholde vekslende områder av akutt og kronisk hypoksi, lav pH verdi og næringsmangel (Moulder *et al*, 1987; Rockwell, 1992). I kreftvev har man påvist forskjellige elektriske og kjemiske egenskaper forskjellige fra normal vev. Forskjellige cellestrukturer er involvert i transformasjon under kreft: kjerne, cellemembran og mitokondrier. Det er funksjonelle forstyrrelser i cellulær energiproduksjon og forandringer i membranpotensial (Seeger and Wolz, 1990). Cellenes liv kan ta slutt på to måter: enten ved at de deler seg og blir til nye identiske celler eller ved at de eldes og desintegrerer (Pettersen, 2005).

#### 2.1.1 Endetarmskreftkreft.

Kolonoskopi og rektoskopi er de undersøkelsene som påviser de fleste tilfellene av endetarmskreft, disse oppstår oftest fra godartete polypper i epitellag som kler rektums vegg og som etter en visse forandringer blir ondartet og øker i størrelsen. Når polyppen er mindre enn 1cm i diameter ser fordeling av celler i epitel vanligvis normalt ut. Jo større polyppen blir, desto mer vil den inneholde av uvanlig differensierte celler, som formerer unormalt organiserte strukturer. Etter hvert blir kreftceller mer invasive, bryter gjennom epitellag, sprer seg til muskelvev og til slutt, metastaserer til lymfeknuter, lever, lungene og andre organer (Alberts *et al*, 2003). Hvilke mekanismer får en normal celle til å bli en kreftcelle?

## 2.1.2 Regulering av cellevekst og celledeling.

Epitelcellene i endetarm er utsatt for mye slitasje på grunn av mekaniske og kjemiske belastninger og påvirkning. For å opprettholde funksjonen må det kontinuerlig produseres nye celler.

Cellen dobler sitt volum og sin proteinmengde i løpet av en cellesyklus. Cellesyklus deles inn i to faser: mitosen, der celledeling finner sted og interfase. Interfasen består av S-fasen (DNA syntesen) og to tidsgap – G1 og G2, som inneholder kontrollpunkter for cellesyklus. I kontrollpunktene (G1k, G2k, Mk) skjer det koordinering av alle de prosessene som er nødvendige for en vellykket cellesyklus og celledeling, kontroll og reparasjon av genetisk materiale slik at hver datter celle får komplett kopi av informasjon fra mors celle. I normalt vev ligger stamceller i hvilefase (G0) til de får signal til ny celleproduksjon (Nias, 1998; Alberts *et al*, 2003; Pettersen, 2005).

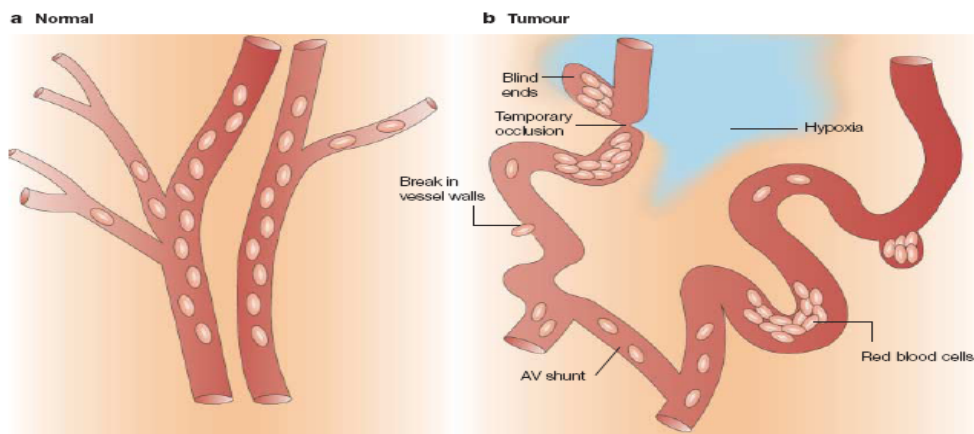
Grunnen til at kreftsvulstene vokser er at kreftceller kontinuerlig produserer nye celler uavhengig av om det er etterspørsel etter nye celler og at deres celledødsrate er under 100 %.

Proliferasjonsgener (proto-oncogener) er vekstfremmede gener som øker celledelingshastighet. Sammen med tumorsuppressorgener, som bremser ned celledeling, regulerer de cellesyklusen. Ved en mutasjon i proliferasjonsgener kan celledeling opptre spontant og gi opphav til kreftutvikling. Tumorsuppressorgener (for eksempel pRB og p53) har den motsatte effekten på kreftutvikling enn proliferasjonsgener (Pettersen, 2005).

I de fleste tilfellene skyldes endetarmskreft mutasjoner i en rekke gener: onkogen K-Ras og tumorsuppressorgener p53 og APC. Mutasjon av p53 suppressor gen var observert i ca. 80 % av kolorektalkreft (Vogelstein *et al*, 1988) og dette assosieres med resistans mot celledød, forårsaket av ioniserende stråling for denne celletypen (Lee og Berstein, 1993; Nagasawa *et al*, 1994). p53 proteinet aktiveres under stressforhold som for eksempel utsettelse for ioniserende stråling. Den gjenkjenner skader i DNA, binder seg til skadestedet og enten hindrer celler med DNA-skader i å gå inn i S-fase (cellesyklus arrest) eller induserer apoptose (dvs selvdstruksjon). G1-arrest er svært avhengig av normalt fungerende p53proteinet, mens arrest i G2 kan oppstå selv om p53 er skadet (Kastan *et al*, 1991) Dette betyr at G2 er siste sjans for kreft celler til å reparere DNA skader og inngå mitose (Playle *et al*, 2002).

### 2.1.3 Vaskularisering og hypoksi.

Utteksling av næringsstoffer, gasser og avfallsstoffer mellom kapillærene og cellene foregår ved diffusjon (stoffenes egen bevegelse) og filtrasjon (ved hjelp av trykk). Vannløselige molekyler (som for eksempel  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , glukose og aminosyrer) og fettløselige stoffer (for eksempel  $\text{O}_2$  og  $\text{CO}_2$ ) vandrer mellom cellene og blodet. I normalt vev opprettholdes denne balansen stabil (Bjålie et al, 2000). I kreftsvulster deler cellene seg kontinuerlig og økende antall celler medfører økt oksygenbehov. Jo lenger en celle er fra en blodåre, desto lavere er oksygeninnholdet. For å få tilgang til oksygen må levende celler befinne seg innen ca.  $70 \mu\text{m}$  avstand fra et kapillær på den arterielle siden og enda mindre på den venøse. Oksygenering av celler og vev reduseres med økende avstand. Svulster som har en diameter som er større enn 2mm i diameter, kan allerede inneholde partier der cellene har et redusert oksygeninnhold (Nias, 1998; Hall, 2000). Figuren 2.1 viser forskjellene mellom vaskulaturen i normalt vev og vaskulaturen i tumorvev.



Figur 2.1: Vaskulaturen i normal- (venstre) og tumorvev (høyre) (Brown og Giaccia, 1999).

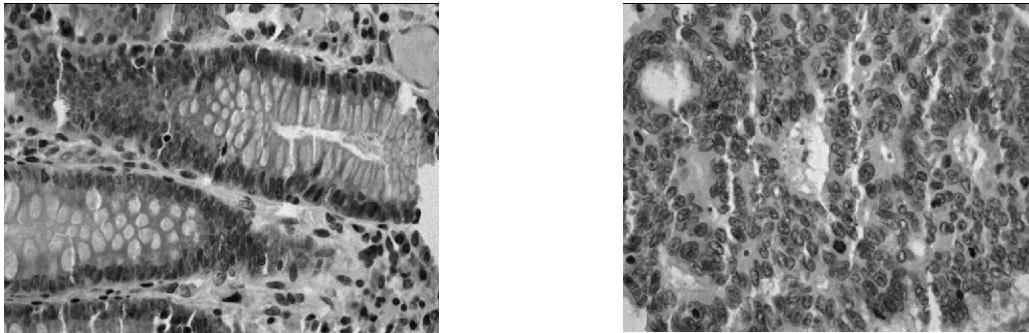
Når oksygentrykket faller under 10 mmHg, kalles en slik tilstand hypoksia. Det finnes to typer hypoksi: kronisk hypoksi og akutt hypoksi. Kronisk hypoksi er resultat av langvarig lav  $\text{pO}_2$ . Celler og vev som ligger på lang avstand fra blodårene er mest utsatte for kronisk også kalt diffusjons betinget hypoksi. Ofte ligger disse cellene i hvilefase fordi de mangler oksygen eller næringsstoffer til å starte på celledeling (Hall, 2000).

Akutt hypoksi skyldes midlertidig og kortvarig oksygenmangel som følge av for eksempel avsperring av blodkar. Blodstrømmen blir ustabil og oksygen- og næringstilførselen varierer.

Langvarig utsettelse for oksygenmangel i et område av tumor fører til omfattende celledød (nekrose). Figur 2.2 viser forskjellen mellom normal kolorektalvev og kolorektalkreftvev. Kreftceller med manglende evne til apoptose forårsaket av inaktivert p53-genet, har høy overlevelsessevne under oksygenmanglende forhold (Davis *et al*, 2004).

Tumorer utskiller vekstfaktorer som iverksetter formering av nye blodårer (angiogenese). Fordelingen av hypoksiske og godt oksygenerte områder veksler i tumor når nye blodårer blir dannet og andre destruert (Holash *et al*, 1999). Tumorer med varierende oksygenering responderer forskjellig på stråleterapi (Gray *et al*, 1953; Graeber *et al*, 1996).

Hypoksiske celler mangler oksygen for å aktivere aerobisk metabolisme. De starter anaerobisk energiproduksjon som fører til økende behov for sukker (Rossi-Fanelli *et al*, 1991).



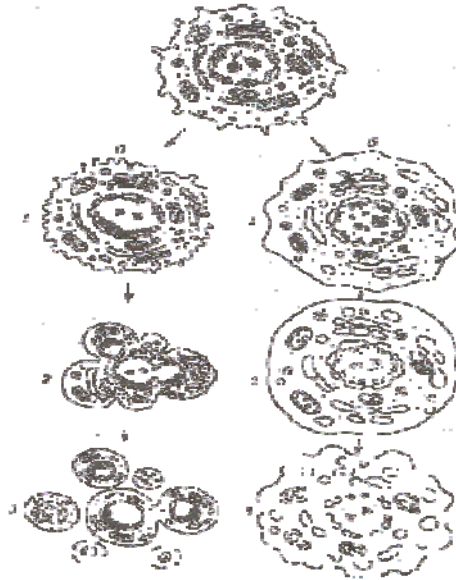
Figur 2.2: Biopsier fra normal kolorektalvev (venstre) og kolorektalkreftvev (høyre) (Davis G. *et al*, 2004).

## 2.1.4 Celledød

Celledød karakteriseres av minskning av klonogent potensiale og forekommer som nekrose (*nekrosis*) eller som apoptose (programmert celledød). Figur 2.3 viser en illustrasjon av veien fra friske celler til celledød.

Nekrose initieres ved forstørring av cellevolum og ødeleggelse av cellemembran. Når fysiske, kjemiske og hypoksiske skader oppstår mister mange celleproteiner sin evne til å strukturere vann (Cope, 1978). Økning i prosent andel av ubundet vann og i gjennomtrenging av cellens membran fører til oppsvulming. Dette betyr at kalium forlater cellen og erstattes av natrium; konsentrasjon av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Ca}^{2+}$  ioner øker. Kalsium aktiverer endonukleaser (hydrolyse, spalting av DNA), fosfolipaser (nedbryting av membraner) og proteaser (destruering av cytoskjelett) (Path.lectures, 2006). Forandringer i cellenes indre homeostase

medfører endring i ionekonsentrasjon og irreversible forandringer i mitokondrienes funksjoner. Dette fører til avslutning av alle livsviktige prosesser, irreversible forandringer i energiproduksjon under mangel av oksygen.



Figur 2.3: To typer celledød: a). apoptose, b). nekrose (Chencov Y, 2004).

Cellenes kjerner gjennomgår også forandringer (Ling og Ochsenfeld, 1976). Cellenes tilstand forandres slik at det kan bli dannet gigantiske celler. Dette kan skje enten gjennom forstørrelse av celledensitet uten celledeling eller gjennom sammenslåing av 2 datter celler. Intercellulært forbindelsessnitt minsker når celler svulmer opp kan føre til økt elektrisk motstand i regioner med ødem.

Nekrose følger etter lange perioder med dårlig oksigenering og ødem. Membraner mister sin evne til å holde balansen mellom intra- og ekstrasellulær væske. Cytoplasmatiske materialer strømmer ut i det ekstrasellulære rom og resulterer i betennelsesreaksjoner, når leukocytter angriper det nekrotiske området. Celleoverflaten forandres og cellen løsner fra naboceller og proteinfibrer i ekstrasellulær matriks. Det spesielle ved nekrose er at det er store grupper av celler som føres til døden (Chencov Y, 2004). Døde celler etter hvert degraderes til væskeform. Økt prosent væske i nekrotiske områder fører til reduksjon av elektrisk motstand ved strømpassering (Scourou C *et al*, 2004 ).

Ved apoptose eller programmert celledød, starter cellen selvdestruksjon. Morfologi ved apoptose er likt både under normale og patologiske forhold. Ved apoptose skjer det ingen lekkasje av celleinnhold. Under apoptose aktiveres endonukleaser som spalter DNA i små

fragmenter (Alberts *et al*, 2003). Apoptotiske celler deles i små fragmenter som hver for seg er avsluttet i en cellemembran. Senere skal de små cellefragmentene fagocytteres av makrofager eller naboceller. Betennelsesprosessen utvikler seg ikke og det er lite forandring i det ekstracellulært miljøet. Det betyr ingen forandring i ledningsevnen for vevet hvor store mengder av celler var inaktivert i løpet av en kort tid (Chencov Y, 2004, Path.lectures, 2006).

## 2.1.5 Tumormodellsystemer.

Et bredt spektrum av forskjellige tumormodeller både *in vivo* og *in vitro* er disponible for moderne kreftforskere. I forsøkene ble det benyttet xenografter (*in vivo* modell), som dannes ved passasje av human tumor til et forsøksdyr (nude mus). Det gjelder etablering av en ny xenograft-modell, men vanligvis injiseres celleduspensjon som har vært fryst ned.

Vanligvis frastøtes ikke et transplantert kreftvev fordi disse nakne mus har et uhyre svak immunforsvar pga manglende thymus. Humane xenografter er nyttige modeller innen kreftforskning. De har 5 ganger så høy veksthastigheten i forhold til tumor i mennesker og beholder meste parten av biologiske, hystologiske og patologiske egenskaper til human tumor etter flere transplantasjoner (Hall, 2003).

## 2.2 Strålingsfysikk og biologi.

Strålebehandling er en av de viktigste metodene for å bekjempe kreft. Lineærakseleratorer er mest brukt i stråleterapi, men i noen tilfeller brukes det  $\gamma$ -stråling fra radioaktive isotoper som for eksempel Co-60. Strålebehandling av kreft har som mål å drepe kreftcellene uten å skade det friske vevet. Kreftceller kan vokse i noen dager eller uker etter bestråling, men de har mistet sitt klonogene potensial og er ufarlige for pasienten. Cellenes tap av egenskapen til å danne nye celler kalles strålerespons.

### 2.2.1 Ioniserende stråling.

Ioniserende stråling har evnen til å ionisere atomer og molekyler i bestrålt materie. Det betyr at energikvant absorberes av et atom eller molekyl som så får en positiv eller negativ ladning, for eksempel ved frigjøring av et elektron. Den nødvendige energien for å sende ut et elektron er ca. 4-25 eV (Attix, 1986). Ioniserende stråling i sin natur kan være enten i form av partikler, som for eksempel  $\alpha$ - og  $\beta$ -partikler, nøytroner,  $\pi$ -mesoner osv., eller i form av

elektromagnetisk stråling. Når det gjelder elektromagnetisk stråling har vi relasjonen:  $E = 1239,8/\lambda$ , hvor energien er gitt eV og  $\lambda$  i nm (Attix 1986).

Ioniserende elektromagnetisk stråling inndeles i røntgen og  $\gamma$ -stråling. Begge to typene består av fotoner, men forskjellen ligger i måten de produseres. Røntgenspekteret består av karakteristisk stråling og bremsestråling.  $\gamma$ -stråling som var brukt i eksperimentet, oppstår ved desintegrasjon av atomkjerner eller anhilering av partikkel og antipartikkel. I denne studie ble det brukt  $\gamma$ -stråling fra en cobalt-60 kilde.  $^{60}\text{Co}$  kan produseres både i lineærakseleratorer og i reaktoren med bombardering av stabil  $^{59}\text{Co}$  atomer med nøytroner. Selve kjernereaksjonen skrives på følgende måte:  $^{59}\text{Co}(n, \gamma)^{60}\text{Co}$ .  $^{60}\text{Co}$  desintegrerer til  $^{60}\text{Ni}$  ved utsending av en  $\beta$  partikkel og to fotoner med energier 1,17 MeV og 1,33 MeV (Khan, 2003) hver per desintegrasjon.

Spredningskomponenten for strålingen fra Cobalt-60 kilde er ca. 10 % av den totale intensiteten (Khan, 2003) og består av lavenergetisk  $\gamma$ -stråling fra primær  $\gamma$ -stråle som vekselvirker med kilden, kapselen og kollimatoren.  $\beta$ -partikler blir nesten fullstendig absorbert og bidrar ikke til pasientens dose. De "brukbare" komponentene i strålen består bare av  $\gamma$ -stråling.

## 2.2.2 Strålingens vekselvirkning med materie.

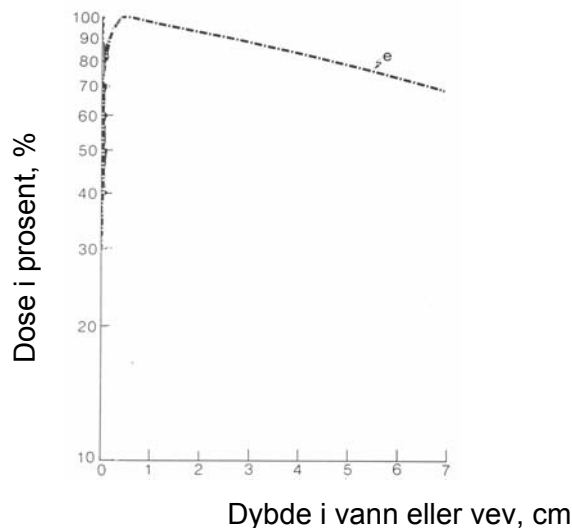
Kapittel 2.2.2 er basert på (Khan, 2003) og (Hall, 2000).

Når et monoenergetisk stråleknippe passerer gjennom et medium vil intensiteten avta i henhold til følgende formel:

$$I(x) = I_0 e^{-\mu x} \quad (2.1)$$

der  $I(x)$  er transmittert intensiteten,  $I_0$  - den innfallende intensiteten,  $x$  er tykkelsen av mediet og  $\mu$  er den linear attenuasjonskoeffisienten til mediet. Den lineære attenuasjonskoeffisienten er satt sammen av sannsynligheten for energioverføring som følge av fotoelektrisk effekt, pardannelse og Comptoneffekt. Ved den aktuelle strålingsenergi i dette forsøket (1,17 MeV og 1,33 MeV) dominerer Comptoneffekt.

Når bindingsenergi til et elektron i atom er lavere enn energien til det innkommende fotonet, vi kan si at elektronet er fritt. Foton gir en del av sin energi og moment til elektron og blir spredt med lavere energi. Jo høyere energi innkommende foton har, desto mindre forandrer den opprinnelige retningen. I Comptonvekselvirkninger, når elektronene i det spredende atomet virker uavhengig av hverandre, kan vi med god tilnærmelse si at det finnes ingen differensiering mellom forskjellige stoffer eller med andre ord, strukturfaktoren faller bort. Innkommende  $\gamma$ -stråling fører til at det dannes stor antall elektroner som er i stand til å påføre biologiske skader. De sekundære elektronene har høy energi i retningen innover i vevet (dvs. de har liten spredningsvinkel). De rekker langt inn i vevet før de avsetter det meste av sin energi. Figur 2.4 viser at maksimalt dose ligger ikke nær vevsoverflate, men avsettes et sted dypere. Dette fenomenet kalles "build-up" effekt.  $\gamma$ -stråling kan derfor bli benyttet i behandling av dyptliggende tumorer.



Figur 2.4: Dybdedosekurve for vann eller bløtvev for  $\gamma$ -stråling fra en cobalt-60 kilde, feltstørrelse = 10x10 cm, SSD=80 cm ( Khan, 2003).

### 2.2.3 Dosimetri.

Denne kapittel er basert på (Attix, 1986) og (Malinen, 2005).

Når indirekte ioniserende stråling passerer materie vil det medføre at en del energimengde avsettes i mediet som traverseres. Denne energimengden vil avhenge av stråletype, energi og absorbator. Dosen avsatt i volumet defineres ved:

$$D = \frac{d\bar{\varepsilon}}{dm} \quad (2.3)$$



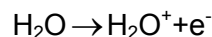
hvor  $\bar{d\varepsilon}$  er middel verdi av overført energi til volum  $dV$  med masse  $dm$ . Absorberte dosen måles i enheten Gy=J/kg.

## 2.2.4 Termoluminescens dosimeter (TLD).

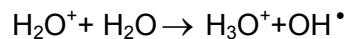
Mange krystallinske stoffer kan fremvise termoluminescens fenomenet. Det betyr at de kan få forandringer i krystallgitteret når de mottar store stråledoser. TL mekanismen skjer på følgende måte at den absorberte energien får noen elektroner eller hull hoppe over til metastabile energi nivåer til de får ekstra energier ved oppvarming og returnerer tilbake til grunntilstand ved utsendelse av lys. Intensiteten til lys er en funksjon av temperatur med topper tilsvarende forskjellige energinivåer. For LiF:Mg,Ti materiale toppen ligger mellom  $180^{\circ}C$  og  $260^{\circ}C$  ( A handbook for Teachers and Students). Utsendt lys er målt med fotomultiplikator som omgjør lys til elektrisk strøm.

## 2.2.5 Direkte og indirekte effekt av ioniserende stråling.

Når strålen vekselvirker med materie fører det til forandring i molekyler i cellen. Ved direkte effekter av stråling oppstår skader først og fremst i DNA hvor energien var absorbert. Ved indirekte effekten reagerer strålingen med andre atomer og molekyler, vanligvis med vann. Forandring i target blir forårsaket av svært reaktive produkter av radiolyse reaksjoner (vannradikaler). Vannradikalene overfører skader til biomolekyler fordi de er i stand til å forflytte seg før de reagerer og de er meget reaktive. Mesteparten av skader i DNA er forårsaket av radikaler som blir dannet i slike reaksjoner hvor først vannmolekyl ioniseres og mister et elektron:



Og etterpå  $H_2O^+$  ion reagerer med nøytral vannmolekyl og danner vannradikal:



Sammen med radikalene  $H^{\bullet}$  og  $e_{aq}^-$  utgjør det de tre vannradikalene. Indirekte effekten kan bli forsterket eller svekket med kjemiske preparater (Hall, 2000) og (Pettersen, 2005). For molekyler oppløst i vann bidrar den indirekte effekten til 80-90% av celleinaktiveringen, mens den direkte effekten bare 10-20 % (Hall, 2000).

## 2.2.6 Effekter av ioniserende stråling på kreftceller.

Genetisk ustabilitet skiller kreftceller fra friske celler og er forårsaket av kromosomforandringer eller tap av reparasjonsmekanisme. Pga defekter i forskjellige cellesyklus kontrollpunkter har tumorceller mistet evnen til cellearrest og cellen kan fortsette å dele seg etter bestråling. Men mesteparten av bestrålte kreftcellene vil dø etter noen dager som resultat av DNA-skader de fikk etter at de prøvde å dele seg med defekter i kromosomer. Alberts beskriver på denne måten hva som skjer etter bestråling med en kreftcelle som har defekt i p53-proteinet. Først får tumorceller store DNA skader etter å ha mottatt en dose av ioniserende stråling. En del celler ville dø i apoptose om p53 fungerte. Istedenfor passerer de forbi cellesyklus kontrollpunkter uten å bli arrestert og går i mitosen. Her deler de seg med store kromosomskader og ender sitt liv enten gjennom massiv mitotisk død (og det er ønskelig for oss) eller de fortsetter å dele seg og fører til tumorprogresjon. Om en stor dose var mottatt i en smell stor antall celler sprekker samtidig og svulsten sveller. Da svulstens volum kan ikke være som mål for effekten. Men om dosen var noe mindre vil væsken bli absorbert og cellerestene fagocytteres; svulsten krymper (Alberts *et al*, 2002).

Cellenes DNA er det strålefølsomme target. Skadene i DNA kan være letale, subletale og potensielt letale skader. De letale skadene er irreversible, ureparerbare og fører til celledød. Subletale skader i prinsippet kan bli reparert innen kort tid, men de er ikke dødelige selv om de ikke repareres. Reparasjon av subletale skader påvirker i stor grad celleoverlevelsen. Potensielt letale skader er reparerbare, men vil være dødelige hvis de ikke repareres i tide. De kan repareres bare hvis cellen befinner seg i optimale omgivelser. Det spekuleres om at resistansen i humane tumorer skyldes reparasjonen av potensielt letale skader (Hall, 2000).

Singeltrådbrudd (SSB, single strand break) oppstår ofte ved påvirkning av ioniserende stråling og skyldes i de fleste tilfellene virkningen av OH<sup>\*</sup> radikaler. Disse trådbruddene kan repareres raskt ved eksisjonsreparasjon og resyntese av DNA. For å inaktivere eller ødelegge celler trenges det dobbeltrådbrud DNA skader (DSB, double strand break). Denne typen trådbrud oppstår enten ved samtidig singeltrådbrudd eller når to single spor bryter hver sin tråd nært hverandre nesten samtidig. DSB skader kan repareres gjennom ikke homolog og homolog rekombinasjon. Ikke homolog rekombinasjon representerer ett segmenttap. Homolog rekombinasjon er en mye mer komplisert prosessen hvor nukleotid sekvens fra intakt kromosom blir overført til kromosom med dobbeltrådbrud med samme basesekvens. Denne typen reparasjon er mye mer nøyaktig (Alberts *et al*, 2002). Reparasjonsprosessene

fører til dannelser av kromosom aberrasjoner i form av for eksempel disentriker og ringer (Hall, 2000).

## 2.3 Bioimpedansmonitorering i biologiske systemer/svulster.

Forandringer i vevets elektriske egenskaper bygget på organisasjon av cellestruktur, gjennomtrengelighet av cellemembran, relative forhold i intra- og ekstracellulærvæskes strømmer og ionsammensetning reflekteres i forandringer av vevets bioimpedans. I den senere tid har dette fenomenet blitt benyttet i kreftforskning. Surowiec *et al*, fant i 1988 at konduktiviteten i normalt vev var ca.  $0,1 (\Omega m)^{-1}$  i kontrast til  $0,2-0,4 (\Omega m)^{-1}$  i tumorvev i lavfrekvensområdet. Bioimpedansmålemetoden er allerede tatt i bruk for brystkreftdiagnostikken (Piperno *et al*, 1990, Webster, 1990, Scharfetter, 1999) og viser mye høyere prediksjonsevne enn mange andre metoder (palpering, mammografi, termografi osv). Bioimpedansanalyse ble brukt som prognoseindikator i utviklet bukspyttkjertel- og kolorektalkreft. (Gupta, Les *et al*, 2004, Gupta, Lammersfeld *et al*, 2004). De har påvist at en fasevinkel kan assosieres med overlevelse. Lav fasevinkel gjenspeilte høy celledød eller minsket celleintegriteten; mens høy fasevinkel var mål på mengden intakte cellemembraner. Skourou *et al*, 2004 har påvist at elektrisk impedansanalyse er en meget følsom metode og er i stand til å detektere både tumorer i størrelsesorden på mindre enn 3 mm i diameter og forandringer assosiert med tumorer (vevsseparasjon, inflammatoriske prosesser og ødem). Glickman *et al*, 2003 og Åberg *et al*, 2003 har studert med EIS morfologiske forandringer relaterte til skinn kreft. Osterman *et al*, 2004 har brukt denne metoden for å måle atrofi og utvikling av fibrose etter bestråling med 26 og 52 Gy og bekreftet at non-invasiv bioimpedansmålemetode kan utvikles til en monitoreringsmetode for responsen på stråleterapi. Gersing *et al* undersøker i 2003 med bioimpedansanalyse responsen på fotodynamisk- og hypertermiskterapi. Han fant ut at impedansmålingene i løpet av fotodynamiskterapi påviser effekten av forskjellige fotosensibilisatorer. R.Lee *et al* bruker i 1999 bioimpedansen til å skille mellom normalt prostatavev og prostatakreft

## 2.4 Elektriske egenskaper til biologiske vev.

Biologisk vev har både elektrolyttiske og dielektriske egenskaper med dominerende karakteristika som elektrolyttisk leder. Intracellulære- og ekstracellulærvæsker inneholder frie ioner som er ladningsbærere i elektrolytter. Vev klassifiseres som et dielektrikum dersom det har evnen til kapasitivt lagring av energi.

## 2.4.1 Elektrolytter.

Kroppen består av et stort antall celler som hver for seg er en liten porsjon vann og oppløste stoffer omgitt av en cellemembran, som ikke er vannløselig. Væsken i kroppen, både i og utenfor cellene, er kompliserte løsninger av et stort antall ulike stoffer. En ioneløsning eller elektrolytt består av ioneforbindelser (NaCl) løst i vann og leder elektrisk strøm som bæres av negative og positive ioner. Hastigheten til ionevandring er 10 mm/s (Grimnes og Martinsen, 2000). Vann, elektrolytter, næringsstoffer og cellenes organeller danner sammen cytoplasma, en intracellulærvæske.

Cellene er omgitt av den ekstracellulærevæsken, som også er en løsning av næringsstoffer og elektrolytter i vann. Ekstracellulær væske er en isoton løsning der cellenes volum holdes konstant. Fysiologisk saltvann av 9g NaCl per liter er en isoton løsning (Bjålie *et al*, 2004). Kationer (her  $\text{Na}^+$ ) vandrer i elektrisk felt retning, anioner ( $\text{Cl}^-$ ) i motsatt retning. Det oppstår ingen forandring verken i konsentrasjon eller i elektrolyttsammensetning. I Tabell 2.1 er det gitt noen verdier for elektrolyttkonsentrasjoner i kroppens væsker. Ionekonsentrasjon i cytoplasma er annerledes enn konsentrasjonen i ytre omgivelser og i blodplasma og det gjelder bare for levende celler. Hvis cellene dør vil ioneforskjellene forsvinne etter en viss tid.

Ioner	Intracellulær konsentrasjon	Extracellulær konsentrasjon
<b>Kationer</b>		
$\text{Na}^+$	10	142
$\text{K}^+$	140	4
$\text{Mg}^{2+}$	30	2
$\text{Ca}^{2+}$	$10^{-4}$	5
$\text{H}^+$ (pH 7.4)	$4 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-5}$
<b>Anioner</b>		
$\text{Cl}^-$	4	103
$\text{HCO}_3^-$	10	24
Protein <sup>-</sup>	36	16
$\text{HPO}_4^{2-} + \text{SO}_4^{2-} +$ organiske syrer	130	10

Tabell 2.1: Intracellulær og ekstracellulær elektrolyttkonsentrasjon i meq per liter (Grimnes og Martinsen, 2000).

Alle atomer vekselvirker med hverandre med hjelp av 4 forskjellige typer bindinger: ione-, kovalent-, metall- og Van der Waals binding. I biologisk vev inngår karbon i enkle og dobbelte kovalentbindinger som karakteriserer rotasjonsmulighetene; dette påvirker de elektriske egenskapene, som for eksempel polarisasjons tid. Det er flere andre faktorer som påvirker den elektriske ledningsevnen: konsentrasjon av ioner er viktig for bevegeligheten, temperaturavhengighet for de fleste ioner i vannløsninger er ca.  $2 \% / ^\circ C$  (Grimnes og Martinsen, 2000).

## 2.4.2 Makromolekyler: proteiner, karbohydrater og lipider.

Kapittel 2.1.2 er basert på (Grimnes og Martinsen, 2000) og (Remizov *et al*, 2004).

Proteiner, lipider og polysakkarider er makromolekylene i kroppen vår. Proteiner er satt sammen av opptil 20 aminosyrer bundet sammen med peptidbindinger. Rekkefølgen bestemmes av DNA-sekvensen til genet som koder for vedkommende protein. Aminosyrer er organiske forbindelser, hvor molekylene i ionisert form under pH=7 inneholder aminogruppe med ett ekstra proton -  $NH_3^+$ , karboksylgruppe som har mistet ett proton-  $COO^-$ , sentral karbon atom og R- sidekjede. Ladningene er separert og presenterer en dipol. Når pH=7 er alle aminosyrer polare. Proteiner kan være både løselige og uløselige i vann.

Karbohydrater består av karbon, hydrogen og oksygen og kan formere viktige elementer av ekstracellulære strukturer. Polysakkarider kan ha negativ ladning med pH under 7, men meste parten av karbohydratene har ikke så stor ladning.

Lipidene danner ikke lange kjeder og består av fettstoffer, som er lite løselige i vann. Lipider inneholder karbon- og hydrogenatomer og har få polare bindinger.

## 2.4.3 Cellemembranens oppbygning og transport.

Cellemembranen befinner seg mellom ekstracellulærevæsken og cellenes cytoplasma og består av lipider (fettstoffer) og proteiner. Fosfolipider danner et dobbelt molekylag, med de polare hodene vendt mot vannløsningene på hver side av membranen. De hydrofobe halene er vendt mot midten av membranen og danner en barriere for de hydrofile stoffene som er løst i vannet. Membrangjennomtrenging for forskjellige stoffer er avhengig av overflateladning (Bjålie *et al*, 2003). Plasmamembranen utfører cellens kontakt med det ytre miljø, med alle stoffer og stimulatorer som påvirker cellen og danner en

halvgjennomtrengelig barriere, hvorav forskjellige molekyler passerer membranen med forskjellig hastighet.

Membranpassasjen kan være passiv eller aktiv. Passiv transport er betinget av to prosesser, som er diffusjon av molekyler og ioner i retning med liten konsentrasjon, og forflytting av ioner i retning av det elektriske feltet. De krever ikke bruk av kjemisk energi og skjer via diffusjon gjennom lipidlaget, vannfylte proteinkanaler og ved binding til transportproteiner. Aktiv transport oppbevarer forskjellen mellom intracellulært og ekstracellulært miljø. Prosessen går i retning fra lav til høy konsentrasjon av ioner og skjer med hjelp av transportproteiner (pumper). ATP kan være energikilden for aktiv transport.

En plasmamembran begrenser fri strøm av lav- og høymolekylære forbindelser og fri diffundering av stoffer i begge veier gjennom membranen. Lipidmembraner er maksimalt permeable for vann, gasser og små upolære molekyler. Membranen er en effektiv osmotisk barriere for ioner, og det er forholdsvis få ionekanaler i membranen. En cellemembran er normalt mest permeabel for  $K^+$ , mens permeabiliteten for  $Na^+$  og  $Ca^{2+}$  er svært liten. Permeabiliteten for ioner er ikke så stor, og hastigheten varierer for forskjellige ioner. Kationer  $K^+$  og  $Na^+$  har høyere hastighet enn anioner  $Cl^-$ . Plasmamembraner er følsomme for temperatur, trykk, kjemisk sammensetning og forandringer i det elektriske feltet. Konsentrasjon av ioner i cytoplasma påvirkes av temperaturen. Det skjer en del faseforandringer i membrantilstanden som fører til endringer i ionepassasjen gjennom membranen. Avkjøling av celler fører til utjevning av  $K^+$  og  $Na^+$  konsentrasjoner. Under oppvarming forsvinner forskjellen pga aktiv transport (Antonov V, 2003).

Transport av ioner karakteriseres av to faktorer: konsentrasjonsgradient og påvirkning av elektrisk felt. Det kan beskrives med Nernst-Planck ligning (Remizov *et al*, 2004):

$$J = -D \left( \frac{dc}{dx} + \frac{ZFc}{RT} \frac{d\varphi}{dx} \right) \quad (2.4)$$

Hvor  $J$  er diffusjonsstrømtetthet,  $D$  diffusjons koeffisient,  $\frac{dc}{dx}$  - molar konsentrasjons gradient,  $\frac{d\varphi}{dx}$  - potensialgradient,  $Ze$  - ioneladning,  $ZeN_A = ZF$ ,  $F$  - Faraday konstant,  $R$  - universal gas konstant og  $T$  - termodynamisk temperatur. Membranpotensial er en elektrisk spenningsforskjell mellom intracellulær- og ekstracellulær væske. Vanligvis er innsiden negativ i forhold til utsiden og membranpotensialet er da definert som negativt. Størrelsen

varierer mellom forskjellige typer av celler, men membranpotensial kan godt beskrives ved hjelp av Nernst formel (Antonov V, 2003):

$$\varphi_M = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[c_2]}{[c_1]} \quad (2.5)$$

hvor  $c_1$  og  $c_2$  er molare ionekonsentrasjoner på begge sider av membranen.

#### 2.4.4 Dielektrikums.

Biologisk vev har også dielektriske egenskaper. Enkelte typer vev har dielektriske karakteristika mer uttrykket enn andre typer vev (for eksempel hud), (Grimnes og Martinsen, 2000). Dielektrikum beskrives med permittivitet og kapasitans. Permittiviteten for et dielektrikum er:

$$\varepsilon = \varepsilon_r \varepsilon_0 \quad (2.6)$$

hvor  $\varepsilon_r$  - relativ permittivitet (avhengig av materialtype) som i vakuum er  $\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} F/m$ . Kapasitansen måles i Farad og er:

$$C = Q/U \quad (2.7)$$

hvor er  $Q$ -elektrisk ladning (Coulomb, C),  $U$  – spenning (volt, V).

#### 2.4.5 Elektrisk impedans.

For likestrøm uten elektromotorisk spenning i et element som kan lede strøm kan resistans defineres etter Ohms lov som er:

$$R = U/I \quad (2.8)$$

hvor  $R$  – er resistans (måles i ohm,  $\Omega$ ),  $U$  – spenning (volt, V) og  $I$  – er elektrisk strøm (amper, A). Resistans avhenger av mengden ladningsbærere, temperaturen som påvirker mobiliteten til ladningsbærere og parametere til en leder (Grimnes og Martinsen, 2000). For

et homogent segment med resistivitet  $\rho$  ( $\Omega$  m), lengde  $L$  (m) og tversnitt  $A$  ( $m^2$ ) er resistansen:

$$R = \rho L / A \quad (2.9)$$

Vekselstrøm spenning  $U = \hat{U} \cos \omega t$  og elektrisk strøm  $I = \hat{I} \cos(\omega t - \varphi)$  forandres ikke i den samme fasen. Impedans for et element i vekselstrømkrets kan framstilles i komplekse tall (de inneholder informasjon om modul og fase) som forhold mellom potensialdifferens og strøm:

$$Z = |Z| e^{j\varphi} = R + jX \quad (2.10)$$

hvor  $|Z|$  - er impedansmodul,  $R$  - vekselstrømsresistans,  $X$  - reaktans og  $\varphi$  - faseforskjell (rad). Impedansmodul (eller impedans når vi ikke bruker kompleksframstilling) er

$$|Z| = \sqrt{R^2 + X^2} \quad (2.11)$$

Resistansen fører til varmeutvikling i samsvar med Joule-Lence lov og er  $Z = \text{Re}\{Z\} = R$ . Reaktans er den imaginær delen av impedansen  $Z = \text{Im}\{Z\}$  og består av  $X_L = \omega L$  - induktiv reaktans;  $X_C = -1/(\omega C)$  -kapasitiv reaktans;  $L$ - er selvinduktans,  $C$ - kapasitans. For en vekselstrømkrets hvor induktiv og kapasitiv reaktans er i serie har vi modulimpedans

$$|Z| = \sqrt{R^2 + [L\omega - 1/(C\omega)]^2} = \sqrt{R^2 + (X_L - X_C)^2} \quad (2.12)$$

og faseforskjell uttrykkes ut i fra

$$\text{tg} \varphi = \frac{X_L - X_C}{R} \quad (2.13)$$

I tilfelle med biologisk vev har vi  $L\omega < 1/(C\omega)$ ,

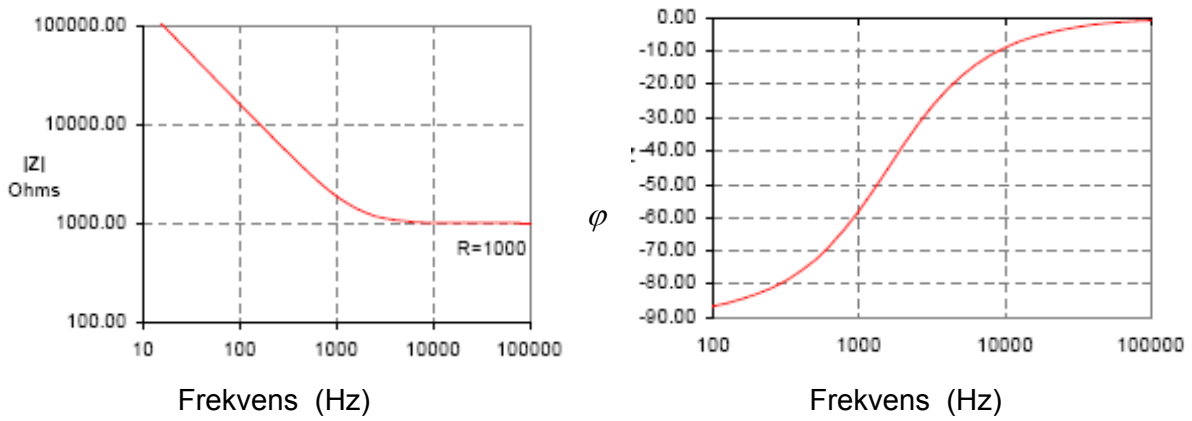
$$|Z| = \sqrt{R^2 + X_C^2} = \sqrt{R^2 + \frac{1}{(C\omega)^2}} \quad (2.14)$$

$\text{tg} \varphi = -X_C/R < 0$ ,  $\varphi < 0$ , hvor elektrisk strøm overgår anvendt spenning i fase; kapasitiv reaktans er høyere enn induktiv (Remizov *et al*, 2004).



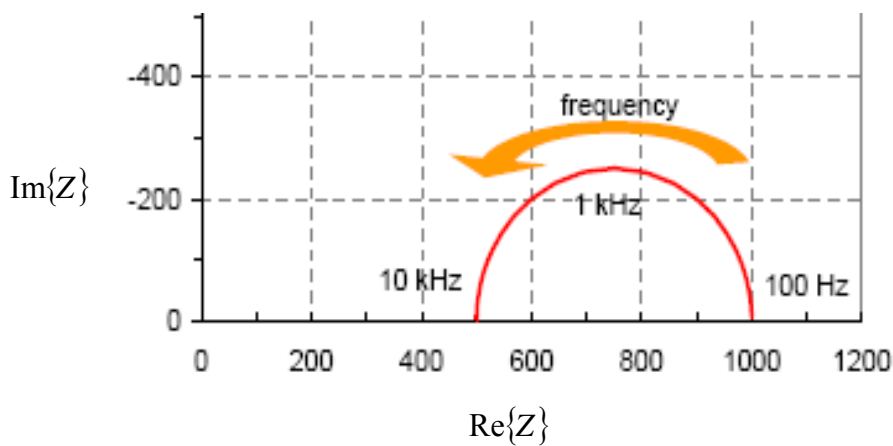
### 2.4.6 Wessel diagram og Bode plott.

Impedans som funksjon av frekvens kan bli presentert i form av Bode plott. På Figuren 2.5 (venstre) kan vi se at en modul av impedans  $|Z|$  er framstilt avhengig av frekvensen ( $\omega = 2\pi f$ ). Begge aksene, horisontale og vertikale, uttrykkes i logaritmisk skala. På Figuren 2.5 (høyre) kan vi se faseverdi  $\varphi$  for hver frekvens. I dette tilfelle er det bare frekvens som framstilles i logaritmisk form (Ivorra, 2002).



Figur 2.5: Bode plott av impedans

Det samme informasjonen kan legges fram i en annen form: Wessel diagram (også kalt Cole diagram eller Nyquist plott). Der er den imaginær delen av impedansen  $Z = \text{Im}\{Z\}$  plottet versus real delen av impedans  $Z = \text{Re}\{Z\}$  for hver frekvens  $\omega$ :



Figur 2.6: Wessel diagram (Ivorra, 2002)

### 2.4.7 Polarisasjon.

I dielektrisk teori for biomaterialer betraktes biomolekyler enten som polare materialer eller som inhomogene materialer med grenseflatepolarisasjons bidrag. Polarisasjon er en anskaffelse av dipolmoment hos ett dielektrikum. Hvis det elektriske feltet (styrken eller retningen) varierer harmonisk vil ladningene i materiale flytte på seg, og denne endringen som kalles polarisasjon forandres harmonisk også. Elektrisk polarisasjon ( $C/m^2$ ) er:

$$P = D - \varepsilon_0 E = (\varepsilon_r - 1) \cdot \varepsilon_0 E \quad (2.15)$$

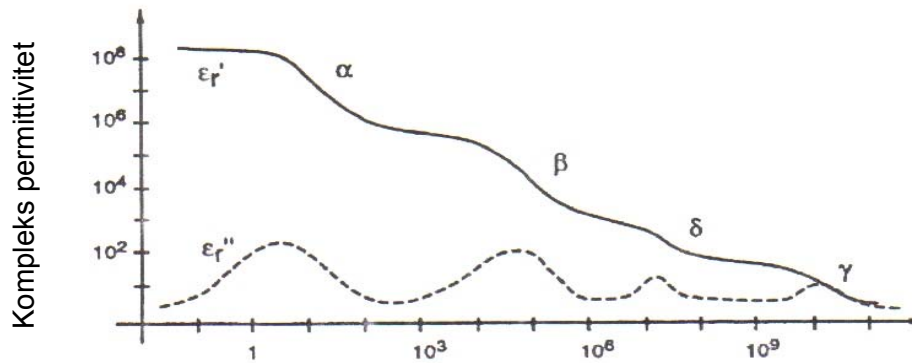
hvor  $D = \varepsilon E = \varepsilon_0 E + P$  - er elektrisk flukstetthet og  $E$  - er elektrisk feltstyrke.

Polarisasjon inndeles i tre komponenter som til sammen danner total polarisasjon: elektronisk polarisasjon (rask (ps) forskyvning av elektroner i forhold til kjernen i et atom eller molekyl); orienteringspolarisasjon (rotasjonsbevegelser til dipoler i en elektrisk felt i polare materialer) og ionisk polarisasjon (forskyvning av positive ioner i forhold til negative ioner). Endring av ladningenes posisjon skjer ikke momentant. Relaksasjon karakteriserer tidsavhengighet. Etter at systemet er eksitert trenger det en viss relaksasjonstid for tilbakevending til likevektstilstand. Relaksasjonstid er avhengig av polarisasjonsmekanismen. Organiske molekyler som for eksempel proteiner er så store at rotasjon kan gå veldig sakte. Dispersjon binder relaksasjon med frekvensområder: permittivitet som funksjon av frekvens (Grimnes og Martinsen, 2000, Martinsen *et al*, 2002).

### 2.4.8 Impedansdispersjon.

Figur 2.7 viser impedansen til biologisk materiale som funksjon av frekvens. Vi kan se særegenheter i denne avhengigheten. Den første er jevn minskning av impedans med frekvensøkning. Og den andre er eksistens av tre frekvensområder (ifølge Schawn, 1957). I disse dispersjonsområder finnes impedansutslag fra frekvens:  $Z$  forandres lite. De var navngitt  $\alpha, \beta, \gamma$ - impedansdispersjoner. (Martinsen *et al*, 2002, Remizov *et al*, 2004, Ivorra, 2002 og Pethig, 1984) som refererer til fjerde  $\delta$  område som ligger mellom  $\beta$  og  $\gamma$  dispersjon rundt 100 MHz, forårsaket av dipolære momenter til store molekyler, for eksempel proteiner. Områder med  $\alpha, \beta, \gamma$ - impedansdispersjoner forklares slik at i

polarisasjonsfenomenet deltar forskjellige strukturer av biologisk vev under frekvensøkning av vekslende elektriske felt.



Figur 2.7: De ulike dispersjonsområdene (Grimnes og Martinsen, 2000).

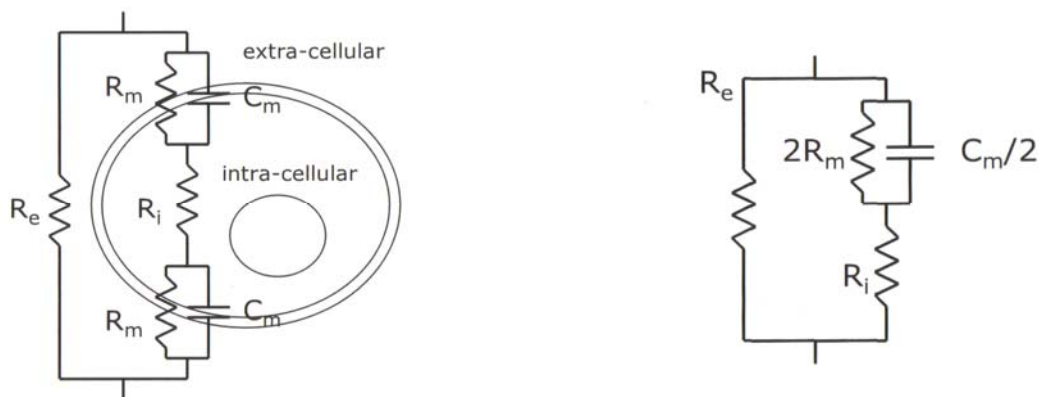
I lavfrekvensområder reagerer alle strukturer på feltforandringer. Under  $\alpha$ -dispersjon skjer polarisasjon av hele celler som resultat av ionisk diffusjonsprosesser. Det tar lang tid og lavfrekvensområdet (0,1-10 kHz) tilsvarer til  $\alpha$ -dispersjon. I dette frekvensområde er kapazitiv reaktans til membranen veldig høy. I  $\alpha$ -dispersjon dominerer strømmer som går utenom celler tangentielt til cellemembranen og strømmer gjennom omliggende ekstracellulær elektrolytter. Denne bevegelsen omgjør cellen til en stor dipol med lang relaksasjons tid (Remizov *et al*, 2004). Til  $\alpha$ -dispersjon bidrar følgende mekanismer som for eksempel mot-ion mekanismer ved siden av membranoverflate, aktive cellemembraneffekter og porer, ionisk diffusjon, intracellulære strukturer og dielektrisk tap (lav frekvens resulterer i lav konduktivitet), (Grimnes og Martinsen, 2000).

Cellemembranen har et dobbelt lag av fosfolipider som atskiller intracellulær medium fra ekstracellulær definert som elektrolytt (ionisk løsning). Bioimpedansen til intracellulær medium er en blanding av ledende og kapasitive egenskaper; dobbelt lipid membran er dielektrisk. Hele strukturen kan se ut som leder-dielektrikum-leder (Ivorra, 2002).  $\beta$ -dispersjon er en følge av kapazitiv oppladning av den ytre cellemembranen (Maxwell-Wagner relaksasjon). Store polare organiske molekyler har betydelig masse og rekker å reagere på vekslende elektriske felt i frekvensområdet 0,1-100 MHz (radiofrekvent dispersjon), (Remizov *et al*, 2004, Martinsen *et al*, 2002 og Grimnes og Martinsen, 2000). Det ligger flere mekanismer bak  $\beta$ -dispersjon som for eksempel effekten i grenseovergangen mellom ulike dielektrika, passive cellemembrankapasitanser, intracellulære organellemembraner og responsen til proteinmolekyler (Grimnes og Martinsen, 2000).

Dipolare mekanismer i polare medier (vann, salter og proteiner) er kilder til  $\gamma$ -dispersjon. Noen substanser er fullt ionisert i vann (sterke oksider), andre bare delvis (svake oksider). Vann er nødvendig for ionisering eller splitting av molekyler. Noen molekyler for ekte ikke-elektrolytter er ikke ionisert eller løst opp av vann. Polare medier består av molekyler som har ikke symmetrisk fordeling av ladning, hvor sentrene for den negative og den positive ladninger faller ikke sammen, og formerer permanente dipoler med total ladning lik null. Disse dipolene vil orientere seg etter eksternt elektrisk felts retning (Remizov *et al*, 2004). Molekyler til vann har veldig liten masse. Orienterings polarisasjon av vann presenterer  $\gamma$ -dispersjon og ligger i frekvensområde fra 0,1 til 100 GHz (mikrobølgefrekvens dispersjon) (Martinsen *et al*, 2002, Grimnes og Martinsen, 2000).

## 2.4.9 Ekvivalentkrets for biologisk materiale.

For å beskrive vevsbioimpedans benyttes ekvivalentkrets modeller. Elektrisk strøm injisert i ekstracellulær medium strømmer gjennom cellenes lipidmembran ( $C_m$ ) eller ionekanaler ( $R_m$ ) eller kan sirkulere rundt cellen ( $R_e$ ). Figur 2.8 viser en slik modell.



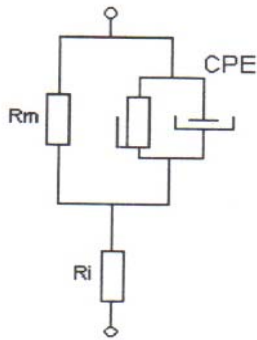
Figur 2.8: Elektrisk modell for biologisk materiale (Ivorra, 2002).

Strøm inni cellen traverserer intracellulært medium ( $R_i$ ) og forlater cellen gjennom membranen ( $R_m || C_m$ ). Kretsen er ekvivalent til modellen etter innføring for enkelthetsskyld regelen at resistanser er i serier og kapasitanser er parallelle. For at modellen skal bli bedre tilpasset aktuelle bioimpedansmålinger må vi innføre et nytt begrep: CPE – konstant fase element. CPE beskrives ofte som frekvensuavhengig kapasitans. CPE impedans er gitt ved likningen:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j \cdot \omega \cdot C)^\alpha}$$

(2.16)

hvor  $\alpha$  - CPE parameter kan variere mellom 0,5 og 1 (Ivorra, 2002). Modellen på Figur 2.9 som kalles en Cole ekvivalentkrets inneholder konstant fase element som ikke er fysisk realiserbar med elektriske komponenter (Grimnes og Martinsen, 2000).

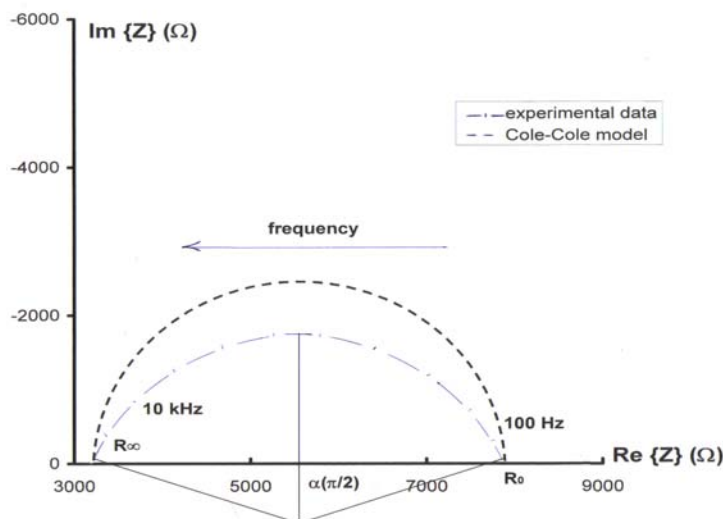


For ekvivalentkrets som inneholder CPE kan bioimpedansen beskrives med Cole-Cole formel:

$$Z = R_{\infty} + \frac{R_0 - R_{\infty}}{1 + (j \cdot \omega \cdot \tau)^{\alpha}} \quad (2.17)$$

Her er  $R_i = R_{\infty}$  resistansen i intracellulærvæske (impedans ved uendelig frekvens),  $R_0 = R_m + R_i$  - er resistans ved 0 Hz frekvens,  $R_m$  og  $C_m$  - resistansen og kapasitansen til celledmembranen og  $\tau = R_m \cdot C_m$  -

tidskonstant. Ligningen (2.17) beskriver impedansen i vevet i form av impedans med frekvensuavhengige parametere,  $(R_{\infty}, R_0, \tau, \alpha)$ . Wessel plott av denne funksjonen ser slik ut:



Figur 2.10: Colefunksjonens kurve over impedansen i det komplekse plan (Ivorra, 2002).

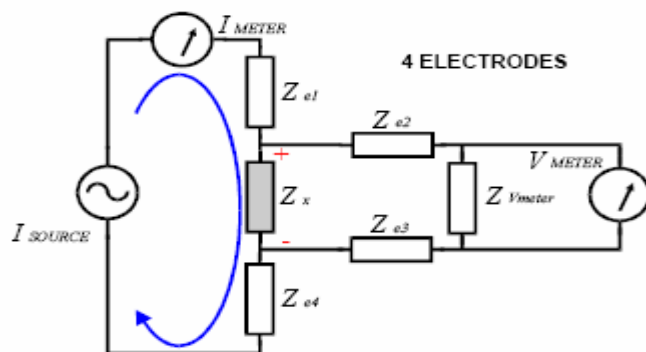
I biologisk materiale ved forskjellige frekvenser oppstår flere dispersjoner og ligningen (2.17) ser ut slik:

$$Z = R_{\infty} + \frac{(R_0 - R_{\infty})_1}{1 + (j \cdot \omega \cdot \tau_1)^{\alpha_1}} + \frac{(R_0 - R_{\infty})_2}{1 + (j \cdot \omega \cdot \tau_2)^{\alpha_2}} + \dots \quad (2.18)$$

## 2.5 Sensorer

I medisinsk teknikk brukes vanligvis elektroder som sensorer: de omdanner medisinsk - biologisk og fysiologisk informasjon til elektriske signal. Elektroder både registrerer elektrisk signal og tilfører elektromagnetisk påvirkning. Elektroder brukt i diagnostikk kan lett fikseres og tas av, har høy stabilitet av de elektriske parameterne, er belastbare, de lager ikke støy, har minimalt tap av brukbar informasjon, særlig i elektrode-hud overgangen og irriterer ikke det biologiske vevet (Remizov *et al*, 2004). Type og konfigurasjon til elektroder er variert: non-invasive- (Skourou *et al*, 2004, Osterman *et al*, 2004, Gupta *et al*, 2004, Martinsen *et al*, 2000 og Grimnes, 1983), mikroinvasive- (Åberg *et al*, 2003, Glickman *et al*, 2003 og R.Lee *et al*, 1999), invasive (Gersing *et al*, 2003), to-, tre-, fireelektrodersystemer (Grimnes og Martinsen, 2000, Skourou *et al*, 2004, Osterman *et al*, 2004, Martinsen *et al*, 2000, Schwan og Ferris, 1968 og Schwan, 1963). Elektrodekonfigurasjon bestemmer kvaliteten til måleresultatene.

Fireelektrodesystem er ofte benyttet for *in vivo* målingene. Eksitasjonssignal tilføres med det ene kilde elektrodepar, som eksiterer vevet, og spenningsfall registreres med det andre passive sensor elektrodepar. I neste kapittel på Figur 3.3.b) kan man se oppsett av et slikt system og Figur 2.11 viser fireelektrodeskrets. Den totalt målte bioimpedansen kan inneholde parasittisk del fra polarisasjons- og hudimpedansen. Polarisasjonsimpedans skyldes elektrokjemiske prosesser i overgangen metall/elektrolytt (Grimnes og Martinsen, 2000). Denne impedansen som sjelden er høy nok til at den bidrar særlig til strømbegrensning, kan forstyrre målinger i lave frekvenser som er dominante i fysiologiske undersøkelser. Det eksisterer mange forskjellige teknikker for å overvinne problemer og valg av tetrapolær konfigurasjon som nesten eliminerer elektrodepolarisasjon (Schwan, 1963).



Figur 2.11: Skjematisk visualisering for fireelektrodeskrets (Ivorra, 2002 ).

Elektrisk ledeevne for noen deler av organismen som befinner seg mellom elektroder er avhengig av motstanden til hudens og underhudens lag. Motstanden kan variere med hudens tykkelse, alder, fuktighet og andre parametere (Osterman *et al*, 2004, Martinsen *et al*, 1997 og Grimnes, 1983). Hudimpedansen viser ofte variasjon i en uforutsigbar vei som funksjon av fysiologiske forandringer hos forsøksobjektet (Grimnes, 1983). For eks. en EKG-elektrode på tørr hud kan vise en kontaktimpedans med en resistiv del på ca.100 k $\Omega$  (Jacobson, 1995). Huden er bygd opp av to lag: overhuden (epidermis) og lærhuden (dermis). Stratum corneum er et helt ytterst lag av epidermis (15 $\mu\text{m}$ ) som består av døde flate keratinceller som ikke er omgitt av vevsvæsker og som fungerer som en slags barriere, særlig for vann. I lav frekvensområde har stratum corneum stor og bred  $\alpha$ -dispersjon (Åberg *et al*, 2003). Selv om huden over tumoren er alt for tynn og strukket kan vi ikke se helt bort fra hudimpedansens rolle. For å oppnå den beste elektriske kontakten mellom elektroder og hudoverflaten har noen brukt koblings midler, som for eksempel NormGel<sup>®</sup> (Osterman *et al*, 2004), 0,9% fysiologisk saltvann (Åberg *et al*, 2003).

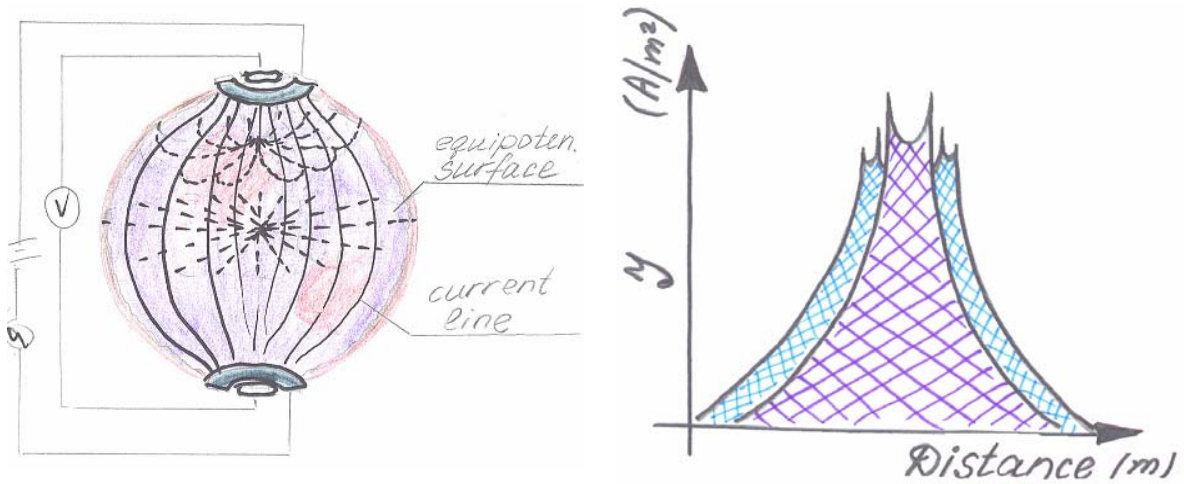
## 2.6 Sensitivitetsfordeling

Sensitivitetsfordelingen av bioimpedansmålinger kan bli framstilt ved hjelp av elektrisk felt teori. Tumor er inneholde veloksygenerte og nekrotiske områder, som vanligvis befinner seg nær sentrum av en svulst. Dette betyr at måleobjektet består av områder med forskjellig ledningsevne. Sensitivitetsfordelingen beskriver forhold mellom impedansen (og dens forandring) forårsaket av fordelingen av konduktiviteten (og forandringer i den). Fordelingen i sensitiviteten beskriver hvor effektivt hvert tumorområde bidrar til målt impedans (Kauppinen, Kjøbi *et al*, 2006; Kauppinen, Hyttinen, 2006).

Sensitivitetsfordelingen kan beskrives ved hjelp av formel 2.19, hvor  $\sigma$  er den spesifikke konduktiviteten ( $\sigma = 1/\rho$ ).

$$J(x, y, z) = \sigma(-\text{grad}V(x, y, z)), \quad (2.19)$$

Figur 2.11 a). viser strømtettheten og ekvipotensiallinjer i en uniform objekt (tumor) som ble monitorert ved hjelp av fireelektrodessystem og Figuren 2.11 b). viser sensitivitetsfordelingen for en elektrode, formet som en ring:



a). Strømtetthetsfordelingen i en uniform tumor

b) Sensitivetsfordelingen som funksjon av avstanden fra ringelektroder

### 2.12 Sensitivetsfordelingen i et måleobjekt (tumor).

Strømtettheten er høyest ved kanter av ringelektroder. Etter en grafisk analyse er det mest sannsynlig å tro at sensitiviteten er lavest i områder nær tumoroverflaten, med unntak av områder hvor elektroder har kontakt med overflaten.



## Kapittel 3 Materialer og metoder.

Teori er en god sak, men riktig eksperiment skal vare evig.

- Pjotr Leonyidovics Kapica

Det er foretatt bioimpedansmålinger av behandlede og ubehandlede tumorer fra en tumorlinje HT29, og prosedyren for forsøksmetoden, samt utstyr brukt i eksperimentet og metoder for dataanalyse, er beskrevet i det følgende kapitlet.

### 3.1 Dyr og tumormodeller.

Totalt 40 voksne hannmus av typen GBNIH ble benyttet i forsøkene. Forsøksdyrene ble avlet ved Dyreavdelingen ved Det Norske Radiumhospitalet. Alle prosedyrer og eksperimenter i dette studie hvor forsøksdyr var involvert er godkjent av utvalg for forsøksdyr og i henhold til Europakonvensjonen. Dette innebar spesifikke patogen-frie forhold, med positive lyd/støy (<55dBA)-, luftfuktighet(RH=55±5%)-, temperaturforhold (20-24°C) og nøytral trykk. Forsøksdyr var oppstallet med 12 timer lys/12 timer mørke.

I dette studiet ble det benyttet HT29 tumorcellelinje. HT29 er avledet fra human spontan kolon carcinoma (Fogn og Trempe, 1975) og har mutert p53 gen (Rodrigues *et al*, 1990). HT29 er en av de mest stråleresistente kolon tumor cellelinjene (Leith *et al*,1991, Dunne *et al*, 2003). Xenografter fra human kolorektal cellelinje ble dyrket ved passasje av tumorvev til nakenmus. Tumorvev (2×2×2 mm<sup>3</sup>) ble innpodet subkutan nederst på ryggen på hver side til forsøksdyr. Tumorstørrelse ble målt to ganger per uke ved hjelp av skyvelære. Det ble beregnet tumorens volum fra to dimensjoner (ellipsoide tumor modell) ved hjelp av formelen:

$$V = \frac{\pi}{6} a \cdot b^2 \quad (3.1)$$

hvor  $a$  er lengst- og  $b$  er kortest målt diameter.

Selve forsøket startet når korteste tumordiameter var 10 mm på hver akse. Størrelsen på tumorene ble også estimert på bakgrunn av avstand mellom elektrodene ved hjelp av en skyvelære vår elektrodene var montert på.

## 3.2 Anestesi og forberedelser.

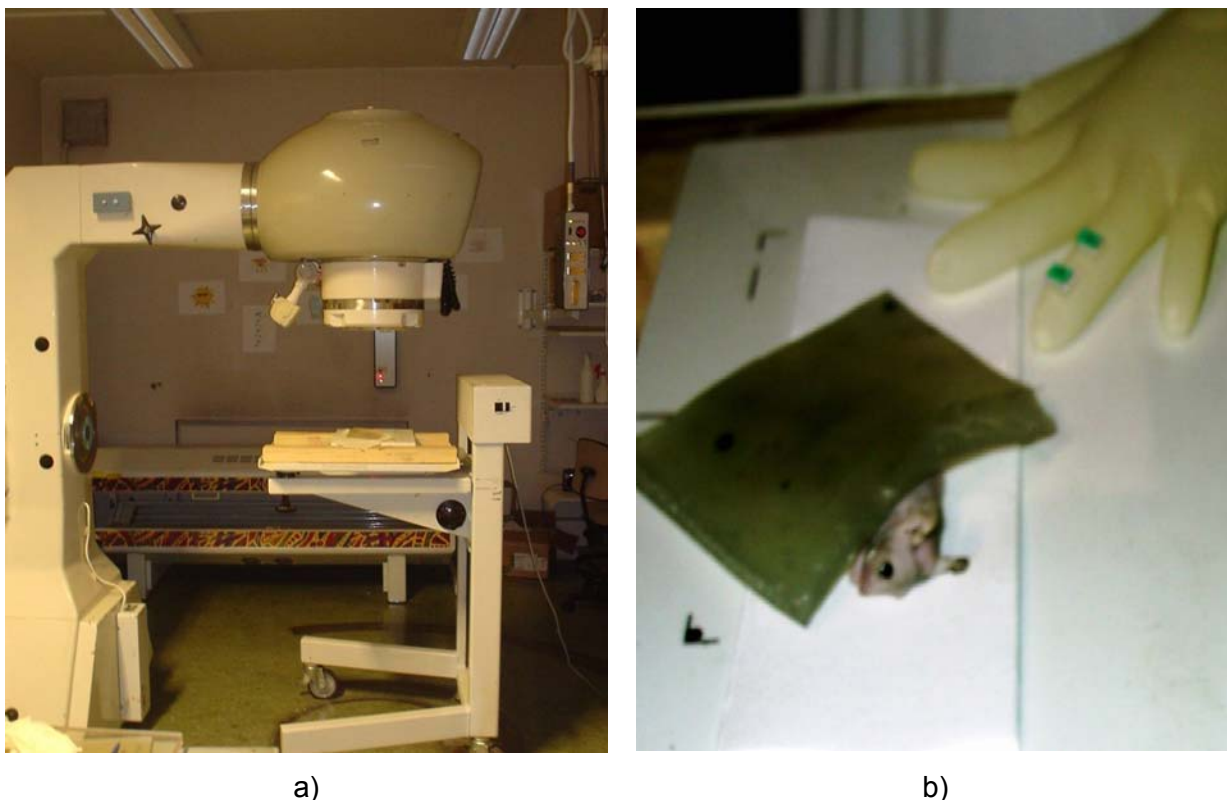
Hele prosessen ble utført på sederte mus for å unngå bevegelsesartefakter. Som anestesimiddel brukte vi "zoletil- mix". Stamsløsningen bestod av 10 ml Narcoxyl eller Rompun® (aktiv komponent er xylasin 20 mg/ml) og 0,5 ml Torbugesic® (aktiv komponent er butorphanol 10 mg/ml) løst i Zoletil® tørrstoff, 1 hetteglass (aktive komponenter zolazepam 125 mg og tiletamin 125 mg). Bruksløsningen ble fortynnet i forhold 1:5 med sterilt vann. Dose av anestesimiddel ble gitt til mus på ca.20 gr, dvs. voksne mus, ca. 0,10 ml under bioimpedansmålingene og ca. 0,15 ml under bestråling. Anestesi ble gitt ved subcutan injeksjon på ryggen og øynene ble smurt med Simplex øyesalve for å unngå uttørking.

Elektrodeimpedansen varierer avhengig av hudens tilstand og fuktighet (Jacobson, 1995). For å minske bidrag fra hornhuden ble alle tumorene fuktet med 0,9 % fysiologisk saltvannsløsning og det ble fjernet hår fra noen av tumorene der det trenges før bioimpedansmålingene ble utført.

## 3.3 Bestråling og dosimetri.

Bestrålingen ble utført ved Det Norske Radiumhospitalet med en Co-60 kilde (Mobaltron 80; TEM Instruments Ltd., Crawley, UK), som var installert der i 1996. Halveringstid for Co-60 er 1925,1 dager. 15.september 1996 i 0,5 cm dybde ble det målt invers dose-rate på nivå 31,350 s/Gy (SSD = 80 cm, felt =10 cm×10 cm). Bestrålingstid for hver individuell dose var beregnet ut fra invers dose-rate , korrigert for reduksjon i aktivitet.

Selve protokollen for bestråling av mus, samt eksempel på beregningen av bestrålingstid finnes på side 84 i Vedlegg B. Figur 3.1 viser bestrålingsoppsett og posisjonering av dyr under forsøket. Bestråling ble utført ovenfra (gantry er 0°), SSD= 80 cm, felt= 10cm×10cm. Mus ble plassert på en 2 cm tykk plate av Perspex materiale og dekket av bolus. For å finne ut hvordan dosen fordeles i strålefeltet det ble benyttet et fantom (målingene ble tatt 27/1), bestående av en gummihandske fylt med vann. I avstanden 1,5 cm fra hjørnet inn mot sentrum av feltet ble 87,3 % av måldose oppnådd (13,09 Gy) For å oppnå 15 Gy i dette punktet må en bestråle med 17,18 Gy.



Figur 3.1: Bestrålingsoppsett: a) Bestrålingsoppsett. b) Posisjonering av forsøksdyr og fantom under bestråling

Dose-rate for cobalt kilden ble målt av Christoffer Lervåg ved hjelp av termoluminescens dosimetri (TLD). Brikkene ( $3,2 \times 3,2 \times 0,9 \text{ mm}^3$ ) laget av LiF: Mg,Ti materiale (TLD-100; Harshaw TLD Bicrom, Solon, OH, USA) ble plassert over hver svulst og fiksert med teip. Avlesning av brikkene og doseberegning ble utført ved Det Norske Radiumhospital i samsvar med prosedyres standarder.

### 3.4 Forsøksprosedyren.

Da forsøksdyrets tumor hadde nådd ønsket størrelse, ble forberedelser til bioimpedansmonitorering satt i gang. Prosedyrene som ble fulgt er oppsummert skjematisk i Figur 3.4, og er beskrevet mer detaljert i det følgende kapitlet.

#### 3.4.1 Forberedelser før bioimpedansmonitorering.

De utvalgte forsøksdyret ble først anestesert, som beskrevet i kapittel 3.2, og da dyret ikke lenger var ved bevissthet ble det satt i gang hudforberedelser. Ettersom noen av dyr hadde en del hår i tumorområde, ble de fjernet ved hjelp av hårfjerningskrem "Veet" (Reckitt

Benckiser, Dansom Lane Hull, HU8 /DS, UK ). Etterpå ble huden til forsøksdyret enten bearbeidet med ett av de stoffene (fysiologisk saltvann, springvann) eller huden ble bare tørr.

Forsøksdyret ble plassert med tumoren vendt opp på ett stativ dekket av myk stoff, dette for å minke dyrets varmetap under bioimpedansmonitoreringen. Tumoren ble plassert slik at den dekket hele elektrodeoverflater og etterpå lett sammenpresset. For å unngå kontakt mellom ytre og indre ringene, ble alt vann fra hudoverflaten fjernet.

### 3.4.2 Bioimpedansmonitorering og fireelektroderssystem.

Bioimpedansmålingene ble foretatt ved hjelp av Solartron 1260 Impedans/ forsterknings - fase analyser og Solartron 1294 Impedansimpedansgrensesnitt (firma). Impedansen ble registrert i frekvensområde mellom 1 Hz og 1 MHz og det ble påført et signal 100 mV / 500 mV. Både Solartron 1260 og Solartron 1294 har fireterminalsmålekonfigurasjon, det vil si at det er mulig å bruke fireelektroderssystem. Solartron 1294 er spesielt tilpasset for biologisk materiale hvor er svært aktuelle problemer med registrering av veldig lave strømmer, når elektrodeimpedansen er ganske høy. Figur 3.2 viser apparatur som ble brukt i dette eksperimentet.



a)

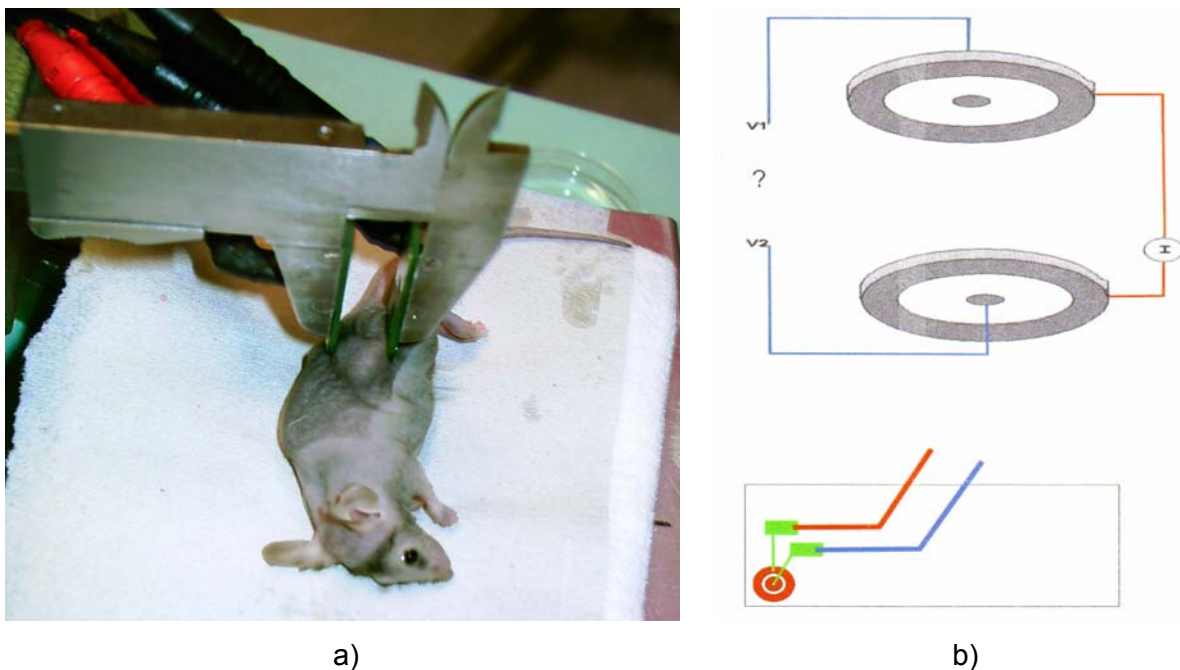


b)

Figur 3.2: Apparatur for BI-målinger: a) Solartron 1260 og b) Solartron 1294.

Elektroder var konstruert av Vidar Skulberg, avdelingsingeniør ved avdeling for Strålingsbiologi, DNR og bygget opp av Lyng Nilsen på Elektronikklaboratoriet ved det Fysiske institutt, UIO. Det ble brukt ikke-invasive overflateelektroder. Hvert elektrodepar inneholdt overflateelektroder med følgende dimensjoner:

- |                    |                  |
|--------------------|------------------|
| 3mm ytre diameter  | isolasjon 0,5 mm |
| 1mm indre diameter | isolasjon 0,3 mm |



Figur 3.3: BIS: a) Plassering av mus ved bioimpedansopptak. Dyr er posisjonert med tumor mellom elektrodene; b) Fireelektrodens parallell – plateoppsett: rød (aktiv)-strømelektrode, blå (lyttende)- spennigelektrode.

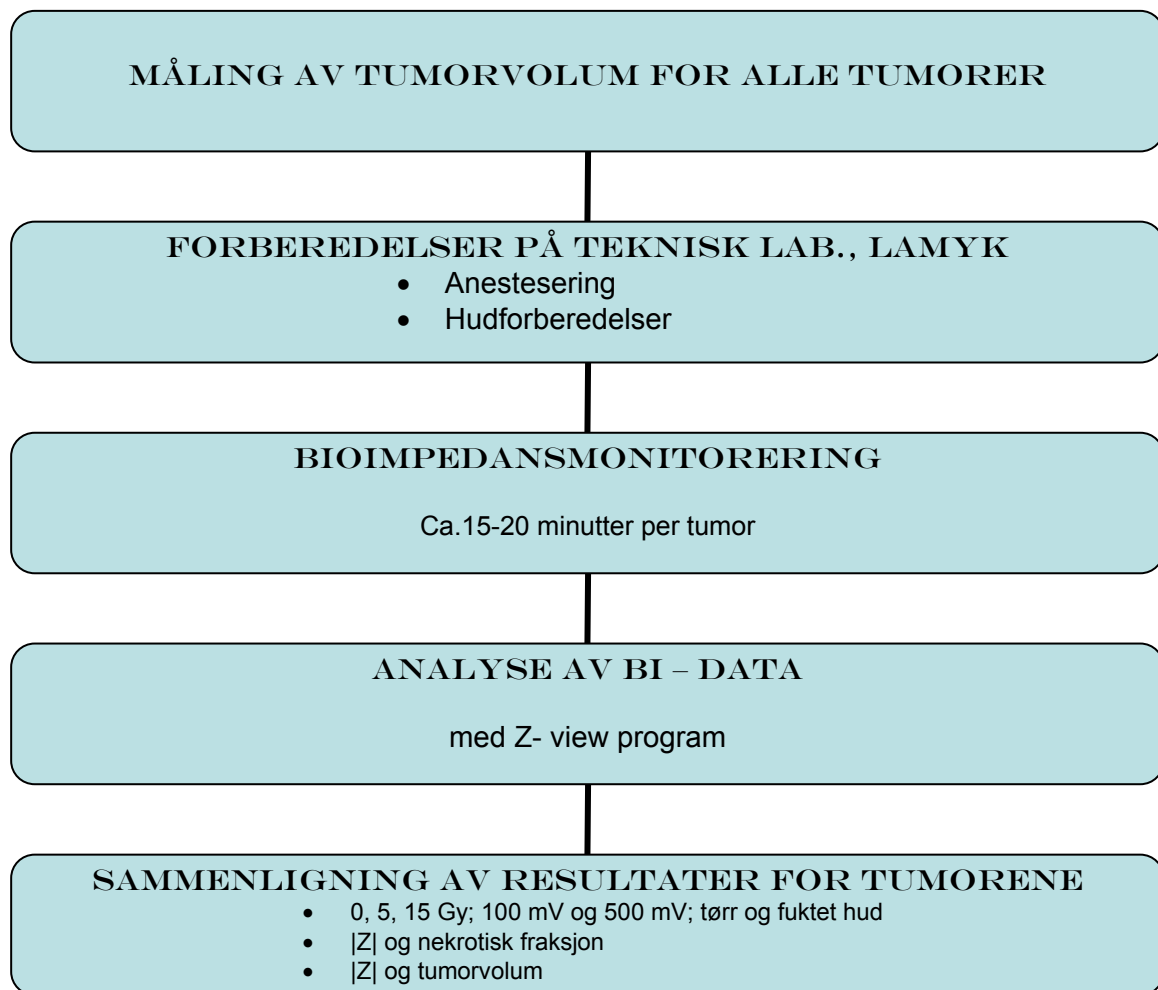
Måleelektroder besto av to sett metall-plate elektroder som var montert på et metall skyvelære. Det ble brukt to-sidig kopperprintplate med utetsede og gullbelagte ringer på den ene siden med gjennomplettering til koppersiden for tilkøpling der. Høyre og venstre elektrode-plate ble speilvendte av hverandre. Den lengste avstanden mellom eksitasjons- og deeksitasjonselektroder var på tvers av hele tumor. Systemet ble fiksert i et stativ og hadde som forutsetning at måleobjektet måtte være absolutt ubevegelig under målingene. Eksperimentoppsett og elektrodekonfigurasjon er visst på Figur 3.3.

### 3.4.3 Analyse.

Alle målingene ble utført og deretter lagret ved hjelp av programvaren Z- plott 2.6 (© 1990 - 2002 Scribner Associates, Inc.wrt. Derek Johnson) for analyse. Z-plott gir mulighet til å variere mellom påført signal styrke og grenser til frekvensområde som ligger i interesse for å utføre målinger. Ett annet program Z-view 2.6 ( ©, Scribner Associates) ble benyttet for å utføre analyser av Wessel diagram og Bode plott for å undersøke om bioimpedansmålingene var vellykket og om de var egnet for videre analyse. Programvaren gav mulighet for å se tidsutviklingen til impedansen basert på serier av mange kurver. For at en tumor skulle bli inkludert i analysen, måtte verdien av fasevinkel for den ikke overstige 100. Tumorer hvor Wessel diagram og Bode plott hadde mye støy ble ikke inkludert i analysen.

### 3.5 Histologi.

Rett etter bioimpedansmonitorering ble forsøksdyr avlivet i samsvar med planen (Eksperiment 1 – dagene 0, 3, 5, 8, 10 og 12 og Eksperiment 2 – dagene 5, 10 og 15). Tumorene ble tatt ut, merket med svart tusj for å påvise orientering og satt inn i en 7 ml beholder (QTY 700; Bibby Sterilin LTd, Stone, Staffordshire ST15, OSA, UK) fylt med 4% nøytral-buffered formaldehyd. Histologiske prøver ble forberedt ved Laboratoriet for patologi, Det Norske Radiumhospitalet. Hver tumor ble kuttet i åtte skiver på ekvivalent avstand (1,5 mm separasjon) i plan perpendikulær til elektrode – overflate kontakt; skivene ble forberedt rutinemessig, farget med hematoxylin og eosin (H&E). Ved histologisk analyse ble hver skive evaluert etter egenskaper ved bruk av lys mikroskop HM-LUX (Leitz, Wetzlar, Germany) og AquaCosmos 2.5 programvare (© 1999-2004, Hamamatsu Photonics K.K.). Etterpå ble det beregnet prosent av nekrotisk vev i forhold til tumor volumet og definert eksistens av fibrose.



Figur 3.4 Skjematisk oversikt over forsøksoppsettet.

## Kapittel 4 Resultater.

Evig vitenskapstragedie: stygge fakta ødelegger vakre teorier.

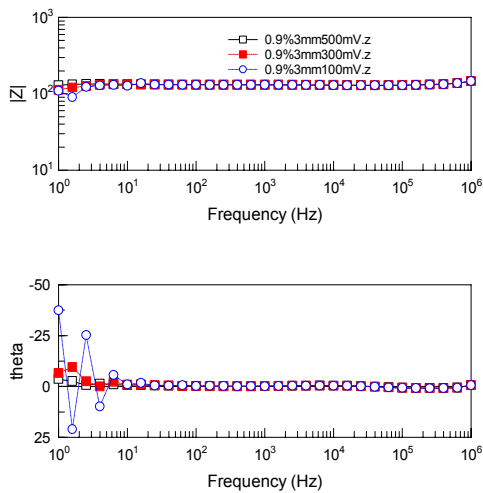
- Tomas Geksli

I dette kapitlet vil resultatene fra bioimpedansmålinger av tumorer hos mus bli presentert samt resultater fra histologisk undersøkelse. Det blir også gitt en analyse av resultater fra elektrodekalibrering, som ble utført før målingene på tumorvev startet.

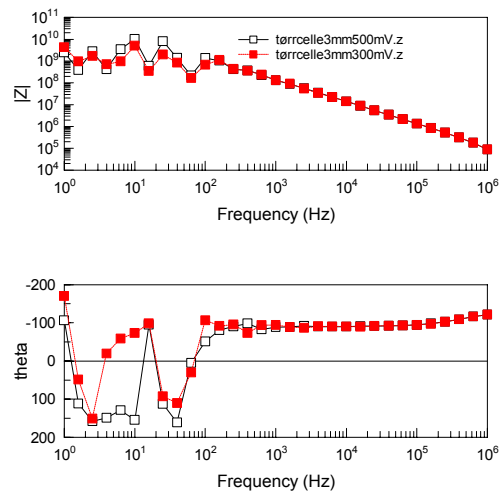
Vi hadde to komponenter i denne oppgaven: bioimpedansmålinger som ble tatt under forskjellige forhold og histologisk undersøkelse. Bioimpedansmålinger ble gruppert etter ulike dosenivå, hudens fuktighet og påført spenning; histologiske resultater – etter dosenivå og tid etter bestråling. Data fra bioimpedansmålingene ble presentert først. Impedans- og faseverdier for tumorer fra behandlede og kontroll dyr, tilsvarende lavfrekventområde ble vist i tidsprogresjon. Dette ga en oversikt over stråleinduserte forandringer i tumorvev og kunne hjelpe til å finne ut, hvilke prosesser foregår i vevet etter strålebehandling med 3 forskjellige dosenivåer (0, 5 og 15 Gy). For 2 tumorer (1 behandlet og 1 kontroll) ble resultater presentert i form av plots i kompleks plan som viser både real og imaginær komponenter av målt impedans i frekventområde fra 1 Hz til 1MHz. Deretter presenteres resultatene fra histologiske undersøkelser, som omfanget 7 tumorer fra kontroll dyr, 8 og 6 tumorer fra dyr, som fikk strålebehandling på 15 og 5 Gy henholdsvis. Presentasjon av måleresultater ble avsluttet med en analyse av sammenheng mellom impedansverdiene, nekrotisk fraksjon og tumorvolum for tumorer fra behandlede og kontroll dyr på enkelttumornivå. Resultater av sammenlikning av  $|Z|$  og volum/nekrotisk fraksjon ble presentert i ukorrigert og korrigeret i henhold til tumorstørrelse form.

### 4.1 Kalibrering av elektroder.

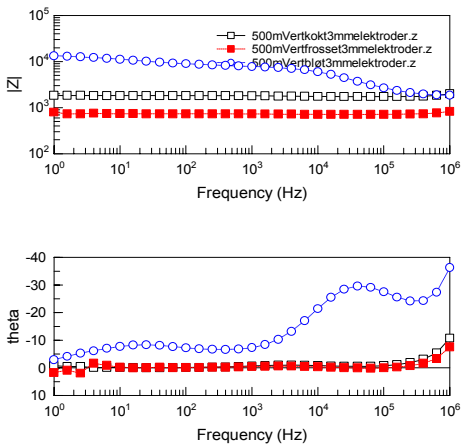
Kalibrering av vårt målesystem ble utført for å finne ut egenskaper, kvaliteten, stabiliteten, og sensorenes svakheter under forskjellige forhold. Verdier av impedansen og fase ble observert fra målinger i fysiologisk saltvann, tørr luft og i biologisk system under forskjellige forhold. Som biologisk system ble det valgt erter på grunn av sin tumorlignende geometriske form, stoffsammensetning og komponentinnhold. Resultater ble presentert i form av Bode plott.



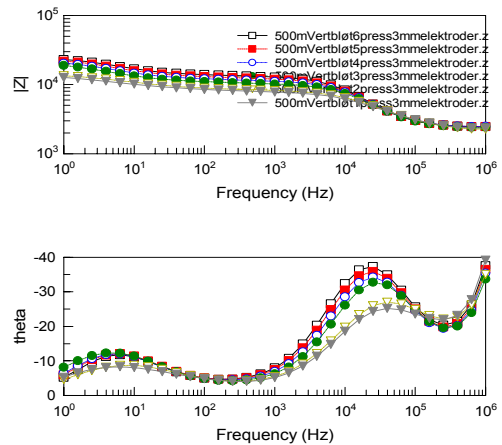
a). Bode plotts for 0,9% fysiologisk salt vann for tre forskjellige verdier til påført signal (100, 300 og 500 mV).



b). Bode plotts for 0,5mm avstand mellom elektroder i tørr luft for to forskjellige verdier til påført signal (300 og 500 mV).



c). Bode plotts for bløt, kokt og frossen ert for påført signal 500 mV.



d). Bode plotts for en bløt ert som ble sammenpresset (500 mV).

Figur 4.1 Kalibrering av vårt målesystem.

Figur. 4.1 a). viser resultater for målinger som ble utført i 0,9 % fysiologisk saltvann. Impedansverdiene for fysiologisk saltvann, målt ved hjelp av vårt 4- elektrodesystem ligger i spektret [70-120]Ohm og  $\phi \in [-37,5-25]$ rad. Det viser seg at systemet har en del støy i område fra 1 Hz til 10 Hz, men meste parten av spektret er fri fra feil. Kvaliteten for målingene var



best for 500 mV. En enda høyre økning i spenningsnivå kunne påvirke eksperimentelle resultater på grunn av varmeutveksling mellom elektroder og vevet og forandringer i celleorganisasjon.

Det ble målt betydelig høyere verdier av  $|Z|$  og  $\varphi$  i tørr luft:  $|Z|=[10^8-3 \times 10^{10}]$  og  $\varphi=[-175-175]$ rad. Målingene som ble tatt i tørr luft inneholdt betydelig mye mer støy i forhold til målingene i fysiologisk salt vann i lavfrekvent område (Fig. 4.1 b). Kalibreringstesten i fysiologisk saltvann og tørr luft ble utført både før og etter Eksperimenter med bioimpedansmonitorering i tumorvev.

Neste test gikk ut på å finne hvordan sensorer reagerer på forandringer i selve biologiske systemet (ert) (Fig. 4.1 c). Det viste seg at elektroder var ganske følsomme til ertets tilstand. Den høyeste verdien av impedansen tilsvarte normale forhold i indre miljø (bløt ert) og kritiske forandringer (kokt eller frossent ert) førte til fallet av impedansen i lavfrekvent område. Forskjellen i  $|Z|$  under varierte forhold var på størrelsesorden på ca.  $10^3$  Ohm i lavfrekventområde. Det ble også lagt merke til at frossen ert viser lavere verdier for impedansen enn kokt ert i hele frekvensspektret.

Det ble også utført en test for å se på hvordan systemet reagerte på kraften som ble brukt under fikseringen av elektroder på måleobjektet (Fig.4.1 d). Impedansverdiene økte med økende press, som er i strid med teori. Det kan tyde på at ertene kan ikke bli brukt som kalibreringssystem for vevet i et press-test fordi de ble destruert under sammenpressing av elektroder.

Resultater fra kalibreringstest og dens rolle i analyse av elektrodensystemets påvirkning på målinger i tumorvev er nærmere diskutert i kapittel 5.2.1.

## 4.2 Bioimpedansmonitorering.

Monitorering av terapieresponsen i tumorer og undersøkning av ubehandlet vev ble foretatt ved hjelp av bioimpedansmålemetode på 2 grupper nakne mus. 41 dyr totalt ble involvert i alle forsøkene. Søknad om tillatelse til å utføre forsøk med dyr ble godkjent av Forsøksdyrutvalget og er vedlagt på side 76 i Vedlegg A. Selve målingene fant sted på LAMYK (Laboratoriet ved Avdeling for miljø- og yrkesbetinget kreft), Institutt for kreftforskning, Det norske Radiumhospital. De tok ca. 15-20 minutter per dyr.

I første eksperimentet varte observasjonsperioden i 12 dager totalt. Det ble gjort en analyse av hvilke forandringer i elektriske egenskaper skjer i tumorvev etter bestråling med singel stråledose på 15 Gy i forhold til ubehandlet tumorvev. Parallelt ble det gjort en undersøkelse om det var store forskjeller i målingene som ble utført under 100 og 500 mV påført spenning. For å fukte huden og forbedre kontakten mellom vev og elektroder ble det benyttet fysiologisk saltvann. Samtidig ble den første gruppen av dyr ble brukt i et annet forsøk. Dette innebærer at disse forsøksdyr fikk anestesi to ganger i løpet av dagen. Det andre eksperimentet gikk over litt lengre periode, i 15 dager. Musene ble delt i to grupper. Den ene gruppa fikk singeldose på 15 Gy og huden under målingene ble holdt tørr, mens den andre gruppe fikk 5 Gy og huden ble fuktet med ren springvann.

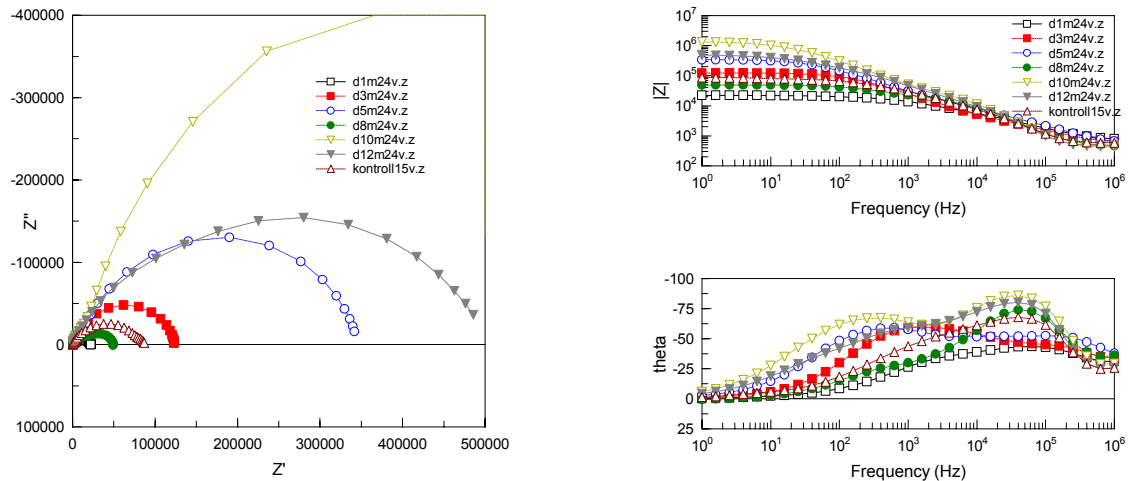
Ved ytre observasjoner av tumorene ble det funnet at meste parten av tumorene var oval- eller kuleformet i begge forsøk, men enkelte tumorer hadde formen liknende dråpe, peanøtt, noen hadde delt seg i flere biter. I begynnelsen av eksperimentet var tumorene meget solide, harde og dens størrelsen ganske liten i forhold til elektrodens ytre diameter. Det ble problematisk å dekke hele elektrodeoverflaten med tumorvev og å oppnå en god kontakt mellom tumor og elektrodepar. 3-5 dager etter bestråling ble tumorvev mye mykere og huden til forsøksdyr en del tørrere enn før. I Eksperiment 2 viste forsøksdyr mye aggressivitet til hverandre og enkelte dyr har fått seg store skader på huden etter slag.

Visuell analyse av Bode plotts og Wessel diagrammer fra målingene på biologisk materiale hadde påvist at de største forandringene i impedans- og faseverdier skjer i frekventområde fra 1 Hz til 1 kHz. Bero på resultater av dette observasjon ble alle dataene fra bioimpedansmålinger på tumorer analysert i lavfrekventområde.

#### 4.2.1 Eksperiment 1-1: 0 og 15Gy, 500mV, fysiologisk saltvann.

I forsøk 1-1 ble det tatt bioimpedansmålinger på ubehandlede tumorer (kontroll gruppe) og på dyr, som fikk singeldose bestråling på 15 Gy. Huden til forsøksdyr ble fuktet med fysiologisk saltvann. Bioimpedansmålinger under slike forsøksforhold ble utført på til sammen 24 tumorer i begynnelsen (16- behandlede og 8 ubehandlede dyr) og etter hvert ble antall dyr redusert på grunn av at hver 3-e, 5-te, 8-te og 12-te dag ble det tatt ut 2 (totalt 8) tumorer til histologisk undersøkelse. En tumor fra kontrollgruppe og 3 tumorer fra dag 10 ble imidlertid ekskludert fra videre analyse, da plotts fra de inneholdt mye støy.

Bioimpedans- og faseverdier for hver måling ble bestemt ved hjelp av programvare Z-veiw. I Figur 4.2 (til venstre) er resultater fra målingene i tumorer fra HT-29 presentert som Wessel diagramm. Figur 4.2 viser målinger i mus 24 (venstre tumor) fra dag 1, 3, 5, 8, 10 og 12 i forhold til kontroll dyr (mus 15 venstre). Målingene fra Figur 4.2 viser fram en klar  $\alpha$ -dispersjon. Her vises det at største forskjeller for impedansverdier ligger i område fra 1 til 100 Hz.



Figur 4.2: Wessel diagram og Bode – plotts for behandlet kontra ubehandlet tumor (15 Gy, 500 mV, fysiologisk saltvann).

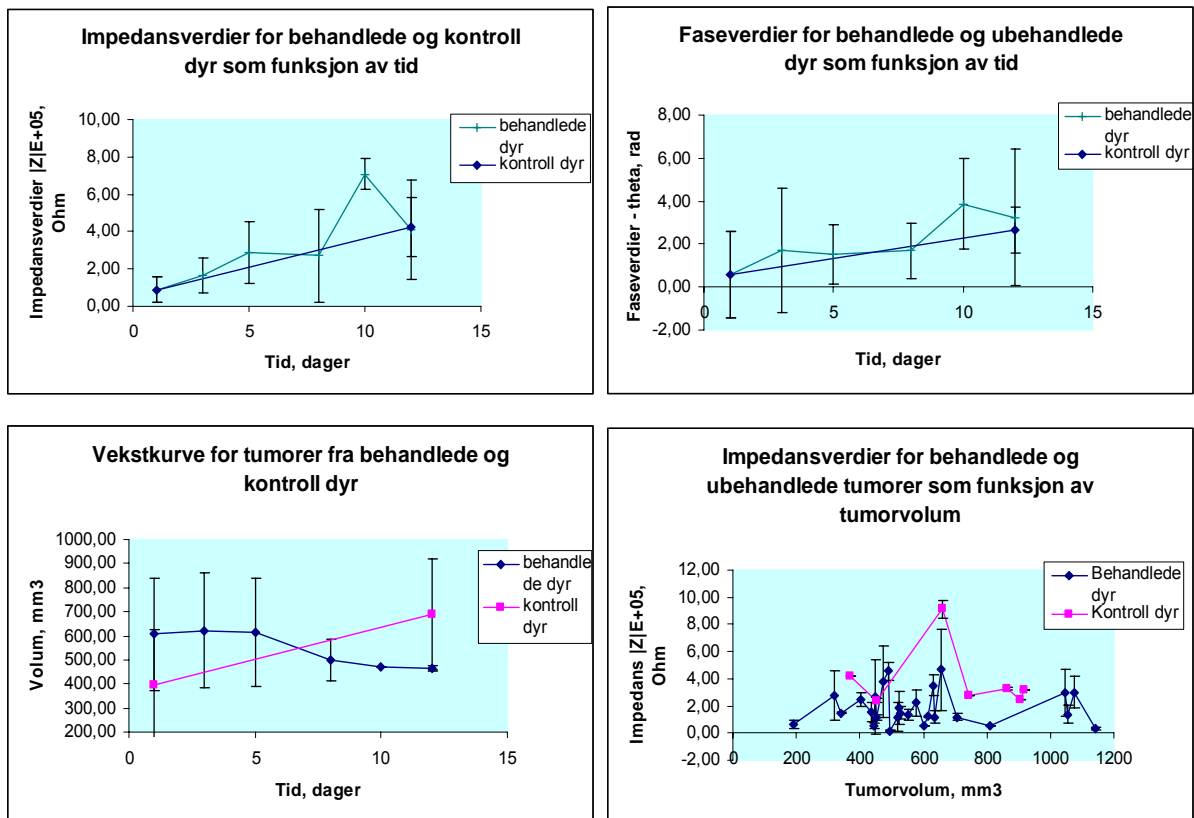
Lavfrekv område	Dag 1	Dag 3	Dag 5	Dag 8	Dag 10	Dag 12	Kontroll
$ Z E+05$ , Ohms	$0,895 \pm 0,704$	$1,657 \pm 0,961$	$2,875 \pm 1,644$	$2,716 \pm 2,485$	$7,075 \pm 0,856$	$4,220 \pm 2,658$	$4,133 \pm 1,574$
Theta, rad	$-0,561 \pm 2,007$	$-1,701 \pm 2,889$	$-1,510 \pm 1,402$	$-1,683 \pm 1,320$	$-3,868 \pm 2,097$	$-2,669 \pm 3,148$	$-3,250 \pm 1,056$
Volum, mm <sup>3</sup>	$607,884 \pm 233,573$	$620,645 \pm 239,224$	$616,276 \pm 223,933$	$497,919 \pm 85,552$	$472,308 \pm 0,00$	$466,077 \pm 10,745$	$689,152 \pm 229,535$

Tabell 4.2 Gjennomsnittsverdiene for impedans og fase for ubehandlede og behandlede dyr fra HT-29. Behandlingen ble gitt som singel stråledose på 15 Gy på dag 2. Alle tumorer ble fuktet med fysiologisk salt vann før bioimpedansmonitorering. Impedansverdiene, presentert i dette tabell tilsvarer lavfrekvent område.

Resultater fra Eksperiment 1-1 er presentert i Tabell 4.2. Fra dag 1 til dag 5 ble det observert en økning i gjennomsnittsimpedansverdier fra  $(0,895 \pm 0,704)E+05$  Ohm til  $(2,875 \pm 1,644)E+05$  Ohm, som deretter stabiliserte seg og fra dag 8 til dag 12 skjer en økning

i gjennomsnittsimpedansverdiene. På dag 10 ble det observert meget høye gjennomsnittsverdier av impedans på ca.  $(7,075 \pm 0,856)E+05$  Ohm. Faseverdier viser en utvikling, ganske liknende impedansen. Gjennomsnittsimpedansdata fra 12-te dag for bestrålte dyr var på  $(4,220 \pm 2,658)E+05$  Ohm. Kontroll dyr hadde gjennomsnittsimpedansverdier på  $(4,133 \pm 1,574)E+05$  Ohm. Tumorstørrelser varierte gjennomsnitt fra  $466,077 \pm 10,745$  mm<sup>3</sup> for bestrålte dyr til  $689,152 \pm 229,535$  mm<sup>3</sup> for kontroll dyr på dag 12.

Figur 4.3 illustrerer utviklingen med tiden av impedans ( $|Z|$ , Ohm) og fase ( $\varphi$ , rad) for behandlede (15 Gy) og kontroll dyr. Grafen nederst til venstre viser en vekstkurve for begge grupper tumorer; behandlingen ble gitt på dag 2. Figuren 4.3 nederst til høyre representerer impedansverdiene ( $|Z|$ , Ohm) fra tumorer i behandlede og kontroll dyr som funksjon av tumorvolum (mm<sup>3</sup>):



Figur 4.3 viser utviklingen i gjennomsnittsverdier av impedans, fase og volum over tid for ubehandlede kontra behandlede tumorer. Strålebehandling- singel stråledose på 15 Gy. Fuktighetsmiddel - fysiologisk saltvann. Påført signal - 500 mV. Figuren nederst til høyre presenterer impedansverdiene (Ohm) for behandlet og ubehandlet tumorvev som funksjon av tumorvolum (mm<sup>3</sup>).

Som ble sagt tidligere, måleresultatene fra dag 10 skilte seg betydelig fra andre dager. Men samtidig ble det funnet ut, at på dag10 måtte en betydelig del av målingene ekskluderes fra analysen på grunn av dominerende støynivå. Dette kan innebære stor usikkerhet for bioimpedansmonitorering på den aktuelle dagen.

Ut fra Figuren 4.3 (nederst til høyre) kan de sies at impedansverdiene fra tumorer i ubehandlede dyr ( $(3,91 \pm 2,38)E+05$  Ohm) ble gjennomsnitt en del høyere enn verdier fra like store tumorer i bestrålte dyr ( $(1,86 \pm 1,26)E+05$  Ohm).

#### 4.2.2 Eksperiment 1-2: 0 og 15Gy, 100mV, fysiologisk saltvann.

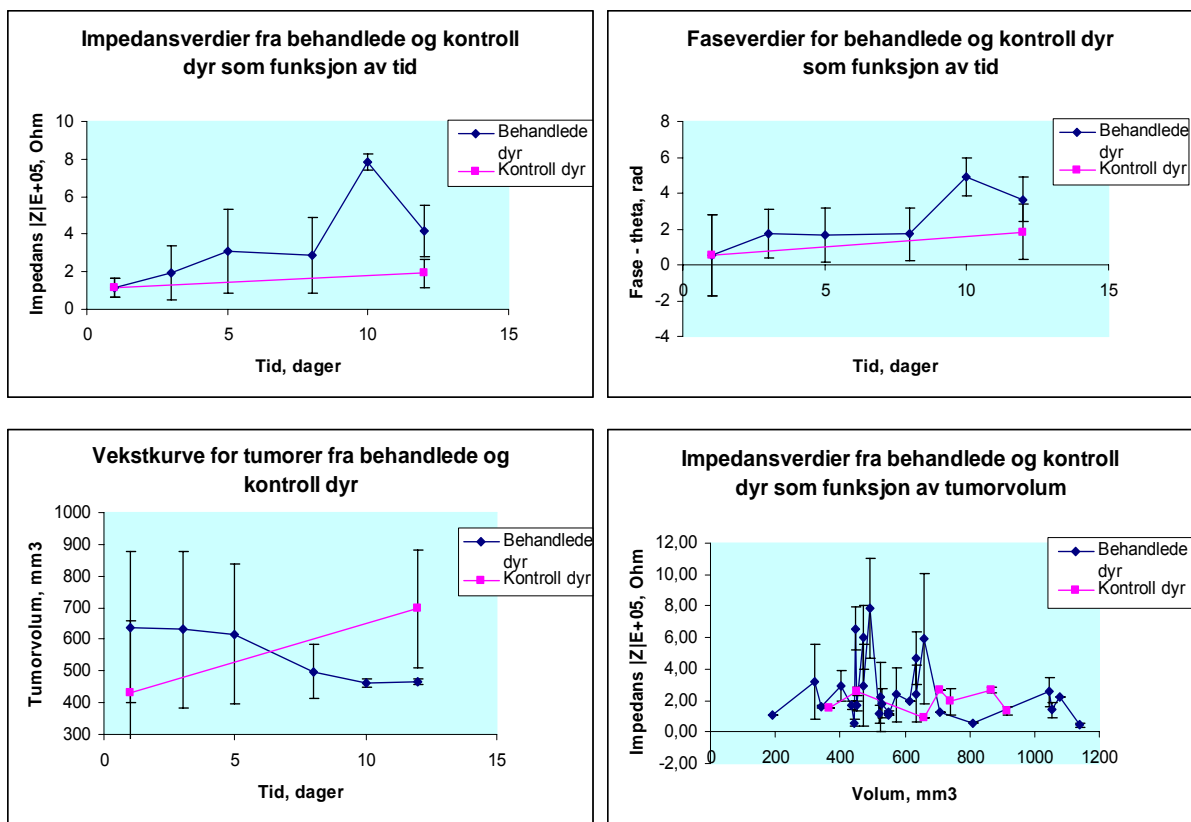
Det ble utført en rekke målinger under liknende forhold som var beskrevet i Kapittel 4.2.1 (strålebehandlingen ble gitt som singel stråledose på 15 Gy og alle tumorer ble fuktet med fysiologisk saltvann før målingene startet). Forskjellen består i at påført spenning var på 100 mV. Hensikten med slik forsøk var å sammenligne resultater fra målinger, utført med 500 mV og 100 mV spenning for å finne ut om vi hadde den samme utviklingen i impedans- og faseverdiene og hvor klare i forhold til støy var disse målingene. Dette forsøket ble utført på den samme gruppen forsøksdyr, med tidsmargin på 5 minutt mellom omgjøring i spenning fra 100 til 500 mV. Resultater fra Eksperiment 1 (del 2) er presentert i Tabell 4.3. og Figur 4.4 illustrerer gjennomsnittlige verdier av impedans, fase og volum for behandlet og ubehandlet vev som funksjon av tid.

Lavfrekv område	Dag 1	Dag 3	Dag 5	Dag 8	Dag 10	Dag 12	Kontroll
$ Z E+05,$ Ohms	1,160 ± 0,502	1,937 ± 1,427	3,100 ± 2,240	2,882 ± 2,039	7,844 ± 0,454	4,150 ± 1,360	1,935 ± 0,744
Theta, rad	-0,535 ± 2,245	-1,736 ± 1,390	-1,659± 1,484	-1,696 ± 1,467	-4,912 ± 1,057	-3,648 ± 1,246	-1,835 ± 1,547
Volum, mm <sup>3</sup>	638,728 ± 237,706	630,883 ± 245,891	617,092 ± 219,047	497,919 ± 85,552	460,174 ± 13,267	466,077 ± 10,745	695,946 ± 187,138

Tabell 4.3 Gjennomsnittsverdiene for impedans og fase for ubehandlede og bestrålte med 15 Gy singeldose tumorer. Påført spenning -100 mV. Fuktighetsmiddel - fysiologisk saltvann. Verdiene for  $|Z|$  og  $\phi$  tilsvarer lavfrekvent område.

Bode – plotts viste mye støy i målingene, spesielt i lavfrekventområde. Støyen i enkelte målinger ble så dominerende at  $\frac{3}{4}$  del av alle målinger ble ekskludert fra videre analyse fordi de kunne medføre betydelig usikkerhet for våre resultater.

Utviklingen i impedans- og faseverdiene gjennom tiden skjer litt annerledes i tilfelle med 100 mV påført spenning, enn i tilfelle med 500 mV. Her vises det en økning i gjennomsnittsimpedansverdier fra dag 1 helt fram til dag 10 og deretter faller den ned. Det fantes flere forskjeller i målinger, som ble tatt på 100 mV fra de, som ble utført på 500 mV. Den største forskjellen var at i gjennomsnitt lå impedansverdiene for behandlet vev  $(2,58 \pm 1,96)E+05$  Ohm en del høyere, enn for kontroll dyr  $(1,96 \pm 0,71)E+05$  Ohm. Dette er omvent enn det vi fikk i Eksperimentet 1-1. Gjennomsnittsfaseverdier viser litt annerledes utvikling enn gjennomsnittsimpedansverdiene. De forholder seg stabile helt fra dag 3 til dag 8. På dag 10 skjer det en betydelig økning, som avtar på dag 12.



Figur 4.4 Utvikling i impedans, fase og volum over tid for ubehandlede og behandlede tumorer. Strålebehandling - singel stråledose på 15 Gy. Fuktighetsmiddel - fysiologisk saltvann. Påført spenning – 100 mV. Figuren nederst til venstre viser en vekstkurve for tumorer fra behandlede og kontroll dyr. Figuren nederst til høyre representerer impedansverdier (Ohm) for tumorer fra behandlede og ubehandlede dyr som funksjon av tumorvolumet (mm<sup>3</sup>).

### 4.2.3 Eksperiment 2-1: 0 og 15 Gy, 500 mV, tørr hud.

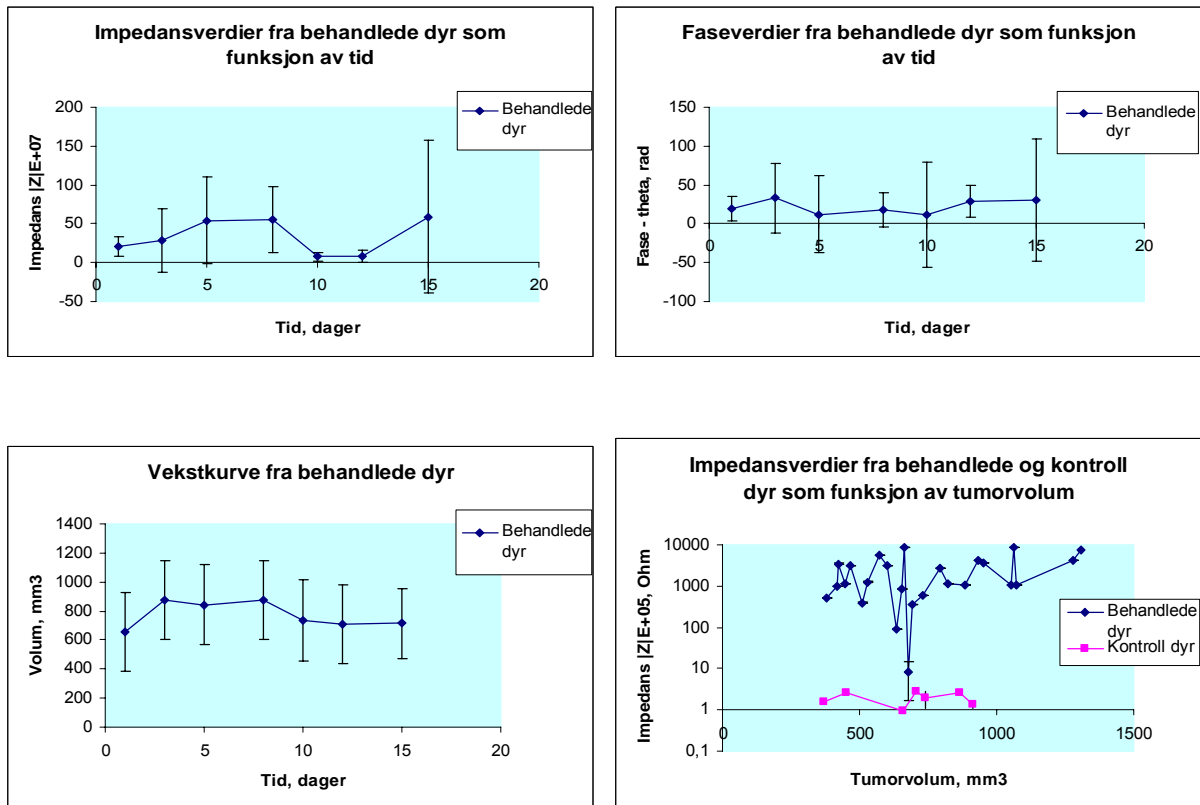
I andre forsøk ble alle tumorer delt i 2 grupper. Den første gruppen forsøksdyr (Eksperiment 2-1) bestod av 8 tumorer som ble behandlet med singel stråledose på 15 Gy. Tumorer ble monitorert med bioimpedansmålemetode på dagene 1, 3, 5, 8, 10, 12 og 15. Alle målingene i Eksperiment 2-1 ble utført på tørr hud. Resultater fra dette forsøket er presentert i Tabell 4.4 og Figur 4.5.

Disse resultater ble sammenlignet med dataene fra Eksperiment 1-1 (15 Gy, 500 mV, fysiologisk saltvann) for å finne ut, hvordan kan koblingsmiddel påvirke måleresultater. Sammenligning viser at impedansverdiene som ble målt på tørr hud er betydelig høyere ( $E+07$  Ohm) enn de som var tatt på fuktete tumorer ( $E+05$  Ohm). Men her må det pekes på at i Eksperiment 2 deltok mange mus som hadde store (i forhold til elektrodedimensjoner) skader på hud. Disse skadene var resultat av slag påført fra andre forsøksdyr. Tørre blodflekker, risper og ødem kunne vært en av årsakene til så betydelige forskjeller.

Lavfrekv område	Dag 1	Dag 3	Dag 5	Dag 8	Dag 10	Dag 12	Dag 15
$ Z E+07$ , Ohms	20,767 ± 12,791	28,363 ± 40,595	54,453 ± 55,622	55,355 ± 42,018	7,461 ± 6,127	8,108 ± 8,147	59,173 ± 97,867
Theta, rad	-19,879 ± 15,720	-32,958 ± 45,391	-12,316 ± 48,968	-17,887 ± 21,793	-11,924 ± 67,173	-29,247 ± 20,895	-30,799 ± 78,894
Volum, mm <sup>3</sup>	655,259 ± 268,540	874,170 ± 271,021	841,171 ± 276,020	871,210 ± 271,518	736,237 ± 278,269	706,486 ± 271,576	713,712 ± 242,121

Tabell 4.4 Gjennomsnittsverdiene for impedans og fase for tumorer fra HT-29 cellelinje som ble bestrålt med singel stråledose på 15 Gy. Alle verdiene tilsvarer lavfrekvent område. Huden under målingene ble holdt tørr.

På tross av ulik størrelsesorden kan det sees at de to gruppene (tørr og fuktet hud) har en ganske lignende utvikling av impedansverdier gjennom tiden. Første bilde i Figur 4.5 viser at gjennomsnittlige impedansverdier øker fra dag 1 ( $20,767 \pm 12,791$ ) $E+07$  Ohm til dag 5 ( $54,453 \pm 55,622$ ) $E+07$  Ohm, etterpå de stabiliserer seg og så faller de kraftig ned til ( $7,461 \pm 6,127$ ) $E+07$  Ohm på dag 10. Fra dag 10 til dag 15 ( $59,173 \pm 97,867$ ) $E+07$ , Ohm konstateres det en økning av impedansverdiene igjen.



Figur 4.5 viser utvikling i impedans og fase over tid for behandlede tumorer fra HT-29. strålebehandling – singel stråledose på 15 Gy Koblingsmiddel – ingen, tumorene ble monitorert på tørr hud. Påført spenning - 500 mV. Figuren nederst til venstre presenterer vekstkurve for behandlede tumorer som funksjon av tid etter bestråling. Figuren nederst til høyre viser bioimpedansverdier for behandlede og kontroll dyr som funksjon av tumorvolum. Dataene for kontroll dyr er hentet fra Eksperiment 1-1.

Figuren 4.5 (nederst til høyre) sammenlikner impedansverdiene fra behandlede og kontroll dyr. Det ble målt gjennomsnitt impedansverdier på ca.  $(54,03 \pm 40,22)E+07$  Ohm for behandlede dyr (tørr hud), som var mye høyere enn verdier for kontroll dyr, som ble hentet fra Eksperiment 1  $(1,86 \pm 1,26)E+05$  Ohm (fuktet hud). Dette sammenlikning er ikke helt riktig, siden det ble brukt resultater fra eksperimenter, som ble utført under forskjellige forhold.

#### 4.2.4 Eksperiment 2-2: 5 Gy, 500 mV, springvann.

I Eksperiment 2-2 består måleobjekter av 24 tumorer i begynnelsen. Det ble tatt ut 2 tumorer per 5-te, 10-e og 15-e dag til histologisk undersøkelse. Alle tumorer fikk strålebehandling på 5 Gy som singel stråledose på dag 2. Tumorene ble fuktet med spring vann før bioimpedansmonitorering. Målingene ble utført med påført spenning på 500 mV. 2 tumorer



ble ekskludert fra videre analyse på grunn av for stor støyinnhold i måleresultater. Resultater fra Eksperiment 2-2 er presentert i Tabell 4.5 og Figur 4.6:

Lavfrekv område	Dag 1	Dag 3	Dag 5	Dag 8	Dag 10	Dag 12	Dag 15
Z E+05, Ohms	4,178 ± 2,459	11,383 ± 10,554	13,251 ± 9,845	112,718 ± 198,636	21,625 ± 20,442	48,858 ± 50,695	395,059 ± 476,287
Theta, rad	-2,644 ± 1,669	-5,304 ± 3,717	-9,056 ± 9,368	-12,094 ± 11,170	-8,262 ± 5,161	-14,049 ± 11,752	-18,257 ± 14,245
Volum, mm <sup>3</sup>	659,125 ± 371,857	863,453 ± 420,004	806,718 ± 440,147	932,657 ± 270,706	995,380 ± 329,897	963,666 ± 355,403	1258,819 ± 521,099

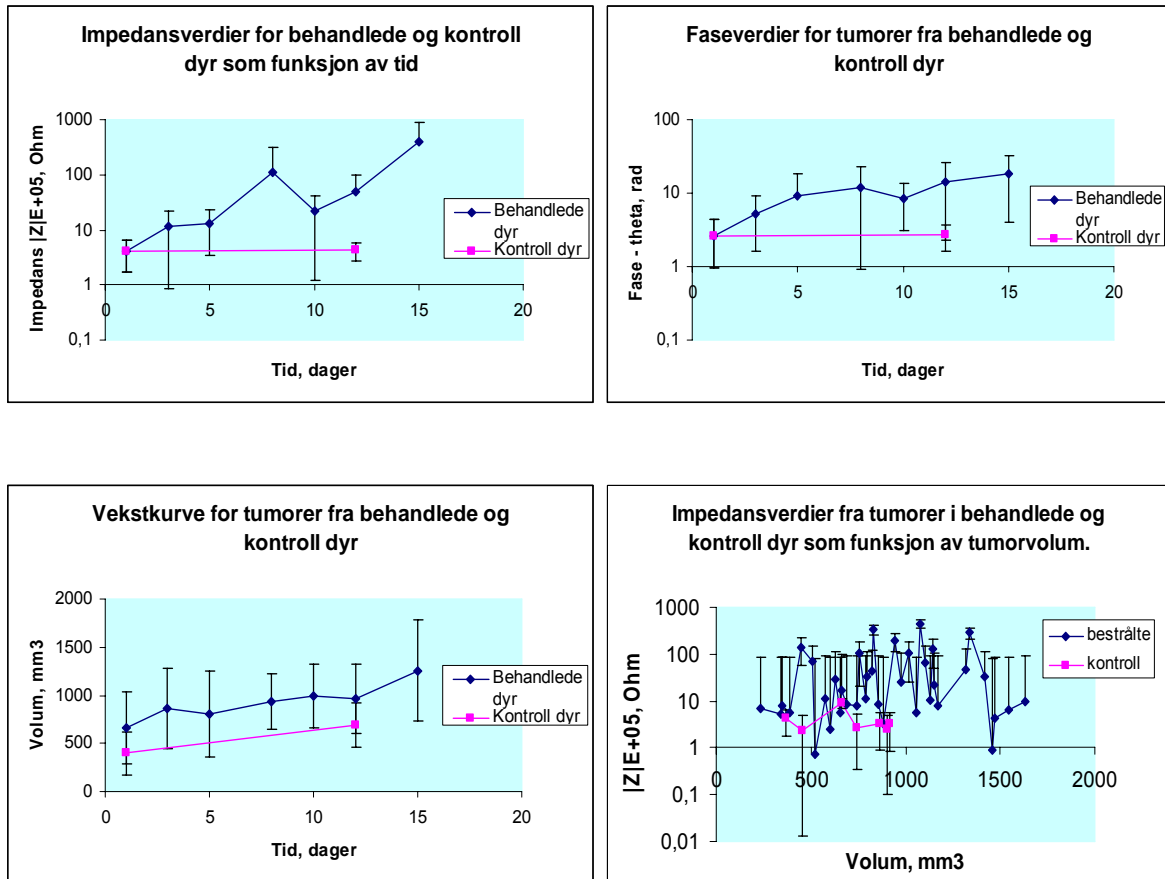
Tabell 4.5 Gjennomsnittsverdiene for impedans og fase for tumorer fra HT-29 celledinje, som ble bestrålt med 5 Gy singel dose. Alle tumorer ble fuktet med spring vann før bioimpedansmonitorering. Impedans- og faseverdier tilsvarer lavfrekvent område.

Tabell 4.5 viser at størrelsesorden på impedansverdiene (E+05 Ohm) for tumorer, fuktet med spring vann er ligger på det samme nivå som for tumorer, fuktet med fysiologisk saltvann. Når det blir sammenlignet utviklingen av gjennomsnittsimpedans- og faseverdier over tid, så kan det konstateres at økningen i verdiene skjer over litt lengre tid for tumorer som fikk 5 Gy engangsdose, enn for de som fikk 15 Gy. Tabell 4.5 viser også at middelerverdier for fase og impedans er litt høyere i forhold til målingene som ble tatt på behandlede med 15 Gy tumorer.

Det ble observert en økning i impedansverdiene for tumorer behandlet med stråledose på 5 Gy fra (4,178±2,459)E+05 Ohm på dag 1 til (112,718±198,636)E+05 Ohm på dag 8. Deretter faller verdiene kraftig ned til (21,625±20,442)E+05 Ohm på dag 10. Etterpå begynner impedansverdiene å stige igjen til en verdi på (395,059±476,287)E+05 Ohm på dag 15. Faseverdier viser en liknende utvikling med tiden.

Når det gjelder støynivå, det kan bli sagt at målingene innehold en del støy i lavfrekventområde, men den var ikke så dominerende som i tilfelle med målinger på tørr hud.

Eneste ting som blir nevnt her spesielt er at enkelte målinger på dagene 1 og 3 skjedde under negative forhold. På grunn av feil i anleggssystemet lå temperaturen i disse dagene på 5°C lavere enn det er normalt. Dette kunne gi en innflytelse på resultater av målinger, så dataene fra enkelte tumorer ble tatt ut fra videre analyse på disse dagene.



Figur 4.6 Utvikling i bioimpedans og fase over tid for behandlede og ubehandlede tumorer fra HT-29. Strålebehandling - singeldose på 5 Gy. Koblingsmiddel - spring vann. Påført spenning - 500 mV. Figuren nederst til venstre viser vekstkurve for behandlede og ubehandlede tumorer som funksjon av tid etter bestråling. Figuren nederst til høyre sammenligner impedansverdier (Ohm) for behandlede (5 Gy) og ubehandlede tumorer som funksjon av volum (mm<sup>3</sup>). Dataene for kontroll dyr er hentet fra Eksperiment 1-1.

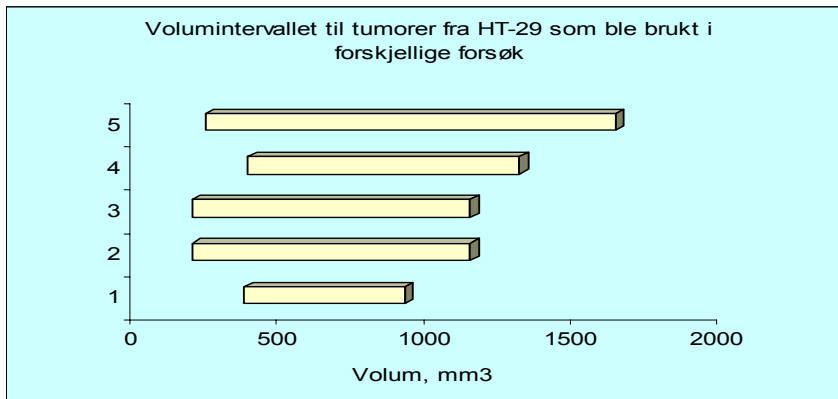
### 4.3 Volumbetraktninger.

Volumet til tumorene som ble benyttet i Eksperimenter 1-1, 1-2, 2-1 og 2-2, og som ligger til grunn for sammenligninger i denne oppgaven, varierte mellom de ulike forsøkene.

Tumorene fra HT-29, som ble benyttet i bioimpedansmonitorering, varierte i størrelse og formen. Tumorene fra Eksperiment 2-2 var generelt betydelig større enn tumorene fra Eksperimenter 1-1, 1-2 og 2-1. I tillegg til at tumorene fra Eksperiment 2-2 var betydelig større enn tumorene i Eksperimenter 1-1, 1-2 og 2-1, hadde de en vesentlig større variasjon i

størrelse. Volumene til tumorene fra Eksperiment 1-1 og 1-2 var i samme volumintervall, men dette volumintervallet var igjen ulik volumintervallet fra kontroll dyr.

Referert til studie som ble utført av Carlsson *et al* (1983) er formel (3.1) mest nøyaktig formel for beregning av tumorvolum fra to dimensjoner. Men denne formelen er ikke helt korrekt for beregning av volum for tumorer fra HT-29, da mange av disse tumorene hadde ikke form som ellipsoider. Figur 4.6 illustrerer de ulike volumintervallene:



Figur 4.7: Volumintervallet til tumorene fra HT-29, som ble benyttet i forskjellige eksperimentene: №1- kontroll dyr (368-915 mm<sup>3</sup>), №2- Eksperiment 1-1, (192-1140 mm<sup>3</sup>), №3- Eksperiment 1-2 (192-1139 mm<sup>3</sup>), №4- Eksperiment 2-1 (381-1308 mm<sup>3</sup>), №5- Eksperiment 2-2 (235-1635 mm<sup>3</sup>)

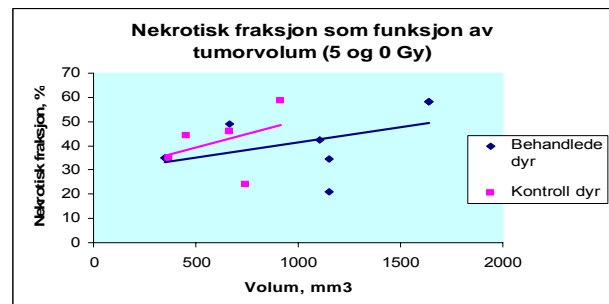
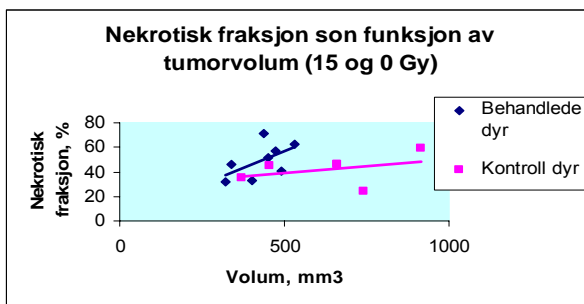
Figuren 4.7 viser tydelig den skjeve volumfordelingen mellom de ulike forsøkene. Det vil bli diskutert i Kapittel 5.3 usikkerhet rundt volumintervallet for tumorer fra HT-29 sammen med konsekvenser av benyttning av ulike volumintervaller i de forskjellige forsøkene.

## 4.4 Histologisk undersøkelse.

I histologisk undersøkelse ble det involvert 8 tumorer som fikk stråledose på 15 Gy (2 tumorer per 3, 5, 8 og 12 dag); 6 tumor som fikk stråledose på 5 Gy (2 tumorer per 5, 10 og 15 dag) og 6 tumorer fra kontroll gruppe (dag 12). Alle resultater fra histologiske snitt ble analysert ved hjelp av programvare AquaCosmos 2.5 og i tillegg for å sikre resultater ble det gjort en manuell undersøkelse av hvert snitt i et optisk mikroskop. Histologiske resultater ble klassifisert etter 2 kategorier: 1) prosent andel av nekrotisk vev og 2) innhold av fibrose i tumorer. Histologiske resultater er presentert i Figurer 4.8, 4.9 og 4.10.

I de fleste tumorer ble det observert cytoplasmatiske forandringer: rosa flekker, som oppstår når homogen acidofil cytoplasma ble farget av eosin tydet på at celler ble omfanget av nekrotiske prosesser. Dette betyr at i tumorer skjedde koagulering av cytoplasmatiske proteiner og destruksjon av ribosomer og membraner. Konturer av kjerner var forsvunnet. Histologisk undersøkelse påviste at de fleste nekrotiske områder var konsentrert i senter av tumor. Apoptose er en prosess som skjer i enkelte celler eller i små grupper av celler, og aldri følges av betennelse (Path.lectures, 2006). Siden apoptotiske kropper fagocytteres fort, så histologisk observasjon av apoptose var meget vanskelig.

Det ble også observert en økning i fibrose med tiden. I dagene 3 og 5 inneholdt fibrotisk vev var liten, men etter hvert den økte til middel eller stor verdi på dagene 8 og 10. Fibrose har oppstått etter at nekrotisk vev ble spist av makrofager og bindevev har erstattet eller innkapslet nekrotisk vev. I lys mikroskop så fibrose ut som små røde risper. I enkelte tumorer, som fikk bestråling på 15 Gy ble det observert tomme rom eller cyster.

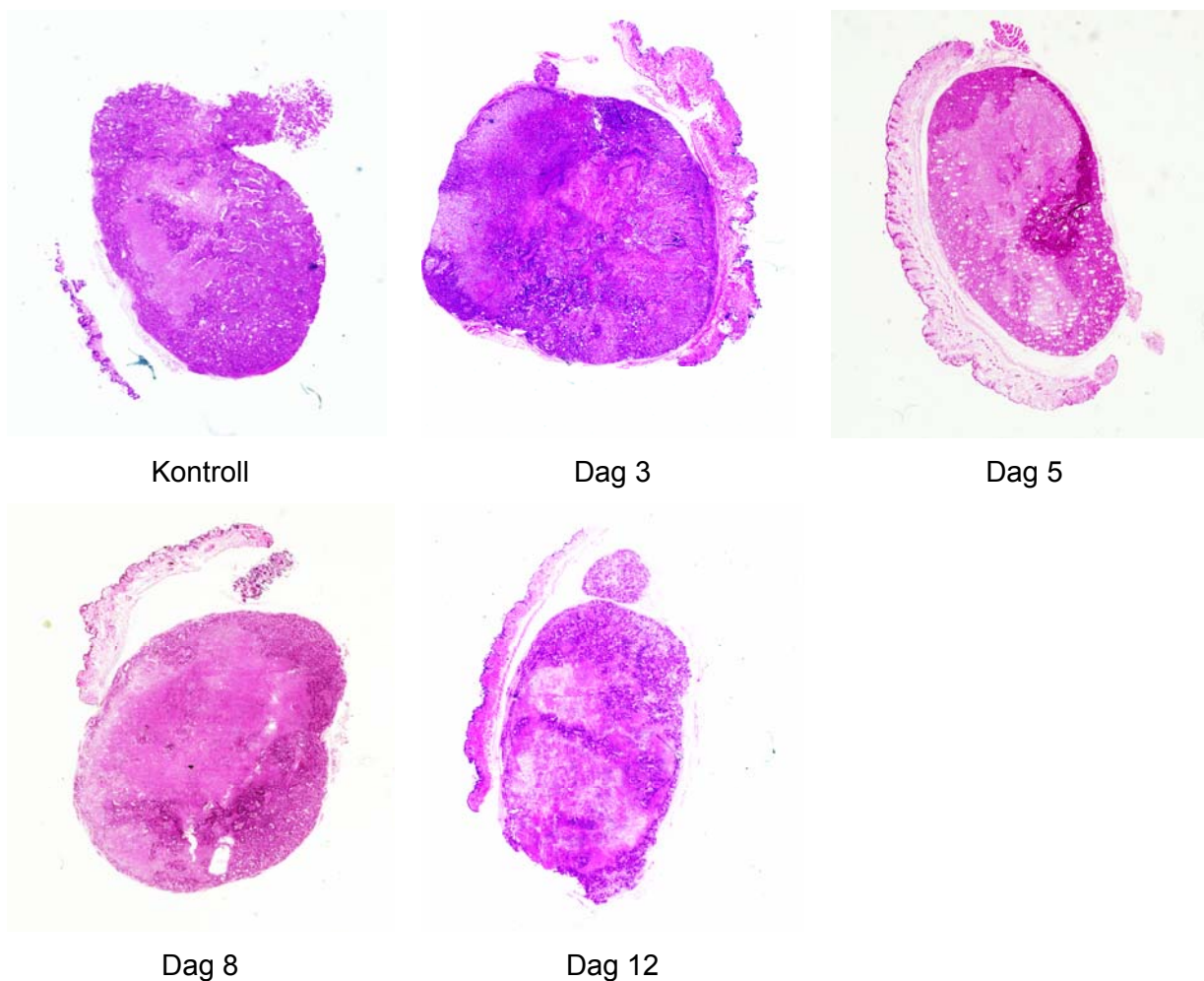


a). behandlede (15 Gy) og kontroll tumorer

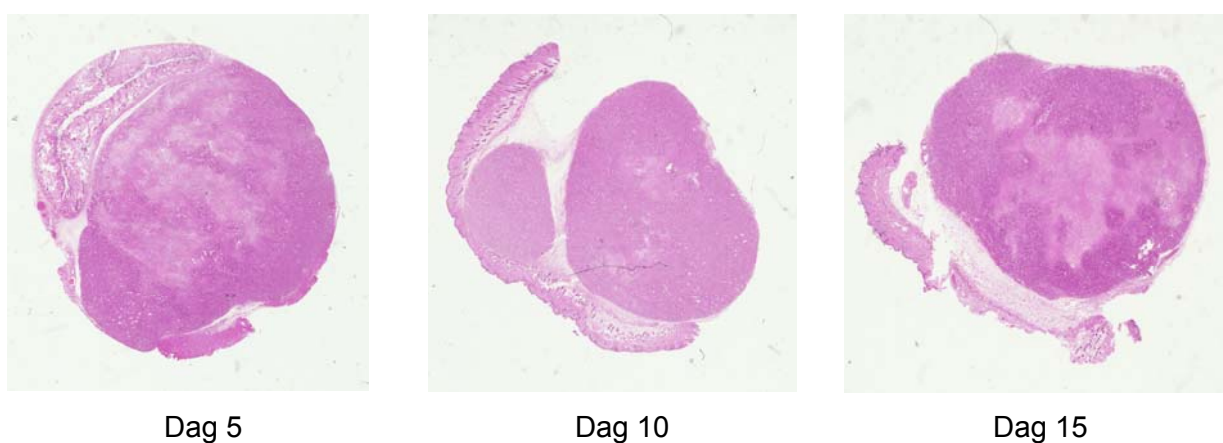
b). behandlede (5 Gy) og kontroll tumorer

Figur 4.8 a) og b) viser forandringer i nekrotisk fraksjon (%) som funksjon av volum i tumorene fra behandlede og kontroll dyr. I grafen b) som kontroll ble det brukt tumorer fra en annen gruppe (Eksperiment 1-1).

Alle tumorer viser en økning i nekrotisk fraksjon med økende tumorvolum. Men hastigheten den økningen skjer med er forskjellig mellom de tre gruppene. Den største tempo i utvikling av nekrotisk fraksjon viser tumorer bestrålt med 15 Gy, lavest – bestrålte med 5 Gy tumorer. Gjennomsnitt prosent andel av nekrose hos dyr, bestrålt med 5 Gy (39,99 %) er nesten likt til prosent andel av nekrose hos kontroll dyr (39,66); høyest gjennomsnittsverdi av nekrotisk fraksjon viste tumorer bestrålt med 15 Gy (49,42 %). Tumorer fra kontroll dyr og tumorer, som ble bestrålt med 15 Gy tilhørte den samme gruppen av forsøksdyr. Disse dyr ble brukt i et annet forsøk samtidig som bioimpedansmålingene pågikk og de var mer passive og apatiske.



Figur 4.9: Figuren representerer histologi for kontroll tumor (øverst til venstre) og bestrålte tumorer (15 Gy – dag 3,5,8,12). Tumorer stammer fra HT-29 cellelinje.



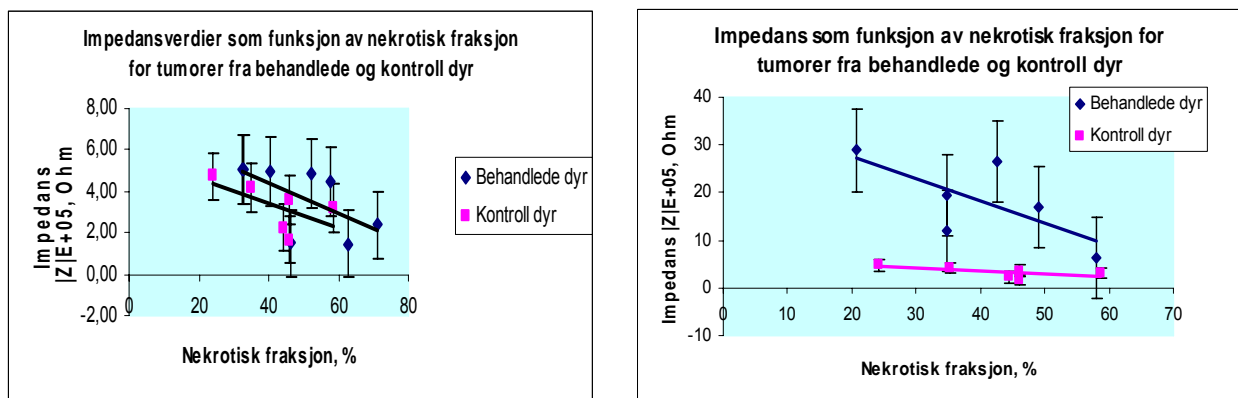
Figur 4.10: Figuren representerer histologi for bestrålte tumorer (5 Gy – dag 5,10,15). Tumorer stammer fra HT-29 cellelinje.

## 4.5 Oppsummering av resultater.

For å undersøke om det er noen sammenheng mellom behandlingsrespons og forandringer i vevs elektriske egenskaper, ble resultater fra bioimpedansmonitorering i tumorer fra HT-29 nærmere undersøkt på enkelttumornivå. Det ble gjort en sammenligning av monitorerte  $|Z|$  verdiene fra Eksperimenter 1-1 og 2-2 med nekrotisk fraksjon til tumorene fra 3 forskjellige dosenivåer (0, 5 og 15 Gy). Deretter ble presentert sammenligning av impedansverdiene  $|Z|$  med tumorvolum. Analysen ble foretatt på 6 tumorer fra kontroll gruppe, 6 tumorer bestrålt med 5 Gy og 8 tumorer som fikk stråledose på 15 Gy. Alle tumorer inkludert i dette analyse var monitorert på fuktet hud.

### 4.5.1 Sammenligning av $|Z|$ og nekrotisk fraksjon.

For å sammenligne resultater fra bioimpedansmålingene med nekrotisk fraksjon, er det i figur 4.11 plottet impedansverdier  $|Z|$  til hver enkelt tumor versus dens nekrotisk fraksjon (%). Diagram a) og b) i figur 4.11 viser en sammenheng mellom impedansverdiene og nekrotisk fraksjon.



a) behandlede (15 Gy) og kontroll dyr

b) behandlede (5 Gy) og kontroll dyr

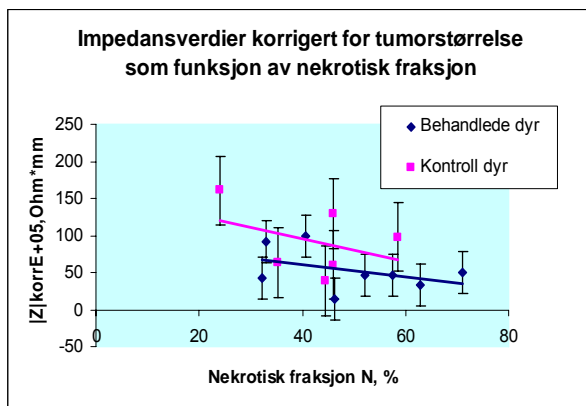
Figur 4.11: Sammenheng mellom verdier av impedans  $|Z|$  og nekrotisk fraksjon for behandlede og ubehandlede tumorer fra HT-29. Det er representert data fra behandlede tumorer (15 Gy - fysiologisk salt vann og 5 Gy - spring vann) og kontroll dyr.

Voksende tumor stimulerer betennelsesreaksjoner og ødematøse effekter. Disse effekter øker etter hvert tumoren vokser og bli mer nekrotisk. Nekrose assosieres med degradering av nekrotiske celler til væskeform, som hjelper til passasje av elektriske strømmer under

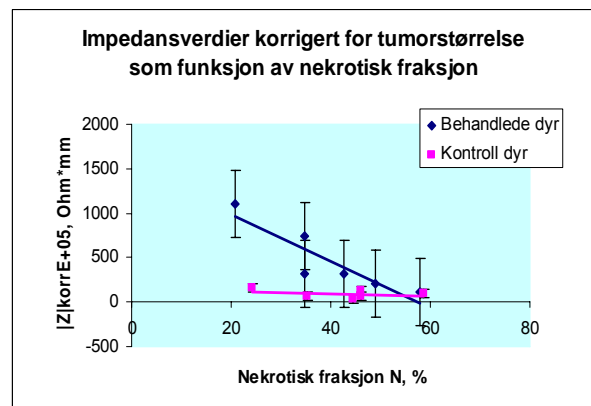
bioimpedansmonitorering. Da kan det bli observert en minsking av impedansrespons (Skourou C., 2004). Det vil derfor være mest sannsynlig å forvente at tumorenes impedansverdier  $|Z|$  i lavfrekventområde faller med økende nekrotisk fraksjon.

Figuren 4.11 viser en tendens til dette for alle tre grupper forsøksdyr (2 behandlede og 1 kontroll) faller verdiene av  $|Z|$  med økende nekrotisk fraksjon. Tumorer som fikk strålebehandling på 5 Gy viser betydelig høyere verdier av  $|Z|$  enn ubehandlede tumorer. Tumorer bestrålt med 15 Gy viser observerbar høyere verdier av  $|Z|$  enn tumorer fra kontroll gruppe.

For å gi et mer representativt bilde ble impedansverdiene korrigeret for tumorstørrelser for hver enkelt tumor. Dette ble gjort på en følgende måte. For en ideell modell med homogent vev som befinner seg mellom to elektroder kan impedansen beskrives ved hjelp av formel  $Z = \rho L/A$ , hvor  $\rho$  ( $\Omega m$ ) er resistiviteten til vevet,  $L$  (m) – lengden og  $A$  ( $m^2$ )- tversnitt til måleobjekt. I approksimasjon for vår tilfelle hvor lengden til tumoren er likt  $b$ - kortest målt diameter og  $A$  likt  $\pi a^2/4$  ( $a$ - lengst målt diameter for tumor) ville  $Z = 4 \rho b / \pi a^2$ . Selvfølgelig for vårt realistiske oppsett med 4-elektrodesystem, forskjellige former for undersøkte tumorer og uhomogent tumorvev, ville matematikken være mer komplisert enn dette. Ut fra den formodningen følger at impedansen korrigeret til tumorstørrelse er  $Z_{\text{korrt}} = Za^2/b$ .



a) behandlede (15 Gy) og kontroll dyr



b) behandlede (5 Gy) og kontroll dyr

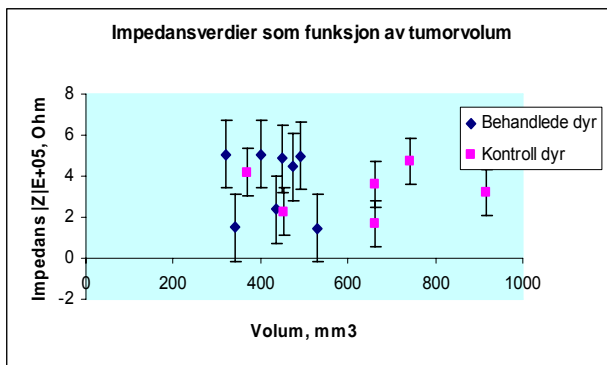
Figur 4.12 viser sammenheng mellom nekrotisk fraksjon og impedansverdiene som er korrigeret til tumorstørrelse for tumorer i behandlede og ubehandlede dyr.

I venstre figur vises det at  $|Z|$  verdiene for tumorer som fikk strålebehandling på 15 Gy ligger temmelig lavere enn verdier for tumorer fra kontroll dyr, mens figuren til høyre viser en motsatt utvikling for verdier fra behandlede (5 Gy) og ubehandlede tumorer.

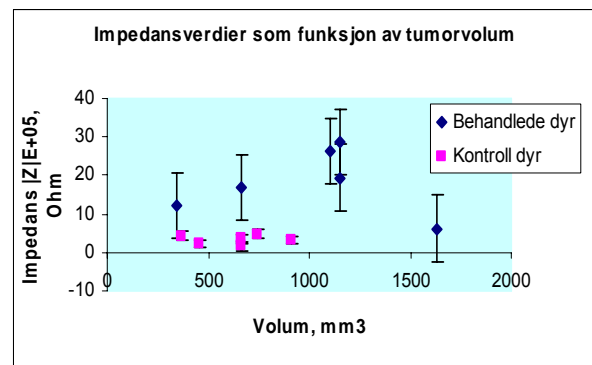
### 4.5.2 Sammenligning av $|Z|$ og tumorvolum.

I følge teorien er impedansen proporsjonalt med lengden til måleobjektet (b-kortest målt diameter) og omvendt proporsjonal med tumortversnitt  $\pi a^2/4$  (a-lengst målt diameter). Men samtidig, mens tumor vokser, så blir den mer og mer nekrotisk. Økning i nekrotisk fraksjon resulterer i reduksjon av impedansverdiene. Derfor var det mest sannsynlig å forvente at impedansverdiene viste en reduksjon med økende volum.

Figur 4.13 a) og b) viser sammenheng mellom impedansverdiene for ubehandlede og behandlede tumorer fra HT-29 med tumorvolum. Ut fra diagrammer 4.13 er det ikke mulig å lese noen klar sammenheng mellom tumorvolumet og impedansen.

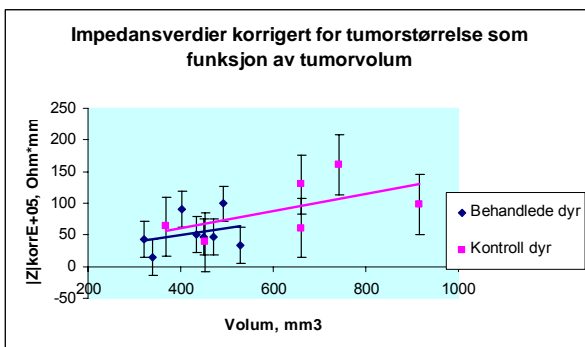


a). behandlede (15 Gy) og kontroll dyr

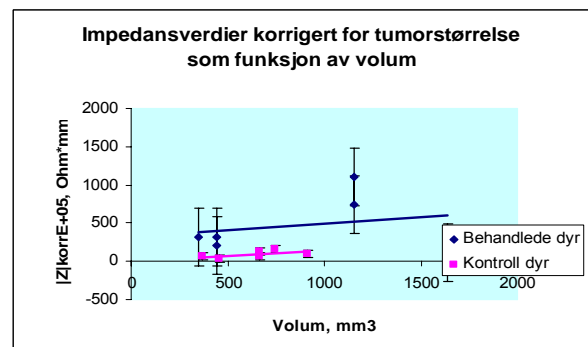


b). behandlede (5 Gy) og kontroll dyr

Figur 4.13: Impedans  $|Z|$  som funksjon av tumorvolumet for tumorer i behandlede og kontroll dyr.



a). behandlede (15 Gy) og kontroll dyr



b). behandlede (5 Gy) og kontroll dyr

Figur 4.14: viser sammenheng mellom tumorvolum og impedansverdiene som er korrigeret til tumorstørrelse for tumorer i behandlede og ubehandlede dyr.



Det ble gjort en lignende analyse for impedansverdier korrigert til tumorstørrelse. Figuren 4.14 representerer sammenlikning av korrigerede impedansverdiene for behandlede og kontroll dyr med tumorvolum. Diagram a) og b) i figur 4.14 viser en økning av impedansverdiene for alle grupper dyr med økende volum. Figurene viser at tumorer som ble bestrålt med 5 Gy stråledose har høyeste verdier av  $|Z|$  enn tumorer fra tumorer bestrålt med 15 Gy og tumorer fra kontroll gruppe.

Her er det nødvendig å påpeke at under sammenlikning av resultater i diagram b) figur 4.14 tilhørte behandlede (5 Gy) og kontroll mus forskjellige grupper dyr. I tillegg ble tumorer som fikk behandling på 5 Gy fuktet med springvann under monitorering, mens alle andre - med fysiologisk saltvann. Ved bruk av forskjellige fuktighetsmidler kan kontaktimpedansen variere mellom 10 og 100 kOhm (Jacobson, 1995). Denne sammenlikningen er basert på forskjellig grunnlag og blir diskutert nærmere i Kapittel 5.2.3 og Kapittel 5.6.

## Kapittel 5 Diskusjon.

Hvis fakta strider mot min teori da er det verst for fakta.

- Fridrih Gegel

### 5.1 Diskusjon av materialer og metoder.

#### 5.1.1 Tumormodell.

I dette studiet ble det benyttet xenografter av endetarmskreft som modellsystem for humane tumorer. Histologisk sett har slike modeller egenskaper tilsvarende opprinnelige humane tumoren. Sett i forskningssammenheng er fordelen ved xenografter at reproduserbarheten er stor. Responsen på stråleterapi i xenografter er svært lik responsen i den opprinnelige tumoren. Dessuten har grafting av tumorer fra kolorektal kreft visst seg å være relativt vellykket. Alt som ble nevnt ovenfor og i kapittel 2.1.5 tyder på at valg av xenografter som modellsystem har flere fordeler sammenliknet med andre systemer, som for eksempel spontane musetumorer.

Xenograftmodeller er likevel ikke helt representative: blodåresystemet i den transplanterte tumoren er karakteristisk for vertedyret og kan påvirke blodtilførsel, og følgelig kan stoff- og gassutveksling være annerledes enn i humane svulster. Dette kan påvirke forhold som for eksempel hypoksisk fraksjon. For at xenograften skal kunne vokse, må immunforsvaret hos forsøksdyr slås av. Dette fører til betydelig økning i veksthastigheten, som resulterer i forandringer i tumorvaskulaturen. Derfor må resultater fra målinger med xenografter bekreftes gjennom kliniske studier før de implementeres i ordinær klinisk sammenheng.

#### 5.1.2 Sikkerhet ved bioimpedansmonitorering.

Bioimpedansspektroskopi er en non-invasiv måleteknikk. I 1994 bekreftet NIH (National Institutes of Health Office of Medical Applications of Research) at teknologien var meget sikker på grunn av en rekke ulike faktorer: strømmer av lave frekvenser er ikke i stand til å elektrisk eksitere noen typer vev (nerver og hjertemuskler) og at det er involvert relativt liten strømstyrke, som er mindre enn verdien, hvor kroppen kan oppfatte den (Lee B.R., 1999).

### 5.1.3 Feilkilder i forsøksprosedyrene.

Bioimpedansmonitorering i tumorer er en meget følsom metode som er avhengig av en rekke forskjellige faktorer. Dette er både en styrke og en svakhet ved denne teknikken. Blant faktorene, som har påvirket bioimpedansmålingene i tillegg til fysiologiske faktorer er:

- Hudimpedansen
- Polarisasjonimpedansen
- Mekanisk trykk
- Kropstemperatur

I fysiologiske undersøkelser i lavfrekventområdet kan forstyrrelser oppstå på grunn av polarisasjonsimpedansen; dette skyldes elektrokjemiske reaksjoner i metall/elektrolytt-overgangen. Ved å bruke et parallellplate elektrodesystem blir systemet mindre følsomt for støy og det elektriske feltet mer homogent. I oppbygning av elektroder ble det brukt edelt metall: Au. Valg av akkurat dette metallet er begrunnet med ønske om å eliminere effekten av elektronveksling i overgangen mellom vevet og elektrodene. Selv om fireelektrodesystem er det beste valget med hensyn til å minske bidraget fra polarisasjonimpedansen, kan en del elektrodeimpedans likevel framkomme i lavfrekventområdet.

Hudimpedansen som er avhengig av fysiologiske forandringer hos forsøksdyr kan også gi bidrag til den totale bioimpedansen. Hudimpedansen kan variere med hudens tykkelse, fuktighet og andre parametere. I Eksperiment 1-1 og 1-2 ble huden fuktet med fysiologisk saltvann og i Eksperiment 2-2 med springvann. Bruk av et slik koblingsmiddel på systemer med små dimensjoner kan innebære en del risiko for å få feil i resultatene. Det kan oppstå væskebruer mellom to nærliggende elektroder om det er noe vann igjen på overflaten. Å øke avstanden mellom to elektroder fra et elektrodepar var ikke mulig på grunn av små tumordimensjoner. Eksperiment 2-1 ble utført på tørr hud. De fleste mus som ble benyttet i dette forsøket hadde skader på huden. Tørre blodflekker, risp og sår vil kunne ha hatt betydelig innvirkning på hudimpedansen og medført dårlig kontakt mellom elektroder og måleobjektet. I tillegg ble enkelte tumorer bearbeidet med hårfjerningskrem rett før monitorering. Dette førte til at huden har blitt ekstra ren og godt fuktet. Det må nevnes her at 3-5 dager etter bestråling ble huden til forsøksdyr en del tørrere sammenlignet med før og 1-2 dager etter bestråling; ifr Eksperiment 1-1 og 1-2. Enten det kan tyde på hudreaksjon som følge av barberingen og påvirkningen av saltvann eller på dermatitt ("dry

desquamation”, engelsk), som er en av tidlige reaksjonsformer på stråleterapi (Denekamp J. og Fowler J.F., 1965; Hendry J.H., 1980).

For å oppnå gode resultater i forsøk med bioimpedansmonitorering, må sensorer plasseres meget tett på et måleobjekt. Konfigurasjonen til fireelektrodessystemet er slik at den ga mulighet til å tilpasse avstanden mellom elektrodene til hver enkelt tumorstørrelse. Under alle de utførte forsøkene ble tumorer lett sammenpresset mellom to parallelle elektroder. Som nevnt i kapittel 4.1, ga ikke press-testen på erter noen svar på spørsmålet om hvordan systemet skulle oppføre seg under press. Styrken som ble brukt for å fikse elektroder kunne enten vært så stor at den kunne påvirke blodstrømmen i måleobjektet eller for svak, slik at det kunne oppstå luftrom i elektrode-vev overgangen. For å ta hensyn til dette ble det brukt et mekanisk trykk som hold tumoren fastklemt mellom to elektrodepar slik at den kunne ikke skli ut av målesystemet. Dette trykket var ikke så betydelig at det førte til deformering av tumoren.

Kroppstemperatur er en uhyre viktig parameter når det gjelder bioimpedansmonitorering siden den påvirker den elektriske ledningsevnen (Grimnes og Martinsen, 2000). Kroppstemperatur er regulert av blodstrøm mer nær hudoverflaten. På grynn av manglende fysisk aktivitet under sedasjonsperioden vil vaskulær perfusjon avta med tiden. Blodstrømmen i huden reduseres og forsøksdyrets kroppstemperatur synker etter hvert. Som følge av det vil blodstrømmen i tumorer som er implantert intradermalt bli påvirket. Måleperioden tok 15-20 min og stativet hvor musene ble plassert under målingene var dekket av bomullstoff. I tillegg ble alle dyr monitorert under romtemperatur, som ikke varierte mer enn ca. 2-3 °C. Det kunne da tenkes at svinginger i kroppstemperatur var ikke så store.

#### 5.1.4 Andre feilkilder.

Variasjoner i målinger på hver enkelt dyr kan bli påvirket av stabiliteten på elektrodeplassing og hudforberedelser i gjentatte prosedyrer.

For å unngå endringer i elektrodeposisjonering ble elektrodesystemet fiksert langs korteste akse under hver måling. Ved enkelte målinger kunne tumorens posisjon endres på grunn av forsøksdyrets bevegelser. Dette kan skyldes at musene responderte ulikt på anestesen, og dermed fikk kramper under monitorering. Huden til enkelte dyr trengte en spesiell behandling på grunn av stor antall hår i kontaktområde. Disse hårene ble fjernet med hjelp av hårfjerningskrem som har en fuktende effekt. Tumorer som ble bearbeidet med

hårfjerningskrem oppviste lavere verdier av impedansen, trolig fordi de ble fuktet ekstra godt i forhold til andre tumorer.

## 5.2 Diskusjon av resultater.

### 5.2.1 Diskusjon av resultater fra kalibreringstest.

Før eksperimentene på forsøksdyr startet, var det ønskelig å finne ut hvilke kvaliteter det aktuelle elektrodesystemet som ble brukt under målingene hadde. Figur 4.1 viser resultater fra kalibreringstesten fra studier utført med 4-elektrodessystem på fysiologisk saltvann, tørr luft og biologisk system (erter).

Kalibreringstesten med impedansmålinger utført på fysiologisk saltvann ga oss en mulighet til å påstå at det aktuelle elektrodesystemet var ganske stabilt i mesteparten av frekvensspekteret, særlig ved påført signal på 500 mV. Resultater fra impedansmålinger på tørr luft lå i intervallet fra  $10^8$ - $10^{10}$  Ohm for det lavfrekvente området. Impedansen, monitorert i tumorvev, befant seg i området fra  $10^5$  –  $10^6$  Ohm for fuktet hud til  $10^7$  –  $10^8$  Ohm for tørr hud. På bakgrunn av resultater fra kalibreringstest av bioimpedansverdier i luft kan vi anta at enkelte målinger i tumorer monitorert på tørr hud viste meget høye bioimpedansverdier på grunn av dårlig kontakt mellom elektrodepar og tumoren. Dette kan være forårsaket av hudens ujevnheter hos sårede dyr.

### 5.2.2 Diskusjon av resultater fra målinger på fuktete og tørre tumorer.

For å finne ut i hvilken grad bruk av forskjellige koblingsmedium kan påvirke resultater, ble det utført målinger på tørr hud og hud fuktet med henholdsvis fysiologisk saltvann og spring vann. Bruk av fuktighetsmidler leder til forbedring av elektrisk kontakt mellom elektroder og hud fordi lav ionekonsentrasjonsgradient mellom koblingsmiddel og vev reduserer bidraget fra hudimpedansen (Osterman K.S. *et al*, 2004). Bidraget fra hudimpedansen er i størrelsesorden 100 kOhm for tørr hud, men reduseres til 2-3 kOhm for med fuktet med fysiologisk saltvann (Jacobson B., 1995). Data for hudimpedansen i tilfellet med springvann ble ikke funnet.

Sammenligning av gjennomsnitts impedans- og faseverdier har vist at bruk av fuktighetsmiddel resulterer i betydelig reduksjon av den total målte impedansen. Størrelsesorden på  $|Z|$  for tumorer, monitorert på tørr hud lå i ca.  $10^7 - 10^8$  Ohm; for fuktete tumorer  $10^5-10^6$  Ohm.

Forskjellene mellom impedansverdier for behandlede tumorer og tumorer i kontroll dyr, hvor tumorene i begge målegrupper var fuktet med fysiologisk saltvann var betydelig mindre enn forskjellene mellom tumorer i kontroll dyr (fuktet med fysiologisk saltvann) og behandlede tumorer monitorert på tørr hud og på hud fuktet med springvann. En mulig årsak til disse forskjellene er bruken av dyr fra forskjellige grupper hvor tumorstørrelsene varierte betydelig fra gruppe til gruppe. Volumintervallet til tumorene som ble monitorert på tørr hud (Eksperiment 2-1: 381-1308 mm<sup>3</sup>) og på hud fuktet med springvann (Eksperiment 2-2: 235-1635 mm<sup>3</sup>) var mye større enn volumintervallet til både behandlede (Eksperiment 1-1: 192-1140 mm<sup>3</sup>) og kontrolltumorer (368-915 mm<sup>3</sup>) fuktet med fysiologisk saltvann.

Det kan også nevnes her at kontakten mellom hud og elektroder var så tett ved bruk av fuktighetsmiddel at under fjerning av elektroder fulgte huden med. I tillegg ga målingene på fuktet hud mange færre resultater med høyt støyinnhold, som måtte ekskluderes fra videre analyse.

Resultater fra forsøkene på tørr hud og huden, som ble bearbeidet med forskjellige koblingsmidler viser at den beste elektriske kontakten mellom elektroder og hudoverflaten som førte til betydelig reduksjon av bidraget fra hudimpedansen ble oppnådd ved målinger på fuktet hud.

### 5.2.3 Diskusjon av resultater fra målinger med 100 og 500 mV påført signal.

I Eksperiment 1-1 og 1-2 ble det benyttet 2 forskjellige nivåer av spenningforskjell (100 og 500 mV). Monitorering ble utført på tumorer hos forsøksdyr fra samme gruppe. Det betyr at tumorene hadde like store volumer og lik fasong. De har fått helt identisk strålebehandling og huden ble forberedt på liknende måte. Resultater fra Eksperiment 1-2 (100 mV) viser en utvikling som er identisk med resultatene fra Eksperiment 1-1 på dagene 1,3,5 og 10, men på dagene 8 og 12 kan det bli observert et betydelig avvik fra resultatene fra Eksperiment 1-1. Dag 12 for tumorer fra kontrolldyr viste signifikant lavere gjennomsnittsverdier av  $|Z|$  for

tumorer, monitorert med 100 mV påført spenning enn for tumorer fra kontroll dyr, monitorert med 500 mV.

Bode-plotts for tumorer, monitorert under 100 mV påført signal viste en betydelig andel støy, særlig i lavfrekvent område. På grunn av dette ble analysen av data utført på begrenset antall målinger. Siden mesteparten av støyen befant seg i lavfrekventområde både i kalibreringstest og i målinger på biologisk vev, så kan vi si at resultater fra eksperiment 1-2 (100 mV) er ikke helt representative og kunne ikke bli brukt ved sammenlikning med resultater fra andre forsøk.

### 5.2.4 Diskusjon av data fra bioimpedansmålinger på tumorer fra behandlede og kontroll dyr.

Studiene vist i Figur 4.3, 4.4, 4.5 og 4.6 er utført på tumorer i ubehandlede og behandlede dyr. Strålebehandling til alle dyr ble gitt som enkeltfraksjon på dag 2. Umiddelbart etter bestråling med 15 Gy viste mesteparten av tumorer enten en økning i tumorstørrelser eller liten reduksjon av tumorvekst. Reduksjon av tumorvekst kan bli forbinde med forsinkelse i celledeling, som er ca. 1,5 time per Gy (ifølge Yarmonenko S. og Vainson A, 2004).

I den første perioden ble det observert en betydelig økning av impedans- og faseverdiene hos dyr som fikk strålebehandling både på 5 og 15 Gy. Dette tyder på at det ble detektert et ødem. Ved ødem er balansen mellom ekstra- og intracellulærrom brutt ned. Celler er ikke i stand til å produsere nok energi for forsyning av ionepumper og membraner blir mer gjennomtrengelige. Ekstracellulærvæske strømmer inn i cellene, cellene øker i størrelsen og innvaderer ekstracellulærrom. Dette fører til reduksjon av lavfrekvente strømmer og som følge av dette økning av  $|Z|$  i lavfrekvent område.

Ved celledød i form av nekrose brytes cellemembraner ned. Intracellulærvæske lekker ut av cellene og dette fører til lett passasje av strømmer tvers gjennom tumoren. Under bioimpedansmonitorering fører økt andel væske i tumor til økning i ledningsevne.  $|Z|$  i lavfrekventområde reduseres.

Døde celler fjernes sakte, enkelte ganger kan denne prosedyren ta noen dager. 4-6 dager etter bestråling begynte tumorene å minske i størrelsen; det betyr at mesteparten av cellene døde og ble fjernet i akkurat denne perioden. Samtidig begynte en del nekrotisk vev å erstattes av fibrose som består mesteparten av kollagen. Kollagen er meget konduktivt.

Histologisk undersøkelse påviste høyest andelen fibrose hos tumorer behandlet med 15 Gy på dag 8 og 10. Ut fra figurene 4.3, 4.5 og 4.6 er det belegg for å hevde at meste parten av tumorene viste en reduksjon eller ingen økning av  $|Z|$  på dag 8/10, med unntak av resultater for tumorer fra Eksperiment 1-1 på dag 10.

Dag 10 for Eksperiment 1-1 viste en unormal høy gjennomsnittsverdi av  $|Z|$ . Dette var sannsynligvis forårsaket av ustabile forhold i strømmett siden det den aktuelle dagen ble observert mye dirring av bilde på PC skjermen. Støy i enkeltmålingene fra dag 10 var så dominerende at mesteparten av resultatene ble ekskludert fra den videre analysen. Gjennomsnittsverdien av  $|Z|$  ble beregnet ut fra resultater av målinger på 2 tumorer. Dette medfører en betydelig usikkerhet for resultater for denne dagen.

Videre bestemmes tumorvekst bare av hastigheten til celledeling av de levedyktige celler. I 1 Eksperiment var dyrene monitorert over 10 dager etter bestråling. Tumorer i Eksperiment 2-1 og 2-2 viser en tendens til å komme tilbake til sin størrelse igjen etter strålebehandling; de var overvåket over en lengre periode (13 dager) etter bestråling. Økning i antall nye celler som er ikke skadet av stråling resulterte i økning av impedansverdiene. Dag 15 (Eksperiment 2-1 og 2-2) viser en slik utvikling både for tumorer bestrålt med 15 og med 5 Gy.

Resultater fra Eksperiment 1-1 for tumorer fra kontroll- og behandlede dyr viser at de gjennomsnitt impedansverdiene som funksjon av tumorvolum for kontroll dyr var en del høyere enn impedansverdiene for behandlede dyr. Det samme gjelder faseverdier: faseverdier for behandlede tumorer var gjennomsnitt lavere for behandlede tumorer enn for tumorer fra kontroll dyr. Resultater fra histologisk undersøkelse viser at behandlede tumorer i gjennomsnitt hadde mye høyere nekrotisk fraksjon enn tumorer fra kontroll dyr. Det er dette som var årsaken til at like store tumorer fra gruppe mus som fikk behandling hadde impedans- og faseverdier som var lavere enn ubehandlede tumorer. Dette stemmer godt med teorien fordi økt nekrotisk fraksjon fører til reduksjon av impedansverdiene.

Sammenlikning av gjennomsnittlige bioimpedansverdier som funksjon av tumorvolum for dyr behandlet med 15 Gy fra Eksperiment 2-1 og kontrolldyr fra Eksperiment 1-1 lar seg ikke gjøre. Målingene i Eksperiment 2-1 var tatt på tørr hud og de kan inneholde betydelig høyere andel av hudimpedansen enn målingene fra kontrolldyr som var monitorert på fuktet med fysiologisk vann hud.

Til sist ble det sammenlignet gjennomsnitt impedansverdier for behandlede med 5 Gy tumorer fra Eksperiment 2-2 og verdier fra tumorer i kontroll dyr (Eksperiment 1-1). Det ble



observert at like store tumorer gjennom forsøket som hadde utviklet lik nekrotisk fraksjon (se mer om dette i Kapittel 5.4), viste høyere impedans- og faseverdier for tumorer i behandlede dyr enn tumorer i kontroll dyr. Det kan være flere årsaker til dette. For det første, høyere verdier av impedans for behandlede tumorer kan skyldes at huden til disse dyrene ble en del tørrere etter strålebehandling og barbering. For det andre, høye verdier av impedans kan også skyldes at under bioimpedansmonitorering av behandlede dyr i Eksperiment 2-2 ble det brukt som koblingsmiddel springvann, mens for kontroll dyr ble fysiologisk saltvann benyttet. Det ble ikke funnet informasjon i litteratur som omhandler hvilket nivå av hudimpedansen forventes med springvann som koblingsmiddel.

### 5.3 Variasjon i tumorvolum.

Figur 4.7 presenterer volumintervallet til tumorene som ble benyttet i de ulike forsøkene. Alle dyr ble inndelt i 4 grupper, som hadde betydelige variasjoner i tumorstørrelser. I Eksperiment 1 (1-1 og 1-2) og i Eksperiment 2 (2-1 og 2-2) ble det benyttet dyr fra forskjellige forsøksgrupper. Det vil si, dyrene var bestilt og fikk implantert xenografter på forskjellige tidspunkter (januar og april 2006 henholdsvis). Variasjoner i tumorvolum er en indikasjon på morfologiske og /eller fysiologiske forskjeller. I tillegg, kan tumorer med likt histogenese vise individuelle variabler i veksthastighet. For implanterte musetumorer kan den variere i 25-80% (Yarmonenko S. og Vainson A., 2004).

Figuren 4.7 illustrerer at volumene til tumorene fra kontroll dyr var betydelig mindre enn tumorvolumer for tumorer fra dyr, som fikk behandling. Tumorer fra kontrollgruppen ble monitorert med bioimpedansmetode i slutfase av forsøket fordi de trengte mer tid for å vokse til ønsket størrelse (10 mm på den korteste siden). Det betyr, at de hadde den lengste tiden til å vokse. Siden volumstørrelsene til tumorene fra kontroll dyr var de minste, så betyr det at disse tumorene hadde den laveste veksthastigheten. Tumorer som vokser sakte har mye mer tid på seg for å utvikle nytt system av blodårer. Dette kan føre til tilfredsstillende perfusjon og diffusjon gjennom årevegger. Slike tumorer utvikler akutt og kronisk hypoksi i mindre grad enn tumorer som vokser raskt.

En annen viktig grunn til at det ble ikke benyttet større tumorer i forsøkene på behandlede dyr var at etter krav fra Forsøksdyrutvalget måtte tumorstørrelsen ikke overstige en verdi på 20 mm på den lengste siden. I tillegg viste enkelte av musene reduksjon i sin egen vekt, og de ble mer passive og apatiske. Dette begynte å bli plagsomt for musene og i strid med etiske normer.

## 5.4 Betydningen av nekrose.

I områder omfattet av nekrose vil det være store ekstracellulære rom som fylt av cellefragmenter, døde celler og acidofil cytoplasma. Økning i transittarealet medfører en enklere passasje av elektriske strømmer under bioimpedansmonitorering og reduksjon av  $|Z|$  i lave frekvenser.

Sammenligning mellom histologiske resultater og data fra bioimpedansmålinger har vist at det er en sammenheng mellom  $|Z|$  og nekrotisk fraksjon. Økning i prosentandel av tumorvev som ble omfattet av nekrose medførte reduksjon av impedansverdiene både for tumorer i behandlede og kontroll dyr.

Høyest gjennomsnittsverdi av nekrotisk fraksjon hadde tumorer som ble bestrålt med singel stråledose på 15 Gy. Forskjellen som ble funnet mellom gjennomsnittsverdi av nekrotisk fraksjon for tumorer bestrålt med 5 Gy (39,99 %) og kontroll dyr (39,65 %) var ubetydelig. Tumorrespons etter singeldose bestråling er i betydelig grad bestemt av den cellulære strålefølsomheten. HT-29 cellelinje er en av de mest stråleresistente blant kolorektalkreft cellelinjer (Leith *et al*, 1991, Dunne *et al*, 2003, Yarmonenko S. og Vainson A., 2004). I Dunnes forsøk på å finne sammenheng mellom strålefølsomhet, stråleindusert apoptose og DNA skade/reparasjon i human kolorektalkreft celler viste HT-29 cellelinje ingen signifikant effekt av singel stråledose på 5 Gy og apoptotisk respons var svært liten (Dunne *et al*, 2003). Overlevelsesfraksjon for celler fra HT-29 er  $SF_{2Gy}=0,73$  (Yarmonenko S. og Vainson A., 2004) Alt dette kan tyde på at celler fra HT-29 har meget høy reparasjonsevne. Singel stråledose på 5 Gy kan derfor være for lavt til å påføre svulsten massiv celledød og følgelig vil behandlede tumorer med 5 Gy ikke oppvise forskjeller i ledningsevnen under bioimpedansmonitorering. Konsekvensene av dette vil bli nærmere diskutert i Kapittel 5.5.

Siden alle tumorer hadde forskjellige former og elektroder alltid var plassert langs korteste akse, spilte beliggenhet av nekrose en viktig rolle. For å gi størst utslag på måleresultatene måtte nekrose befinne seg i områder med høy sensitivitet (mellom to elektroder). Histologisk undersøkelse hadde påvist at vanligvis var nekrotiske områder konsentrert i sentrum av tumoren.

## 5.5 Sammenligning av resultater fra bioimpedansmonitorering med resultater fra histologisk undersøkelse og tumorvolum.

I denne oppgaven skulle det bli undersøkt hvordan bioimpedans kan korreleres til morfologi og fysiologi for ubehandlet tumorvev. Det skulle også undersøkes hvorvidt bioimpedans kan benyttes til tidlig monitorering av terapirespons i xenografter fra endetarmskreft. De elektriske egenskapene til vevet kan variere med histo-patologiske forskjeller og med forskjeller i tumorstørrelse under strålebehandling av tumorer. På bakgrunn av kunnskap om til forandringer i impedans- og faseverdier for tumorvev etter stråleterapi kan effektiviteten til den valgte behandlingen for hvert enkeltindivid studeres på veldig tidlig stadium i behandlingsforløpet.

### 5.5.1 Sammenligning av $|Z|$ og nekrotisk fraksjon.

Nekrotiske prosesser i vevet kan forekomme som resultat av 2 forskjellige prosesser i tumorvevet. I den første prosessen fører oksygenmanglende forhold (akutt og kronisk hypoksi) til celledød, som blir årsaken til lav celletetthet i slike områder og i den andre prosessen, celledrap som følge av stråling. Nekrose assosieres med degradering av cellemembran, irreversible forandringer i cellenes indre homeostase, endring i ionekonsentrasjon og forandringer i energiproduksjon. Alle disse prosesser fører til økt prosent væske i nekrotiske områder og som følge, økt transitt areal (ekstracellulær rom) for lavfrekvente strømmer under bioimpedansmonitorering (Scourou C *et al*, 2004). Det fører til reduksjon av  $|Z|$  i tumorvev i områder med høyere nekrotisk fraksjon siden ledningsevnen i disse områder er mye bedre enn i områder som er ikke omfanget av nekrose.

Ut fra Figuren 4.11 som presenterer sammenheng mellom  $|Z|$  og nekrotisk fraksjon for behandlede og ubehandlede tumorer fra HT-29 kan det hevdes at denne antakelsen gjelder for både behandlede og ubehandlede tumorer. Alle grupper dyr viser en reduksjon av impedansverdiene med økende prosentandel nekrotiske vev i tumorer.

Disse resultater støttes av studier utført av (Haemmerich *et al*, 2003) og (Scourou *et al*, 2004). Ved hjelp av bioimpedansmålemetode klarte de å påvise reduksjon av impedansverdiene i nekrotiske områder.

Som ble beskrevet i teorien er måling av bioimpedans i stand til å differensiere mellom normal og behandlet tumorvev. Stråleterapien induserer forskjellige skadeeffekter i tumorvevet som reflekteres i forandringer av vevets elektriske egenskaper. Respons etter strålebehandling påvirkes av en rekke forskjellige faktorer, som blant annet er dose, doserate, cellulær strålefølsomhet, samt tumorfysiologiske faktorer. Avlevering av stråling i form av singel dose forsterker stråleskader og dermed effekten av stråleterapi. I denne oppgaven ble det brukt 3 forskjellige dosenivåer – 0, 5 og 15 Gy. Derfor kunne det forventes at impedansverdiene fra tumorer ikke bare påviste  $|Z|$  avhengighet av nekrotisk fraksjon, men at de også viste klare forskjeller mellom hverandre avhengig av dosen de har fått.

Figuren 4.12 a) viser at impedansverdiene for tumorer bestrålt med 15 Gy og korrigert for tumorstørrelse ligger en del lavere enn impedansverdier for kontrolltumorer. Dette kan bety at forskjeller i impedansverdier mellom behandlede og ubehandlede tumorer kan være forårsaket av prosesser som foregår i vevet som lever (ikke nekrotisk). Det kan forklares ved at en singel stråledose på 15 Gy medfører at blodkarsystemet i tumor kollapse. Endotelcellelag som er omgitt av en basalmembran er byggekomponent i årevegger. Påviste impedansforskjeller kan være avhengige av hvordan blodceller og celler i årevegger responderte på bestråling.

Figur 4.12 b) viser at impedansverdier for tumorer bestrålt med 5 Gy tumorer og korrigert for korrigert for tumorstørrelse ligger en del høyere enn impedansverdier for kontrolltumorer. Forholdet mellom behandlede og kontrolltumorer var helt motsatte enn i tilfelle med 15 Gy og kontrolltumorer. Dette kan være forårsaket av mange forskjellige grunner, som blant annet, forskjellig måte å forberede huden på (fysiologisk saltvann og springvann). I tillegg stammet dyr som ble brukt i de 2 eksperimentene fra 2 ulike forsøksgrupper (januar og april 2006) og kunne respondere forskjellig på behandlingen.

### 5.5.2 Sammenligning av $|Z|$ og tumorvolum.

I følge teorien er det ikke bare fysiologiske, men også morfologiske egenskaper som spiller betydelig rolle i forandringer av bioimpedans. Vevets elektriske egenskaper varierer for tumorer med forskjellig størrelse og fasong. Det ble foreslått av Jossinet (Jossinet et al, 2002) at bioimpedansverdiene kan bli påvirket av tumorstørrelse. Det ble påpekt at økning i volum skulle kunne resultere i reduksjon av impedansverdiene.

Figur 4.14 a) og b) viste en helt annerledes utvikling av impedansverdierkorrigert for tumorstørrelse som funksjon av tumorvolum. Det ble påvist en økning i impedansverdier med økende volum for alle 3 grupper tumorer. For å forklare en slik utvikling må man ta i betraktning to ting: sensitivetsfordelingen som funksjon av avstanden fra ringelektroder og plassering av sensorer. Det at alle tumorer ble monitorert langs korteste akse betyr at betydelig økning i tvernsnittareal ikke kunne ha betydelig innflytelse på  $|Z|$  fordi områder fjernt fra sentrum av tumor opphold seg i sone med lav sensitivitet. På denne bakgrunn kan man formode at avstanden mellom sensorene (b-kortest målt diameter) hadde størst betydning ved en slik plassering av elektroder. Det kan tenkes at plassering av elektroder langs a-aksen (lengst målt diameter) kunne vise en helt annerledes utvikling.

Som ved sammenlikning av  $|Z|$  og nekrotisk fraksjon, ble de laveste verdier av impedansen påvist av tumorer, behandlet med 15 Gy singeldose. Årsaken til dette kan være at disse tumorene hadde den høyeste prosentandel nekrotisk vev i tumor. Tumorer som fikk behandling på 5 Gy hadde påvist impedansverdier som var betydelig høyere enn tumorer fra kontrolldyr. Årsakene til en slik utvikling ble beskrevet i Kapittel 5.5.1.

## 5.6 Forslag til videre arbeid.

Det er i denne studien utført bioimpedansmålinger på tumorer som ble behandlet med 2 forskjellige dosenivåer: 5 og 15 Gy. Det ble også tatt målinger på kontrolldyr. Tumorer som ble bestrålt med 5 Gy stråledose var forberedt på en annen måte enn tumorer fra kontrollgruppen og tumorer bestrålt med 15 Gy. Huden til dyr, som fikk strålebehandling med dose på 5 Gy ble fuktet med springvann, mens huden til dyr i de andre gruppene (0 og 15 Gy) ble fuktet med fysiologisk saltvann. Varierende forsøksbetingelser begrenser hvilke konklusjoner som kan trekkes på bakgrunn av denne studien. Det ville derfor være gunstigere å utføre en liknende eksperiment med dyr, som ble behandlet med singel stråledose på 5 Gy og monitorert på hud, fuktet med fysiologisk saltvann, det vil si likt tumorer i de andre forsøkene.

Måling av bioimpedans i forbindelse med behandling av kreft er ennå lite utforsket. Det kunne være interessant å se på hvilke konsekvenser bioimpedansdata kunne fått om stråledosen var gitt fraksjonert. Siden HT-29 cellelinje er en av de mest stråleresistente blant kolorektale cellelinjene, så hadde det vært interessant å monitorere forandringer i elektrisk ledningsevne for tumorer fra mer strålefølsomme kolorektal cellelinjer, som for eksempel SW48. Det ville gi oss mer informasjon om hvordan økende andel av celler som inngår i apoptose etter strålebehandling gjenspeiles i resultater fra bioimpedansmonitorering.

I dette prosjektet ble benyttet endetarms xenografter som et modellsystem for humane tumorer. Det ble funnet ut at bioimpedans monitoreringsmetode var i stand til å registrere elektrokjemiske prosesser i vevet som gjenspeilte morfologiske og fysiologiske forandringer i tumorer induisert av stråleterapi. Dersom monitorering av bioimpedans også reflekterer forandringene i humane tumorer, vil dette være en billig non-invasiv metode som kan bidra til å forbedre diagnostikk av kreft samt individualisering av kreftbehandling. Muligheten til dette bør derfor undersøkes i omfattende kliniske forsøk.

## Kapittel 6 Konklusjon.

Konklusjonen starter der hvor forfatteren er blitt lei av å tenke.

- Maxima Maca

Målsetningen med dette prosjektet har vært å undersøke hvordan bioimpedans kan korreleres til morfologiske og fysiologiske forandringer i ubehandlet tumorvev og om denne non-invasive måleteknikken kan benyttes til tidlig monitorering av stråleterapierespons i tumorer fra HT-29 kolorektal cellelinje implantert i mus (xenograftmodell).

Sammenligninger av data fra bioimpedansmålemetode med data fra histologisk undersøkelse og tumorvolum har gitt følgende resultater:

- Forandringer i impedans- og faseverdier over tid i hos behandlede og kontrolldyr er forenelig med prosesser som ødem, inflammasjon og nekrosen i vevet.
- Det er funnet en korrelasjon mellom  $|Z|$  og nekrotisk fraksjon på enkelttumornivå. Resultater fra sammenligningen viser at det er en tendens til at høy  $|Z|$  korrelerer med lav nekrotisk fraksjon både for tumorer fra behandlede og kontrolldyr.
- Resultater viser en omvent korrelasjon mellom  $|Z|$  og tumorvolum enn det var forventet etter at impedansverdiene ble korrigerert til tumorstørrelse. Det viste seg at høy  $|Z|_{\text{kor}}|$  korrelerte med høy tumorvolum. Dette skyldes sannsynligvis at ved plasseringen av elektroder langs korteste akse har målesystemet lav sensitivitet i de mer perifere områdene og at dette har spilt en betydelig rolle for målingene.

Ut fra alt som ble nevnt ovenfor kan bioimpedansmonitoreringsmetode karakteriseres som en vellykket måleteknikk for å detektere morfologiske og fysiologiske forandringer i tumorvev fra HT-29 forårsaket av stråleterapi under visse betingelser. Det må sikres en meget god kontakt mellom elektroder og måleobjekt ved hjelp av koblingsmiddel og målingene må utføres ved optimal verdi av påført signal (ca.500 mV).

## Bibliografi

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., "Molecular Biology of the cell", 4 edition, Garland Science, New York, 2002.

Antonov V., Chernish A., Pasechnic V., Voznesenskiy S., Kozlova E., "Biofysikk" (tittelen er oversatt fra russisk) Vldos, Moskva, 2003

Attix F.H., "Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry", John Wiley and sons, Canada, 1986.

Bjålie J.G., Haug E., Sand O., Sjaastad Ø.V., Toverud K.C., "Menneskekroppen. Fysiologi og anatomi", Gyldendal Norsk Forlag AS, Oslo, 2000

Brown J.M, Giaccia A.J., "The unique physiology of solid tumors: Opportunities and problems for the cancer therapy", Cancer research, 5863-5870, 1999.

Chencov Y.S, "Innføring i cellebiologi" (tittelen er oversatt fra russisk språk), Akademkniga, Moskva, 2004

Cope F.W. "A medical application of the Ling Association-Induction Hypothesis: The high potassium, low sodium diet of the Gerson cancer therapy", Physiol Chem Phys, , № 10(5), 465-468, 1978.

Davis G.L., Maggioni M., Warner F.J., Geshwind F.B., Coppi A.C., DeVerse R.A., Coifman R.R., "Hyper-spectral analysis of normal and malignant colon tissue microarray sections using a novel DMD system.", Tilgjengelig fra: <http://www.math.yale.edu/-mmm82/> (hentet 07.mars 2006)

Denekamp J. and Fowler J.F., "Further investigations of the response of irradiated mouse skin", Int J Rad Biol, Vol.10, № 5, 435-441, 1965

Dunne A.L., Price M.E., Mothersill C., McKeown S.R., Robson T., Hirts D.G., "Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells", British Journal of Cancer, № 89, 2277-2283, 2003



Fogh J, Trempe G. "New human tumour cell lines. In Human Tumour Cells in vitro", Fogh J (ed), pp 115-141, New York: Plenum Press, 1975

Foster K.R., Schawn H.P., "Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review", Critical Reviews in Biomedical Engineering, vol. 17, № 1, 25-104, 1989.

Gersing E., Kelleher D.K., Vaupel P., "Tumour tissue monitoring during photodynamic and hyperthermic treatment using bioimpedance spectroscopy", Physiological Measurement, № 24, 625-637, 2003

Glickman Y.A., Filo O., David M., Yayon A., Topaz M., Zamir B., Ginzburg A., Rozenman D., Kenan G., "Electrical impedance scanning: a new approach to skin cancer diagnosis", Skin Research and Technology, № 9, 262-268, 2003

Graeber T.G., Osmanian C., Jacks T., "Hipoksia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours", Nature, № 379, 88-91, 1999.

Gray L.H., Conger A.D., Ebert M., Hornsey S., Scott O.C. "Concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy", Brit J Radiol, № 26, 638-648, 1953

Grimnes S., "Impedance measurement of individual skin surface electrodes.", Medical and Biological Engineering and Computing, № 21, 750-755, 1983

Grimnes S., Martinsen Ø.G., "Bioimpedance and bioelectricity basis", Academic press, NY, 2000

Gupta D., Lammersfeld C.A., Burrows J.L., Dahlk S.L., Vashi P.G., Grutsch J.F., Hoffman S., Lis C.G., "Bioelectrical impedance phase angle in clinical practice: implications for prognosis in advanced colorectal cancer", Am J Clin Nutr, № 80, 1634-1638, 2004

Gupta D., Lis C.G., Dahlk S.L., Vashi P.G., Grutsch J.F., Lammersfeld C.A., "Bioelectrical impedance phase angle as a prognostic indicator in advanced pancreatic cancer", British Journal of Nutrition, № 92, 957-962, 2004

Hall E.J., "Radiobiology for the radiologist.", 5 edition, Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2000

Hendry J.H., "Analysis of the Steepness of the Dose-Incidence Curve for Necrosis in Mouse Tails after a Multifraction X-ray Schedule", Radiation Biology, № 134, 757-762, 1980

Holash J., Maisonpierre P.C., Compton D. "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF", Science 1999; 283: 1994-1998.

Ivorra A., "Bioimpedance Monitoring for physicians: an overview.", Centre Nacional de Microelectronica, 2002

Jacobson B., "Medicin och teknik", 4 upplagan, Studentlitteratur, Lund, 1995

Kastan M.B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R.W., "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage.", Cancer research, № 51, 6304-6311, 1991

Kauppinen P.K., Hyttinen J.A.K., Kõõbi T., Kaukinen S., Malmivuo J., "Computer modeling and lead field theory in the analysis and development of impedance cardiography". Tilgjengelig fra <http://www.ijbem.org/volume2/number2/kauppinen/paper.htm> (hentet 19.juni 2006)

Kauppinen P.K., Hyttinen J.A.K., Malmivuo J., "Sensitivity distribution visualizations of impedance tomography measurement strategies", International Journal of Bioelectromagnetism, Vol.8, № 1, 2006

Khan F.M. "The physics of radiation therapy", 3-d edition, Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2003

Kreftforeningen. Kreftsykdommer: tarmkreft (online). Tilgjengelig fra: [http://kreftforeningen.no/dt\\_main\\_allatonce.asp?gid=2519](http://kreftforeningen.no/dt_main_allatonce.asp?gid=2519) (hentet 27.jan 2006)

Kreftregisteret (institutt for populasjonsbasert kreftforskning). Tykk- og endetarmkreft. (online). Tilgjengelig fra: <http://www.kreftregisteret.no/ramme.htm> (hentet 27.jan 2006)

Lee B.R., Roberts W.W., Smith D.G., Ko H.W., Epstein J.I., Lecksell K., Partin A., "Bioimpedance: novel use of a minimally invasive technique for cancer localization in the intact prostate", *The Prostate*, № 39, 213-218, 1999

Lee J.M., Berstein A., "p53 mutations increase resistance to ionizing radiation.", *Proc Natl Acad Sci, USA*, № 90, 5742-5746, 1993

Leith J., Faulkner G., Papa P., Michelson S., "In vitro radiation survival parameters of human colon tumour cells", *Int Journal Radiat Oncol Biol Phys*, № 20, 203-206, 1991

Ling G.N., Ochsenfeld M.M. "Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> levels in living cells: Do they depend on the rate of outward transport of Na<sup>+</sup>?", *Physiol Chem Phys*, , № 8, 389,1976

Malinen E. Forelesningsnotater til "Dosimetri", 2005.

Martinsen Ø.G., Grimnes S., Mirtaheri P., "Non-invasive measurements of post-mortem changes in dielectric properties of haddock muscle – a pilot study", *Journal of Food Engineering*, № 43, 189-192, 2000

Martinsen Ø.G., Grimnes S., Schwan H.P. "Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue", *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, Marcel Dekker, 2643-2652, 2002

Martinsen Ø.G., Grimnes S., Sveen O. "Dielectric properties of some keratinised tissues. Part 1: Stratum corneum and nail in situ", *Medical and Biological Engineering and Computing*, № 35, 172-176,1997

Moulder J.E., Rockwell S. "Tumor hypoksia: its impact on cancer therapy", *Cancer Metastasis Rev*, №5, 313-341, 1987.

Nagasawa H., Keng P., Harley R., Dahlberg W., Little J.B., "Relationship between gamma-ray-induced G2/M delay and cellular radiosensitivity.", *Int J Radiat Biol*, № 66, 373-379, 1994

Nias A.H.W. "An introduction to Radiobiology", 2-nd edition, John Wiley and sons, England, 2000.

Osterman K.S., Hoopes P.J., DeLorenzo C., Gladstone D.J., Paulsen K.D., "Non-invasive assessment of radiation injury with electrical impedance spectroscopy", *Physics in Medicine and Biology*, № 49, 665-683, 2004.

Pathology lectures from Donetsckij University, Ukraina (tittelen er oversatt fra russisk). Tilgjengelig fra <http://www.pathology.dn.ua/Lectures/Necrosis.shtml/> (hentet 11.april 2006)

Pethig R., "Dielectric and electronic properties of biological materials.", John Wiley, Chichester, 1979

Pettersen E.O., Forelesningsnotater til "Cellulær radiobiologi", 2005

Piperno G., Frei E.H., Moshitzky M., "Breast cancer screening by impedance measurements.", *Front Med Biol Eng*, № 2, 111-117, 1990

Playle L.C., Hicks D.J., Qualtrough D., Paraskeva C., "Abrogation of the radiation-induced G2 checkpoint by the staurosporine derivative UCN-01 is associated with radiosensitisation in a subset of colorectal tumour cell lines.", *British Journal of Cancer*, № 87, 352-358, 2002

Podgorsak E.B. "Review of Radiation Oncology Physics: A handbook for Teachers and Students", *Journal of Applied Clinical Medical Physics*, №3, 71-74, 2004

Remizov A., Maksina A., Potapenko A., "Medisinsk og biofysikk" (tittelen er oversatt fra russisk) Drofa, Moskva, 2004

Rockwell S. "Use of hypoxia-directed drugs in the therapy of solid tumors", *Semin Oncol*, №19, 29-40, 1992.

Rodrigues NR, Rowan A, Smith MEF, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. "p53 mutations in colorectal cancer", *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 7555-7559, 1990.

Rossi-Fanelli F., "Abnormal substrate metabolism and nutritional strategies in cancer management", *Journal Parenter Enteral Nutr*, Nov-Dec;№ 15(6), 680-3,1991.

Scharfetter H., "Structural modeling for impedance-based non-invasive diagnostic methods.", Thesis for the habilitation, Technical University Graz, 1999

Schwan H., "Electrical properties of tissue and cell suspensions.", *Advances in Biological and Medical Physics*, Academic press, NY, 147-209, 1957

Schwan H.P. "Determination of biological impedances", *Physical techniques in biological research*, Vol.6, Academic press, NY, 1963

Schwan H.P. og Ferris C.D., "Four-electrode null techniques for impedance measurement with high resolution", *The review of scientific instruments*, Vol.39, № 4, 481-485, April 1968.

Seeger P.G., Wolz S. "Successful Biological Control of Cancer: By Combat Against the Causes", 1990.

Skourou C., Hoopes P.J., Strawbridge R.R., Paulsen K.D., "Feasibility studies of electrical impedance spectroscopy for early tumor detection in rats", *Physiological Measurement*, № 25, 335-346, 2004

Steinsvold I., Grotmol T., Glatte E., "Tykktarm - og endetarmkreft – utvikling fra 1956-1995: status i Telemark og bydelene i Oslo og ny masseundersøkelse i 1999", *Norsk Epidemiologi*, №8, 37-43, 1998.


Suroviec A.J., Stuchly S.S., Barr J.R., Swarup A., "Dielectric properties of breast carcinoma and the surrounding tissues.", *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, № 35, 257-263, 1988

Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M., Nakamura Y., Whyte R., Smith A.M.M., Bos J.L., "Genetic alternations during colorectal-tumor development.", *N Engl J Med*, № 319, 525-532, 1988

Webster J.G. "Electrical impedance tomography.", Adam Hilger, Bristol, 1990

Åberg P., Nicander I., Ollmar S., "Minimally invasive electrical impedance spectroscopy of skin exemplified by skin cancer assessments", *IEEE*, № 3, 3211-3214, EMBC, 2003

## Vedlegg A: Søknad om tillatelse til dyreforsøk.

	Forsøksdyrutvalget, P.b. 8147 Dep, 0033 Oslo Telefon / Telefax: 23216584 / 22856501 e-post: <a href="mailto:fd�@dyrehelsetilsynet.no">fd�@dyrehelsetilsynet.no</a> www.fdu.no	Utvalgets ref.:
SKJEMA TIL BRUK VED SØKNAD OM TILLATELSE TIL Å UTFØRE FORSØK MED DYR. (Eksempel på utfylling: Se www.fdu.no)		
Type søknad: <input type="checkbox"/> Nytt forsøk <input type="checkbox"/> Pilotforsøk <input type="checkbox"/> Videreføring/endring <input type="checkbox"/> Blokk søknad <input type="checkbox"/> Feltforsøk		

**Til bruk for ansvarshavende ved forsøksdyravdelingen:**

Feltforsøk: Angi, så godt som mulig, sted/område hvor forsøket skal gjennomføres

Navn på institusjon hvor forsøket er planlagt gjennomført:	Avdelingens nr.: 32
Ansvarshavende: Lena Kjempengren	Avdelingens refereransnr.:
Adresse: Det Norske Radiumhospital, Dyreavdelingen Montebello	102-06
Postnummer: 0310                      Sted: Oslo	Telefon: 22 93 56 45
e-postadresse: lenak@ulrik.uio.no	Telefax: 22 93 56 44

Type forsøk (A-F): E	Brukes anestesi/analgesi? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nei	Start (måned/år): 02/06	Slutt (måned/år): 06/06
Art og type forsøksdyr*: GBNIH nude mus	Antall dyr 20	Antall dyr ved gjenbruk, jfr. forskriftens § 15:0	Er søknaden helt eller delvis fortrolig? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nei
Er lignende forsøk utført tidligere ved avdelingen? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nei	Er lignende forsøk utført tidligere av forskeren? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nei	Er prosjektleders kompetanse iht. Landbruksdepts krav? <input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nei	
EK-statistikk (fylles også ut for feltforsøk):			
Tab. 1 (kilde):	Tab. 2 (formål): 2.1	Tab. 3 (utdyper 2.4):	Tab. 4 (sykdom): 4.1
			Tab.: 5 (iht lovverk) 0

\* For hund og katt skal individnummer angis:

- Godkjent Kopi oversendes utvalget.
- Avslått/videresendt forsøksdyrutvalget for avgjørelse. Begrunnelse for avslag skal legges ved.
- Videresendt forsøksdyrutvalget for avgjørelse. Begrunnelse for videresendelse skal legges ved.

Dato godkjent: 23.januar2006  
sendt FDU:

Dato godkjenning utløper: 1.juli 2006

Dato

Ansvarshavendes underskrift:

Prosjekttype, egenerklæring:

Institutt-rådet ved DNR har pr. 1. juli 2004 vedtatt nye priser for oppdragsforskning og samarbeidsprosjekter med eksterne parter. All oppdragsforskning og samarbeidsprosjekter skal administreres av Forskningsstiftelsen.

Definisjoner:

**A: Internt prosjekt;** Ingen eksterne interesser involvert.

**B: Samarbeidsprosjekt;** Forsøk som gjennomføres for og finansieres av ekstern samarbeidspartner og hvor resultatene eies av forskeren som gjennomfører prosjektet.

**C: Oppdragsforskning;** Forsøk som utføres på oppdrag fra ekstern samarbeidspartner og hvor resultatene tilhører samarbeidspartneren.

Priser:

	Samarbeidsprosjekt	Oppdragsforskning
Egenavlede nude mus, pr. dyr:	250,-	400,-
Mus, oppstalling pr. bur/uke	30,-	40,-
Egenavlede nude rotter, pr. dyr:	350,-	500,-
Rotter, oppstalling pr. bur/uke	35,-	45,-
Eksterne mus, oppstalling pr. bur/uke	30,-	40,-
Eksterne rotter, oppstalling pr. bur/uke	35,-	45,-

### Egenerklæring:

**Jeg erklærer med dette at dette prosjektet er et:**

A. Internt prosjekt **X**

B. Samarbeidsprosjekt

Sett X der det passer

C. Oppdragsprosjekt

*Dato:*

*Signatur:*



**Til bruk for søkeren:****1. Opplysninger om søkeren (prosjektleder).**

Navn og stilling: Kathrine Røe, Student Svetlana Stoknes, Student	Arbeidssted og adresse: Strålingsbiologi v/ Dag Rune Olsen, Radiumhospitalet Montebello 0310 OSLO	Tlf.: 92437646/90055289/22935071	
		Fax:22934607	
Utdannelse: Masterstudenter i medisinsk signalbehandling og biofysikk/medisinsk fysikk.		E-post: <a href="mailto:kathrr@stud.ntnu.no">kathrr@stud.ntnu.no</a> <a href="mailto:svetlanastoknes@hotmail.com">svetlanastoknes@hotmail.com</a>	
Erfaring med tilsvarende forsøk: <input type="radio"/> Nei	Gjennomgått kurs i forsøksdyrlære: <input type="radio"/> Ja		
Erfaring med denne dyreart: Nei	Kurssted Universitetet i Oslo	Kursnavn Forsøksdyrlære	Kursår 2006
Andre medarbeidere som skal arbeide med dyrene:			
Navn	Stilling og utdanning	Kurs i forsøksdyrlære	Kontakttelefon
Therese Seierstad	Stipendiat	<input type="radio"/> Ja	22935071
Marita Martinsen	Avd. ingeniør tumorbiologi	<input type="radio"/> Ja <input type="radio"/>	22935412

**2. Offentlighet (se vedlagt veiledning)**

Inneholder søknaden opplysninger av konfidensiell art og som ikke er egnet til offentliggjørelse?

Nei

I tilfelle ja, legg ved en kort begrunnelse om hvorfor og hvilke opplysninger som ønskes unntatt offentlighet.

**3. Generelle opplysninger****Oppgi forsøkets arbeidstittel:**

A) Bioimpedans og monitorering av behandlingsrespons.

B) In vivo MR spektroskopi og MR diffusjon for evaluering av behandlingsrespons.

Skriv to setninger som beskriver forsøket, beregnet på offentliggjøring (arkivbeskrivelse, årsrapport):  
Det skal utføres bioimpedansmålinger og MR-opptak på mus med implantert tumor for en gruppe mus med strålebehandling og en gruppe uten behandling.

Forsøkets varighet i dager/måneder: 5 måneder	Planlagt start (måned/år): Februar 2006	Planlagt slutt (måned/år): Juni 2006	Varigheten for det enkelte dyr i timer eller dager: 30 dager
--	--	---	---

**4. Karakteristikk av de valgte dyr:**

Dyreart	Linje/stamme	Kjønn	Alder/vekt	Antall dyr som behøves:
Mus	GBNIH nude mus	♂	20-25gram	20

Antall dyr ved gjenbruk, jfr. forskriftens § 15:	
Forventes noen ufysiologisk tilstand hos dyrene som følge av behandling/genmodifikasjon (reproduksjonsproblemer, CNS symptomer, nedsatt immunforsvar, alopeci) Nei.	
Hvilke tiltak skal evt iverksettes/anbefales. Bløte foret, fore dem i forkopp i strø i stedet for i krybbe, avlive dyr, tørke øyne hver dag, redusere lyset i rommet. skru temperaturen opp/skru temperaturen ned, "handle with special care" osv.  Ingen spesielle tiltak.	
<b>Genmodifiserte dyr:</b> <input type="radio"/> Ja <input checked="" type="radio"/> Nei	
Skal dyrene avles ved institusjonen?	<input checked="" type="radio"/> Ja <input type="radio"/> Nei
Dato meldt fra til Sosial og helsedirektoratet:	
Dato meldt fra til Direktoratet for naturforvaltning (kun transport)	

## 5. Begrunnelse for valg av dyremodell

Begrunn valget av den aktuelle dyremodell, jfr. forskriftens § 8 – dyreart, linje, spesielle egenskaper, genmodifikasjoner:

Metodikken med å dyrke disse kolorektale cellelinjene som subcutane tumorer på mus er en etablert teknikk og vil gi oss informasjon som man ikke vil kunne oppnå ved eksperimentelle studier *in vitro*.

## 6. Alternativer til dyreforsøk

Det forutsettes alltid at alternative, vitenskapelig tilfredsstillende, metoder til bruk av levende dyr er vurdert. Redegjør for hvilke alternativer som måtte foreligge, hvorfor disse er forkastet, sett i lys av de 3 R-er:

**Erstatning:**

I MR spektroskopi får man informasjon om den biokjemiske sammensetningen i et utvalgt volumelement, og forandringer i denne under behandling. Denne sammensetningen er et resultat av metabolske prosesser som finner sted i kroppen. MR diffusjon gir ytterligere informasjon ved at man får kunnskap om diffusjonsegenskapene i tumor og mellom tumor og omliggende vev.

Fysiologi følges underveis og man har svært god eksperimentell kontroll.

*In vitro* studier kan ikke gi samme type kunnskap.

Poenget med å gjøre forsøk med tumor i mus er å skape bilde av fysiologi i vevet lignende mennesker. Bioimpedansmetoden kan gi informasjon om ledeevnen til vevet som funksjon av volum, uten å ødelegge vevet. Ingen andre metoder *in vitro* kan gi samme informasjon.

**Raffinering av dyremodell ift tidligere forsøk**

Det gjøres en pilotstudie hvor en kun benytter 2 dosenivå.

**Reduksjon av antall forsøksdyr**

I og med at forsøket er en pilotstudie er antall dyr redusert til et minimum. Antall dyr er valgt slik at man får tilstrekkelig informasjon til å konkludere.

## Prosjektbeskrivelse

### 7. Bakgrunn og hensikt

Gi en kort presentasjon, i en allment tilgjengelig språkform, for bakgrunn og hensikt med forsøket og angi eventuell hypotese som skal testes. Angi særskilt hvis spesielle lovbestemmelser/krav fra off. myndigheter krever at forsøket skal utføres:

Hypotese: MR spektroskopi, MR diffusjon og bioimpedansmålinger kan benyttes til å monitorere behandlingsrespons.

### 8. Metodebeskrivelse

Forberedelsen av dyrene før forsøket, beskriv eventuell merket metode:

Dyrene blir anestisert med katte-zoletilmix (0.15ml/25g mus) under MR-opptak. Katte-zoletilmix (0.05ml/25g) benyttes for bestråling og bioimpedansmålinger.

Behandling under selve forsøket (legg evt med tegning over kirurgisk inngrep)

Xenografts fra de humane kolorektale cellelinjene HT29, HCT116 og SW620 dyrkes ved passasje av tumorvev.

Det plasseres to tumorer på hver mus, en på hver side av rumpa. De er ikke plassert på flanken for å unngå puste-artefakter ved MR-avbildning.

Tumorstørrelse monitoreres to ganger per uke og selve forsøket starter når tumorene har nådd en diameter på 10 mm på den korteste siden.

PILOTSTUDIE (12 mus):

DAG 1:

MR-opptak ca 30 min pr mus, bioimpedansmåling ca 10 min pr mus. Dette gjøres for alle musene.

DAG 2:

Bestråling av 8 mus, dose 15 Gy enkeltfraksjon med <sup>60</sup>Co-apparat.

DAG 3 – 15:

Musene anesteseres og det gjøres et MR-opptak per mus på ulike dager og bioimpedansmålinger 3 dager pr uke.

Musene avlives på ulike tidspunkt underveis. Tumor tas ut og det lages histologiske snitt for bestemmelse av nekrotisk fraksjon. Resttumor legges i flytende nitrogen for eventuell høyoppløselig <sup>1</sup>H Magic Angle Spinning Spektroskopi.

Størrelsen på bestrålt og ikke-bestrålt tumor måles to ganger pr. uke og musene avlives når en av tumorene blir 20 mm i diameter.

Det forventes ikke at dyrene vil bli påført ubehag av forsøkene da bioimpedansmålinger og MR-opptak er ikke-invasive metoder.

Etter at musene er tatt ut av dyreavdelingen oppbevares de på LAMYK underveis i forsøket og fram til forsøket er avsluttet.

3 av musene vil transporteres til Gaustad for CT-undersøkelse med kontrast for kartlegging av karnettverk.

Musene sederes her før de transporteres i privatbil til Gaustad. De holdes varme ved hjelp av varmeputer.

Hva måles på dyrene under/etter forsøket

Bioimpedansteknikken gir oss informasjon om den elektriske ledningsevnen til biologisk vev og er sterkt avhengig av vevets tilstand.

MR-opptak gir et bilde av den kjemiske sammensetningen i tumor samt diffusjonsegenskapene i tumor og mellom tumor og omkringliggende vev.

Størrelse på tumor måles 2 ganger pr. uke.

Beskriv kort forsøksgrupper og eventuelle kontrolldyr:

Resultat av forsøk med bestrålte mus kontrolleres mot mus som ikke har fått strålebehandling.

Oppfølging og overvåkning under forsøket, beredskapsordning:

Man forventer ingen merkbare fysiologiske endringer hos musene som følge av forsøket utover tumordannelsen.

Avlivingsmetode

Musene vil avlives ved nakkedislokasjon etter bildetaking etter behandling.

Beskrivelse av humant endepunkt – når dyrene skal avlives dersom de anses å lide mer enn beskrevet under pkt 10.

Musene forventes ikke å utsettes for lidelse utover den omtalte behandlingen, men de vil bli fulgt opp i hht. interne retningslinjer for klinisk observasjon og vil bli avlivet før forsøkets slutt dersom tumor når 20 mm før forsøket er ferdig eller dersom det viser tydelige tegn til mistriksel eller har et vekttap på mer enn 10 %.

## 9. Sedasjon, anestesi og analgesi

Antas forsøket å være forbundet med smerte, skal det normalt nyttes smertelindring, jfr. forskriftens §§ 8 og 14. Ved kroniske forsøk i forbindelse med kirurgiske inngrep skal det detaljert redegjøre for det postoperative regime med hensyn til overvåkning og smertekontroll. Tillatelse til forsøk der dyrene påføres vedvarende eller betydelig smerte, og forsøket er av en slik art at analgetiske midler vanskelig kan benyttes, kan bare gis av Forsøksdyrutvalget.

ikke aktuelt

Dyrene blir anestisert med zoletil-miks (zolazepam/tiletamin, xylasin og butorphanol)(0.15ml/25g mus) under MR-opptak.

For bestråling og bioimpedansmåling anesteseres med zoletil-miks(0.05ml/25g mus).

Øyesalve brukes på musene ved anestisering.

Anestesi (preparat, dose) Zoletil-miks (0.05/0.15ml/25g mus)	Analgesi (preparat, dose) Ingen	Eutanasi (preparat, dose) Nakkedislokasjon
Annen medikamentering Hvis det i forbindelse med anestesien anvendes nevro-muskulære blokkere, skal dette angis spesielt med en kort begrunnelse: <input type="checkbox"/> ikke aktuelt		

### 10. Smerte og ubehag

Oppgi styrken på forventet maksimal smerte de mest utsatte dyrene kan oppleve under forsøket <input checked="" type="radio"/> <b>Ubetydelig</b>
Varighet av smerte <input checked="" type="radio"/> <b>Sekunder</b>

### 11. Beregning av antall forsøksdyr

Begrunn behovet for antall forsøksdyr. Ved usikkerhet om populasjonsstørrelse skal det gjennomføres pilotforsøk, jfr. forskriftens § 13. Det anbefales å søke hjelp hos statistiker dersom du selv ikke føler deg kompetent. Beskriv forsøksgrupper og gruppestørrelser.  Det utføres en pilotstudie der 12 mus brukes. Det er søkt om 20 mus for å sikre at tumor fester seg på minst 12 av musene. Dette er et minimum for å få nok informasjon til å konkludere etter at forsøket er utført.
Metode brukt for beregning av antall dyr: <input checked="" type="radio"/> Power analyse <input type="radio"/> Ressurslikning <input type="radio"/> Annen metode, beskriv nedenfor <input checked="" type="radio"/> <b>ikke aktuelt (begrunn)</b>  Dette er en pilotstudie.

Avvik fra forsøksplanen skal forelegges ansvarshavende/forsøksdyrutvalget for godkjenning. Forsøksdyrutvalget skal ha melding etter avsluttet/avbrutt forsøk gjennom ansvarshavende. Ved prosjekter av lengre varighet skal det leveres kort rapport om status en gang årlig. Forsøksdyrutvalget er primært interessert i opplysninger som belyser konsekvenser for forsøksdyrene og om resultatene berettiger den påkjenning forsøket har vært for dyrene.

Det skal skrives rapport ved forsøksslutt.

Sted og dato:

Søkerens underskrift:

Underskrift til eventuell prosjektleder; annen enn søker:

## Vedlegg B: Protokoll for bestråling av mus.

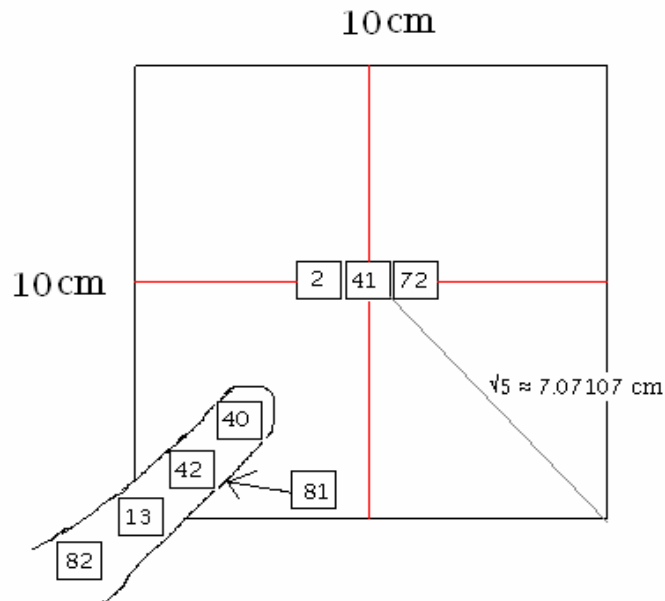
### Bestråling av tumorer på mus

1. Maskinen settes på ON (svart knapp)
2. Oppsett:
  - Lysbryter til rommet er plassert til høyre utenfor døra
  - Benytt tastaturet som henger i taket til å snu gantry slik at bestrålingen skjer ovenfra
  - Plasser en 2 cm tykk Perspex plate (hvit med kryss på) oppå holderen, uten glassplate under
  - Control ON skal trykkes inn og lyse (hvit knapp)
  - Still feltet inn til 10x10, på oversiden av apparatet, still inn x og y til 100 mm. Høyde stilles inn ved å justere på siden av apparatet til strekene er midt i krysset.
3. Beregning av stråletid:
  - Oppmålt: 15.09.1996,  $A^{-1}(0) = 31,350$  s/Gy  
Halveringstid  $^{60}\text{Co}$ -kilde: 1925,1 dager  
Tumor legges i 1,5 cm fra hjørnet. Da vil 87,3 % av måldose oppnås (13,09 Gy) (Dette var målt med fantom 27/1)  
For å oppnå 15 Gy i punktet 1,5 cm inn fra hjørnet må en bestråle med 17,18 Gy. Da vil 87,3 % tilsvare 15 Gy i dette punktet.  
Doserate:  $A^{-1}(15/2) = 108,18$  s/1Gy  
 $A^{-1}(21/2) = 108,18 * (\ln 2 / 1925,1) * 6 \text{ dg.} = 0,2337$  s/Gy  
 $A^{-1}(21/2) = 108,18 + 0,2337 = 108,41$  s/Gy  
Bestrålingstid for 17,18 Gy =  $17,18 \text{ Gy} * 108,41 \text{ s/Gy} = \underline{\underline{1862,55 \text{ s}}}$
4. Bestråling:
  - Still inn på ønsket tid
  - Rotation skal lyse
  - Hold RESET inne til det nulles ut på displayet
  - Hold RESET inne og trykk på RADIATION (rød knapp)
  - Bestråling skjer så lenge den røde lampen på konsollet og utenfor døra lyser
5. Avslutte:
  - Slå av lys
  - Slå av maskinen (ON/OFF-bryter)

## Vedlegg C: Testing av TLD-brikker og fantom.

27.01.2006

- TLD-brikkene som ble brukt i forsøket består meste parten av litiumfluorid (LiF) og i tillegg har de litt magnesium (Mg) og titan (Ti).
- Fantom: Medisinsk gummihanske fylt med vann.  
En finger på hansken settes inn i strålefelt.  
8 TLD-brikker plasseres ut og gummimatte legges over. Se figur.
- Bestråling ovenfra (gantry  $0^\circ$ ) med Mobaltron-80 ( $^{60}\text{Co}$ -kilde)
- Dose: 15 Gy  
SSD = 80 cm (avstand kilde – plate)  
1/DR i 5 mm dybde  
Felt = 10x10 cm
- Ny kilde oppmålt 09.09.1996  
Oppmålt: 15.09.1996 ( $A^{-1}(0) = 31,350 \text{ s/Gy}$ )
- Halveringstid  $^{60}\text{Co}$ -kilde: 1925,1 dager  
Doserate:  $A^{-1}(15/1) = 106,98 \text{ s/1Gy}$   
 $A^{-1}(27/1) = 106,98 * (\ln 2 / 1925,1) * 12 \text{ dg.} = 107,44 \text{ s/Gy}$   
Bestrålingstid for bestråling med 15 Gy =  $15 \text{ Gy} * 107,44 \text{ sek/Gy} = 1611,6 = 1612 \text{ sek}$
- Hver TLD-brikke inneholder 3 krystaller, dvs. tre målinger per brikke.
- Kalibreringsfaktor er målt ved 2 Gy og justert for andre doser.  
- Dose før korreksjon (Gy) = Nettosignal (nC) x Kalibreringsfaktor (Gy/nC)
- Ladningen/nettosignalet en får er ikke lineært ift avsatt dose for høye doser, derfor supralinearitetskorreksjon.  
- Dose etter korreksjon (Gy) = Dose før korreksjon (Gy) x Linearitetskorreksjon (-)



Figur: Viser strålefelt 10x10 cm og illustrasjon av fantom med plassering av TLD-brikker.

TLD-brikke nr.	Plassering i strålefelt	Nettosignal (Ladning) (nC)	Gj.snittlig nettosignal per brikke (nC)	Kalibreringsfaktor (Gy/nC)	Dose før korreksjon (Gy)	Supralinearitetskorreksjon (-)	Dose etter korreksjon (Gy)
2	Sentrum, venstre	4411.902 4337.566 4466.991	4405.43	4.298e-3	18.93	0.782	14.81
41	Sentrum, midt	4686.198 4165.406 4403.358	4418.33	4.298e-3	18.99	0.782	14.85
72	Sentrum, høyre	4173.400 4333.659 4113.079	4206.73	4.298e-3	18.08	0.790	14.28
40	3,2 cm inn fra v.hjørne	4538.662 4555.162 4417.135	4503.60	4.298e-3	19.36	0.782	15.14
42	1,4 cm inn fra v.hjørne	3666.507 4148.442 3506.913	3773.93	4.298e-3	16.22	0.807	13,09
13	0 cm (i v.hjørne)	1718.812 880.046 1181.151	1260.00	4.298e-3	5.42	0.941	5.10
82	1,8 cm utenfor v.hjørne	76.583 62.041 56.029	64.88	4.298e-3	0.28	1	0.28
81	Under fantom - 1.4cm inn	3942.880 3682.128 3373.004	3665.97	4.298e-3	15.76	0.807	12.72

- Snitt for brikkene 2, 41,72 (i sentrum): 14,65 Gy=97,7 % av dosen som trengs
- I ønsket tumorposisjonering: 13,09 Gy=87,3 5 av dosen som trengs



## Vedlegg D: Stråledoser til hver enkel tumor.

### TLD verdier

#### 21.02.06

Beregning av stråletid:

Oppmålt: 15.09.1996,  $A^{-1}(0) = 31,350 \text{ s/Gy}$

Halveringstid  $^{60}\text{Co}$ -kilde: 1925,1 dager

Tumor legges i 1,5 cm fra hjørnet. Dose: 17,18 Gy tilsvarer 15 Gy i dette punktet.

Doserate:  $A^{-1}(15.02.06) = 108,18 \text{ s/1Gy}$

$A^{-1}(21.02.06) = 108,18 * (\ln 2 / 1925,1) * 6 \text{ dg.} = 0,2337 \text{ s/Gy}$

$A^{-1}(21.02.06) = 108,18 + 0,2337 = 108,41 \text{ s/Gy}$

Bestrålingstid for 17,18 Gy =  $17,18 \text{ Gy} * 108,41 \text{ s/Gy} = 1862,55 \text{ s} = 31,05 \text{ min}$

Nº	Netto signal, nC	Dose, Gy	Middel Dose, Gy	Nº TLD/mus	Standart avvik, %
1	4409,046	15,558	15,784	16/24V	4,6
2	4731,413	16,474			
3	4322,219	15,307			
4	4883,240	16,895	16,589	18/6V	2,1
5	4709,449	16,413			
6	4724,682	16,455			
7	4494,514	15,804	16,252	29/24H	3,3
8	4827,725	16,742			
9	4634,354	16,202			
10	5153,678	17,628	16,101	54/6H	10,4
11	4323,281	15,321			
12	4315,103	15,286			
13	3907,676	14,095	13,350	73/fantom	5
14	3642,237	13,305			
15	3422,560	12,643			
16	4412,205	15,567	14,942	91/fantom	4,2

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

17	3980,619	14,310			
18	4201,035	14,951			
19	Bakgrunnstråling	0,210			

**28.02.06**

Beregning av stråletid:

Oppmålt: 15.09.1996,  $A^{-1}(0) = 31,350$  s/Gy

Halveringstid  $^{60}\text{Co}$ -kilde: 1925,1 dager

Tumor legges i 1,5 cm fra hjørnet. Dose: 17,18 Gy tilsvarer 15 Gy i dette punktet.

Doserate:  $A^{-1}(15.02.06) = 108,18$  s/1Gy

$A^{-1}(28.02.06) = 108,18 * (\ln 2 / 1925,1) * 13$  dg. = 0.5064 s/Gy

$A^{-1}(28.02.06) = 108,18 + 0,5064 = 108,69$  s/Gy

Bestrålingstid for 17,18 Gy =  $17,18 \text{ Gy} * 108,69 \text{ s/Gy} = 1867,23 \text{ s} = 31,12$  min

Nº	Netto signal, nC	Dose, Gy	Middel Dose, Gy	Nº TLD	Standart avvik, %
1	3786,763	13,735	14,353	9/23V	7,0
2	3883,487	14,024			
3	4315,675	15,287			
4	4574,817	16,033	15,774	22/20V	2,6
5	4522,777	15,885			
6	4354,048	15,399			
7	3749,655	13,624	12,220	29/20H	13,6
8	3243,835	12,091			
9	2861,805	10,884			
10	Bakgrunnstråling	0,210			

**07.03.06**

Beregning av stråletid:

Oppmålt: 15.09.1996,  $A^{-1}(0) = 31,350$  s/Gy

Halveringstid  $^{60}\text{Co}$ -kilde: 1925,1 dager

Tumor legges i 1,5 cm fra hjørnet. Dose:17,18 Gy tilsvarer 15 Gy i dette punktet.

Doserate:  $A^{-1}(15.02.06) = 108,18 \text{ s/1Gy}$

$A^{-1}(07.03.06) = 108,18 * (\ln 2 / 1925,1) * 20 \text{ dg.} = 0.7790 \text{ s/Gy}$

$A^{-1}(07.03.06) = 108,18 + 0,7790 = 108,96 \text{ s/Gy}$

Bestrålingstid for 17,18 Gy =  $17,18 \text{ Gy} * 108,96 \text{ s/Gy} = 1871,92 \text{ s} = 31,20 \text{ min}$

Nº	Netto signal, nC	Dose, Gy	Middel Dose, Gy	Nº TLD	Standart avvik, %
1	4988,218	17,182	16,570	8/21H	4,6
2	4549,113	15,960			
3	4759,745	16,553			
4	4744,773	16,512	16,095	16/22H	2,9
5	4492,446	15,798			
6	4552,572	15,970			
7	4991,300	17,191	17,033	30/1H	2,6
8	4787,440	16,630			
9	5021,942	17,274			
10	4879,742	16,885	16,266	32/1V	6,0
11	4346,523	15,377			
12	4745,341	16,513			
13	4739,081	16,496	16,146	42/14H	3,7
14	4682,528	16,337			
15	4421,961	15,596			
16	4840,226	16,777	16,291	58/26H	3,3
17	4615,664	16,149			
18	4542,216	15,940			
19	4670,347	16,303	16,730	75/21V	3,0
20	4841,019	16,779			
21	4958,351	17,101			
22	4544,024	15,946	15,555	81/22V	6,3
23	4590,210	16,077			
24	4089,634	14,628			
25	3811,746	13,810	15,352	92/25V	10,7
26	4690,959	16,361			
27	4511,300	15,852			
28	Bakgrunnstråling	0,251			

**02.05.06**

Beregning av stråletid:

Oppmålt: 15.09.1996,  $A^{-1}(0) = 31,350 \text{ s/Gy}$

Halveringstid  $^{60}\text{Co}$ -kilde: 1925,1 dager

Tumor legges i 1,5 cm fra hjørnet. Dose:17,18 Gy tilsvarer 15 Gy i dette punktet.

Doserate:  $A^{-1}(15.04.06) = 110,50 \text{ s/1Gy}$

$A^{-1}(02.05.06) = 110,50 * (\ln 2 / 1925,1) * 17 \text{ dg.} = 0,6764 \text{ s/Gy}$

$A^{-1}(07.03.06) = 110,50 + 0,6764 = 111,1764 \text{ s/Gy}$

Bestrålingstid for 5,547 Gy =  $5,547 \text{ Gy} * 111,1764 \text{ s/Gy} = 616,7 \text{ s} = 10 \text{ min } 28 \text{ s.}$

Nº	Netto signal, nC	Dose, Gy	Middel Dose, Gy	Nº TLD	Standart avvik, %
1	1389,172	5,415	5,365	1/6H	1,5
2	1359,963	5,315			
3	612,456	2,527	3,133	15/1H	28,6
4	923,056	3,742			
5	1352,770	5,290	5,226	21/23V	2
6	1315,455	5,161			
7	1415,324	5,504	5,474	29/2V	0,9
8	1397,978	5,445			
9	1149,773	4,577	4,882	40/2H	9,8
10	1321,559	5,182			
11	0,000	0,000	0,000	49/ikke brukt	141,4
12	0,023	0,000			
13	1408,484	5,481	5,288	52/13H	5,9
14	1295,740	5,093			
15	1333,395	5,223	5,358	53/25H	4,0
16	1411,594	5,491			
17	1423,696	5,532	5,440	54/10V	2,8
18	1369,293	5,347			
19	1323,841	5,190	5,279	61/22H	2,7
20	1375,491	5,368			
21	1266,637	4,991	5,153	73/13V	5,0
22	1359,352	5,313			

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

23	1168,697	4,645	5,084	86/3V	13,6
24	1418,043	5,513			
25	1323,089	5,188	5,186	91/25V	0,0
26	1322,337	5,185			
27	947,886	3,839	4,289	93/10H	16,1
28	1191,661	4,727			
29	1351,099	5,284	5,273	97/3H	0,3
30	1344,606	5,262			

**09.05.06**

Beregning av stråletid:

Oppmålt: 15.09.1996,  $A^{-1}(0) = 31,350 \text{ s/Gy}$

Tumor legges i 1,5 cm fra hjørnet. Dose: 17,18 Gy tilsvarer 15 Gy i dette punktet.

Doserate:  $A^{-1}(15.04.06) = 110,50 \text{ s/1Gy}$

$A^{-1}(09.05.06) = 110,50 * (\ln 2 / 1925,1) * 24 \text{ dg.} = 0,955 \text{ s/Gy}$

$A^{-1}(07.03.06) = 110,50 + 0,955 = 111,455 \text{ s/Gy}$

Bestrålingstid for 5,547 Gy =  $5,547 \text{ Gy} * 111,455 \text{ s/Gy} = 618,24 \text{ s} = 10 \text{ min } 30 \text{ s.}$

Nº	Netto signal, nC	Dose, Gy	Middel Dose, Gy	Nº TLD	Standart avvik, %
1	1214,877	4,809	5,047	4/14V	4,8
2	1297,209	5,098			
3	1335,774	5,231			
4	1421,218	5,524	5,412	53/21H	2,1
5	1368,262	5,343			
6	1375,453	5,368			
7	1358,113	5,308	5,280	54/21V	1,2
8	1360,497	5,317			
9	1330,589	5,214			
10	1351,832	5,287	5,488	66/11V	3,9
11	1420,098	5,520			
12	1460,353	5,662			
13	1433,194	5,564	5,169	70/16H	8,2
14	1302,666	5,117			
15	1217,653	4,819			

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

16	1355,322	5,299	5,435	73/15V	3,1
17	1440,223	5,589			
18	1390,167	5,418			
19	1426,758	5,543	5,566	88/15H	1,1
20	1422,043	5,527			
21	1452,630	5,634			
22	1430,604	5,556	5,328	92/24V	4,8
23	1359,511	5,313			
24	1300,978	5,111			
25	1266,804	4,992	4,914	95/11H	12,9
26	1073,747	4,303			
27	1393,341	5,429			
28	1327,299	5,202	5,088	97/24H	2,5
29	1261,985	4,975			
30	1293,815	5,086			

## Vedlegg E: Eksperimentelle rådata fra bioimpedansmonitorering.

### Eksperiment 1-1

Experiment 1-1, dag 1, 500 mV, salt vann

navn	Z'	Z''	Z	theta	Volum,[mm3]
25V3	73 439,00	-1,50540E+03	73 454,00	-1,174300	635,850
25V2	111 740,00	-2,40330E+03	111 770,00	-1,232100	635,850
24V2	37 889,00	-2,75890E-01	37 889,00	-0,000417	448,693
24V1	22 122,00	-4,52660E+01	22 122,00	-0,117240	448,693
24H3	20 378,00	-1,03150E+02	20 378,00	-0,290020	495,924
24H1	14 319,00	-1,00560E+02	14 319,00	-0,402370	495,924
23V3	97 066,00	5,71580E+03	97 066,00	3,370000	435,413
23V2	132 200,00	5,27600E+03	132 310,00	2,285400	435,413
22V3	109 940,00	-1,05810E+03	109 950,00	-0,551420	529,352
22V2	122 390,00	-2,33460E+03	122 410,00	-1,092800	529,352
22H4	39 404,00	-3,10540E+02	39 405,00	-0,451530	445,095
22H3	32 149,00	2,99260E+01	32 149,00	0,053334	445,095
21V4	109 530,00	-1,16980E+03	109 540,00	-0,611910	551,070
21V2	112 130,00	-1,15380E+03	112 140,00	-0,589540	551,070
21H3	55 161,00	-6,16230E+02	55 164,00	-0,640050	811,167
21H1	52 044,00	-5,00830E+02	52 046,00	-0,551350	811,167
20V4	115 610,00	5,88270E+03	115 760,00	2,912900	523,333
20V3	103 070,00	-1,42490E+03	103 080,00	-0,792040	523,333

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

20H3	119 250,00	1,78420E+03	119 260,00	0,857190	614,001
20H2	123 660,00	7,16410E+03	123 870,00	3,315700	614,001
14H3	387 860,00	-1,11730E+04	388 020,00	-1,650100	1 076,497
14H1	216 090,00	-7,74990E+03	216 230,00	-2,054000	1 076,497
6V2	48 557,00	-7,04380E+02	48 562,00	-0,831090	519,539
6V1	47 368,00	-6,42730E+02	47 372,00	-0,777390	519,539
6H3	50 279,00	-8,73470E+02	50 287,00	-0,995270	601,572
6H2	54 540,00	-9,88600E+02	54 549,00	-1,038400	601,572
4H4	38 065,00	-4,34900E+02	38 067,00	-0,654590	1 139,820
4H3	50 257,00	-9,46290E+02	50 266,00	-1,078700	1 139,820
1V3	86 142,00	-5,16800E+03	86 297,00	-3,433300	192,325
1V2	44 750,00	-6,39960E+03	45 205,00	-8,138600	192,325
1H2	135 750,00	-2,06030E+03	135 770,00	-0,869520	706,500
1H1	99 636,00	-1,26720E+03	99 644,00	-0,728670	706,500
	89 462,00	-7,90075E+02	89 462,00	-0,561006	607,884

Experiment 1, dag 3, 500 mV, salt vann

25V4	1,80E+05	-13263	180000,00	-4,225600	401,920
25V3	2,28E+05	-22199	229040,00	-5,562000	401,920
24V8	99843	1487,9	99854,00	-0,853780	519,539
24V7	1,23E+05	-1942,7	122660,00	-0,907530	519,539
24H8	6,67E+04	2420	66763,00	2,077300	519,539
24H7	6,66E+04	953,89	66626,00	0,820340	519,539
23V2	2,37E+05	-4537,6	236640,00	-1,098700	435,413
22V4	1,46E+05	-3211,3	146230,00	-1,258400	529,352
22V1	2,18E+05	-7282,7	217960,00	-1,914800	529,352
22H4	7,92E+04	-787,24	79175,00	-0,569700	445,095
22H3	5,74E+04	-836,85	57359,00	-0,835960	445,095
21V4	4,20E+05	-4995,1	419730,00	-0,681880	491,541
21H3	1,01E+05	-2490,2	100740,00	-1,416400	657,045
21H1	1,53E+05	-3802,6	153500,00	-1,419500	657,045
20V3	1,97E+05	-52189	203790,00	-14,839000	549,500
20H4	1,09E+05	-2067,8	109460,00	-1,082400	635,850
20H3	1,12E+05	-2016,9	112260,00	-1,029500	635,850
14H4	1,97E+05	-4395,4	197370,00	-1,276100	1044,835
14H3	1,42E+05	-2717,3	142020,00	-1,096400	1044,835
6V8	2,69E+05	-6470,7	268640,00	-1,380200	575,667
6V7	3,28E+05	-8831,4	327690,00	-1,544300	575,667
6H7	2,50E+05	-7401,2	249810,00	-1,697800	633,233
6H6	3,31E+05	-9739,1	331230,00	-1,684900	633,233
4H4	2,97E+04	-543,93	29703,00	-1,049300	1139,820
4H1	3,09E+04	-411,69	30855,00	-0,764510	1139,820
1V4	1,19E+05	-1468	118560,00	-0,709460	321,392
1V3	1,29E+05	-917,76	128730,00	-0,408470	321,392
1H2	2,14E+05	-4538,1	214260,00	-1,213600	1055,040
	1,65E+05	-5864,1	165737,68	-1,700805	620,645

Experiment 1, dag 5, 500 mV, salt vann

25V4	3,04E+05	-24218	304910,00	-4,555600	401,920
25V3	2,65E+05	-4293,4	264790,00	-0,929040	401,920
24V3	3,42E+05	-16132	342030,00	-2,703400	519,539
24V1	2,79E+05	-6753,6	278820,00	-1,387900	519,539
24H2	4,85E+04	-560,52	48504,00	-0,662130	519,539

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

24H1	4,99E+04	-629,33	49924,00	-0,722280	519,539
21V2	3,57E+05	-11057	356740,00	-1,776100	491,541
21V1	4,78E+05	-15803	477790,00	-1,895400	491,541
21H2	4,59E+05	-11324	459330,00	-1,412700	657,045
21H1	5,88E+05	-25495	588330,00	-2,483700	657,045
20V4	1,31E+05	-2314,8	130680,00	-1,015000	549,500
20V2	1,11E+05	-8345,1	111080,00	-4,308400	549,500
20H4	1,89E+05	-4367,8	189220,00	-1,322700	635,850
14H3	3,20E+05	-8844,6	320390,00	-1,581900	1044,835
14H1	5,24E+05	-25345	524110,00	-2,771800	1044,835
6V4	1,57E+05	2181,8	156560,00	0,798520	575,667
6V1	1,34E+05	4153,1	133810,00	1,778500	575,667
6H3	4,20E+05	-12831	420180,00	-1,749900	633,233
6H1	3,97E+05	-10713	396710,00	-1,547400	633,233
1V2	3,52E+05	-11643	352680,00	-1,891800	321,392
1V1	5,06E+05	-17952	506070,00	-2,032900	321,392
1H4	1,11E+05	254,99	110860,00	0,131790	1055,040
1H3	8,78E+04	-1065,6	87849,00	-0,695010	1055,040
	2,87E+05	-9265	287450,74	-1,510272	616,276

Experiment 1, dag 8, 500 mV, salt vann

24V2	4,90E+04	512,13	49036,00	0,598410	523,333
24V1	3,65E+04	-272,7	36525,00	-0,427780	523,333
24H4	2,64E+04	-162,21	26428,00	-0,351670	472,308
24H3	2,31E+04	-176,07	23109,00	-0,436550	472,308
21V4	4,97E+05	-29428	498310,00	-3,385600	491,541
21V3	5,19E+05	-31816	519970,00	-3,508000	491,541
21H3	6,22E+05	-35415	623010,00	-3,258700	657,045
21H1	8,80E+05	-56448	881490,00	-3,671600	657,045
20V4	1,48E+05	-2495,2	147590,00	-0,968700	340,298
20V3	1,50E+05	-2613,6	149680,00	-1,000500	340,298
20H4	1,03E+05	-1234,8	103420,00	-0,684130	452,160
20H3	1,27E+05	-2775,8	126770,00	-1,254700	452,160
6V3	2,17E+05	-6777,2	217600,00	-1,784800	523,333
6V2	2,79E+05	-12601	279620,00	-2,582900	523,333
6H3	3,03E+05	-10738	303610,00	-2,026800	523,333
6H2	3,59E+05	-13673	359410,00	-2,180200	523,333
	2,71E+05	-12882	271598,63	-1,682764	497,919

Experiment 1, dag 10, 500 mV, salt vann

24H4	6,44E+05	-60334	647000,00	-5,350700	472,308
6V4	7,67E+05	-31963	768070,00	-2,385000	472,308
	7,06E+05	-4,61E+04	707535,00	-3,867850	472,308

Experiment 1, dag 12, 500 mV, salt vann

24V4	4,86E+05	-36293	487140,00	-4,272600	448,693
24V3	5,13E+05	-42013	514650,00	-4,682500	448,693
24H2	1,82E+05	-5451,7	182560,00	-1,711200	472,308
24H1	1,83E+05	-6111,4	183360,00	-1,910000	472,308
6V3	4,02E+05	-19902	402970,00	-2,830900	472,308
6V1	4,46E+05	-25772	446990,00	-3,305300	472,308
6H2	4,54E+05	-27596	454770,00	-3,478900	471,000



Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

6H1	6,33E+05	-42146	633990,00	-3,811700	471,000
	4,12E+05	-25660	413303,75	-3,250388	466,077

Experiment 1, kontrolldyr, 500 mV, salt vann

30H2	2,73E+05	-4135,2	272730,00	-0,868760	741,825
26H1	3,20E+05	-5529,5	319930,00	-2,642700	915,833
16V4	2,26E+05	-14248	226450,00	-3,607400	453,730
16V3	2,52E+05	-17149	252170,00	-3,899400	453,730
16H3	2,43E+05	-47061	247990,00	-10,940000	904,320
15V3	9,60E+05	-1368,5	959727,00	-0,817030	661,690
15V2	8,67E+05	-1972,7	867405,00	-1,303200	661,690
10V3	4,19E+05	-1474	418760,00	-0,711150	368,427
10H3	3,31E+05	-4700,6	331480,00	-1,163600	865,135
10H2	3,23E+05	-4125,5	323050,00	-0,731700	865,135
	4,21E+05	-10176,4	421969,20	-2,668494	689,152

## Eksperiment 1-2

Experiment 1, dag 1, 100 mV, salt vann

navn	Z`	Z``	/Z/	theta	Volum,[mm3]
25V8	1,49E+05	-11894	149310,00	-4,568900	635,850
25V6	1,22E+05	-3528,4	122450,00	-1,651200	635,850
23V7	1,53E+05	7980,9	153430,00	2,981700	435,413
23V5	1,39E+05	6728,7	139260,00	2,769400	435,413
22V7	1,43E+05	-1766,7	143110,00	-0,707330	529,352
22V6	1,22E+05	-3319,2	121810,00	-1,561500	529,352
22H8	4,34E+04	-376,19	43477,00	-0,496110	445,095
22H6	3,85E+04	36,778	38499,00	0,054735	445,095
21V8	1,09E+05	-1413,4	108660,00	-0,745300	551,070
21V6	1,06E+05	-985,29	105900,00	-0,533060	551,070
21H7	5,66E+04	-439,29	56586,00	-0,444810	811,167
21H5	6,03E+04	-709,44	60304,00	-0,674060	811,167
20V7	1,06E+05	2497,9	106260,00	1,347000	523,333
20V6	1,13E+05	8772,4	113370,00	4,437900	523,333
20H6	1,94E+05	460,52	194370,00	0,135750	614,001
20H5	1,95E+05	741,92	195040,00	0,217950	614,001
14H5	2,22E+05	-11133	222120,00	-2,873000	1076,497
4H7	5,52E+04	-938,99	55186,00	-0,974940	1139,820
4H6	5,88E+04	-716,22	58787,00	-0,698060	1139,820
1V7	1,12E+05	-11451	112480,00	-5,842900	192,325
1H7	1,22E+05	-2224,8	122510,00	-1,040600	706,500
1H6	1,29E+05	-1999,9	128660,00	-0,890680	706,500
	1,16E+05	-1167,1	115980,86	-0,534455	638,728

Experiment 1, dag 3, 100 mV, salt vann

25V8	1,59E+05	-12745	159670,00	-4,578300	401,920
25V7	3,84E+05	-51265	387000,00	-7,612200	401,920
24V3	1,91E+05	-3077,8	191510,00	-0,920830	519,539
24V2	1,94E+05	-3523,2	193960,00	-1,040800	519,539
24H4	5,66E+04	-1321,1	56602,00	-1,337400	519,539

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

24H3	5,82E+04	-1314,5	58226,00	-1,293600	519,539
23V6	1,95E+05	-4398	195160,00	-1,291300	435,413
23V5	1,90E+00	-3374,9	189890,00	-1,018400	435,413
22V8	1,44E+05	-6889,7	144500,00	-2,732800	529,352
22V5	3,17E+05	-16192	317150,00	-2,926500	529,352
22H8	8,77E+04	-1444	87699,00	-0,943440	445,095
22H7	6,52E+04	-959,08	65200,00	-0,842840	445,095
21H7	1,08E+05	-2879,9	107730,00	-1,531900	657,045
21H5	1,99E+05	-5679,9	199510,00	-1,631400	657,045
20V7	1,34E+05	-3030,7	134340,00	-1,292700	549,500
20V6	1,24E+05	-5959,3	124540,00	-2,742600	549,500
20H7	1,26E+05	-3244,7	126060,00	-1,474900	635,850
20H6	1,26E+05	-3284,4	126090,00	-1,492600	635,850
14H8	2,02E+05	-5002,1	201680,00	-1,421200	1044,835
14H7	1,57E+05	-3402,7	156880,00	-1,242900	1044,835
6V2	3,25E+05	-7054,3	324830,00	-1,244400	575,667
6V1	4,32E+05	-10659	432150,00	-1,413300	575,667
6H4	7,14E+05	-30482	714750,00	-2,444200	633,233
6H3	3,90E+05	-13809	390570,00	-2,026200	633,233
4H8	3,00E+04	-641,39	29986,00	-1,225600	1139,820
4H7	3,09E+04	-501,75	30941,00	-0,929170	1139,820
1V7	1,28E+05	-603,48	128490,00	-0,269100	321,392
1V6	1,75E+05	-1933,4	174530,00	-0,634720	321,392
1H7	1,61E+05	-3427,2	160560,00	-1,223100	1055,040
1H6	2,01E+05	-4525,2	200770,00	-1,291500	1055,040
	1,87E+05	-7087,49	193699,13	-1,735663	630,883

Experiment 1, dag 5, 100 mV, salt vann

25V8	3,06E+05	-28859	307530,00	-5,384700	401,920
25V7	3,15E+05	-5717,9	314930,00	-1,040300	401,920
24V8	9,34E+04	2443,1	93400,00	1,498900	519,539
24V5	1,57E+05	-3087,1	156590,00	-1,129600	519,539
24H8	6,76E+04	-836,13	67577,00	-0,708940	519,539
24H7	9,58E+04	-1841,7	95841,00	-1,101100	519,539
21V6	3,43E+05	-11554	343310,00	-1,928600	491,541
21V5	8,13E+05	-45541	814630,00	-3,204700	491,541
21H6	4,59E+05	-13270	458960,00	-1,656800	657,045
21H5	8,05E+05	-26411	805260,00	-1,879500	657,045
20V8	1,33E+05	-2623	132710,00	-1,132600	549,500
20V6	1,11E+05	-9941,5	111120,00	-5,133100	549,500
20H6	3,78E+05	-12353	378660,00	-1,869500	635,850
20H5	5,47E+05	-21869	547130,00	-2,290800	635,850
14H8	2,86E+05	-8123,8	286280,00	-1,626100	1044,835
14H7	3,70E+05	-12021	370140,00	-1,861100	1044,835
6V8	9,33E+04	-532,88	93347,00	-0,327080	575,667
6V6	9,40E+04	587,52	94048,00	0,357930	575,667
6H7	4,38E+05	-17599	438320,00	-2,301100	633,233
6H6	3,43E+05	-11627	343510,00	-1,939700	633,233
1V6	3,27E+05	-11042	326940,00	-1,935500	321,392
1V5	6,57E+05	-25247	657840,00	-2,199500	321,392
1H8	1,02E+05	-263,57	102120,00	-0,147880	1055,040
1H7	1,01E+05	-1552,5	100710,00	-0,883260	1055,040
	3,10E+05	-11203	310037,63	-1,659360	617,092

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

Experiment 1, dag 8, 100 mV, salt vann

24V8	28397	51,102	28397,00	0,103110	523,333
24V6	29366	144,18	29366,00	0,281310	523,333
24H8	24008	-6,2768	24008,00	-0,014980	472,308
24H5	23731	81,827	23731,00	0,197560	472,308
21V6	9,08E+05	-33684	909010,00	-2,123600	491,541
21V5	1,09E+06	-54415	1088900,00	-2,864500	491,541
21H6	7,61E+05	-40935	762560,00	-3,077200	657,045
21H5	1,20E+06	-102790	1204000,00	-4,897500	657,045
20V8	1,59E+05	-3311	158920,00	-1,193800	340,298
20V7	1,68E+05	-3644,3	168190,00	-1,241600	340,298
20H7	1,45E+05	-3873,3	145380,00	-1,526700	452,160
20H5	1,90E+05	-7076,6	189770,00	-2,137100	452,160
6V8	1,51E+05	-4161,8	151130,00	-1,578000	523,333
6V7	1,99E+05	-3248,9	198540,00	-0,937640	523,333
6H8	5,92E+05	-33121	592870,00	-3,202500	523,333
6H5	5,36E+05	-27345	537020,00	-2,918800	523,333
	387643,875	-19833	388237,00	-1,695746	497,919

Experiment 1, dag 10, 100 mV, salt vann

24V8	7,30E+05	-61486	732350,00	-4,816100	448,693
24V7	8,06E+05	-62665	808680,00	-4,444300	448,693
24H8	7,58E+05	-85195	762840,00	-6,412200	472,308
6H6	8,32E+05	-57808	833590,00	-3,976600	471,000
	7,81E+05	-66788	784365,00	-4,912300	460,174

Experiment 1, dag 12, 100 mV, salt vann

24V8	5,16E+05	-43373	517420,00	-4,808500	448,693
24V7	5,68E+05	-56913	570450,00	-5,725900	448,693
24H6	1,82E+05	-5810,8	182500,00	-1,824600	472,308
24H5	2,46E+05	-10935	246040,00	-2,547300	472,308
6V8	4,13E+05	-23436	413380,00	-3,250000	472,308
6V7	4,18E+05	-22655	418880,00	-3,100300	472,308
6H7	5,18E+05	-35954	518980,00	-3,972600	471,000
6H6	4,51E+05	-31186	452160,00	-3,954900	471,000
	4,14E+05	-28782	414976,25	-3,648013	466,077

Experiment 1, kontrolldyr, 100 mV, salt vann

30H6	2,53E+05	-4315,9	252860,00	-0,978000	741,825
30H5	1,36E+05	-2929,9	135940,00	-1,235000	741,825
26H8	1,18E+05	-3431,1	118170,00	-1,663800	915,833
26H5	1,52E+05	-12383	152940,00	-4,644100	915,833
16V8	2,40E+05	-19158	241170,00	-4,556200	453,730
16V7	2,75E+05	-17255	275200,00	-3,594800	453,730
15V8	9,42E+04	-2378,9	94236,00	-1,446500	661,690
15V7	9,39E+04	-1240,7	93894,00	-0,757120	661,690
12V8	2,71E+05	359,46	270610,00	0,076108	706,500
10V7	1,53E+05	-3403,3	153460,00	-1,270800	368,427
10H7	2,51E+05	-4726	251300,00	-1,077600	865,135
10H6	2,78E+05	-4211,4	277990,00	-0,868030	865,135
	1,93E+05	-6256,145	193147,50	-1,834654	695,946

## Eksperiment 2-1

Experiment 2, dag 1, 500 mV, tørr hud

navn	Z'	Z''	/Z/	theta	Volum,[mm3]
26H3	3,24E+08	-1,55E+08	3,59E+08	-2,55E+01	952,009
20V2	1,83E+08	-7,09E+06	1,83E+08	2,22E+00	448,693
20V1	1,22E+08	-9,35E+06	1,23E+08	-4,37E+00	448,693
12V2	3,43E+08	-8,57E+07	3,54E+08	-1,40E+01	423,900
12V1	3,07E+08	-1,56E+08	3,45E+08	-2,69E+01	423,900
12H4	2,21E+08	-2,31E+08	3,20E+08	-4,63E+01	466,290
5H2	1,31E+08	-6,82E+07	1,48E+08	-2,76E+01	1107,373
4V3	1,71E+08	-2,90E+07	1,74E+08	-9,60E+00	886,527
4V1	3,21E+07	-4,32E+06	3,24E+07	-7,67E+00	886,527
4H4	3,09E+07	-2,51E+07	3,98E+07	-3,91E+01	508,680
	1,87E+08	-7,71E+07	2,08E+08	-1,99E+01	655,259

Experiment 2, dag 3, 500 mV, tørr hud

26H3	1,31E+07	-998710	1,32E+07	-4,35240	1281,120
20V4	-9,88E+07	7,12E+07	1,22E+08	-144,20000	601,833
20V3	4,07E+07	-6,87E+06	4,12E+07	-9,59310	601,833
20H3	4,20E+07	-5,34E+07	6,79E+07	-51,82500	791,542
20H1	7,96E+07	1,23E+07	8,06E+07	8,77630	791,542
5H2	8,78E+08	-6,01E+08	1,06E+09	-34,38700	1107,373
5H1	8,51E+08	-3,60E+08	9,24E+08	-22,90800	1107,373
4V1	1,14E+08	-2,05E+07	1,16E+08	-10,20400	1055,040
4H4	1,10E+08	-5,82E+07	1,24E+08	-27,93000	529,875
	2,26E+08	-1,13E+08	2,84E+08	-32,95813	874,170

Experiment 2, dag 5, 500 mV, tørr hud

26H3	3,39E+08	-4,76E+08	5,84E+08	-5,46E+01	1281,120
26H1	6,61E+08	-1,50E+07	6,61E+08	-1,30E+00	1281,120
20V4	-4,05E+08	2,97E+08	5,02E+08	1,44E+02	601,833
20V1	5,39E+08	-1,38E+08	5,56E+08	-1,44E+01	601,833
20H4	3,70E+08	-2,76E+07	3,71E+08	-4,26E+00	791,542
20H2	5,94E+08	-7,76E+07	5,99E+08	-7,45E+00	791,542
12V3	1,86E+08	-1,18E+08	2,20E+08	-3,26E+01	572,265
12V1	6,25E+08	-6,14E+08	8,76E+08	-4,45E+01	572,265
12H3	2,38E+06	-3,87E+00	2,41E+06	-9,23E+00	634,673
12H2	1,45E+07	-5,24E+06	1,54E+07	-1,99E+01	634,673
5H4	7,24E+08	-1,89E+09	2,02E+09	-6,90E+01	1107,373
5H3	7,11E+08	-1,22E+09	1,41E+09	-5,98E+01	1107,373
4V3	1,26E+08	-6,18E+06	1,26E+08	-2,82E+00	1055,040
4V2	8,17E+07	-8,84E+06	8,22E+07	-6,18E+00	1055,040
4H1	1,37E+08	-6,21E+06	1,38E+08	-2,59E+00	529,875
	3,14E+08	-2,87E+08	5,45E+08	-1,23E+01	841,171

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

Experiment 2, dag 8, 500 mV, tørr hud

20V3	5,88E+08	-6,12E+08	8,48E+08	-4,62E+01	663,521
20V2	8,03E+08	-3,40E+08	8,72E+08	-2,30E+01	663,521
20H2	3,84E+08	1,38E+08	4,08E+08	1,97E+01	934,346
5H2	7,14E+08	-1,87E+08	7,38E+08	-1,47E+01	1308,333
4V3	7,77E+08	-6,39E+08	1,01E+09	-3,95E+01	1168,080
4H4	1,28E+06	-1,49E+05	1,29E+06	-6,66E+00	680,333
4H2	3,38E+05	-9,09E+04	3,50E+05	-1,51E+01	680,333
	4,67E+08	-2,34E+08	5,54E+08	-1,79E+01	871,210

Experiment 2, dag 10, 500 mV, tørr hud

20V3	-1,56E+06	-1,84E+07	1,84E+07	-9,49E+01	381,510
20H2	7,63E+07	-2,57E+06	7,64E+07	-1,93E+00	418,667
5H2	-7,85E+06	1,47E+07	1,67E+07	1,18E+02	823,203
4V4	1,02E+08	-1,05E+08	1,46E+08	-4,60E+01	1072,768
4V2	8,75E+07	-1,24E+08	1,52E+08	-5,48E+01	1072,768
4H4	1,03E+07	-9,46E+04	1,03E+07	-5,26E-01	692,370
4H2	1,02E+08	-5,98E+06	1,02E+08	-3,35E+00	692,370
	5,26E+07	-3,45E+07	7,46E+07	-1,19E+01	736,237

Experiment 2, dag 12, 500 mV, tørr hud

20V3	7,43E+07	-9,07E+07	1,17E+08	-5,07E+01	381,510
20V2	1,32E+07	-1,06E+07	1,69E+07	-3,88E+01	381,510
20H3	6,46E+07	-1,03E+08	1,22E+08	-5,79E+01	418,667
5H3	2,15E+08	-1,58E+08	2,67E+08	-3,64E+01	823,203
5H1	5,36E+07	-7,68E+06	5,41E+07	-8,16E+00	823,203
4V4	7,81E+07	-3,61E+07	8,60E+07	-2,48E+01	1072,768
4V3	3,88E+07	-3,44E+06	3,90E+07	-5,07E+00	1072,768
4H3	7,47E+06	-6,62E+06	9,98E+06	-4,16E+01	692,370
4H2	1,80E+07	5,74E+04	1,80E+07	1,83E-01	692,370
	6,25E+07	-4,63E+07	8,11E+07	-2,92E+01	706,485

Experiment 2, dag 15, 500 mV, tørr hud

20V4	3,97E+07	5,20E+07	6,54E+07	5,27E+01	448,693
20V1	7,11E+07	-8,84E+06	7,16E+07	-7,09E+00	448,693
20H4	7,86E+07	-3,92E+07	8,79E+07	-2,65E+01	654,167
5H3	1,51E+08	-3,49E+07	1,55E+08	-1,30E+01	1063,021
5H2	1,49E+09	-6,59E+08	1,63E+09	-2,39E+01	1063,021
4V4	-2,16E+07	1,74E+07	2,77E+07	1,41E+02	732,667
4V3	-8,40E+07	3,07E+07	8,94E+07	1,60E+02	732,667
4H1	2,09E+09	-1,57E+09	2,61E+09	-3,69E+01	566,770
	4,76E+08	-2,76E+08	5,92E+08	3,08E+01	713,712

## Ekspersiment 2-2

Experiment 2, dag 1, 500 mV, ren vann

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

navn	Z'	Z''	Z	theta	Volum,[mm3]
24V4	1,80E+05	-5215,9	180560,000	-1,655	575,667
24V1	1,75E+05	-16307	175590,000	-5,329	575,667
24H1	3,15E+05	-11830	314800,000	-2,154	628,000
21V4	5,04E+05	-16130	504180,000	-1,833	340,298
21V3	5,66E+05	-33114	567040,000	-3,348	340,298
21H1	9,04E+05	-43272	905270,000	-2,740	830,530
16H1	2,52E+05	-16136	252960,000	-3,657	605,824
15V3	7,57E+04	-933,09	75679,000	-0,706	519,539
15V2	6,82E+04	-1962	68272,000	-1,647	519,539
15V1	6,93E+04	-336,69	69267,000	-0,279	519,539
15H1	8,74E+04	-1646,4	87418,000	-1,079	1459,315
14V4	2,46E+05	-18350	246320,000	-4,272	575,667
14V3	3,30E+05	-6267,4	329880,000	-1,089	575,667
11V3	4,23E+05	-536,43	422840,000	-0,073	1469,520
11V2	4,33E+05	-13811	433470,000	-1,826	1469,520
11H3	8,06E+05	-46219	807540,000	-3,281	235,500
11H2	6,39E+05	-29766	639550,000	-2,668	235,500
11H1	5,88E+05	-12831	588130,000	-1,250	235,500
13V2	5,73E+05	-37275	574650,000	-3,719	385,173
13V1	5,22E+05	-39788	523760,000	-4,357	385,173
13H1	8,03E+05	-42484	803660,000	-3,030	741,825
6H4	3,30E+05	-41467	333010,000	-7,153	886,527
2V2	5,66E+05	-37776	567140,000	-3,819	654,167
2H1	5,56E+05	-24246	556680,000	-2,496	1055,040
	4,17E+05	-20737,4963	417819,417	-2,644	659,125

Experiment 2, dag 3, 500 mV, ren vann

24V3	1,08E+06	-1,69E+05	1093800,000	-8,879	575,667
24V1	8,25E+05	-1,15E+05	833020,000	-7,946	575,667
24H4	4,19E+05	-74784	425990,000	-10,111	759,880
24H3	8,78E+04	-12853	88718,000	-8,330	759,880
16H2	1,11E+06	-5357,5	1105100,000	-0,278	854,865
16H1	1,10E+06	-13409	1097600,000	-0,700	854,865
15V3	2,89E+06	-1,44E+05	2892400,000	-2,857	795,925
15V2	3,81E+06	-7,64E+05	3888400,000	-11,338	795,925
15H2	4,42E+05	-35203	443080,000	-4,557	1547,758
15H1	4,88E+05	-38491	489560,000	-4,510	1547,758
14V2	1,25E+06	-1,59E+05	1257400,000	-7,254	692,370
11V3	1,51E+06	1,76E+03	1509000,000	0,067	1635,417
11H3	4,63E+05	-3,34E+04	464360,000	-4,119	346,185
11H2	3,48E+05	-2,09E+04	348210,000	-3,438	346,185
	1,13E+06	-1,13E+05	1138331,286	-5,304	863,453

Experiment 2, dag 5, 500 mV, ren vann

24V3	3,31E+06	-3,50E+05	3324700,000	-6,046	575,667
24V1	2,50E+06	-9,81E+05	2683700,000	-21,448	575,667
24H4	2,09E+06	-8,29E+05	2246400,000	-21,650	759,880
24H3	9,70E+05	-4,27E+05	1059700,000	-23,773	759,880
16H1	3,17E+05	-3,90E+02	316670,000	-0,071	854,865

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

14V4	5,25E+05	-8,96E+04	532180,000	-9,694	692,370
14V2	7,19E+05	-1,50E+05	734040,000	-11,774	692,370
11V2	6,25E+05	5,96E+03	624730,000	0,547	1635,417
11V1	6,92E+05	-6,85E+03	692060,000	-0,567	1635,417
11H3	1,20E+08	-2,86E+04	1200100,000	-1,364	346,185
11H1	1,16E+06	-7,65E+04	1161700,000	-3,777	346,185
	1,21E+07	-2,67E+05	1325089,091	-9,056	806,718

Experiment 2, dag 8, 500 mV, ren vann

24V2	4,66E+06	-5,61E+05	4688700,000	-6,871	628,000
24V1	3,62E+06	-2,03E+05	3624300,000	-3,215	628,000
24H3	6,62E+07	-3,97E+06	66291000,000	-3,430	830,530
23V3	1,23E+06	-2,22E+05	1247100,000	10,270	823,203
23V1	6,91E+06	-2,49E+06	7347000,000	-19,790	823,203
22H4	2,72E+06	2,03E+04	2720800,000	0,427	791,542
22H3	1,56E+06	-1,30E+06	2025700,000	-39,811	791,542
15H3	9,71E+05	-1,02E+05	976730,000	-5,983	1547,758
14V2	4,56E+07	-1,24E+07	47265000,000	-15,193	759,880
10V3	1,86E+06	-7,61E+05	2008900,000	-22,265	510,446
10V1	1,02E+07	-5,90E+06	11817000,000	-29,968	510,446
10H3	2,10E+06	-5,06E+05	2162200,000	-13,522	1153,950
10H2	2,16E+06	-3,47E+05	2183800,000	-9,136	1153,950
10H1	2,09E+06	-2,80E+05	2112800,000	-7,613	1153,950
6H3	1,15E+06	-1,61E+05	1162000,000	-7,981	1130,400
6H2	9,26E+05	-2,97E+05	972580,000	-17,782	1130,400
3V3	5,62E+07	-1,51E+07	58144000,000	-15,007	445,095
2V2	9,17E+05	-7,73E+04	920240,000	-4,818	1017,360
2V1	2,83E+05	-2,08E+04	283780,000	-4,203	1017,360
2H4	6,95E+05	-1,19E+05	705520,000	-9,748	1168,080
2H3	9,02E+05	-1,87E+05	921570,000	-11,735	1168,080
1H1	2,49E+07	-1,36E+07	28399000,000	-28,684	1335,285
	1,08E+07	-2,66E+06	11271805,455	-12,094	932,657

Experiment 2, dag 10, 500 mV, ren vann

23V2	1,41E+06	-1,01E+05	1415100,000	-4,089	979,680
22H4	6,30E+05	-2,08E+05	664050,000	-18,294	791,542
22H3	6,32E+05	-2,03E+05	663650,000	-17,772	791,542
10H3	1,91E+06	-3,60E+05	1946500,000	-10,669	1153,950
10H1	2,85E+06	-4,17E+05	2883100,000	-8,325	1153,950
6H4	3,23E+06	-1,75E+05	3238000,000	-3,097	1415,097
6H3	2,94E+06	-2,07E+05	2943900,000	-4,037	1415,093
3V4	9,56E+05	-7,53E+04	959200,000	-4,505	445,095
3V1	1,16E+06	-7,97E+04	1160800,000	-3,939	445,095
2V2	1,04E+06	-1,56E+05	1050600,000	-8,541	1017,360
2V1	1,05E+06	-1,33E+05	1059100,000	-7,196	1017,360
2H2	7,87E+06	-1,20E+06	7965700,000	-8,679	1318,800
	2,14E+06	-2,76E+05	2162475,000	-8,262	995,380

Experiment 2, dag 12, 500 mV, ren vann

23V3	3,71E+06	-2,26E+05	3716100,000	-3,485	979,680
22H4	2,38E+05	-10750	238380,000	-2,585	791,542
22H3	2,38E+05	-9543,6	237690,000	-2,301	791,542

Vedlegg D,E,F: Eksperimentelle rådata

6H4	3,35E+06	-1,92E+06	3858100,000	-29,810	1415,097
6H3	3,08E+06	-1,73E+06	3534600,000	-29,392	1415,093
3V4	2,41E+06	-2,65E+05	2423900,000	-6,286	445,095
3V1	6,75E+06	-5,72E+05	6770600,000	-4,843	445,095
2V2	1,23E+07	-3,64E+06	12859000,000	-16,430	1017,360
2V1	1,42E+07	-4,19E+06	14817000,000	-16,418	1017,360
2H3	1,23E+06	-6,79E+05	1402400,000	-28,940	1318,800
	4,75E+06	-1,32E+06	4985777,000	-14,049	963,666

Experiment 2, dag 15, 500 mV, ren vann

23V4	1,34E+07	1,43E+05	13408000,000	0,609	1144,792
23V3	1,28E+07	-1,34E+06	12867000,000	-5,962	1144,792
22H2	1,83E+07	-7,06E+06	19580000,000	-21,143	942,000
3V1	1,68E+06	-1,72E+05	1689400,000	-5,857	661,232
3H3	5,94E+06	-2,98E+06	6646500,000	-26,615	1103,906
2V3	4,30E+07	-3,61E+06	43160000,000	-4,798	1017,360
2H4	2,62E+07	-1,87E+07	32143000,000	-35,534	1076,497
2H3	4,80E+07	-3,24E+07	57921000,000	-34,067	1076,497
1H2	1,61E+08	-3,66E+07	164810000,000	-12,830	2210,560
1H4	3,45E+07	-2,54E+07	42834000,000	-36,376	2210,560
	3,64E+07	-1,28E+07	39505890,000	-18,257	1258,819

## Vedlegg F: Nekrotisk fraksjon.

### Eksperiment 1-1

	kontroll	dag3	dag5	dag8	dag12
	35,1494444	62,8215238	32,25016667	46,2092917	57,4808095
	28,2653333	71,0964583	32,94645833	40,5413333	52,0134167
	41,0328333				
	46,0152083				
	44,3865417				
	58,6420476				
	24,0981765				
Nekr.fraks.	39,655655	66,9589911	32,5983125	43,3753125	54,7471131
Stnd.avv.	11,6710856	5,85126232	0,492352559	4,00785177	3,86603056

### Eksperiment 2-2

	dag 5	dag 10	dag 15
	34,8558645	20,795514	42,5229205
	58,0158503	34,7591008	48,9846116
Nekr.fraks.	46,4358574	27,7773074	45,753766
Stnd.avv.	16,376583	9,87374697	4,56910557