

Proceedings of Clinical Innovation

**Bachelor of Science Projects in Biomedical Engineering,
Lund University**

Volume 4, 2017

Editors:

Hanna Isaksson, Associate Professor, Department of Biomedical Engineering, Lund University

Tomas Jansson, Associate Professor, Clinical Sciences Lund, Biomedical Engineering,
Lund University, and Clinical Engineering Skåne

Department of Biomedical Engineering
Faculty of Engineering, Lund University
Box 118
SE-221 00 Lund, Sweden
www.bme.lth.se

ISSN 2001-9629
Printed by Tryckeriet E-huset, Lund University, Sweden

Contents

Preface

Lund University Innovation System Prize in Clinical Innovation

Contents (in alphabetical order, sorted by title)

Amanda Wallin och Emilia Törnell

3D-mätningar på friska barnhöfter påvisar anatomiska skillnader beroende av kön och ålder

Ester Randahl och Johanna Danielsson

CareNotes - en mobilapplikation för registrering av mat, vätska och smärta inom sjukvården

Rita Hermodsson och Frida Börnfors

Fraktalanalys av vänster kammarvägg i hjärt-MR-bilder

Anna Wikström och Emma Andersson

Kamerahållare för bildåtergivning av kirurgens synfält

Linnea Bunse och Elin Branzell

Migration av humana neurala stamceller på elektrospunna fibrer

Emil Nilén och Olle Oswald

Mjukvara för forskning på prenatal blodcirkulation med obstetriskt Dopplerultraljud

Ayla Borglund och Elisabeth Klint

Nanotrådbaserade retinala implantat: en utvärdering av PMMA, OSTE+ och Topas som baspolymerer

Cornelia Sjöberg och Linnea Hellholm

Rescueeffekten - Celltäthets effekt på cellöverlevnad

Carl Sjögren och Benjamin Luikert

Teckenspråkstolkning med hjälp av multivariat normalfördelning i Matlab för framtida användning

Valentina Vitali och Giulia Core

Unexpected similarities: Learning about how brain cells communicate from the venus fly trap

Thomas Syski och Simon Bakran

Utvecklande av Biokompatibla 3D Matriser med hjälp av Elektrospinning och Elektrospray

Michelle Chin och Paula Carlsson

Utveckling av snabbtest för att mäta effektiviteten av det immunoglobulin G-degraderande enzymet, IdeS

Ellen Kastensson och Klara Peraic

Utveckling av system för reglering av pump vid hjärtevaluering

Sophia Grimmeiss Grahm och Ebba Ahlberg

Volymstatusestimering baserat på arteriell blodtrycksdata

Preface

This is the fourth volume in a series of Bachelor of Science theses authored by students in the Biomedical Engineering program at Lund University. Again, all theses are based on scientific problems or clinical needs stemming from activities at Skåne University Hospital or the Faculty of Medicine at Lund University. Fifteen projects are presented which cover a wide range of topics ranging from growth of retinal cells on nanostructured surfaces and design of mobile phone applications to feedback control of infusion pumps. All projects were conducted during the spring 2017 in the format of a course, including also a lecture series on topics relevant to the project development, e.g., sustainability, technical writing, ethics, and perspectives from people employed by the healthcare sector and industry.

The examination consisted of a report, included in this volume, and public defense held at Skåne University Hospital on June 1, 2017 when each group gave a presentation of their work followed by opposition from their peers. The reports are formatted as journal papers with the goal to train students in scientific communication; the students could choose to author the reports in Swedish (preferred) or English.

The project course is designed to have a clear focus on innovation and entrepreneurship. In these respects, the active and supportive participation of Thomas Rundqvist, Sven Olsson, Alexander Jöndell and co-workers at Lund University Innovation have been instrumental—they have prepared the students to perform a successful pitch of their project as half-time evaluation. As conclusion of the examination, pitching was taken to a more serious level: three projects were elected to qualify for the Lund University Innovation System Prize in Clinical Innovation. The best pitch was awarded with 10 000 SEK, to be spent on further development of the project (see next page).

We would like to express our gratitude to the following persons at Skåne University Hospital and the Medical Faculty at Lund University, who have willingly served as initiators and advisors to the projects: Gabriel Adrian, Jonas Brännström, Einar Heiberg, Fredrik Johansson, Sofia Järnum, Audrius Paskevicius, Maria Thereza Perez, Ulrike Richter, Trygve Sjöberg, Stig Steen, Carl-Johan Tiderius, Phan-Kiet Tran, and Bitte Zetterman.

We would also like to express our gratitude to the following persons who have willingly served as supervisors: Martin Bengtsson, Crister Ceberg, Helen Fransson, Lorenzo Grassi, Anders J. Johansson, Fredrik Johansson, Charlotta Johnsson, Pelle Ohlsson, Kristian Soltesz, Martin Stridh, Lars Wallman, and Kalle Åström.

Lund, November 2017

Tomas Jansson

Hanna Isaksson

Lund University Innovation Prize in Clinical Innovation

Lund University Innovation has again this year generously offered 10 000 SEK as a prize to the group presenting the best arguments for commercial potential or project urgency. The sum can be used to develop the project further, for instance acquisition of materials or market surveys. Four groups were selected as finalists by the course management, based on the reports handed in at the first deadline, the criteria being innovative potential, scientific execution, and quality of the written report:

- Ayla Borglund and Elisabeth Klint—Nanotrådsbaserade retinala implantat: en utvärdering av PMMA, OSTE+ och Topas som baspolymerer
- Emil Nilén and Olle Oswald—Mjukvara för forskning på prenatal blodcirkulation med obstetriskt Dopplerultraljud
- Carl Sjögren and Benjamin Luikert—Teckenspråkstolkning med hjälp av multivariat normalfördelning i Matlab för framtida användning
- Anna Wikström and Emma Andersson—Kamerahållare för bildåtergivning av kirurgens synfält

The jury, consisting of Thomas Rundqvist, Alexander Jöndell and Sven Olsson, Lund University Innovation, and Hanna Isaksson, course manager, selected Anna Wikström and Emma Andersson as recipients of the prize, after having delivered an excellent pitch for their project *Kamerahållare för bildåtergivning av kirurgens synfält*.



Anna Wikström and Emma Andersson receiving the Lund University Innovation Prize in Clinical Innovation from Thomas Rundqvist.

3D-mätningar på friska barnhöfter påvisar anatomiska skillnader beroende av kön och ålder.

Amanda Wallin (BME-14), Emilia Törnell (BME-14)

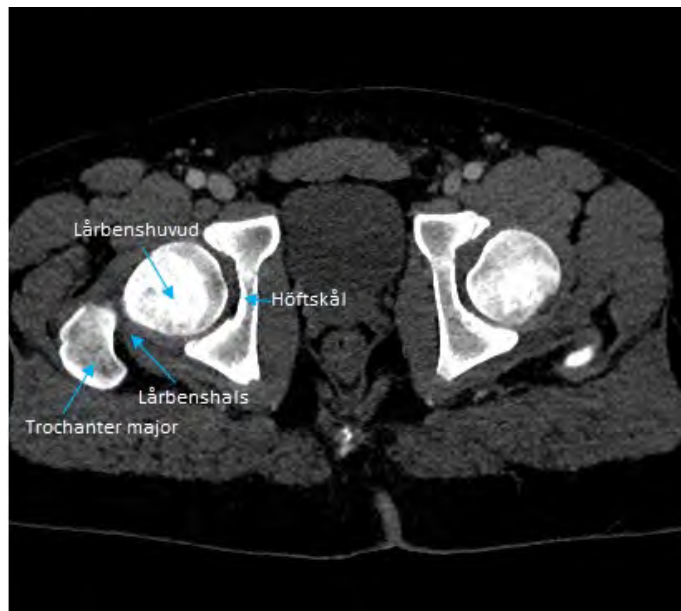
Sammanfattning—Diagnostisering av höftsjukdom på barn innebär idag att läkare tittar på 2D röntgenbilder och visuellt avgör om sjukdom föreligger. Ur 2D röntgenbilder kan vissa vinklar mätas upp manuellt, men ett problem är att noggrannheten i att mäta 3D strukturer i en 2D bild är starkt begränsad. Dessutom saknas i dag en grundläggande beskrivning av hur olika anatomiska parametrar och vinklar varierar mellan barn i samma ålder, samt hur de andras under ett barns uppväxt.

Noggrann uppmätning av anatomiska parametrar i 3D kan öka förståelse för ett antal sjukdomar samt underlätta diagnostik. I ett större projekt utvecklas just nu en metod för att estimera 3D-bilder av en patient baserat på endast en 2D bild, samt en statistiskt baserad formmall som beskriver variationen i populationen. Ett lyckat projekt kan öka noggrannheten av mätningarna utan att utsätta patienter för den stråldos som en 3D datortomografiundersökning (CT-undersökning) innebär, samtidigt som det minskar kostnaderna för undersökningen. För att möjliggöra ett objektivt beslutsfattande vid diagnostisering av barns höfter med denna metod har vi arbetat för att skapa en första statistisk modell. Vi har segmenterat 3D CT-bilder på höfter från friska barn i åldrarna 7-20 år samt mätt ett antal anatomiska parametrar och vinklar.

Resultatet av mätningar på sex patienter ur tre åldersgrupper visade en minskande alfa-vinkeln med ökande ålder för både flickor och pojkar. Acetabular index var större för pojkar i förhållande till flickor i samma ålder. Med ytterligare mätningar kan en fullständig statistisk modell utformas och fungera som komplement vid diagnostisering. I kombination med metoden att gå från 2D-bilder till 3D-bilder blir resultatet positiva följder för patienten med avseende på lägre stråldos, lägre kostnader och högre noggrannhet.

I. INTRODUKTION

För att förebygga och undvika de allvarliga komplikationer som följer obehandlade sjukdomar i höfterna på barn behövs ett effektivt sätt för diagnostik utan att behöva utsätta patienterna för onödigt höga stråldoser. Regelbunden CT-skanning är alltså inte ett alternativ, även om diagnostisering underlättas med tillgång till en 3D-bild. Förutom hög stråldos skulle det även kosta mycket tid och pengar för dessa undersökningar. Att endast baserat på 2D-röntgenbilder kunna dra slutsats om sjukdom föreligger med samma precision som med 3D-röntgenbilder är därför att föredra. En metod som håller på att utvecklas vid institutionen för biomedicinsk teknik, LTH, vid Lunds Universitet, handlar just om att gå från 2D-röntgenbilder på höften till dess motsvarighet i 3D. 2D- och 3D-bilder har tagits på en grupp patienter. Utifrån mätningar



Figur 1. En snittbild av en höft. Höger och vänster lårbenshuvud har tät anslutning till höger respektive vänster höftskål. På bilden visas även lårbenshals och trochanter major, medan trochanter minor finns längre ned längs lårbenet och syns därmed inte i snittet.

på 3D-bilderna har en modell skapats varpå 3D-rekonstruktion av 2D-bilderna har utförts genom att matcha deras mätvärden mot modellen [1]. På detta vis kan en noggrann 3D-bild uppnås med lika låg stråldos som för 2D-röntgenbilden. Den slutgiltiga produkten av det projektet kommer ha många potentiella tillämpningar och bland dem finns diagnostisering av höftsjukdomar som typisk drabbar barn.

Höften har i huvudsak två viktiga beståndsdelar som måste samverka. Dessa komponenter är femur och acetabulum som med vardagligt tal benämns som lårben inklusive lårbenshals och lårbenshuvud samt höftben med höftskål. På lårbenet sitter även trochanter major och trochanter minor. Trochanter major är en utbuktning på den övre, bakre delen av lårbenet och utgör fästpunkt för muskeln gluteus medius som är en av sätesmusklerna, se figur 1. Trochanter minor är en annan utbuktning som sitter lite längre ned längs lårbenet och i denna fäster iliopsoas, en muskel som sträcker sig från ländryggen till lårbenet [2].

Under ett barns uppväxt utgår lårbenshalsens tillväxt från en skiva av brosk. Denna växer och utvecklas och med tiden omvandlas brosk till ben. När utvecklingen är klar bildas en liten knöl på den laterala sidan av lårbenshuvudet och denna

Inlämnat den 5 juni 2017

E-mejladress: {mat12awa@student.lu.se, mte14eto@student.lu.se}

Tekniska handledare: Hanna Isaksson och Lorenzo Grassi, Biomedicinsk teknik, Lunds tekniska högskola

Klinisk handledare: Carl-Johan Tiderius, Avdelning ortopedi, kliniska vetenskaper

markerar var tillväxtskivan suttit under höftens tillväxtsfas. Hos vissa barn kan höftsjukdomar utvecklas under tillväxten och dessa är alltid viktiga att åtgärda så tidigt som möjligt. Studien som sammanfattas i denna rapport fokuserar främst på parametrar som utgör viktiga indikationer för sjukdomarna dysplasi, fysiolyt och Perthes sjukdom.

Dysplasi, som drabbar 7 per 1000 nyfödda barn i Malmö varje år, är ett tillstånd som innebär felpositionering i höften. Detta är svårt att detektera då dysplasi refererar till instabilitet som är svårt att definiera [3]. Dysplasi utvecklas ofta under en persons första levnadsår och det är i allra högsta grad viktigt att det upptäcks i tid eftersom det då finns goda möjligheter att korrigera problemet genom operation eller applicering av en rosenskena [4] [3]. En obehandlad dysplasi kan istället leda till allvarliga besvär med artros senare i livet, ofta med påföljande utbyte av höftleden mot en protes [5]. För att undvika detta är det viktigt att få kunskap kring hur höften utvecklas och förändras över tid. På så vis kan det bli lättare att identifiera gränsen för sjukdom.

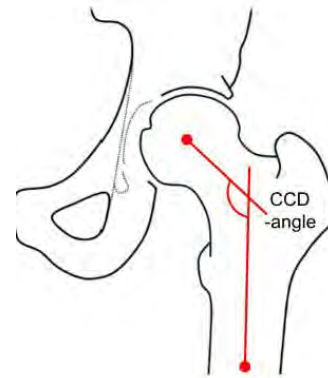
Perthes är en sjukdom som innebär att lårbenshuvudet blir missbildat. Missbildningen uppstår i grunden av nekros som uppkommer på grund av ett avbrott i blodförsörjningen till tillväxtplattan [6]. Perthes drabbar barn och främst pojkar, andelen är 4:1 mot flickor. Vanligast är att barnen är i åldern tre till sju år när sjukdomen uppkommer och oftast upptäcks det på grund av att barnet haltar och känner smärta lokaliserad i lumsken samt i vissa fall även i lår och knän [7]. För att behandla Perthes sjukdom har bisfosfonater visat sig vara effektivt, både i frågan om reducering av deformation och minskning av smärta hos patienten. Med denna bromsande metod är det viktigt att medicinering sätts in i ett tidigt stadium eftersom sjukdomen är icke-reversibel [8].

Fysiolyt orsakas av att trycket på lårbenshuvudet blir för högt för att brosket ska kunna stå emot under tillväxtfasen. Detta leder i sin tur till att glapp uppstår mellan lårbenshuvud och lårbenshals, där huvudet tenderar att glida ner en liten bit. Tidigare studier visar på samband mellan sjukdomen och en för stor alfa-vinkel, beskriven i figur 5, och tillståndet orsakar svår smärta [9] [10]. En av behandlingarna som kan göras för att minska alfa-vinkeln till ett friskt tillstånd är artroskopisk osteokondroplasti. Detta innebär att en kirurg filar ned knölen från tillväxtplattan som hindrar höftens rörelse och som också definierar storleken på alfa-vinkeln [11].

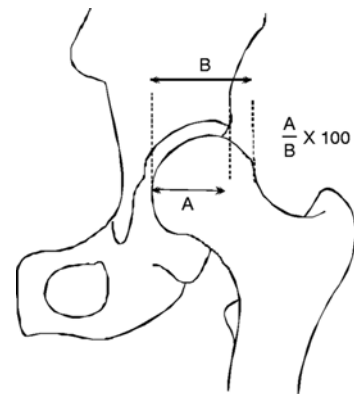
I vissa allvarliga fall av både Perthes och fysiolyt kan det, liksom för patienter med dysplasi, vara aktuellt att genomföra en fullständig ersättning av den ursprungliga, biologiska höften och istället sätta in en protes [12].

Idag finns det redan definierade vinklar som kan undersökas för att diagnostisera olika höftsjukdomar hos barn. Vinklarna som belyses i denna artikel är CCD-vinkeln (caput-collum-diaphyseal angle), FHEI (femoral head extrusion index), acetabular index och alfa-vinkeln, där alfa-vinkeln även utgör en intressant parameter för huruvida en individ förväntas utveckla artros senare i livet [13]. Illustration av de fyra utvalda parametrarna finns i figur 2-5. För dysplasi är FHEI, även kallad Reimer's index, och acetabular index viktiga parametrar att bestämma [14] [15]. En avgörande vinkel som går att mäta för att diagnostisera fysiolyt är som tidigare nämnt alfa-

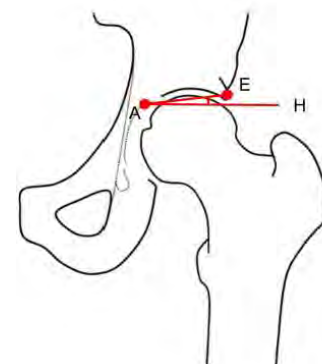
vinkeln som inte får vara för stor [16]. Vid diagnostisering av Perthes sjukdom är parametrarna CCD-vinkel, acetabular index och FHEI viktiga att undersöka och mäta [17] [18].



Figur 2. CCD-vinkeln utgörs av vinkeln mellan de rätta linjer som går genom centrum av lårbenet respektive lårbenshalsen [19].



Figur 3. FHEI är ett mått på hur stor del av lårbenshuvudet som finns innanför höftskålen [20].



Figur 4. Acetabular index är vinkeln mellan linjen från den mest superiora punkten på acetabulum (E) till den mest mediala punkten i acetabulum (A) samt den horisontella linje som går ut från A (H) [17].



Figur 5. Alfa-vinkeln utgörs av vinkeln mellan en rät linje längs mitten av lårbenhalsen samt linjen mellan centrum av lårbenshuvud och den punkt där lårbenshuvudets form viker in från ytan av en sfär [13].

Speciellt alfa-vinkel kan vara svår att mäta i 2D-röntgenbilder eftersom den intressanta alfa-punkten kräver att bilden tas då patienten ligger i grodposition. Att mäta alfa-vinkeln ur en traditionellt tagen röntgenbild blir därmed svårt, men underlättas vid tillgång till en 3D-bild. Nuvarande underlag för mätning av dessa saknar noggrann anpassning till ålder, variation och standardavvikelse inom varje åldersgrupp samt eventuell variation mellan könen. De riktlinjer som används är följande: alfa-vinkeln bör ligga under 60 grader [21] [22]. CCD-vinkeln ligger normalt på omkring 150 grader hos nyfödda och 126 grader hos vuxna [23]. Gällande FHEI, som främst är intressant vid diagnostisering av dysplasi och Perthes anges att ett index på mindre än 75 procent indikerar sjukdom [24]. Litteraturstudier kring acetabular index påvisade att denna har ett brett normalspann, 3-13 grader [25].

För alla parametrar utom CCD-vinkeln är riktlinjerna definierade utifrån studier på vuxna människor och det är inte säkert att dessa är tillämpningsbara på barn. Dessutom, och kanske än viktigare, har mätningarna tidigare gjorts på 2D-bilder, vilket kan ge felaktiga värden på vinklar som i praktiken handlar om 3D-strukturer.

Idag saknas data på om variationer mellan olika friska individer föreligger och om det finns en normalkurva för hur parametrarna förändras med ålder och varierar mellan könen. Intressant är också att titta på hur stor spridningen är inom varje köns- och åldersgrupp, det vill säga hur stor standardavvikelsen är för friska personer. En sådan normalfördelning är i dagsläget inte framtagen. För att mäta de fyra parametrarna kan landmärken användas och genom att placera ut dessa på en 3D-struktur kan mätningar av hur de förhåller sig till varandra utföras. För acetabular index är en av de intressanta punkterna den mest mediala punkten i acetabulum. Eftersom denna punkt varierar mellan flickor och pojkar förväntas en skillnad i normalvärden på acetabular index för de olika könen [26].

För att underlätta undersökning av barns höfter och diagnostisering av dessa sjukdomar har syftet med denna studie varit att ta fram statistik på vad som kan anses som normala värden för olika parametrar. Genom att segmentera 54 CT-bildset från friska barn, det vill säga frilägga höft- och lårben från resten av kroppen i bilden baserat på densitet, samt att utföra mätningar på dessa har målet varit identifiera mönster i hur olika vinklar

och parametrar varierar under ett barns uppväxt, hur de skiljer sig mellan de båda könen och hur stort spann som innefattas i definitionen av friskhet. Följderna av en vidareutveckling av denna studie kommer bli att diagnostiseringen kan ske baserat på matematik istället för subjektiva uppfattningar från läkarens sida. Det kommer minska osäkerheten i besluten som fattas kring diagnos och behandling och därmed kommer patienterna med större sannolikhet få rätt typ av hjälp och behandling. Mätningarna har gjorts på 3D-bilder och när metoden att utifrån en 2D-bild beräkna fram dess tredimensionella motsvarighet är färdigutvecklad så kommer statistik från studier likt denna även kunna appliceras på konventionella röntgenbilder, vilket är den vanligaste formen av röntgenundersökningar som utförs. Kombinationen mellan att kunna studera 2D-bilder i 3D samt statistik för parametrar i 3D kommer resultera i billigare undersökningar med låg stråldos och hög noggrannhet [27].

II. DATA

CT-bilderna som segmenterades avbildade patienter som hade genomgått en CT-undersökning av andra orsaker än höftsjukdom. De 64 friska patienterna, med avseende på höftsjukdom, valdes ut av läkare Carl-Johan Tiderius. Undersökningarna har utförts i Lund och Malmö. Bilderna från CT-undersökningarna var av filformatet DICOM, som står för "Digital Imaging and Communications in Medicine" och är standard för medicinsk bildgivning. Speciellt för bilder av detta format är att de innehåller exempelvis pixeldata, patient-ID, stråldos, exponeringstid samt information om var och när undersökningen har utförts i en och samma fil. Denna information kan aldrig separeras från själva bilden. Av de 64 CT-bildseten var det inte alla som nådde upp till en tillräckligt god kvalitet med avseende på upplösning för att segmenteras. Antalet kompletta segmenteringar blev 54 stycken och fördelningen mellan ålder och kön visas i tabell I.

Tabell I
ANTAL SEGMENTERADE CT-BILDER AV FLICKOR OCH POJKAR I
ÅLDERSGRUPPERNA 7-10 ÅR, 12-15 ÅR OCH 17-20 ÅR.

Ålder (år)	Flickor	Pojkar
7-10	3	5
12-15	9	17
17-21	9	11
Totalt antal	21	33

III. METOD

För segmentering av medicinska bilder finns flera gratisprogram att tillgå på nätet. Grundläggande kunskap om segmentering och funktionen ”Thresholding” som är nyckelfunktion i sammanhanget erhöles i programmet ImageJ [29]. Thresholding innebär att användaren väljer ett intensitetsfönster som avspeglar tätheten i objektet och med rätt inställning separeras skelettet från mjukvävnaden. Ett antal exempelbilder segmenterades innan arbetet med de aktuella patienterna startades upp i Stradwin [28]. Svårigheter med inläringen och därmed hinder i utförande av ett professionellt arbete med bilderna medförde en övergång till programmet Seg3D [30]. Detta program har ett enklare användargränssnitt, men tillräckligt hög nivå för målen med segmenteringen. En funktion som dock faller bort är mätning av kortikal tjocklek.

Då bilderna på patienterna innehöll en större del av kroppen än endast höfterna användes programmet LHP Builder för att med verktyget ”Crop” ta bort alla snitt ovanför acetabulum [31]. Voxelstorleken valdes kubiskt med funktionen ”Volume resample” så att längden i alla tre dimensioner x, y och z blev lika. Om voxelmått från början hade stor diversitet i proportioner blev bilderna ofta dåliga när voxel-elementen approximerades till kuber eftersom det då krävdes stor förändring i någon dimension. Några blev så dåliga att de inte kunde användas. Bilderna exporterades som VTK-filer inför segmenteringsprocessen.

Bensegmenteringen gjordes enligt ett halvautomatiskt protokoll bestående av fem funktioner: ”Threshold”, ”Connected components”, ”Smooth dilate erode”, ”Paint brush” och ”Fill holes”. Med ”Threshold” sorterades pixlar med en intensitet inom valt intervall ut. Beroende på bildernas ljusstyrka och kontrast krävs olika inställningar för att separera störst andel ben från omgivande vävnad utan att också markera denna. ”Connected components” användes för att plocka ut alla utsorterade pixlar inom en viss sammanhängande struktur. För varje patient gjordes detta för höger och vänster femur samt för höger och vänster acetabulum, vilket resulterade i fyra olika lager som vidare kunde behandlas separat.

Med ”Smooth dilate erode” fylldes små hål i kanterna på den i övrigt sammanhängande strukturen. Funktionen korrigerar inte avvikelser över en viss storlek och därför utnyttjades ”Paint brush” för att manuellt fylla i kanterna. Strukturen fylldes med funktionen ”Fill holes”. Håligheterna berodde dels på det inre spongiösa benets lägre densitet jämfört med det yttre kortikala, vilket medför lägre intensitet i röntgenbilder och därmed annat krav på tröskelvärde. Lårbenets naturliga hålighet bidrog också. Varje patients fyra strukturer exporterades som mat-filer och omvandlades till STL-filer i Matlab.

Tretton landmärken placerades ut på femur, beskrivna i tabell II, där ID står för landmärkets benämning i programmet LHP Builder.

Landmärkena ”1” till ”4” på femur utnyttjades för att skapa landmärket ”Centrum av lårben” som beräknades genom att använda funktionen ”Average landmark” som skapar en medelvärdespunkt. ”Topp av lårben” placerades i centrum på toppen av lårbenet, precis i angränsning till gropen fossa trochanterica vid trochanter major [2]. En linje skapades med

funktionen ”Distance meter” mellan denna och ”Centrum av lårben”. Denna linje är nödvändig för att bestämma CCD-vinkeln och alfa-vinkeln. Den andra linjen som krävs för beräkning av CCD-vinkeln går från centrum av lårbenshuvudet till en punkt i mitten av lårbenshalsen. En sfär anpassades till lårbenshuvudet och i centrum av denna placerades ”Centrum av lårbenshuvud”. ”Alfa-punkt”, nödvändig för alfa-vinkeln, definieras som den punkt där sfären avviker från lårbenshuvudet. Den mest prominenta punkten på trochanter minor, ”Prominent trochanter minor”, och den mest superiora punkten på trochanter major, ”Superior trochanter major”, medelvärdebildades till ländmärket ”Medelvärdespunkt på trochanter”. DICOM-filen från samma patient importerades och funktionen ”Slicer” användes för att skapa ett plan som orienterades genom de tre landmärkena ”Centrum av lårben”, ”Centrum av lårbenshuvud” och ”Topp av lårben” och förflytta medelvärdespunkten till detta plan. Med funktionen ”Refsys” skapades ett referenssystem med ”Centrum av lårbenshuvud” som utgångspunkt och x-axeln i riktning längs lårbenshalsen. Landmärket ”Medelvärdespunkt på trochanter” förflyttades längs denna x-axel till skärningen med linjen mellan ”Topp av lårben” och ”Centrum av lårben”. CCD-vinkeln beräknades med detta landmärke som utgångspunkt och ”Centrum av lårbenshuvud” och ”Centrum av lårben” som slutpunkter med funktionen ”Distance meter”. Alfa-vinkeln beräknades utifrån de tre punkterna ”Centrum av lårbenshuvud”, ”Medelvärdespunkt på trochanter” samt ”Alfa-punkt” med samma beräkningsfunktion som tidigare användes för att beräkna CCD-vinkeln.

Acetabular index beräknades mellan punkterna ”Medial punkt på acetabulum”, ”Superior punkt på acetabulum” och ”Horisontell punkt”. Granskning av CT-bilderna i arbetsfönster ”RXCT” underlättade placering av den mediala punkten. ”Superior punkt på acetabulum” placerades på den högsta punkten av höftskålens kant. Detta landmärke duplicerades varav den ena projicerades ned till samma z-koordinat, där z-axeln i CT-bilder definieras längs kroppen, som den mediala punkten.

FHEI utgörs av kvoten mellan två avstånd i höften, se figur 3, som beror av tre punkter. ”Medial punkt på lårbenshuvud” hittades med samma metod som ”Medial punkt på acetabulum”. ”Lateral punkt på lårbenshuvud” skapades som en kopia av alfa-punkten som naturligt ligger som den mest laterala punkten på lårbenshuvudet. Kopian projicerades ned till samma z-koordinat i referenssystemet för CT-bilderna som lårbenshuvudets mediala punkt. På samma sätt projicerades även en kopia av ”Superior punkt på acetabulum” till denna z-koordinat.

Alla landmärken som placerades på lårben, lårbenshals och lårbenshuvud samt de som placerades på höftskålen visas i tabell II respektive tabell III och resultatet av landmärkenas placering på dessa komponenter visas i figur 6 respektive figur 7.

Metoden för placering av landmärken validerades genom att för en av patienterna utföra mätningar vid tre olika tillfällen. Medelvärde, standardavvikelse och variationskoefficient beräknades baserat på dessa.

Tabell II
VALDA LANDMÄRKEN PÅ FEMUR. ID HÄNVISAR TILL LANDMÄRKETS
REFERENS I LHP BUILDER.

Landmarks på femur	ID
1	1
2	2
3	3
4	4
Centrum av lårben	average
Topp av lårben	top
Prominent trochanter minor	prominentLT
Superior trochanter major	superiorGT
Medelvärdespunkt på trochanter	averageTrochanter
Centrum av lårbenshuvud	centerHead
Alfa-punkt	alpha
Lateral punkt på lårbenshuvud	lateralHead
Medial punkt på lårbenshuvud	medialHead

Tabell III
VALDA LANDMÄRKEN PÅ ACETABULUM. ID HÄNVISAR TILL
LANDMÄRKETS REFERENS I LHP BUILDER.

Landmarks på acetabulum	ID
Medial punkt på acetabulum	medialAcetabulum
Superior punkt på acetabulum	superiorAcetabulum
Horisontell punkt	acetabularIndexPoint
Lateral punkt på acetabulum - FHEI	lateralAcetabulumFHEI

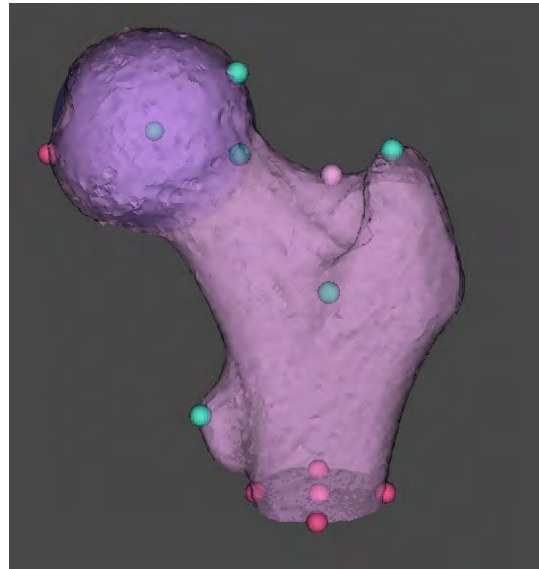
IV. RESULTAT

Mätningar av CCD-vinkel, alfa-vinkel, FHEI och acetabular index färdigställdes på höger och vänster höft på sex patienter, en pojke och en flicka från varje åldersgrupp. På flickan i den yngsta åldersgruppen var vänster femur för kort för att på ett bra sätt placera ut landmärken, vilket medförde att en annan patients vänstra höft från denna grupp valdes ut. Beräknade resultat på höger och vänster höft för flickan i åldersgrupp 7-10 år är därmed från olika patienter. Resultatet av alla mätningar visas i figur 10-13.

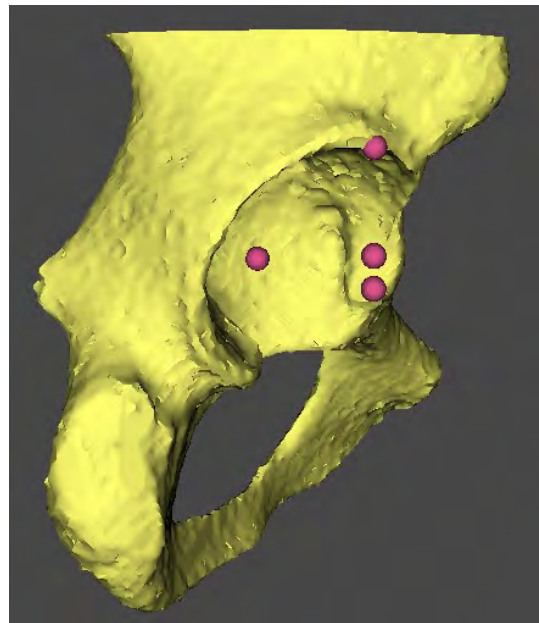
Bakgrundens beskrivning av en minskande CCD-vinkel med ökande ålder speglas inte i de mätningar som gjorts, figur 10. Acetabular index var i fem fall av sex mindre för flickor än pojkar, figur 13. Alfa-vinkeln tycks inte skilja sig märkbart mellan pojkar och flickor men minskar överlag med ökande ålder, figur 11. FHEI är i stort sett samma för alla åldrar och ser inte ut att variera mellan könen, figur 12.

Validering av metoden för placering av landmärken på bilderna av flickan i åldersgrupp 12-15 år visar att alfa-vinkeln är den med störst osäkerhet, där mätningarna av patientens vänstra sida resulterar i stor standardavvikelse, se tabell IV. I övrigt har mätningarna på patientens vänstra sida mindre spridning än de som gjorts på den högra höften.

CT-bilderna av patienter från den yngsta gruppen hade överlag sämre upplösning än CT-bilderna av patienterna från de två äldre grupperna. På grund av detta var det en patient av manligt kön i den yngsta åldersgruppen där det endast var möjligt att segmentera höger och vänster femur och inte acetabulum. Denna segmentering är användbar vid mätning av alfa-vinkel och CCD-vinkel, dock inte vid mätning av



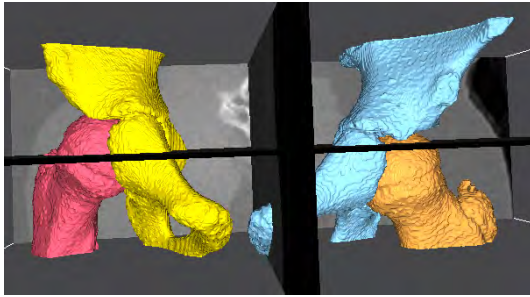
Figur 6. Landmärken utplacerade på femur i programmet LHP Builder.



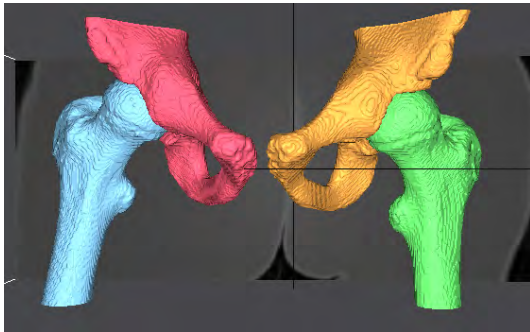
Figur 7. Landmärken utplacerade på acetabulum i programmet LHP Builder.

acetabular index och FHEI. Ofta inkluderade bilderna på de yngsta patienterna inte lika stor del av lårbenet utan slutade strax under lårbenshalsen. Detta går att se vid jämförelse av bilden på en segmentering från åldersgrupp 7-10 år, figur 8, med bilden på en segmentering från åldersgrupp 12-15 år, figur 9. Vid mätning av CCD-vinkeln är just lårbenet en viktig komponent av den geometriska figuren.

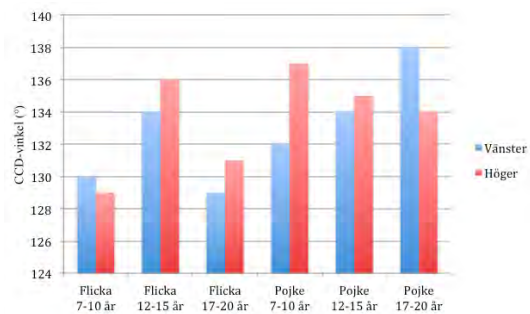
När mätningar har utförts på resterande 48 patienter vars höfter har segmenterats kan ett statistiskt underlag för de fyra parametrarna skapas.



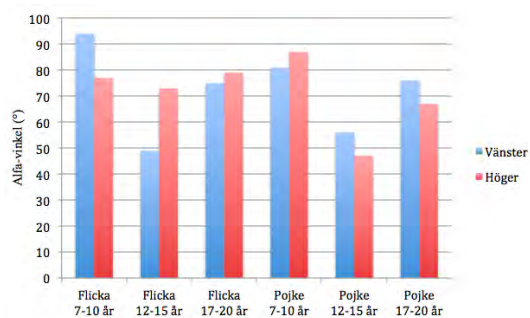
Figur 8. Segmentering av en flickas höger och vänster femur, samt höger och vänster acetabulum i åldersgrupp 7-10 år.



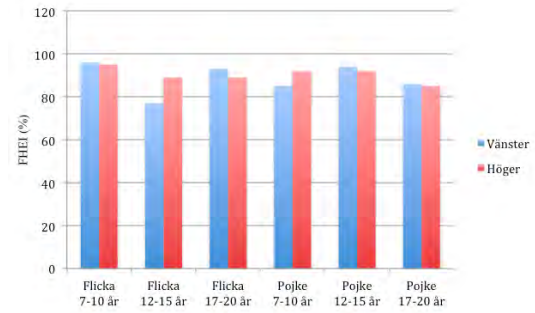
Figur 9. Segmentering av en pojkes höger och vänster femur, samt höger och vänster acetabulum i åldersgrupp 12-15 år.



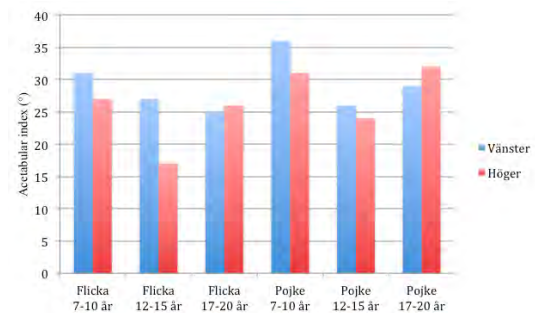
Figur 10. CCD-vinkel på vänster (blå stapel), respektive höger (röd stapel) höft för de olika åldersgrupperna.



Figur 11. Alfa-vinkel på vänster (blå stapel), respektive höger (röd stapel) höft för de olika åldersgrupperna.



Figur 12. FHEI för vänster (blå stapel), respektive höger (röd stapel) höft för de olika åldersgrupperna.



Figur 13. Acetabular index på vänster (blå stapel), respektive höger (röd stapel) höft för de olika åldersgrupperna.

Tabell IV

SAMMANSTÄLLNING AV BERÄKNADE VINKLAR OCH PARAMETRAR I LHP BUILDER SAMT MEDELVÄRDE, STANDARDAVVIKELSE (SD) OCH VARIATIONSKOEFFICIENT (CV) FÖR FLICKAN I ÅLDERSGRUPP 12-15 ÅR.

Beräkning	CCD [°]	Alfa [°]	FHEI [%]	Acetubular index [°]
1 Vänster	134	49	77	27
2 Vänster	132	57	76	26
3 Vänster	135	61	77	27
Medelvärde	133,7	55,7	76,7	26,7
SD	2,3	37,3	0,33	0,33
CV %	1,7	67,1	0,43	1,25
1 Höger	136	73	89	17
2 Höger	133	79	81	22
3 Höger	137	77	82	24
Medelvärde	135,3	76,3	84	21
SD	4,3	9,3	19	13
CV %	3,2	12,2	22,6	61,9

V. DISKUSSION

Syftet med studien var att baserat på kvantitativa 3D-mätningar ta fram en statistiskt modell för hur höftens olika parametrar och vinklar varierar under ett barns uppväxt, hur de skiljer sig mellan könen samt hur stor variation som föreligger inom varje åldersgrupp.

Jämförelse av den uppmätta alfa-vinkeln inom könen påvisar en minskning med ålder. Om detta kan säkerställas innebär det att en för stor alfa-vinkel hos barn inte alltid behöver innebära att personen kommer utveckla fysiologiska, utan att parametern kan komma att ändras till ett friskt värde under barnets uppväxt. Litteraturstudier visade att alfa-vinkeln i en 2D-bild ska ligga under 60 grader för friska vuxna. Att våra mätningar visar på större värden kan bero på att de gjorts på barn och i 3D. Gällande FHEI påvisar värden mindre än 75 % sjukdom. Då ingen markant skillnad kunde ses i denna parameter varken vid jämförelse mellan kön eller över ålder och alla uppmätta värden är större än 75 % så överensstämmer detta med tidigare studier. Uppmätta värden på acetabular index bekräftade förväntningarna om skillnad mellan pojkar och flickor. Resultatet indikerar generellt sett större värden för pojken jämfört med flickan i respektive åldersgrupp. Mätningarna resulterade dock i betydligt större värden än det normalspann på 3-13 grader som litteraturstudien visade. Felet gentemot normalvärdena är repetitivt, vilket tyder på ett systematiskt fel vid placering av någon av de ingående landmärkena. Av mätningarna på CCD-vinkeln kan en minskning med åldern urskiljas. Detta är motsägande för det som framgick i litteraturstudien. Anledningen till detta kan vara att de yngre patienternas CT-bilder ofta hade ett kortare lårben vilket är av betydelse för den linjen som ska placeras i mitten av denna.

Valideringen av landmärkesplaceringen visade konsekventa mätningar av CCD-vinkeln och FHEI, vilket gör metoden lämplig för att jämföra dessa parametrar mellan olika individer. Bortsett från mätningar av alfa-vinkeln hade mätresultaten från patientens högra sida större spridning än den vänstra. Detta gäller speciellt acetabular index som varierar mellan 17 och 24 grader vid de tre olika mätningarna, vilket vi tror beror på den svårplacerade punkten på mediala acetabulum snarare än den på superior acetabulum. Den till synes bristande träffsäkerheten på patientens högra höft är att bilderna av denna sida slutade högt upp på lårbenet, vilket hindrade korrekt placering av landmärket på trochanter minor. Detta har inget med patientens högra sida att göra utan beror på bildtagning av just denna patient.

Då alla de parametrar som undersöktes är definierade utifrån 2D-röntgenbilder är det inte säkert att de normalvärden som togs upp i bakgrunden är lämpliga att jämföra våra 3D-mätningar med. Mätningarna i 3D gör att de beräknade vinklarna inte hamnar i samma plan som det skulle gjort i ett 2D-snitt. Detta medför att vinklarna som beräknas i 3D kan få ett större värde. Detta kan illustreras genom att tänka sig två skärande linjer i ett plan. Om planet studeras som en skiva rakt framifrån så kan en viss vinkel, θ , noteras. Om betraktaren istället tittar ovanifrån så kommer linjerna ligga ovanpå varandra, så att vinkeln mellan dem blir noll. Alla

lägen däremellan kommer resultera i en vinkel någonstans mellan noll och θ , vilket också blir fallet när olika vinklar i höften studeras i 2D-bilder. Även den manuella utplaceringen av landmärken kan vara en grund till de större beräknade värdena då detta kan utgöra ett systematiskt fel. Därför skulle vår framtida statistik bättre lämpa sig för att undersöka om det finns variationer mellan olika åldrar och mellan könen genom jämförelse av mätningarna inom vår studie än för jämförande med tidigare utförda studier.

En annan följd av den manuella segmenteringen är att bilderna från de yngre barnen, med stor andel brosk i höftbenet, var svåra att segmentera på ett konsekvent sätt. Ibland var brosket tydligt och kunde plockas ut som ben, men ibland gick brosket inte att urskilja från mjukvävnaden och i dessa fall resulterade broskpartierna i stora glapp i segmenteringen, se figur 8. Detta gav också konsekvensen att det blev än svårare att veta var landmärket "Medial punkt på acetabulum" skulle placeras. Ibland tycktes den mest mediala punkten ligga precis i hålrummet och då fick landmärket istället placeras på närmaste punkt med ben, även om denna kunde ligga lateralt om den önskade punkten.

Fördelen med att segmentera höftpartiet i programmet Seg3D är enkelheten i att förstå de funktioner som används för detta syfte. Det ges ett tidigt visuellt resultat då de segmenterade komponenterna färgläggs. Nackdelen med programmet är att trots de automatiserade funktionerna i programmet krävs en hel del manuellt arbete där segmenteringen på många enskilda bildskivor måste korrigeras. Vid jämförelse med Stradwin som är ett mer komplext program så lämpade Seg3D sig bättre då processen hade färre steg och tidigt återgav visuell feedback som underlättade i de första stegen av projektet, samtidigt som resultatet av segmenteringarna såg mer korrekta ut. Framtida studier kan använda mer avancerad segmenteringsteknik för att få automatiserade metoder där även mätning av det kortikala benet kan vara av intresse.

Anledningen till att bilderna från den yngsta patientgruppen hade sämre upplösning än de övriga beror på att barn är känsligare för bestrålning än vuxna och därmed strävas det efter att minimera stråldosen när dessa undersöks. Av samma anledning, minimal bestrålning, var bilderna i den yngsta åldergruppen inte heller lika många som bilderna i de äldre. Små barn undersöks i högre grad med konventionell röntgen framför CT. Följderna av detta blir att mätningarna inte garanterar samma noggrannhet samt att standardavvikelsen kan förväntas bli större bland de yngsta barnen än för de äldre där bildseten både är fler och har bättre upplösning.

Antalet patienter som studerats var få för att få en träffsäker statistik som avspeglar de variationer som generellt föreligger i en större population. Det finns en risk för att de patienterna i denna studie har lägre eller högre värden på parametrarna än den stora massan, vilket både kan leda till felaktiga medelvärden och dessutom påvisa för stort eller för litet värde på standardavvikelsen som fanns med i hypotesen som vi utgick ifrån.

VI. SLUTSATSER

Idén bakom studien som har genomförts har stor potential att bli användbar i en ny metod för undersökning och diagnostisering av barns höfter. Baserat på de mätningar som gjorts syns en trend av en minskande alfa-vinkel med ökande ålder. Acetabular index tycks generellt sett vara större bland pojkar än flickor, vilket bör tas hänsyn till när denna undersöks i diagnostiskt syfte. En framtida förbättring är automatisk segmentering och landmärkesplacering samt att mäta på bilder från fler individer.

VII. EFTERORD

Vi vill tacka Hanna Isaksson och Carl Johan Tiderius som har inspirerat och väglett oss i detta arbete. Ytterligare stort tack till Lorenzo Grassi, som under hela studiens gång bidragit med stöd och rådgivning. Arbetet har utförts på BMC i Lund där vi har arbetat sida vid sida vid två datorer och provat de olika programmen och slutligen segmenterat och gjort beräkningar på CT-bilderna. Detta har varit fördelaktigt då vi har kunnat rådfråga varandra och även haft möjlighet till en nära kontakt med Hanna och Lorenzo. Även all form av litteraturstudier samt möten med handledare har gjorts gemensamt då vi har ansett att två personers tolkningar ger ett bredare perspektiv. För att uppnå en enhetlig rapport har vi utfört hela rapportskrivningen gemensamt.

REFERENSER

- [1] S. Väänänen, L. Grassi, G. Flivik, JS. Jurvelin, och H. Isaksson. "Generation of 3D shape, density, cortical thickness and finite element mesh of proximal femur from a DXA image", *Medical Image Analysis*, vol. 24, pp. 125-134, 2015.
- [2] H. Feneris and W. Dauber, *Anatomisk bildordbok. Femte upplagan*. Ljubljana: Korotan, pp. 64-67, 2007.
- [3] D. Wenger, H. Düppe, och C-J. Tiderius. "Acetabular dysplasia at the age of 1 year in children with neonatal instability of the hip", *Acta Orthopaedica*, vol. 84, pp. 483-488, 2013.
- [4] D.D. Aronsson, M.J. Goldberg, T.F. Kling, och D.R. Roy. "Developmental Dysplasia of the Hip", *Pediatrics*, vol. 94, 1994.
- [5] C. Chen, S. Doyle, D. Green, J. Blanco, D. Scher, E. Sink, och E.R. Dodwell. "Presence of the Ossific Nucleus and Risk of Osteonecrosis in the Treatment of Developmental Dysplasia of the Hip: A Meta-Analysis of Cohort and Case-Control Studies", *Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume*, vol. 99, pp. 760-767, 2017.
- [6] B. Joseph. "Management of Perthes' disease", *Indian journal of orthopaedics*, vol. 49, pp. 10-16, 2015.
- [7] M. Nelitz, S. Lippacher, R. Krauspe, och H. Reichel. "Perthes Disease Current Principles of Diagnosis and Treatment", *Deutsches Ärzteblatt International*, vol. 106, pp. 517-523, 2009.
- [8] M.L. Young, D.G. Little, och H.K.W. Kim. "Evidence for Using Bisphosphonate to Treat Legg-Calvé-Perthes Disease", *Clinical Orthopaedics and Related Research*, vol. 470, pp. 2463-2475, 2012.
- [9] M.J. Boyle, J.F. Lirola, G.D. Hogue, Y-M. Yen, M.B. Millis, och Y-J. Kim. "The alpha angle as a predictor of contralateral slipped capital femoral epiphysis", *Journal of Children's Orthopaedics*, vol. 10, pp. 201-207, 2016.
- [10] F.P. Krüger, P.S. Gérzon de Britto, L.M. Neto, och C.R. Schwartzmann. "Evaluation of presentation of signs and symptoms of femoroacetabular impingement after epiphysiolysis of the proximal femur", *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*, vol. 46, pp. 176-183, 2011.
- [11] P.M. Tscholl, P.O. Zingg, C. Dora, E. Frey, S. Dierauer, och L.E. Ramseier. "Arthroscopic osteochondroplasty in patients with mild slipped capital femoral epiphysis after in situ fixation", *Journal of Children's Orthopaedics*, vol. 11, 2017.
- [12] T. Lehmann, I. Engesäter, L. Laborie, S. Atle Lie, K. Rosendahl och L. Engesäter. "Total hip arthroplasty in young adults, with focus on Perthes' disease and slipped capital femoral epiphysis", *Acta Orthopaedica*, vol. 83, pp. 159-164, 2012.
- [13] R. Agricola, M-P. Heijboer, S. Bierma-Zeinstra, J. Verhaar, H. Weinans och J. Waarsing. "Cam impingement causes osteoarthritis of the hip: a nationwide prospective cohort study (CHECK)", *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 72, 2016.
- [14] D. Wenger, C. Siversson, L.E. Dahlberg och C.J. Tiderius. "Residual hip dysplasia at 1 year after treatment for neonatal hip instability is not related to degenerative joint disease in young adulthood: a 21-year follow-up study including dGEMRIC", *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 24, pp. 436-442, 2016.
- [15] S. Noordin, M. Umer, K. Hafeez och H. Nawaz. "Developmental dysplasia of the hip", *Orthopedic reviews*, vol. 2, 2010.
- [16] B. Dawes, J.L. Jaremko, och J. Balakumar. "Radiographic Assessment of Bone Remodelling in Slipped Upper Femoral Epiphyses Using Klein's Line and the Angle of Femoral-Acetabular Impingement: A Retrospective Review", *Journal of Pediatric Orthopaedics*, vol. 31, pp. 153-158, 2011.
- [17] P. Pouletaut, I. Claude, R. Winzenrieth, M. Ho Ba Tho och G. Sebag. "Automated analysis of MR image of hip: geometrical evaluation of the Legg-Calvé-Perthes disease", *Medical Engineering & Physics*, vol. 27, pp. 415-424, 2005.
- [18] A. Grzegorzewski, M. Synder, K. Kmieć, K. Krajewski, M. Polgaj och M. Sibiński. "Shelf Acetabuloplasty in the Treatment of Severe Legg-Calvé-Perthes Disease: Good Outcomes at Midterm Follow-Up", *BioMed Research International*, 2013.
- [19] K.-H. Widmer och M. Majewski. "The impact of the CCD-angle on range of motion and cup positioning in total hip arthroplasty", *Clinical Biomechanics*, vol. 20, pp. 723-728, 2005.
- [20] B. Shore, D. Spence, och HK. Graham. "The role for hip surveillance in children with cerebral palsy", *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, vol. 5, pp. 126-134, 2012.
- [21] J. Örtengren, L. Björklund-Sand, M. Engbom, och C.J. Tiderius. "Continued Growth of the Femoral Neck Leads to Improved Remodeling After In Situ Fixation of Slipped Capital Femoral Epiphysis", *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 2016.
- [22] O. Guler, M. Isyar, D. Karatas, T. Ormeci, H. Cerci, och M. Mahirogullar. "A retrospective analysis on the correlation between hip pain, physical examination findings, and alpha angle on MR images", *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, vol. 11, 2016
- [23] C. Veillette. "Hip joint", *OrthopaedicsOne - The Orthopaedic Knowledge Network*, 2015.
- [24] M. Harris-Hayes, och N.K. Royer. "Relationship of acetabular dysplasia and femoroacetabular impingement to hip osteoarthritis: a focused review", *PM&R*, vol. 3, pp. 1055-1067, 2011.
- [25] M. Tannast, M.S. Hanke, G. Zheng, S.D. Steppacher, och K.A. Siebenrock. "What Are the Radiographic Reference Values for Acetabular Under- and Overcoverage?", *Clin Orthop Relat Res*, vol. 473, pp. 1234-1246, 2015.
- [26] A. Belén Galán López, och M. Domínguez-Rodrigo. "A biometric analysis of the pelvic acetabulum as an indicator of sex in bovinds", *Comptes Rendus Palevol*, vol. 13, pp. 561-567, 2014.
- [27] A. Mosez. "Out-of-Pocket X-Ray, CT Scan Costs Vary Widely", *HealthDay*, 2016.
- [28] G.M. Treece, K.E.S Poole, och A.H. Gee. "Imaging the femoral cortex: Thickness, density and mass from clinical CT", *Medical Image Analysis*, vol. 16, pp. 952-965, 2012.
- [29] C.A. Schneider, W.S. Rasband, och K.W. Eliceiri. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature Methods*, vol. 9, pp. 671-675, 2012.
- [30] CIBC. "Seg3D: Volumetric Image Segmentation and Visualization. Scientific Computing and Imaging Institute (SCI)", Download from: <http://www.seg3d.org>, 2016.
- [31] M. Viceconti, F. Taddei, L. Montanari, D. Testi, A. Leardini, G. Clapworthy, och S. Van Sint Jan "Multimod Data Manager: a tool for data fusion.", *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 87, pp. 148-159, 2007.

CareNotes - en mobilapplikation för registrering av mat, vätska och smärta inom sjukvården

Ester Randahl (BME-14), Johanna Danielsson (BME-14)

Sammanfattning—I takt med en åldrande befolkning ökar behovet av sjukvård. Samtidigt möts vi i media av larmrapporter om sjukvårdspersonalens pressade arbetsituation. För att hålla nere kostnader och värna om personalens arbetsmiljö har framtidens sjukvård ett stort behov av digitala lösningar. Lösningar inriktade på multisjuka äldre är särskilt önskvärda då det är en av de patientgrupper som ökar mest i antal. Henrik Elg, verksamhetschef på medicinavdelning 2 på SUS i Malmö, och Bitte Zetterman, verksamhetsutvecklare inom internmedicin och akutsjukvård på SUS har efterfrågat en digital lösning på de analoga mat- och vätskelistorna som används på medicinavdelning 2 idag. De har även uttryckt en önskan om en digital smärtregistreringsfunktion. Syftet med detta projekt är att ta fram en lösning på dessa båda önskemål. Efter ett besök på medicinavdelning 2 och samtal med avdelningens personal utvecklades en mobilapplikation i Android anpassad till avdelningens surfplattor. Tanken med appen är att underlätta i vårdpersonalens dagliga arbete och öka patientdelaktigheten. Registrering av mat, vätska och smärta går att göra i appen. Slutsatsen som drögs i denna rapport är att appen kan vara ett lämpligt hjälpmedel att använda istället för de registrerings-system som används idag, även om det finns flera möjligheter till förbättring.

I. INTRODUKTION

SVERIGE går mot en allt äldre befolkning enligt SCB, Statistiska Centralbyrån [1]. Denna åldrande befolkning i kombination med högre förväntningar på vården kommer resultera i stadigt ökande vårdkostnader. En lösning för att minska och bromsa denna kostnadsökning är digitalisering av vården, en reform som år 2025 skulle kunna spara 180 miljarder svenska kronor [2].

År 2016 tog därför regeringen tillsammans med SKL, Sveriges Kommuner och Landsting, fram en vision, *Vision E-hälsa 2025*. Denna vision beskriver hur vården i Sverige ska kunna nå ett arbetssätt där digitaliseringens möjligheter används på ett optimalt sätt. Visionen uttrycker även ett mål att Sverige år 2025 ska vara bäst i världen på E-hälsa. Det finns alltså en strävan efter att utveckla nya digitala lösningar som kan ersätta gamla analoga system och arbetsrutiner.

Redan idag har vissa steg mot en mer digitaliserad vård tagits. Två olika exempel är att Region Skåne har satsat miljoner på ett nytt journalsystem som förväntas införas år 2020 och att det idag finns surfplattor till förfogande på många vårdavdelningar på svenska sjukhus. Dessa surfplattor är ett verktyg som inte enbart bereder väg för nya, digitala lösningar utan även kan ge ökad patientdelaktighet. Ökad

patientdelaktighet har bland annat visat sig ha hälsobringande effekter [3].

En mer specifik digitaliseringsmöjlighet är en digitalisering av det, nu, analoga systemet för mat- och vätskeregistrering. Mat- och vätskeregistrering är något som görs på en del patienter idag för att kontrollera deras mat- och vätskeintag. Denna typ av registrering används ofta på äldre multisjuka patienter, en patientgrupp som år 2005 uppgick till 57 872 stycken inom svensk slutenvård [4]. Anledningen till att matregistrering ibland görs på dessa patienter är att de ofta lider av undernäring när de kommer i kontakt med slutenvården. När det gäller vätskeregistrering utförs detta på de patienter som lider av olika sviktsjukdomar, sjukdomar som inte sällan förekommer hos dessa patienter. Patienter med sviktsjukdomar tar ofta osmotiskt drivna mediciner. Dricker då patienten för mycket förlorar medicinerna sin verkan och patientens tillstånd försämras.

Idag är mat- och vätskeregistreringen uppbyggd kring ett analogt listsystem där det varje dag skrivs ut en lista för varje patient, se bilaga A. På listan fyller personalen sedan i klockslag, maträtt eller dryck, hur mycket de serverat, hur mycket som konsumerats och därefter hur många kalorier det som konsumerats innehåller. Händelserna från ett dygn summeras därefter för hand och läggs in i patientens journal innan en ny lista påbörjas.

Något som, till skillnad från mat- och vätskeregistrering, inte övervakas rutinmässigt på många sjukhusavdelningar är patienters smärta. Med tillgång till smärtdata skulle patientens välmående kunna förbättras, då smärtdatan kan användas för att reglera patienters medicinering. Detta trots att en sådan registrering skulle kunna förbättra patienters välmående genom att smärtdata kan användas för att reglera patienters medicinering. Det finns förvisso flertalet appar som skulle kunna användas i det syftet såsom *Manage My Pain*, *Catch my pain* eller *My pain diary* och som skulle kunna användas på avdelningens surfplattor. Det är dock inte tillåtet enligt patientdatalagen eftersom data som användaren fyller i lagras i appföretagens databaser.

Samma problem finns för den uppsjö av appar som skulle kunna ersätta de analoga mat- och vätskelistorna: Patientdata skulle lagras vid användning. Ytterligare problem med dessa appar är att de inte är anpassade till sjukhusens verksamhet då sjukhusen har särskilda mat- och dryckesmenyer och där både serverat och konsumerat ska fyllas i.

Tekniken finns alltså för att införa digitala system för exempelvis mat-, vätske- och smärtregistrering samtidigt som det finns en strävan efter att digitalisera inom vården. Det finns dessutom ett behov av att rutiner kring dessa

Inlämnat den 8 juni 2017

Emejladress: {mte14era@student.lu.se, mte14jda@student.lu.se}

Teknisk handledare: Martin Stridh, Institutionen för Biomedicinsk teknik

Klinisk handledare: Bitte Zetterman, Akutsjukvård och internmedicin i Malmö

parametrar förändras eller införs. En app som kan övervaka dessa tre parametrar, som är anpassad till sjukvårdens krav, arbetsrutiner och menyer och som inte sparar data och därmed följer patientdatalagen skulle kunna möta detta behov och vara ett steg på vägen mot en mer digitaliserad vård.

I samråd med Medicinavdelning 2, en avdelning för multisjuka patienter med olika svikt- och sjukdomstillstånd, på Skånes Universitetssjukhus i Malmö har en app utvecklats för deras surfplattor. I appen ska vårdpersonal enkelt kunna fylla i patienters mat- och vätskeintag och patienter ska själva kunna fylla i hur mycket de konsumerar av en serverad vätska eller maträtt samt registrera smärta. Målet är att appen ska kunna underlätta i vårdpersonalens dagliga arbete och öka patienters delaktighet i sin egen vård.

För att utvärdera om denna app möter det behov som finns har denna vetenskapliga artikel sammanställts. I artikeln beskrivs inledningsvis de metoder som använts vid utveckling och testning av appen. Efter vår redogörelse för resultaten av projektet förs avslutningsvis en diskussion om appens möjliga framtida användning. Här betraktas även aspekter av hållbar utveckling och medicinsk etik.

II. METOD

A. Uppstart

Projektet inleddes med ett möte på Skånes Universitetssjukhus, SUS, i Malmö med klinisk handledare Bitte Zetterman, sjuksköterska och verksamhetsutvecklare inom internmedicin och akutsjukvård och Henrik Elg, enhetschef på medicinavdelning 2 på SUS. Beskrivningen av projektet diskuterades, vilket gav en större förståelse för projektets syfte. Det framgick att digitala lösningar för loggföring på Medicinavdelning 2 önskades, men vilka parametrar det skulle gälla stod inte klart. Vätska, mat och smärta identifierades tillsammans med Zetterman och Elg som lämpliga parametrar att fokusera på. För- och nackdelar med en mobilapplikation respektive en hemsida diskuterades. Det bestämdes att en mobilapplikation för Android bäst svarade mot avdelningens behov och projektets genomförande.

Nästa steg i projektet var ett besök på Medicinavdelning 2 för en fördjupad förståelse för avdelningens och patienternas behov. Genom samtal med Henrik Elg och annan sjukvårdspersonal noterades vilken typ av patienter som var inlagda där, hur personalens rutiner kring mat-, vätske- och smärtregistrering såg ut samt personalens inställning till digitala lösningar noterades. Dessa iakttagelser användes som grund vid fortsatt utveckling av appen. Det bestämdes även att de analoga listorna skulle användas som bas.

B. Prototyp

En prototyp av appen gjordes först för hand på papper. Lay-outen såväl som appens olika funktioner och hur användaren ska interagera med appen diskuterades fram. Dessutom kartlades det antal sidor som appen skulle innehålla. Gestaltlagarna om närhet, likhet och kontinuitet och även Donald Normans designprinciper utnyttjades vid utformning av prototypen [5].

Båda dessa metoder är metoder som ofta används inom interaktionsdesign och är baserade på den mänskliga kognitionen.

Namnet på appen, CareNotes, beslutades även i detta steg. Detta gjordes genom en process där olika ord relaterade till appens funktion sattes ihop i olika konstellationer. Målet var att skapa ett namn som tydligt representerade appens funktion. När den handritade prototypen var färdig skapades en interaktiv, digital prototyp med hjälp av hemsidan Marvel App. Ikonerna som finns i appen skapades i ritprogrammet Paint.

C. Utveckling av appen

För att få ökad kunskap om programmering i Android och programspråken som skulle användas togs flera interaktiva lektioner på hemsidan Udacity. Därefter påbörjades själva programmeringen av appen där Android Studio var det program som användes och Java och XML var de programspråk som appen programmerades i. Programmeringen utfördes med prototypen från Marvel App som mall. Tester av appen gjordes kontinuerligt men då ingen fysisk enhet fanns till förfogande testades den på en emulator. En emulator är ett verktyg på datorn som simulerar en fysisk smart device, exempelvis en surfplatta som i detta fall.

D. Klinisk testning av appen

När appen var programmerad utfördes testning på medicinavdelning 2 i Malmö. Programmet laddades över till en av avdelningens surfplattor och appen testades över en helg. Därefter gjordes en utvärdering.

III. RESULTAT

A. Iakttagelser

Följande iakttagelser gjordes vid besök på medicinavdelning 2 i början av projektet:

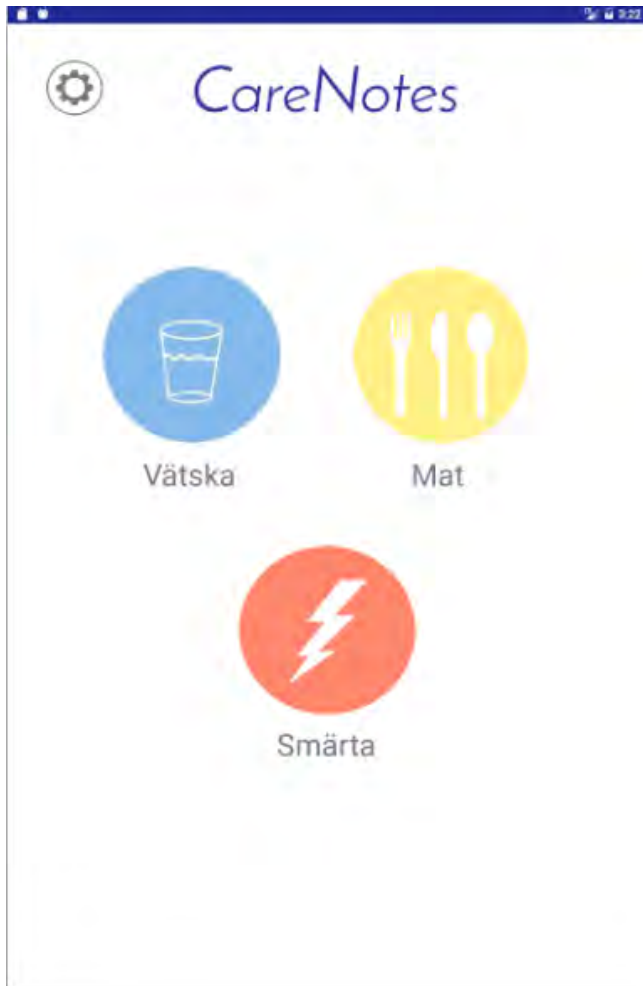
- En stor andel av patienterna är multisjuka
- På en stor andel av patienterna utförs vätske- och/eller matregistrering.
- Idag används endast analoga vätske- och matlistor.
 - Texten på dessa är liten och otydlig
 - Listorna fylls inte alltid i korrekt
 - Listorna kräver mycket tidsödande huvudräkning av personalen
- Personalen på avdelningen är positiva till digitalisering av de analoga listorna
- Smärtregistrering utförs inte på denna avdelning

B. Applikationen

Projektets slutgiltiga resultat är en androidapplikation med namnet CareNotes. CareNotes är anpassad för sjukvården och erbjuder digital registrering av mat, vätska och smärta. Syftet med appen är att användas som ett hjälpmedel på sjukhus, av både vårdpersonal och patienter.

Totalt sett består appen av 13 olika sidor. Majoriteten av sidorna är försedda med en bakåtpil för att användaren enkelt ska kunna orientera sig mellan sidorna. När appen startas

visas en startsida, se Figur 1 där sidan för inställningar samt huvudsidorna för registrering av mat, vätska respektive smärta kan nås. I de tre huvudsidorna kan ytterligare funktioner nås, specifika för respektive huvudsida. En mer detaljerad beskrivning av huvudsidorna går att finna i avsnitten E, F och G nedan. Förutom knappar som tar användaren till olika sidor syns även appens blå logga högst upp på startsidan.



Figur 1. Startsidan för CareNotes.

Som tidigare nämnt är appen tänkt att kunna användas av både vårdpersonal och patienter. Vissa sidor i appen är tänkta att endast hanteras av vårdpersonal medan andra sidor är anpassade till att i första hand användas av patienter. Är en patient dock oförmögen eller inte vill använda appen kan vårdpersonal fylla i de patientanpassade sidorna istället. Ett exempel på en sida i appen som ska hanteras av personal är *Serverat* som nås från huvudsidan för mat respektive vätska. Sidan *Konsumerat* som nås från samma huvudsidor är däremot anpassad till att fyllas i av patienter. Smärtregistreringsfunktionen riktar även den i första hand till patienter.

Genom hela appen finns flertalet funktionella barriärer i form av hintar som enkelt guidar användaren genom appli-

kationen och förhindrar felaktig användning. Hintarna gör att användaren upptäcker att något är fel och texten i dem är upplagd för enkel felsökning. Detta genom att beskriva vad som har gått fel och vad användaren kan göra för att åtgärda felet. Hintarna visas under lång tid så att användaren säkert ska hinna läsa dem.

Eftersom patientdata inte får sparas raderas all data om appen avslutas på ett korrekt sätt. Tidpunkter som skrivs ut i olika delar av appen hämtas automatiskt från surfplattans egen klocka.

Nedan följer ett avsnitt om CareNotes generella layout för att introducera läsaren till konceptet och sedan följer utförliga beskrivningar av varje huvudsidas funktion.

C. Layout

CareNotes har en färgskala bestående av tre olika huvudfärger: blå, gul och röd. Varje huvudsida (vätska, mat och smärta), är tilldelad en huvudfärg och har ett eget färgtema baserat på den färgen. Färgerna som valdes symboliserar även de olika huvudsidornas funktioner: Blått för vätska, gult för mat och rött för smärta. Eftersom de tre olika huvudsidorna har olika färgtema valdes en vit bakgrundsfärg dels för att inte behöva byta bakgrundsfärg när användaren orienterar sig genom appen men även för att öka appens kontraster.

Att alla huvudsidor har ett eget färgtema grundar sig i att gestaltlagen om likhet användes. Denna gestaltlag användes även vid utformning av knapparnas form och menyer med samma funktion och är anledningen till att alla knappar i CareNotes är runda och att menyer med samma funktion är upplagda på samma sätt. Gestaltlagarna användes även vid organisering av CareNotes olika menyer. Vid utformning av den triangelform som används i startsidan och huvudsidan för vätska och mat användes gestaltlagen om kontinuitet och gestaltlagen om närhet. Triangelformen blir en kontinuerlig form och användaren vet då intuitivt att dessa element hör ihop, enligt gestaltlagen om kontinuitet. Denna layout utnyttjar sedan gestaltlagen om närhet genom att knappar som orienterar användaren till sidor med liknande funktion läggs nära varandra. Exempelvis ligger knappen som tar användaren till vätskesidan och motsvarande knapp för matsidan bredvid varandra på startsidan.

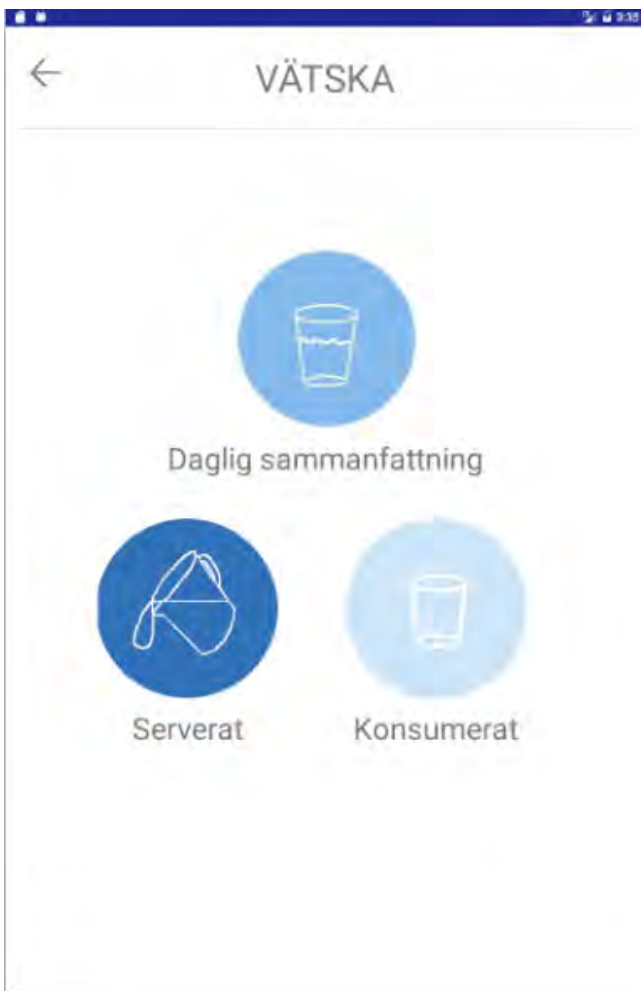
Alla ikoner och menyer är placerade i förhållande till varandra så att CareNotes bäst lämpar sig för användning på surfplatta.

D. Inställningar

Genom att klicka på kugghjulet högst upp i vänstra hörnet på startsidan nås *Inställningar*. Denna sida är den första som bör fyllas i när appen startas. Fylls inte denna sida i fungerar inte appen korrekt och det medför en risk att appen senare kraschar. En patients maximala vätskeintag respektive maximala kaloriintag för en dag fylls i genom att användaren skriver i två olika fritextfält. De värden som användaren fyller i används sedan i sidan *Daglig sammanfattning* för mat respektive vätska.

E. Vätska

En av huvudsidorna som går att nå från startsidan är *Vätska*, se Figur 2. Denna nås genom att klicka på en blå knapp med en bild på ett vattenglas. Även vätskesidans färgtema är blå, som nämnt i avsnittet Layout. Denna färg valdes då det ansågs vara en färg som förknippas med vätska. I huvudsidan för vätska kan användaren göra tre olika val; gå in på sidan *Serverat*, *Konsumerat* eller *Daglig sammanfattning*. Alla knappar är i olika nyanser av blå och bilderna på knapparna representerar de olika funktionerna som användaren leds till. Bilden för daglig sammanfattning är ett vattenglas, samma bild som för att nå huvudsidan för vätska. För serverat är bilden en kanna och för konsumerat ett tomt vattenglas.



Figur 2. Huvudsidan för vätska.

I *Serverat* fyller vårdpersonal i vilken dryck och vilken mängd vätska som hen serverar till patienten. Vilken dryck som serveras väljs utifrån en lista som innehåller samma drycker som i Region Skånes analoga vätskelistor, se bilaga B. För att välja hur många milliliter som serveras finns en plus- och en minusknapp. För varje klick som görs ökas eller minskas den serverade mängden med 25 ml. Startmängden är 150 ml då det är storleken på ett standardglas. När dryck och mängd har fyllts i finns det en OK-knapp som vid klick sparar

data och tar användaren tillbaka till huvudsidan för vätska. Det går det inte att klicka på "OK" om inte både dryck har valts.

I *Konsumerat* fyller vårdpersonal eller patient i hur mycket av den serverade drycken som har konsumerats. Vilken dryck som har valts i *Serverat* visas på sidan *Konsumerat* för användaren. För att välja hur många milliliter av drycken som har konsumerats finns, precis som i serverat, en plus- och en minusknapp som ökar eller minskar mängden med 25 ml för varje klick som görs. Startmängden är mängden som valts i *Serverat*. Att välja en större konsumerad mängd i *Konsumerat* än vad som valts i *Serverat* är inte möjligt. Det går inte heller att gå in i sidan *Konsumerat* från huvudsidan för vätska före *Serverat* har fyllts i. Försöker detta göras visas en hint på botten av skärmen som talar om: *Vänligen servera vätska innan du konsumerar*.

I *Daglig sammanfattning* finns en tabell som innehåller all vätska som har serverats och konsumerats under dagen, se Figur 3. Rubrikerna till kolumnerna i tabellen är *Tid*, *Dryck*, *Serverat (ml)*, *Konsumerat (ml)*. Högst upp på sidan syns dessutom hur stor andel av det maximala vätskeintaget som har konsumerats under dagen.

Tid	Dryck	Serverat	Konsumerat
10:15	Fortimel	150	150
14:38	Kaffe	150	150
14:38	ProViva	200	150
14:39	Vatten	150	100
14:47	Kaffe	150	100
05:12	Kaffe	200	150

Figur 3. Daglig sammanfattning över serverad och konsumerad vätska under en dag.

F. Mat

Mat är en huvudsida som liknar den för vätska både vad gäller funktion och layout. Triangelformen som återfinns på flera sidor i CareNotes återfinns även här där de olika knapparna som användaren kan trycka på är *Daglig sammanfattning*, *Serverat* och *Konsumerat*. Dessa olika funktioner bygger på varandra och nedan följer därför en kronologisk beskrivning av dem.

När mat serveras till en patient är tanken att vårdpersonal ska gå in på sidan *Serverat*, se Figur 4. Här väljer användaren först vilken måltid som avses i en rullgardinsmeny och sedan vilken maträtt som serveras.

Innehållet i den här menyn är samma som i den analoga matlista som används i Region Skåne idag, se bilaga B. För att enkelt kunna hitta rätt maträtt har menyn flera nivåer, där den första nivån är olika maträttskategorier och den andra nivån maträtterna inom varje kategori.



Figur 4. Sidan som fylls i då mat serveras.



Figur 5. Sidan som fylls i då mat konsumerats.

När måltid och maträtt har valts visas två knappar på skärmen, plus och minus. Med hjälp av de två knapparna kan användaren reglera mängden som serveras. Mellan knapparna visas den mängd som serveras och maträttens enhet. Enheten som visas anpassas efter den valda maträtten. Ifall användaren är nöjd med sina val klickar hen på "OK", annars kan användaren enkelt göra om sitt val genom att återigen klicka på någon av menyerna. Om användaren vill registrera ytterligare serverad maträtt går hen direkt in på *Serverat* igen från huvudsidan för mat.

När en maträtt sedan ska markeras som konsumerad, det vill säga när patienten inte vill äta mer av just den maträtten, går patienten eller någon ur personalen in på sidan *Konsumerat*, se Figur 5. Här visas alla serverade maträtter som ännu inte markerats som konsumerade i en lista som användaren kan scrolla sig igenom. Under varje maträtt finns en plus- och en minusknapp som har samma layout som de i *Serverat*, men med större storlek. Mellan plus- och minusknappen visas mängden som konsumerats. För att användaren inte ska behöva komma ihåg hur stor mängd som valts i *Serverat* visas alltid mängden som konsumerats som "1 port". "0.5 port" innebär alltså att patienten har konsumerat hälften av den mängd som valts i *Serverat*. När användaren känner sig klar trycker hen

på "OK" och händelserna sparas tillsammans med tiden som automatiskt hämtas från surfplattans klocka till en fil. Om användaren skulle klicka på *Konsumerat* innan någon fyllt i *Serverat* visas en hint i botten på skärmen som förklarar för användaren att maträtter måste serveras innan de konsumeras.

I *Daglig sammanfattning* kan vårdpersonalen se en tabell med samma upplägg som i de analoga mat- och vätskelistorna. En skillnad är dock att den totala mängden konsumerade kilokalorier skrivs ut som en andel av det dagliga kaloriintaget ovanför tabellen. Själva tabellen innehåller kolumnerna *Måltid*, *Tid*, *Maträtt*, *Serverat*, *Konsumerat* och *Kcal*, precis som i de analoga mat- och vätskelistorna. Dock kan användaren, till skillnad från i de analoga listorna, inte se de händelser som är serverade men ännu inte konsumerade. Tabellen skapas genom att läsa från en fil som finns i surfplattans internminne där de olika händelserna sparas. Värdet i kolumnen *Kcal* beräknas genom att den konsumerade mängden multipliceras med kaloriinnehållet per enhet för en viss maträtt, värden som automatiskt sparas till surfplattans internminne.

G. Smärta

Smärta har en annorlunda layout jämfört med de båda andra huvudsidorna då den bara innehåller två funktioner. Om användaren klickar på *Smärta* på startsidan kommer hen till en huvudsida innehållande en stor rund knapp som tar hen till sidan *Daglig sammanfattning* och ett formulär där patienten kan registrera smärta, se Figur 6. Detta formulär bygger på VAS-skalan och olika typer av smärtkaraktärer hämtade från Internetmedicin [6, 7]. Smärtkaraktärerna som går att välja på är molande, kolikartad, huggande, stickande och brännande.

Figur 6. Huvudsidan för smärta.

Till varje del av formuläret finns en tydlig ledtråd om vad som ska fyllas i. De tre olika fälten är:

- Var har du ont? - ett fritextfält där patienten fyller i var hen känner smärta
- Hur ont på en skala? – en så kallad SeekBar som låter patienten dra en prick över en linje och därmed gradera sin smärta på en skala från 0 till 10.
- Vilken sorts smärta? – en drop-down meny där patienten väljer en av flera smärtkaraktärer. Den valda karaktären ersätter sedan den ledtråd som visas i rullgardinsmenyn.

När användaren känner sig nöjd klickar hen på "OK" i botten på skärmen. Om något inte fyllts i korrekt visas en hint i

botten på skärmen som beskriver vad användaren missat att fylla i. Är allt däremot korrekt ifyllt kommer användaren till en sammanfattningssida som ger en översikt över det som precis fylldes i. Denna sida skriver ut klockslag, var patienten tyckte sig ha ont, vilken intensitet smärtan hade och vilken smärtkaraktär som valdes. Om patienten här ser att något är felaktigt eller vill ändra något kan hen trycka på "Ändra" i botten på skärmen och hen tas då tillbaka till formuläret. Det patienten fyllde i tidigare finns då kvar så att det enkelt går att ändra på det som blev fel och sedan trycka på "OK" igen. Om patienten däremot är nöjd klickar hen på "OK" och händelsen sparas till en fil som används för att göra en tabell i sidan *Daglig sammanfattning*. Denna tabell skapas genom samma metod som tabellen i *Daglig sammanfattning* för huvudsidorna *Mat* och *Vätska* och nås, som tidigare nämnt från sidan som innehåller formuläret. Tabellen har samma layout som övriga tabeller för daglig sammanfattning i CareNotes, men med kolumnerna *Tid*, *Var*, *Karaktär* och *Intensitet*.

H. Klinisk testning av appen

Vid klinisk testning på medicinavdelning 2 identifierades några möjliga förbättringar.

- Det glömdes enkelt bort att fylla i *Inställningar* i början på dagen
- Det var omständligt att behöva gå in på *Serverat* i huvudsidan för mat flera gånger då endast en maträtt kunde fyllas i åt gången
- Appen fungerar inte om surfplattan roteras
- CareNotes är ännu inte förstahandsvalet av registrerings-system

IV. DISKUSSION

Vilka parametrar som skulle kunna registreras i appen var inte klarlagt från början. Anledningen till att parametrarna mat, vätska och smärta sedan valdes grundar sig i, som tidigare nämnt, att det fanns ett särskilt behov av att kunna registrera dessa digitalt. Mat och vätska var önskvärda parametrar då systemet som används med de analoga mat-och vätskelistorna inte fungerar optimalt idag. Smärta valdes som parameter då det inte finns något smärtregistreringssystem som används rutinmässigt på många avdelningar idag. På grund av att projektet var tidsbegränsat kändes dessa tre tillräckliga. Valet av en applikation framför en hemsida grundar sig i att tjänsten lämpar sig bättre för användning på surfplattor än datorer. Dessutom fanns redan kunskaper kring programmering i Java, ett av programspråken som används vid programmering i Android.

Under designprocessen av appen fanns det hela tiden i åtanke att göra appen tydlig, intuitiv och mer lätthanterlig än de nuvarande analoga mat- och vätskelistorna. Av den orsaken användes gestaltlagarna och Donald Normans designprinciper. Ett exempel på detta är att knapparna gjordes runda för att inbjuda användaren till att klicka. För att göra appen anpassad till patienter togs det hänsyn till att patienter kan ha dålig syn, ha nedsatt kognitiv förmåga och teknikovana. Det var anledningen till att texten och knapparna gjordes stora och att

de patientanpassade sidorna skapades så att även vårdpersonal kan fylla i dem om patienten är oförmögen till detta.

Flera fördelar har identifierats med CareNotes jämfört med det nuvarande registreringssystemet; appen underlättar i vårdpersonalens arbete, den ökar patientsäkerheten och ökar patientdelaktigheten. Nedan diskuteras dessa tre fördelar:

Appen underlättar för vårdpersonal genom att de sparar tid på att inte behöva räkna ihop kalorier och milliliter för hand eftersom detta görs automatiskt i appen. De slipper dessutom behöva handskas med papper som lätt tappas bort.

Patientsäkerheten ökas bland annat genom de funktionella barriärerna som appen innehåller. Även det automatiska räknesystemet ökar patientsäkerheten eftersom det minskar risken för fel vid uträkning och summering av kalorier och milliliter. Felanvändning, vilket förekommer med systemet som används idag, förebyggs med hjälp av hintarna som dyker upp om information saknas eller om något har fyllts i fel. Detta system med tydliga felmeddelanden är viktigt i en stressig miljö.

Patientdelaktigheten ökas genom att appen innehåller patientanpassade sidor (*Smärta* och *Konsumerat*) som patienter själva kan sköta. Här skiljer sig CareNotes från de nuvarande mat- och vätskelistorna där vårdpersonal sköter allt. Patientdelaktighet är av betydelse då det har visats öka patienters välmående, se introduktionen.

Efter att ha testat appen på medicinavdelning 2 i Malmö och utvärderat resultaten identifierades vissa möjliga förbättringar. I denna artikel presenteras fem möjliga förbättringar. Den första förbättringen är att programmera om appen genom att lägga in hintar om felaktig användning där det saknas idag. Detta gäller exempelvis om användaren försöker gå in i *Daglig sammanfattning* utan att först ha fyllt i *Inställningar*. Om appen kraschar på grund av detta måste användaren återigen fylla i *Inställningar*, något som har uppfattats som svårt att komma ihåg vid testning. En förbättring är därmed att komma på ett sätt att detektera om användaren fyllt i *Inställningar* eller inte och om det inte gjorts skriva ut en hint.

Den andra förbättringen är lite svårare att genomföra, men innebär att CareNotes skulle kunna överföra insamlad data direkt till patientens journal. Detta skulle underlätta ytterligare för vårdpersonal och arbetssteg i dagens system hade eliminerats. På grund av patientdatasäkerhet och kompatibilitet med dagens journalsystem är detta i nuläget inte möjligt att genomföra. Om ett samarbete hade upprättats mellan CareNotes och utvecklingen av det nya journalsystemet skulle denna möjlighet kunna öka.

Den tredje förbättringen är att omformatera vissa ikoner i CareNotes. Idag är många av dessa dåligt upplösta eller mindre visuellt attraktiva. En förbättring av den delen av layouten skulle ge CareNotes ett mer professionellt och visuellt attraktivt utseende och därmed skulle den möjligen fungera bättre [8].

Den fjärde förbättringen är att skapa ytterligare layouter i Android Studio. För att en surfplatta ska kunna roteras, vilket uppfattades vara ett önskemål från Medicinavdelning 2 efter testning, behövs nya layouter programmeras.

Den sista förbättringen som presenteras i denna rapport är att flera maträtter ska kunna registreras samtidigt i *Serverat*

utan att användaren behöver gå tillbaka till huvudsidan för mat. Detta skulle minska antalet knapptryckningar som behöver göras när en hel måltid ska registreras och därmed ytterligare effektivisera vårdpersonalens arbete.

Generellt kan sägas att vårdpersonalen helst inte använder CareNotes i nuläget. Detta beror på att det finns vissa förbättringar som behöver göras, vilka förklaras ovan. Den huvudsakliga anledningen är dock att en inlärningsprocess behövs från vårdpersonalens sida. I nuläget så är detta system inte familjärt och den kognitiva belastningen är då högre än vid användning av det gamla systemet. Inte nog med att det gör CareNotes svårare att använda så gör det även att risken för fel ökar, vilket kanske gör att CareNotes på vissa plan uppfattas fungera dåligt eller att *Inställningar* glöms fyllas i [9]. Om CareNotes skulle börja användas mer skulle kanske personalen efter ett tag, genom att rutinerna kring användandet lagras i lägre kognitiva nivåer i minnet, uppfatta CareNotes som smidigare än de analoga listorna.

A. Hållbar utveckling

Utvecklingen av CareNotes kan på olika sätt relatera till hållbar utveckling, som i regel brukar delas upp i social, ekonomisk och ekologisk hållbarhet. Nedan följer en presentation av hur CareNotes relaterar till dessa typer av hållbar utveckling.

Enligt folkhälsomyndigheten handlar social hållbarhet bland annat om att det som erbjuds i samhället ska vara anpassat efter den grupp som har störst behov [10]. De med störst behov av anpassning i detta fall är en äldre patientgrupp där teknikvana kan vara låg, synen nedsatt och så även den kognitiva förmågan. Detta har tagits hänsyn till under utvecklingen av CareNotes genom att göra layouten tydlig och knappar och text av större storlek. Dock kanske parametrarna, låg teknikvana, nedsatt syn och nedsatt kognitiv förmåga, stänger ute vissa användare från möjligheten att använda CareNotes. Därmed uppnås inte syftet med patientdelaktighet och CareNotes svarar i lägre utsträckning mot social hållbarhet.

Å andra sidan bidrar CareNotes till den ekonomiska hållbarheten då den blir ett verktyg i digitaliseringen av vården, en nyckel till att bromsa de kraftigt ökande vårdkostnaderna [2]. Dessutom bidrar CareNotes även till den ekologiska hållbarheten då papper inte behöver skrivas ut för varje patient varje dag. Det kräver dock att surfplattor tillverkas, vilket på kort sikt kan belasta den ekologiska hållbarheten.

Även om CareNotes belastar den totala hållbara utvecklingen på vissa sätt, så bedömer vi att CareNotes positiva bidrag till den hållbara utvecklingen överväger.

B. Etik

En av grundprinciperna inom den medicinska etiken är autonomiprincipen. Detta innebär att patienten ska ha rätt till att acceptera eller avböja erbjuden vård [11]. CareNotes stödjer denna princip då det är helt upp till patienten om hen vill vara delaktig och använda CareNotes själv eller inte. Om patienten väljer att inte vara delaktig kan CareNotes fortfarande användas för den patienten, men med vårdpersonalens hjälp.

CareNotes kan även ge ökat människovärde i det att patienten blir delaktig och därmed får makt över sin egen vård. Möjligen kan det påverka synen på patienten som en aktör med egen agens.

V. SLUTSATS

Idag finns vissa förbättringar som behöver genomföras för att CareNotes ska fungera optimalt och vara ett konkurrenskraftigt redskap vid val av registreringssystem. Även sedan vissa redovisade förbättringar genomförts utgör den inlärningsprocess som krävs när ett nytt system införs ett hinder. Vårdpersonalen är ännu inte familjär med användningen av en app istället för det analoga systemet, vilket försvårar införandet av appen som en rutin trots att behovet som finns möts på de flesta plan. Behovet möts genom att CareNotes underlättar för vårdpersonalen genom att vissa beräkningar inte behöver utföras och genom att texten är tydligare, patientsäkerheten ökas med hjälp av olika funktionella barriärer och automatiska beräkningar och patientdelaktigheten ökar, samtidigt som ett smärtregistreringssystem införs och ett steg mot digitalisering görs.

VI. EFTERORD

Vi skulle vilja tacka vår externa handledare Bitte Zetterman och Henrik Elg, enhetschef på medicinavdelning 2, för ett givande samarbete. Vi vill också tacka vår handledare Martin Stridh, universitetslektor vid avdelningen för biomedicinsk teknik, för värdefulla kommentarer under projektets gång. Slutligen skulle vi även vilja tacka de som har hjälpt oss när vi stött på problem inom bland annat programmeringen.

Arbetet i detta projekt har delats upp lika mellan författarna och samarbete har varit ett genomgående inslag.

REFERENSER

- [1] BE18 SM 1701. Sveriges framtida befolkning 2017-2060, 2017. Stockholm: SCB. Tillgänglig: http://www.scb.se/contentassets/fee6de8eb7dc43bd9b3f36da925b5458/be0401_2017i60_sm_be18sm1701.pdf [2017-05-10].
- [2] McKinseyCompany. *Värdet av digital teknik i den svenska vården*, 2016. Tillgänglig: <http://www.mckinsey.com/industries/healthcare-systems-and-services/our-insights/digitizing-healthcare-in-sweden> [2017-05-08].
- [3] SBU-rapport nr 260. *Patientdelaktighet i hälso- och sjukvården. En sammanställning av vetenskapliga utvärderingar av metoder som kan påverka patientens förutsättningar för delaktighet*, 2017. Stockholm: Statens beredning för medicinsk och social utvärdering (SBU). Tillgänglig: http://www.sbu.se/contentassets/4065ec45df9c4859852d2e358d5b8dc6/patientdelaktighet_i_halso_och_sjukvarden.pdf [2017-05-08].
- [4] Ekerstad, N., Carlsson, P. Edberg, A. *Prioritering av multisjuka äldre inom kardiologi (Elektronisk resurs): en medicinsk, etisk och hälsoekonomisk utmaning*. 2008. Linköping: PrioriteringsCentrum, Landstinget i Östergötland. Tillgänglig: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:liu:diva-44600> [2017-05-08].
- [5] Preece, J., Rogers Y., Sharp, H. *Interaction design: beyond human-computer interaction*. 2002. New York: Wiley.
- [6] Norsell, H. *Smärta, analys*, 2016. Tillgänglig: <http://www.internetmedicin.se/page.aspx?id=173> [2017-05-08].
- [7] Vårdhandboken. *Smärtskattningsinstrument*, 2016. Tillgänglig: <http://www.vardhandboken.se/texter/smartskattning-av-akut-och-postoperativ-smarta/smartskattningsinstrument/> [2017-05-16].
- [8] Norman, D.A. *Emotion design: Attractive things work better*. *Interactions Magazine*, ix(4), 2002. ss. 36-42. Tillgänglig: http://www.jnd.org/dn.mss/emotion_design_at.htm [2017-05-15].
- [9] Johnson, J. *Designing with the mind in mind: simple guide to understanding user interface design rules*. 2008. Amsterdam: Morgan Kaufmann Publishers/Elsevier.
- [10] Mötesplats social hållbarhet. *Vad är social hållbarhet för oss?*, 2014. Tillgänglig: <https://www.folkhalsomyndigheten.se/motesplats-social-hallbarhet/social-hallbarhet/#Definitioner> [2017-05-11].
- [11] Statens medicin-etiska råd. *Autonomi*, u.å. Stockholm: Statens medicin-etiska råd. Tillgänglig: <http://www.smer.se/etik/autonomi/> [2017-05-11].

VII. BILAGOR

A. Mat- och vätskelista

Skånes universitetssjukhus
En del av Region Skåne

Mat- och vätskelista

SUS Nutritionsnätverk i Lund och Malmö, februari 2017

Patient: _____ Säng: _____ Datum: _____ Vårdplan finns: Ja Nej
 Kosttyp: A E Övr: _____ Energinivå (kcal): 1600 2100 2800
 Registreringen görs från kl _____ till _____ Registreringen ska avslutas den _____

VÄTSKELISTA						Restriktioner:					
KI	Vätska	Serverat, ml	Konsumerat, ml	Kcal	g protein						
SUMMA			ml	kcal	g						

VÄTSKEFÖRLUSTER									
KI	Volym	KI	Volym	KI	Volym	KI	Volym	KI	Volym
SUMMA									
									ml

MATLISTA					
KI	Mat	Serverat	Konsumerat	Kcal	g protein
	Frukost				
	Mellanmål				
	Lunch förrätt	0 ½ 1	0 ½ 1		
	Lunch varmrätt	0 ¼ ½ ¾ 1	0 ¼ ½ ¾ 1		
	Lunch dessert	0 ¼ ½ ¾ 1	0 ¼ ½ ¾ 1		
	Mellanmål				
	Kvällsmat förrätt	0 ½ 1	0 ½ 1		
	Kvällsmat varmrätt	0 ¼ ½ ¾ 1	0 ¼ ½ ¾ 1		
	Kvällsmat dessert	0 ¼ ½ ¾ 1	0 ¼ ½ ¾ 1		
	Mellanmål				
SUMMA:				kcal	g

INTAG (mat + vätska): _____ kcal _____ g protein

BEHOV: _____ kcal _____ g protein

SIGN: _____

B. Mat- och dryckesmeny

Guide för beräkning av energi- och proteinintag

Drycker, kalla soppor, välling	kcal/dl	protein/dl	Glass, efterrätt, mellanmål, frukt	kcal/st	protein/st	Tillbehör	kcal/port	protein/port	Grov paté och timbal	kcal/port	protein/port
Söta drycker/efterrättsoppa/ProViva	50	0	Kräm, 1 dl	80	0	Mos, sylt, marmelad, 1 msk	30	0	1600-kcal nivå, varmrätt	390	18
Lättöl, lättdryck	20	0	Konserverad frukt, ½ frukt el 1 ring	40	0	Sylt (osötad/sötningemedel), 1 msk	5	0	2100-kcal nivå, varmrätt	520	23
Chokladdryck Ögonblink (blandad med vatten)	50	2	Risfrutti/Mannafrutti	240	5	Lemon curd, 1 msk	80	0	2800-kcal nivå, varmrätt	650	32
Chokladdryck O'boy (med 3% mjölk)	80	4	Chokladpudding Jacky	150	5	Socker, bit	10	0	Dessert	160	3
Välling (vuxen, fullkorn, majs)	70	4	Glass, light, 1 bägare	100	2	Socker, 1 msk	50	0	Soppa 1600-kcal nivå, varmrätt	250	12
Liva Nypondryck	100	0	Glass, grädd/ tuffline, 1 dl	100	2	Socker, 1 rör	20	0	Soppa 2100-kcal nivå, varmrätt	330	15
ProViva Superfrukt, 1 shot (80 ml)	40	0	Glass, grädd, 1 bägare	130	2	Honung, 1 tsk	20	0	Soppa 2800-kcal nivå, varmrätt	410	19
Resource aktivt (ketringsplommondryck)	50	0	Glasspinne gräddglass	60	1	Vaniljås, 1 dl	110	3	Dessert till soppa	230	8
Kaffe/te/vatten/lightdryck/lightläsk/druckbuylong	0	0	Glasspinne iglass	50	0	Chokladås, 1 msk	50	1			
			Glass, Skee-is, energi- och proteinrik	210	6	Olja, flytande margarin, 1 tk	30	0	Flytande kost	kcal/port	protein/port
Mjölk, fil, yoghurt, grädd	kcal/enhet	protein/enhet	Fryssta bär, 1 dl	30	0	Kall sås, 100 g	440	2	Varm soppa: 1600-kcal nivå, varmrätt	250	14
Mjölk, fil, naturlig yoghurt (3%), 1 dl	60	3	Färs frukt, banan	100	1	Varm sås, 100 g	90	1	Varm soppa: 2100-kcal nivå, varmrätt	330	19
Mellanmjölk (1,5%), 1 dl	50	3	Färs frukt, 1 st/ vindruvor 1 dl	60	1			Varm soppa: 2800-kcal nivå, varmrätt	440	25	
Lättmjölk, lättfil, lättoghurt (0,5%), 1 dl	40	3	Fruktpuré barn, 1 msk	10	0	A-kost och övrig specialkost	kcal/port	protein/port	Dessertsoopa	180	7
Fruktyoghurt inki laktosfri och vanilj, 1 dl	80	4	Fazer sandwich	230	12	1600-kcal nivå, varmrätt	360	20			
Turkisk yoghurt, 1 dl	130	4	Fazer smoothie	160	6	2100-kcal nivå, varmrätt	470	26	Icke-klara näringsdrycker	kcal/dl	protein/dl
Visprådde, vispad, 1 msk	60	0	Fazer fetast m oliver, cocktailtomater	220	9	2800-kcal nivå, varmrätt	630	34	Fortimel Compact Protein	240	14
Visprådde, vispad, 1 msk	30	0	Fazer korv- och skinkallrik	160	12	Dessert	170	3	Fortimel Yoghurt Style	150	6
Crème Fraiche, 1 msk	50	0	Fazer kesu m grönsaksstavar	120	13	Soppa 1600-kcal nivå, varmrätt	280	16	Fresubin Protein Energy Drink	150	10
Kaffegrädd, 1 msk	20	0	Fazer kaka	200	4	Soppa 2100-kcal nivå, varmrätt	360	21	Resource Komplet Näring 1.5	150	6
Kaffemjolk, 1 st (20 ml)	10	1				Soppa 2800-kcal nivå, varmrätt	480	28	Resource 2.0 med/utan fiber	200	9
Kesella vanilj, 1 msk	20	2	Kakor, kex, skorpor	kcal/st	protein/st	Dessert till soppa	230	8	Resource 2.5 Compact med/utan fiber	250	10
Havregurt naturlig, 1 dl	70	1	Kanelgiffel	60	1			Resource Protein	130	9	
Protino drickoghurt, 1 st (125 ml)	250	14	Vetebulle, slät	160	4	E-kost	kcal/port	protein/port	Klara näringsdrycker	kcal/dl	protein/dl
Protino dessertoghurt, 1 st (80 g)	120	6	Veteliängd/rulltårta, skiva 2 cm	130	2	1600-kcal nivå, varmrätt	240	14	Resource Addera Plus	130	4
			Muffins	130	1	2100-kcal nivå, varmrätt	320	18	Fortimel/Fresubin Jucy	150	4
Gröt, flingor	kcal/dl	protein/dl	Småkaka, Ballerina	60	1	2800-kcal nivå, varmrätt	420	24	ProvideXtra Drink	150	4
Havregrynsgrot	70	2	Tärtbit, bakelse	320	4	Förrätt	120	5			
Grahamsgröt	60	2	Morotskaka, mazarin, chokladboll	160	2	Dessert	170	3	Anpassat innehåll eller konsistens	kcal/dl	protein/dl
Manne-, risgröt (på 3% mjölk)	90	4	Digestivekex	70	1	Soppa 1600-kcal nivå, varmrätt	250	12	Resource Senior Activ	150	10
Camflakes, Havrefräs	50	1	Risikaka, Mariekex, wafers	20	0	Soppa 2100-kcal nivå, varmrätt	330	15	Resource Diabet	100	7
Müsi (bas)	140	4	Smörgåsårn, Saltiner	20	0	Soppa 2800-kcal nivå, varmrätt	440	21	Renilon 4.0	200	4
Müsi (Crunchy, Start)	150	3	Skorpa	50	2	Dessert till soppa	230	8	Renilon 7.5	200	8
									Smartfuh Nutrifriend 600	130	5
Smörgås, bröd, pålägg, ägg	kcal/st	protein/st	Godis, snacks	kcal/st	protein/st	SNR-kost	kcal/port	protein/port	Fresubin Thickened stage 1	150	10
Mjuk smörgås (bröd, margarin, pålägg)	140	6	Choklad, ruta eller pralin	40	1	1600-kcal nivå, varmrätt	430	21	Fresubin YoCrème, 125 ml *	190	9
Hård smörgås (kriscke, margarin, pålägg)	110	5	Chokladkaka, 100 g	550	8	2100-kcal nivå, varmrätt	570	28	Fresubin Dessert Fruit, 125 ml *	200	9
Mjukt bröd, 1 skiva	70	2	Kexchoklad, Dajm, Japp, 25-30 g-bit	130	1	2800-kcal nivå, varmrätt	740	37	Nutris Complete Stage 1 eller 2, 125 ml *	306	12
Hårt bröd, 1 skiva	40	1	Smågodis, bit	20	0	Dessert	50	0	Isoosover MCT, 1 påse = 330 ml	100	4
Margarin, 70-80%, 1 portionsförpackning (10g)	70	0	Smågodis, 1 g	4	0	Soppa 1600-kcal nivå, varmrätt	220	12	Frebini Energy Drink med/utan fiber	150	4
Margarin lätt, 40%, 1 portionsförpackning (10g)	40	0	Naturgodis, 1 g	5	0	Soppa 2100-kcal nivå, varmrätt	290	15	Nutrimilkid Smoothie/Multi Fibre	150	3
Pålägg (ost, korv), per smörgås	50	3	Ostbågar, 1 dl	40	1	Soppa 2800-kcal nivå, varmrätt	380	21	Resource MiniMax	120	4
Pålägg (skinka), per smörgås	20	3	Potatsschips, 1 dl	60	1	Dessert till soppa	230	8			
Pålägg (leverpaste), per smörgås	40	2	Popcorn, 1 dl	30	1						
Pepparotspis, 1 msk	50	0	Salta pinnar	8	0	Vegetarisk kost (LOV)	kcal/port	protein/port	Berikningsprodukter	kcal/enhet	protein/enhet
Dessertost till 1 smörgås	80	4	Nötter, mandel, 1 dl	400	10	1600-kcal nivå, varmrätt	400	17	Calogen, 30 ml	140	0
Ägg	80	8	Torkad frukt, 1 dl	200	2	2100-kcal nivå, varmrätt	530	22	Calogen Extra shots, 40 ml/förp	160	2
Sill, gaffelbit	20	1				2800-kcal nivå, varmrätt	700	29	Nutrical, 1 msk = 15 ml	35	0
Rödbetsallad, 1 msk	40	0	Microrätter och varma soppor	kcal/port	protein/port	Dessert	170	3	Scandishake Mix, 1 p+240 ml mjölk 3%	590	13
Skagenröra, 1 msk	60	1	Frost enportionsrätt/paj	se förp	se förp	Soppa 1600-kcal nivå, varmrätt	220	15	Resource Instant Protein, 1 msk = 5 g	20	5
Inlagd gurka, 1 msk	4	0	Pan Pizza	420	17	Soppa 2100-kcal nivå, varmrätt	300	19	Nutrison Powder, ½ dl = 20 g	90	4
Makrill i tomatås, halv burk = 60 g	120	7	Crêpes, 1 st	60	3	Soppa 2800-kcal nivå, varmrätt	400	26	Resource energipulver, 1 msk = 7 g	30	0
			Go Vital soppa (250 ml)	330	17	Dessert till soppa	230	8	Fresubin Protein Powder, 1 skopa = 5 g	18	4
			Kyklingbuljong energi/proteinrik (230 ml)	660	16						

Fraktalanalys av vänster kammarvägg i hjärt-MR-bilder

Frida Börnfors (BME-14), Rita Hermodsson (BME-14)

Sammanfattning—Fraktalanalys kan användas för att studera hur geometrisk komplex en struktur är. I analysen bestäms ett värde på de fraktala egenskaperna genom att studera hur stor del av ett plan eller rum som strukturen fyller upp. Det har visats att vid vissa hjärtsjukdomar som bland annat hypertrofisk kardiomyopati (HCM) är det fraktala värdet förhöjt för hjärtats vänstra kammare. För att fraktalanalys ska finna klinisk nytta krävs mer forskning.

Denna rapport beskriver hur ett fraktalanalysverktyg för hjärt-MR-bilder har implementerats i analysprogrammet Segment, utvecklat av Medviso AB. För att bestämma den fraktala dimensionen användes metoden box-counting. Resultatet av projektet blev ett plug-in till Segment som bestämmer fraktala dimensionen för vänster kammarvägg i hjärtat. Programkoden är skriven på ett sätt som gör det lätt att justera efter klinisk frågeställning.

Fraktala dimensionen kan variera beroende på hur bilden är behandlad och hur fraktalanalysen utförs. Inom detta projekt analyserades resultatet av att variera två metodparametrar på 5 olika nivåer för att undersöka metodens stabilitet. Verktöget testades sedan på 10 stycken friska frivilliga och 10 stycken patienter med HCM. Testningen visade att det fraktala värdet skiljde sig signifikant mellan grupperna. Störst skillnad fanns i nedre tredjedelen av hjärtat.

Verktöget möjliggör för vidare forskning på området för att hitta samband mellan hjärtsjukdomar och geometrisk komplexitet, samt bestämma gränsvärden för vad som är normalt respektive inte normalt.

I. INTRODUKTION

A. Fraktalanalys

FRAKTAL är ett matematiskt begrepp som betyder att en bild eller mängd är starkt sönderbruten. Det finns många exempel på strukturer i naturen som har fraktal geometri, bland annat ormbunksblad [1]. I människokroppen finns fraktala egenskaper i bland annat hjärnan, ben och hjärtat. Fraktalanalys kan användas för att kvantifiera och matematiskt beskriva dessa fraktala egenskaper [2].

Ett index som kallas fraktala dimensionen, FD , beskriver hur stor del av rummet eller planet som en struktur fyller upp och är ett mått på de fraktala egenskaperna [1]. FD är lämpligt som geometriskt mått för detaljerade strukturer som inte är lämpade att beskriva med till exempel area och omkrets. Fördelar jämfört med traditionella geometriska mått är att FD är oberoende av skala och dimension. För en tvådimensionell bild kommer den fraktala dimensionen alltid att ha ett värde mellan 1 och 2 [2].

Inlämnat den 19 maj 2017
 Emejladress: {frida.bornfors@gmail.com, ritahermodsson@gmail.com}
 Teknisk handledare: Helen Fransson, Medviso AB
 Klinisk handledare: Einar Heiberg, Medviso AB

B. Tillämpningar

Fraktalanalys har funnit några tillämpningar inom medicin, bland annat för diagnostisering och mätning av utfall vid behandling av maligna tumörer [2]. Till exempel har det använts för att upptäcka låg benmassa i käken [3] och för att diagnostisera benskörhet genom att studera spongiöst ben [4]. Det finns många publikationer och användningar för fraktalanalys med tillämpningar på hjärnan. Däremot har det endast forskats i begränsad utsträckning på fraktalanalys för hjärt-MR-bilder [2].

Hjärt-MR används för att diagnostisera och undersöka patienter med hjärt- och kärlsjukdomar. 1,9 miljoner svenskar är idag drabbade av hjärt- och kärlsjukdomar och det är den vanligaste dödsorsaken i Sverige [5]. Vissa av dessa sjukdomstillstånd ger hjärtväggen mer eller mindre kompakt vävnad, vilket ger en förändrad geometrisk komplexitet [6]. Left Ventricular Non-Compaction, LVNC, är ett tydligt exempel på en sådan sjukdom.

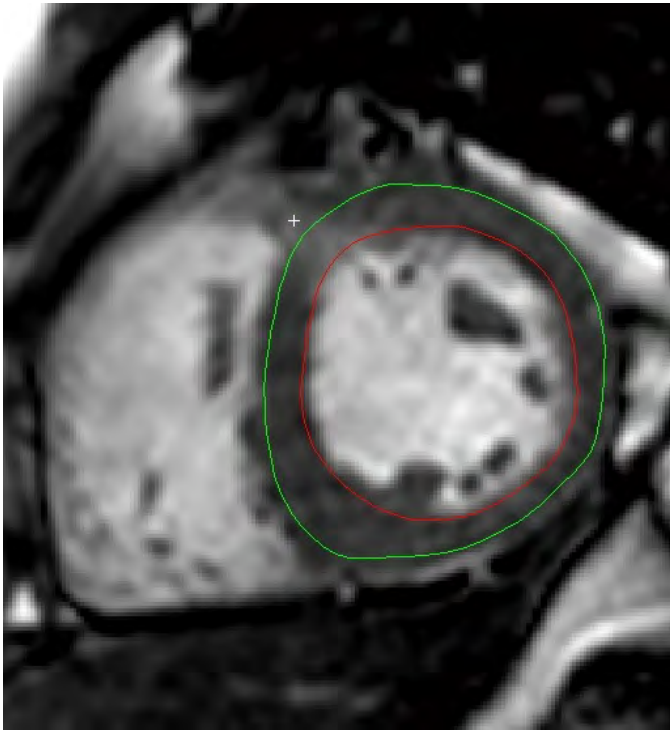
Vid LVNC är muskelväggen i vänstra kammaren mer spongiös, vilket gör att hjärtat kan få svårt att pumpa blod effektivt [7]. LVNC är en genetisk sjukdom som kan kopplas samman med komplikationer som hjärtsvikt, arytmier samt embolier [8]. Idag ställs diagnosen genom att undersöka kvoten mellan det kompakta och det icke kompakta i hjärtmuskeln. Ett bra diagnostiskt verktyg med liten risk för falska positiva svar ger en bra möjlighet att anpassa situationer och undvika komplikationer. Till exempel skulle det för idrottare kunna innebära begränsad träning för att undvika hjärtstopp om LVNC påvisats tillsammans med andra abnormaliteter [8].

Ett annat exempel på en sjukdom som påverkar den geometriska komplexiteten är hypertrofisk kardiomyopati, HCM. Sjukdomen innebär att hjärtmuskelcellerna förstoras och detta leder till att vänster kammarvägg ökar i tjocklek. Detta är en relativt vanlig sjukdom som drabbar 1 av 500, och genetik kan vara en bakomliggande orsak. En patient kan bära på en genetisk mutation för sjukdomen utan att ha utvecklat hypertrofi i vänster kammare. För dessa patienter finns det forskning som visar på att fraktala dimensionen, FD , skulle kunna vara en preklinisk indikation på en begynnande sjukdom då det kan mäta abnormaliteter i trabekler i hjärtmuskeln [9].

FD skulle kunna vara en biomarkör för både LVNC och HCM, för att tidigt kunna ställa säkra diagnoser och för uppföljning av patienter. Det är även möjligt att det har tillämpningar för fler hjärtsjukdomar.

C. Projektet

FD används inte kliniskt än då det behövs mer forskning på området för att hitta nyttan av verktöget innan det kan nå



Figur 1: En hjärt MR-bild där vänster kammarens inre vägg (endokardium) är utlinjerat i rött och yttre vägg (epikardium) i grönt.

klinisk rutin [2]. För att genomföra den kliniska forskningen behövs programvaror med möjlighet till att utföra fraktalanalys. Programvaran Segment är en bra plattform som används både kliniskt och för forskning på hjärt-MR, men saknar i dagsläget en funktion för fraktalanalys. Segment används idag på ett 20-tal sjukhus i Europa och USA, däribland Malmö, Lund och Helsingborg. Segment laddas hem av 5-6 forskare dagligen och finns i 76 länder. Det publiceras 1-2 artiklar i veckan där programvaran refereras. Programmet är utvecklat av Medviso AB, som projektet gjorts i samarbete med.

Vi har utvecklat ett plug-in till Segment som beräknar den fraktala dimensionen på vänster kammarevägg på hjärt-MR-bilder med minimal användarinteraktion. Verktøget har potential att bli ett kliniskt användbart verktyg för att diagnostisera, riskbedöma, välja behandling och följa upp patienter med hjärt- och kärlsjukdomar.

Metoden innehåller beskrivning av hur verktyget fungerar och de tester som har genomförts med verktyget. Resultatet beskriver hur vårt färdiga plug-in ser ut. Fördelar och potentiella förbättringsområden med verktyget diskuteras, samt även framtida möjligheter för fraktalanalys med tillämpningar på hjärtat.

II. MATERIAL OCH DATA

Med MR-teknik kan tidsupplösta 3D-bilder av hjärtat samlas in över hela hjärtcykeln. Det samlas in flera 2D-snitt som tillsammans bildar en bildstack. I figur 1 visas ett sådant 2D snitt i såkallad kortaxelvy.

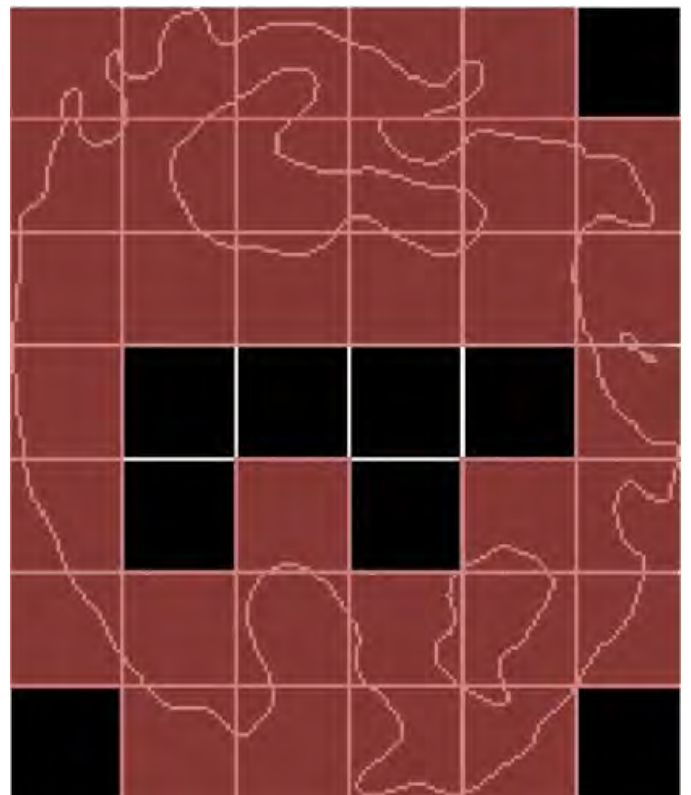
Verktyget utvecklat i detta projekt har testats på bildstackar från 10 friska frivilliga personer och 10 patienter diagnostiserade med HCM. De friska frivilliga har studerats av läkare och befunnits friska utan sjukdomstecken i hjärtat. Alla bilderna använda i detta projekt kommer från hjärt-MR-gruppen i Lund. På bilderna har läkare utfört utlinjeringar av vänster kammare. Dessa utlinjeringar markerar vänster kammarens yttre (epikardium) och inre vägg (endokardium) och görs för att kunna beräkna kliniskt intressanta parametrar. Utlinjeringarna görs ofta vid två olika tidpunkter: slutsystole och slutdiastole. Slutsystole är då hjärtats båda kammare är i slutet av kontraktionen och slutdiastole är då hjärtats kammare är i slutet av fyllnadsfasen precis innan kontraktionen börjar.

III. METOD

A. Box-counting

Det finns olika metoder för att approximativt beräkna den fraktala dimensionen, FD . Vilken metod som används påverkar värdet på FD som erhålls. Metoden som valdes för detta projekt kallas box-counting och används ofta i analys av medicinska bilder. Box-counting är passande för att beräkna FD för konturer på två- eller tredimensionella bilder [2].

En variant av box-counting, differential box-counting, är lämplig för en fullkomligt automatiserad process då den ej kräver förberedande bildbehandling, utan görs direkt på en gråskalebild. Metoden beräknar ett värde som relaterar till komplexiteten för planbilden av ett objekt [10], i detta fallet hela hjärt-MR-bilden, istället för endast kammareväggen. Av

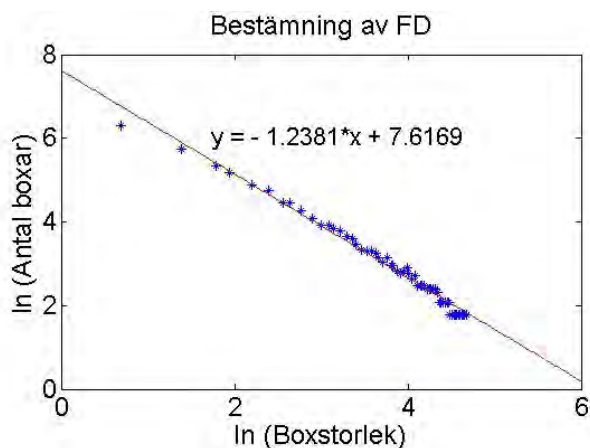


Figur 2: Principen för box-counting. Antal boxar (röda) som innehåller en del av konturen räknas.

denna anledning valdes den traditionella box-counting metoden istället för differential box-counting.

Vid box-counting läggs ett rutnät över bilden och antal rutor (boxar) som innehåller en del av konturen räknas. I figur 2 visas hur detta ser ut principiellt. Detta görs för olika storlekar på rutorna. Storleken på boxarna som användes går från 45% av den största rutan som innesluter konturen (så kallad bounding box) och minskar sedan linjärt ner till 2 pixlar i 60 steg. En beräkning av antal boxar innehållandes kontur görs alltså för 60 olika boxstorlekar. Genom att logaritmera antal räknade boxar, Y , mot boxstorlek, X , och göra en linjärregression av resultatet erhålls FD som lutningen i grafen, se ekvation 1 och figur 3.

$$\ln(Y) = -FD * \ln(X) + konstant \quad (1)$$



Figur 3: Linjärregression av logaritmerat antal boxar mot logaritmerad boxstorlek. Riktningskoefficienten ger fraktala dimensionen.

När boxarna är av sådan storlek att de inte jämnt fyller upp bilden blir resultatet av box-counting beroende av placeringen av boxarna. För att minimera denna variation placerades rutnätet med fyra olika utgångspunkter, där bildens hörn användes. För var och en av dessa positioner anpassas en rät linje och FD beräknas som beskrivet ovan. Således fås alltså fyra olika FD för samma bild, ett medelvärde beräknas och är det slutliga värdet som returneras till användaren.

Till en början användes en färdig MATLAB-metod som laddades ned för box-countingen. Denna visade sig ge oralistiska värden och använde sig av väldigt få antal boxstorlekar vilket gav få mätvärden till regressionen. Vi valde därför att skriva en egen funktion. *FracLac*, som har utvecklat ett program för fraktalanalys och har en hemsida med förklaringar till analysen, har varit ett stöd i utvecklingen av koden [11].

B. Förberedande bildbehandling och segmentering

För att beräkna FD för vänster kammarens endokardiumkontur krävs viss förberedande bildbehandling på en MR-bild. Det krävs också en segmentering, det vill säga en markering av önskat område. Denna segmentering ska noggrant definiera vad som är endokardium. Till en början användes

Segments level-set segmentering. Denna segmentering gav ett bra resultat, men var tidskrävande och krävde en del användarinteraktion. I detta projekt var en så automatiserad metod som möjligt önskad och en nästintill automatisk segmenteringsalgoritm skapades för att ersätta level-set segmenteringen. En automatiserad metod minskar den mänskliga faktorn och gör det dessutom lättare att forska på stora datamängder.

Den nya segmenteringsmetoden utgår från en redan utförd utlinjering av vänster epikardium. Det är vanligt att en sådan utförs av läkare vid analys av hjärt-MR-bilder. För att undvika skarpa kanter i den resulterande konturen uppsamlas bilden till en bildbredd på 300 pixlar innan segmenteringen görs. Bilden som laddas in i Segment kan vara av olika storlek. Det kan vara en bild över hela kroppen eller en beskuren bild av endast hjärtat och därför beskars bilden utifrån epikardiumutlinjeringen innan bilden uppsamlades. För att inte påverka originalbilden kopieras bilden till MATLAB där kopian bildbehandlas och används till vidare beräkningar.

Epikardiumutlinjeringen som redan finns utgör en mask som markerar det intressanta i bilden, i detta fall är alla pixlar som befinner sig innanför epikardium intressanta, se figur 4(a). Innanför denna mask beräknas ett tröskelvärde, som då endast kommer bero av de pixlar som finns innanför epikardiumutlinjeringen. Tröskelvärdet gör att pixlarna kan kategoriseras i två grupper; en som har mindre värden i gråskalan än tröskelvärdet och en som har större värden, se figur 4(b). Tröskelvärdet används alltså för att bestämma vilka pixlar som ligger innanför respektive utanför endokardium. Detta resulterar i en binär bild av endokardium, se figur 4(c) och sedan tas konturen av denna fram, se figur 4(d). Inbyggda MATLAB-funktioner har använts för att hitta tröskelvärdet (graythresh) och för att finna konturerna (bwperim).

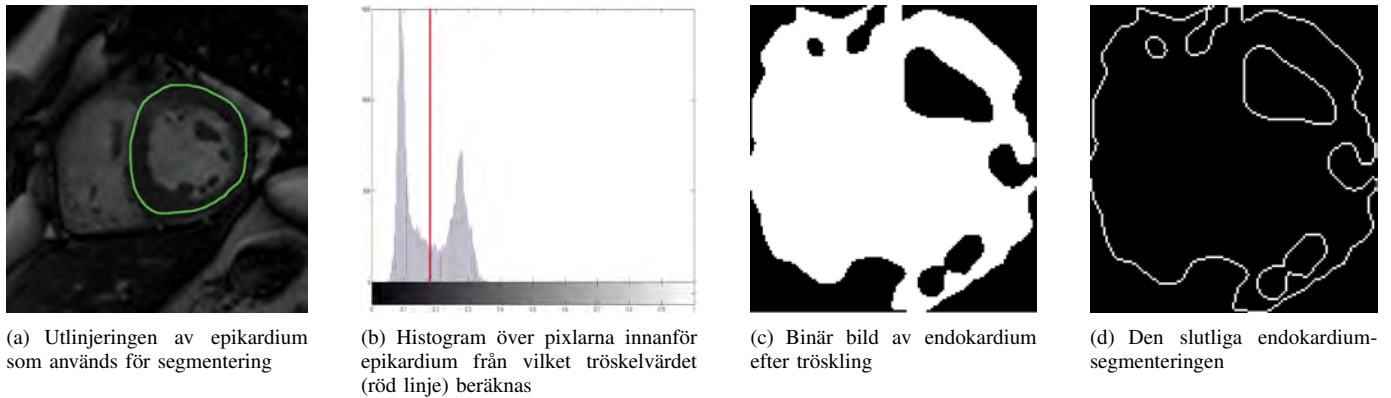
C. Utveckling av plug-in

Koden utvecklades och testades i MATLAB och integrerades som ett plug-in till Segment. Detta plug-in utvecklades med hjälp av Segments kodningskonventioner [12] och med hjälp av ett färdigt plug-in templat som finns tillgängligt i källkoden för Segment.

Fraktalanalysen går att utföra på olika snitt och vid olika tidpunkter i hjärtcykeln på varje patient. Vilka tidpunkter verktyget kan användas på bestämdes utifrån en litteraturstudie.

Under utvecklingens och testningens gång stöttes olika problem på. Antingen kunde vissa segmenteringar inte göras eller så misslyckades box-countingen. Detta beror på att MR-bilderna varierar i utseende under kontraktionscykeln och i de olika snitten vilket gjorde att oförutsedda specialfall inträffade.

Ett problem som uppstod var då utlinjeringen av epikardium var så stor att den täckte en del av höger kammare, vilket innebar att denna del följde med i trösklingen och räknades på i fraktalanalysen. För att lösa detta togs alla objekt i segmenteringen som var sammanhängande med epikardiumutlinjeringen bort. Detta kunde dock resultera i att även den nyss utförda segmenteringen togs bort om denna hängde ihop med epikardiumutlinjeringen. Fraktalanalysen kan då inte utföras. Genom att räkna antal objekt i bilden med MATLAB-funktionen bwlablel kan analysen avbrytas för det aktuella



Figur 4: Steg i den förberedande bildbehandlingen, från utlinjering av epikardium till kontur av endokardium

snittet om inga objekt finns kvar i bilden. I något fall erhöles en enda vit pixel som analysen skulle utföras på, vilket ledde till en krasch av programmet. För att lösa detta kontrolleras storleken på konturen.

Ett annat problem vi stött på var att endast papillarmuskler, muskler som fäster till hjärtklaffarna, blev den resulterande segmenteringen och därmed gav ett orimligt värde på FD . Detta löstes genom att exkludera alla värden som var mindre än 1 från det slutliga resultatet. Värden under 1 bör inte uppstå för tvådimensionella bilder.

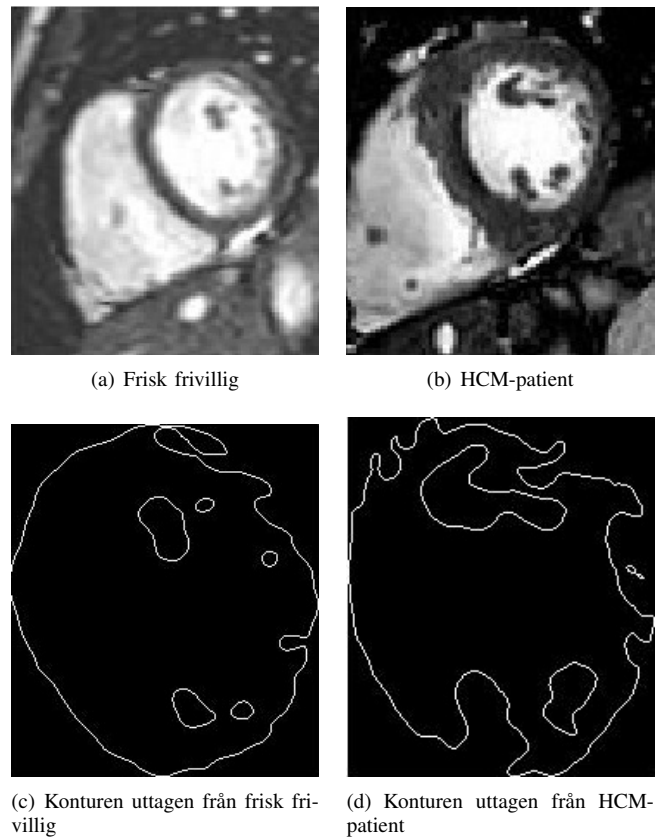
D. Testning av parametervärde

För att undersöka inverkan av olika parametrar i bildbehandlingen och fraktalanalysen gjordes testningar. För en och samma patient användes verktyget på 11 snitt i bildstacken med olika värden för antalet boxstorlekar och antalet pixlar som bilden uppsamlas till. Antalet boxstorlekar som testades var 20, 40, 60, 80 och 100 stycken. Detta testades då bilden uppsamlades till att vara 300 pixlar bred. Testning av uppsamlingens inverkan gjordes för bildbredden 100, 200, 300, 400 och 500 pixlar. Detta testades då antalet boxstorlekar var 60 stycken.

E. Testning av två populationer

Verktyget testades sedan på två grupper: en frisk population och en population diagnostiserade med HCM. Populationen med HCM bör uppvisa ett högre fraktalt värde, både enligt vad vi kan se med blotta ögat och enligt tidigare studier [9]. Exempel på hur detta kan se ut visas i figur 5, där vi ser MR-bilderna i figur 5(a) och 5(b) med motsvarande konturer i figur 5(c) och 5(d). Testningen gjordes för att undersöka om vårt plug-in också kan hitta en skillnad mellan dessa grupper.

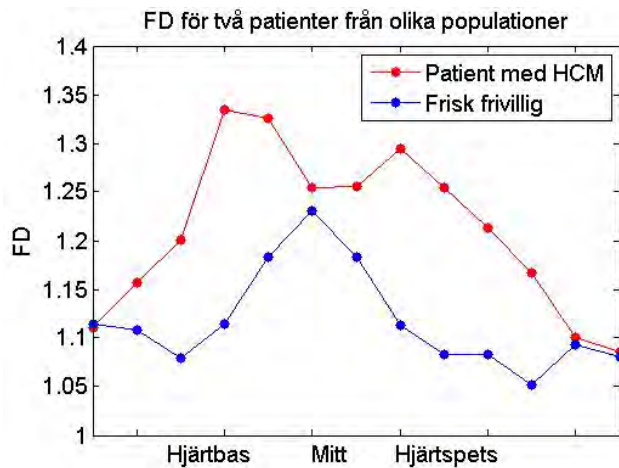
För varje patient beräknades den fraktala dimensionen för alla snitt som hade en utlinjering av vänster kammare. Dessa snitt delades in i tre delar: hjärtspetsen (nedersta tredjedelen), mitten och hjärtbasen (översta tredjedelen). Denna uppdelning gjordes på grund av att den största fraktala komplexiteten för både friska och sjuka bör återfinnas i mellersta delen av hjärtat på grund av papillarmuskler. I denna del av hjärtat skiljer sig inte FD speciellt mycket mellan olika grupper. Den största



Figur 5: Exempel på hur MR-bild och endokardiumkontur kan se ut för de olika grupperna. Patienten med HCM har mer fraktala egenskaper än den friska frivilliga personen.

skillnaden i FD mellan friska och sjuka brukar uppkomma i den nedersta delen av kammaren [2]. Figur 6 är ett exempel på hur FD kan variera i de olika delarna av hjärtat för en frisk frivillig person och en HCM-patient. Detta förklarar varför medelvärde eller det maximala värdet i hela hjärtat antagligen inte är det mest intressanta att studera. För varje tredjedel som hjärtat delats upp i sparades endast maxvärdet av FD .

För varje patientgrupp beräknades medelvärde och standardavvikelse för de olika delarna av hjärtat. Vid testningen



Figur 6: Skillnaden i FD är minst i mitten av hjärtat och störst i de andra delarna. Den övre kurvan är värden från en patient med HCM och den nedre är från en frisk frivillig.

användes 60 stycken olika boxstorlekar och bilden uppsamlades till att vara 300 pixlar bred. Alla fraktalanalyser i testningen gjordes på den slutdiastoliska tiden för att minimera eventuella skillnader i FD som kan uppkomma beroende på när i hjärtcykeln analysen görs.

För att ta reda på om det blev någon skillnad mellan grupperna gjorde en statistisk undersökning med två tester; f-test och t-test. F-testet gjordes för att bestämma om fördelningarna hade samma varians. Detta påverkar hur t-testet ska utföras. Båda testen gjordes på nivå 0,05. T-testet var tvåsidigt. För att kunna göra t-testet antas mätvärdena vara normalfördelade.

IV. RESULTAT

A. Verktöget

I Segment finns nu under fliken "Plug-ins" två stycken menyalternativ "FD all slices" och "FD current slice". Vid tryck på något av menyvalen kommer en dialogruta upp där användaren får välja om beräkningarna ska göras på den slutdiastoliska tiden eller den slutsystoliska tiden. För "FD current slice" beräknas FD för snittet som visas i Segment, och resultatet visas i en dialogruta. Om ingen utlinjering finns kan programmet inte köras och ett felmeddelande lämnas till användaren.

För "FD all slices" beräknas FD för alla snitt i stacken som har en epikardiumutlinjering och resultatet visas i en graf med fraktala dimensionen på y-axeln och numret på snittet på x-axeln. Värdena dyker även upp på listform i en dialogruta. Om det finns snitt som saknar utlinjering meddelas detta i samma dialogruta. Det meddelas även om det finns snitt där fraktalanalysen misslyckats trots att utlinjering funnits.

Verktöget visar även den kontur som beräkningen gjorts på, vilket gör att användaren kan kontrollera att segmenteringen gått rätt till. Användaren behöver veta hur en utlinjering av epikardium görs för att använda verktöget, men i övrigt krävs inga särskilda kunskaper. Verktöget är snabbt och lämnar ett resultat inom 15 sekunder för en hel bildstack.

B. Testning av två populationer

F-testen visade att för hjärtbas och hjärtspets kunde varianserna antas vara samma för testgrupperna. För hjärtats mitt kunde det inte antas vara samma varianser. Av denna anledning gjordes två olika sorters t-test, båda var tvåsidiga.

Vid testningen delades hjärtats snitt upp i tre och det maximala FD -värdet för varje tredjedel bestämdes. Detta gjordes för 10 stycken bildstackar från de båda testgrupperna, friska frivilliga och HCM-patienter. Resultatet av testningen för var tredjedel av hjärtat för testgrupperna redovisas i tabell I.

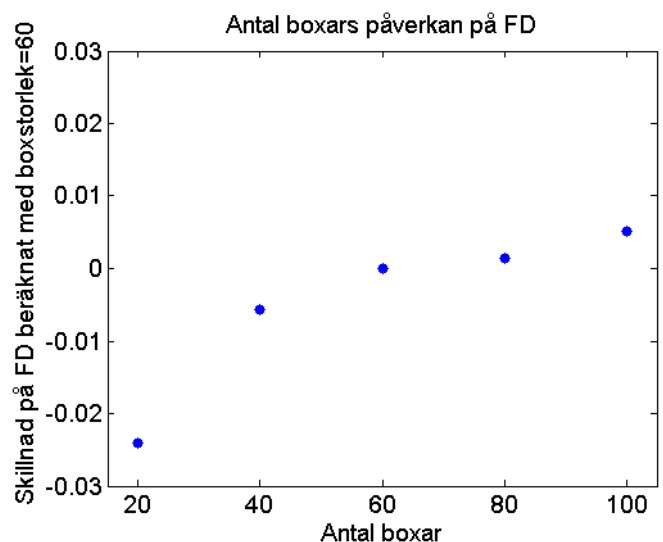
Tabell I: Resultat från testning av två populationer

	Friska frivilliga	HCM-patienter	P-värde	Signifikans
Hjärtbas	1,162±0,060	1,239±0,077	<0,024	*
Mitten	1,230±0,030	1,282±0,049	<0,012	**
Hjärtspets	1,123±0,046	1,227±0,062	<0,001	***

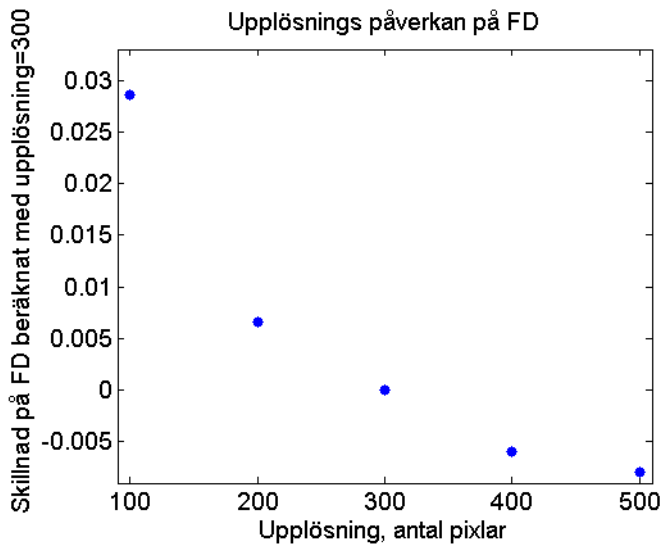
Tabellen visar resultatet på form medelvärde ± standardavvikelse för två grupper i de tre delarna av hjärtat. Signifikans redovisas på form *, ** eller ***, där * betyder att det finns en signifikant skillnad med $p < 0,05$, ** med $p < 0,01$ och *** med $p < 0,001$. Detta betyder att det kunde visas en signifikant skillnad på nivå $p < 0,05$ för hjärtbasen, $p < 0,01$ för mitten medan för hjärtspetsen fanns en skillnad med $p < 0,001$.

C. Testning av parametervärde

Testning för hur stabil FD -beräkningen är gjordes också med avseende på två parametrar: upplösning och antal boxstorlekar. Resultatet blev med ett ökat antal boxstorlekar även ett ökat värde på FD , se figur 7. Resultatet visas som avvikelse från FD då antal boxor var 60 stycken. För upplösningen blev det ett minskat värde på FD med en ökad upplösning, se figur 8. Resultatet visas som avvikelse från FD då antal pixlar var 300 stycken.



Figur 7: FD ökar med fler antal boxstorlekar.



Figur 8: FD minskar med ökande upplösning.

V. DISKUSSION

A. Framtid

Verktyget är en resurs för framtida forskning på området, men har i nuläget ingen direkt klinisk applikation. Vi tror att FD har stor potential att bli en användbar biomarkör. Måttet har en fördel i att det är oberoende av skala, vilket innebär att komplexiteten då kan jämföras för två patienter trots olika storlek på hjärtat. Med tanke på att Segment används av många forskare världen över kommer även vårt verktyg få en stor spridning. Det är ett verktyg som kan underlätta för forskning på relativt ovanliga sjukdomar och leda till nya framsteg.

De valmöjligheter som finns i verktyget idag är baserat på vår litteraturstudie och diskussioner med våra handledare efter vad vi tror är intressant att tillämpa analysen på. Det är enkelt att ändra i koden för att titta på andra strukturer eller tidpunkter. Till exempel skulle en segmentering av höger kammare kunna göras istället och sedan hade fraktalanalyskoden kunnat användas som den är eftersom koden för förberedande bildbehandling och själva fraktalanalysen är separerade.

B. Begränsningar

För att kunna använda verktyget krävs att bilderna har en epikardiumutlinjering och det krävs därför att läkare vet hur detta görs i Segment. Vi har förutsatt dessa kunskaper eftersom programmet används kliniskt för andra tillämpningar, samt eftersom det är en vanlig funktion att använda. En automatisk epikardiummarkering kan enkelt göras i Segment med endast några få knapptryck. Det finns vidareutvecklingspotential att kolla över hur en felaktig utlinjering kan påverka resultatet och vad som kan göras för att förhindra att detta sker.

C. Testning och statistik

Testningen av parametervärdena gav oss information om vad som kan påverka verktyget och hur pass stabilt det är. Detta hade kunnat testas vidare för att utvärdera verktyget ännu mer och välja rätt parametervärden. Det som också

bör testas är som tidigare nämnt utlinjeringens påverkan på segmenteringen och därmed även FD . Vidare kan också tröskelvärdets inverkan undersökas och metoden för att ta fram detta för att se hur det påverkar resultatet av fraktalanalysen. Antalet placeringar av rutnätet är ytterligare en parameter som hade kunnat testas.

Vid testning av parametervärdena visade det sig att FD ökar med fler boxstorlekar och minskar med ökad uppsamling. Det ser ut att plana ut då antalet boxstorlekar är ca 60-80, men för uppsamlingen planar det ut runt 400-500 pixlar. Trots detta valdes 300 pixlar i pixelbredd när testningen gjordes, vilket är en felkälla. Detta bör inte påverka testningen i stor utsträckning eftersom båda grupper testades med samma parametervärde. Dessutom är det små skillnader jämfört med de skillnader vi hittat mellan friska och sjuka. Däremot kan det påverka om jämförelser görs av FD -beräkningar gjorda i en annan programvara med andra parametervärde.

För att göra den statistiska undersökningen har det antagits att värdena är normalfördelade, vilket är ett rimligt antagande att göra för testgrupperna med tanke på gruppernas storlek. Detta borde ha kontrollerats med ett test, vilket inte gjordes i detta projekt.

Testningen hade kunnat göras på större grupper för att få ett noggrannare resultat. Detta kan göras genom att skriva ett script som kör igenom ett stort antal bilder för många olika patienter, vilket inte gjordes i detta projekt för att lägga mer fokus på verktyget snarare än forskningen. Trots att vår testning inte var särskilt omfattande kunde en signifikant skillnad påvisas. Störst skillnad i vår testning var i nedersta tredjedelen av hjärtat, vilket stämde med litteraturen.

Verktyget fungerar alltså som tänkt för sjukdomar där vänster kammarevägg är mer geometriskt komplex då det ger ett förhöjt värde som skiljer sig från en frisk person. Nästa steg är precis som tidigare nämnt att testa på större patientgrupper och andra patientgrupper för att hitta den kliniska nyttan av att göra fraktalanalys.

Uppdelning av hjärtat i tre är en diskuterbar felkälla. Vi utgick från de utlinjeringar som fanns och delade därefter snitten med en utlinjering i tre delar som är en praxis när vänster kammare delas in i sektorer. Antalet utlinjeringar för varje bildstack varierar mellan olika patienter. Om detta antal inte var delbart med tre lades i förstahand ett extra till mitten och sedan till hjärtspetsen. Denna uppdelning har ingen fysiologisk bakgrund och kan ha påverkat resultatet.

VI. ETIK OCH HÅLLBAR UTVECKLING

De MR-bilder som använts har varit anonymiserade och kommit från friska frivilliga och patienter som givit samtycke till att deras bilder används i forskningssyfte. Eftersom bilderna funnits att tillgå är det inga extra resurser som behövs för insamlingen av dessa. För fortsatt forskning krävs det heller inte några extra bildinsamlingar för att fraktalanalys ska kunna utföras, utan analysen görs på de bilder som samlas in på precis samma sätt som förut. Projektet är därför utfört på ett hållbart sätt och med existerande bildmaterial kan ny kunskap erhållas.

Vi ser detta som ett verktyg som kommer göra vården mer lika för alla om det skulle bli kliniskt användbart, då det är ett

kvantitativt och objektivt verktyg som gör resultatet oberoende av läkare och sjukhus. Som med andra biomarkörer är det däremot viktigt att fundera över betydelsen av ett positivt resultat, hur träffsäkert är det för en sjukdom och vilka följder kommer det att få? Detta är en fråga för de som forskar med hjälp av verktyget i framtiden.

VII. SLUTSATSER

Fraktalanalys på hjärt-MR bilder har potential att göra skillnad för diagnos och behandling. Det finns ett tydligt samband mellan vissa hjärtsjukdomar och fraktala egenskaper. Det finns relativt lite forskning inom området och därför finns det ingen tydlig kravspecifikation över hur ett sådant här verktyg ska fungera. Verktyget vi har utvecklat öppnar dörrar för forskning på området för att finna den kliniska nyttan.

VIII. EFTERORD

Vi vill tacka våra handledare Einar Heiberg och Helen Fransson från Medviso AB för hjälp med Segment, programmering och att driva projektet framåt. De har även gett värdefull feedback på vår rapport och inför presentation av arbetet.

Vi vill även tacka Robert Jablonowski på Klinisk fysiologi för hjälp med att sammanställa bilder på patienter diagnostiserade med HCM.

Båda artikelförfattarna har implementerat koden, gjort testningen och skrivit rapporten tillsammans.

REFERENSER

- [1] H. Wallin. "Fraktal," *Nationalencyklopedin*, <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/fraktal> (hämtad 2017-04-07)
- [2] G. Captur, A.L. Karperien, C. Li, F. Zemrak, C. Tobon-Gomez, X. Gao, D.A. Bluemke, P.M. Elliott, S.E. Petersen and J.C. Moon. "Fractal frontiers in cardiovascular magnetic resonance: towards clinical implementation," *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, vol. 17, pp. 1-10, 2015.
- [3] C. Lindh and G. Jonasson. "Diagnostik av osteoporos inom tandvården," *Tandläkartidningen*, vol. 99, pp. 54-57, 2008.
- [4] K.J. Koh, H.N. Park and K.A. Kim, "Prediction of age-related osteoporosis using fractal analysis on panoramic radiographs," *Imaging Sci Dent*, vol. 42, pp. 231-235, 2014.
- [5] "Hjärt- och kärlsjukdomar," *Hjärt-Lungfonden*, <https://www.hjartlungfonden.se/Sjukdomar/Hjartsjukdomar/> (hämtad 2017-04-12)
- [6] G. Captur, A.L. Karperien, A. D. Hughes, D. P. Francis and J. C. Moon. "The fractal heart — embracing mathematics in the cardiology clinic," *Nature Reviews Cardiology*, vol. 14, pp. 56-64, 2017.
- [7] K. Shemisa, J. Li, M. Tam and J. Barcena. "Left ventricular noncompaction cardiomyopathy," *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, vol. 3, pp. 170-175, 2013.
- [8] S. Caselli, C. H. Attenhofer Jost, R. Jenni, A. Pelliccia, "Left Ventricular Noncompaction Diagnosis and Management Relevant to Pre-participation Screening of Athletes" *The American Journal of CardiologyEur Heart J*, vol. 116, pp. 801–808, 2015.
- [9] G. Captur, L.R. Lopes, V. Patel, C. Li, P. Bassett, P. Syrris, D.M. Sado, V. Maestrini, T. J. Mohun, W.J. McKenna, V. Muthurangu, P.M. Elliott, J.C. Moon. "Abnormal Cardiac Formation in Hypertrophic Cardiomyopathy Fractal Analysis of Trabeculae and Preclinical Gene Expression," *Circulation - Cardiovascular Genetics*, vol. 7, pp. 241-248, 2012.
- [10] S. Liu. "An Improved Differential Box-Counting Approach to Compute Fractal Dimension of Gray-Level Image," *2008 International Symposium on Information Science and Engineering Information Science and Engineering*
- [11] A. Karperien. *FracLac for ImageJ*, <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fractal/FLHelp/Introduction.htm>. 1999-2013
- [12] "Segment - Technical Manual" *Medviso AB*, <http://medviso.com/documents/segment/techmanual.pdf>. 2017

Kamerahållare för bildåtergivning av kirurgens synfält

Emma Andersson (BME-14), Anna Wikström (BME-14)

Sammanfattning—I samband med kirurgisk vård är vårdskador vanligt förekommande. Dessa kirurgiska vårdskador uppkommer till stor del på grund av kirurgens oförmåga att hitta rätt i operationsfältet. Idag utför en kirurg tusentals operationer för att lära sig att hitta rätt i operationsfältet. Tillvaratagandet på kunskapen från erfarna kirurger är idag dålig på grund av bristande dokumentation av operationer. Genom att bildligt dokumentera operationer kan kirurger lättare titta tillbaka på operationer och tolka de anatomiska defekterna som skall åtgärdas kirurgiskt, vilket kommer att leda till reducering av antal kirurgiska vårdskador. Syftet med projektet är att ta fram en kamerahållare som möjliggör bildlig dokumentation av det som en kirurg ser under en operation utan att störa befintligt arbetssätt. Utformning av kamerahållaren har gjorts genom en designprocess bestående av tre delar: identifiera, konceptgenerera och prototyp. Kontinuerlig kontakt med experter inom tre olika kompetensområden som alla berör utformningen av kamerahållaren har hållits. Slutresultatet för projektet är en 3D-printad prototyp av kamerahållaren som testats i operationssal. Kamerahållaren möjliggör återgivning av kirurgens synfält utan att störa befintligt arbetssätt och uppfyller samtliga krav som ställs på den. Kamerahållaren är ett steg på vägen i reducering av antalet kirurgiska vårdskador.

I. INTRODUKTION

TROTS skickliga kirurger och välutvecklade kirurgiska metoder utsätts idag en sjättedel av alla patienter som genomgår kirurgisk vård för onödiga vårdskador. Kirurgiska vårdskador kostar idag samhället uppskattningsvis 1,4 miljarder kronor årligen [1]. Under de gångna decennierna har det skett fantastiska framgångar inom kirurgi. Allt mer komplexa anatomiska defekter kan åtgärdas inom samtliga kirurgiska specialiteter. Bakom denna utveckling ligger en rad viktiga medicinska upptäckter och tekniska innovationer. Den största utmaningen och vanligaste orsaken till misstag i samband med kirurgi ligger i förmågan hos kirurgen att hitta rätt i operationsfältet. Förmågan att kunna navigera rätt i operationsfältet och därmed se och kunna tolka de anatomiska defekter som skall åtgärdas kirurgiskt är helt avgörande för operationsresultatet. En särskilt betydelsefull utveckling som har lett till framgångar inom kirurgisk vård är utvecklandet av bildåtergivande metoder. Bildåtergivning ökar kirurgens förmåga att tolka anatomiska defekter och att navigera i operationsfältet. Befintliga bildåtergivande metoder är till stor hjälp men fortsatt otillräckliga för att kunna tolka

de anatomiska defekter som skall åtgärdas kirurgiskt. Största begränsningen med dagens bildåtergivande metoder är att endast förmedlar indirekta bilder av verkligheten. Indirekta bildåtergivande metoder använder olika fysikaliska egenskaper i kroppen för att bildligt återge anatomin. Med dessa metoder återges anatomin indirekt och ger därmed inte en tydlig bild av hur anatomin ser ut i verkligheten.

Idag använder kirurger pre- och postoperativt bildmaterial av indirekta bilder, såsom ultraljud och datortomografi, för att avgöra var anatomiska strukturer återfinns i verkligheten. Men det saknas idag bildligt återgivande på genomförandet av operationen. Kirurgiska ingrepp dokumenteras idag med skriftliga operationsberättelser där kirurgen återberättar hur anatomin såg ut och hur operationen genomfördes. Således är det bara de opererande kirurgerna som har vetskap om hur de anatomiska strukturerna verkligen såg ut vid operationstillfället. Baserat på operationsberättelsen förlitar vi oss idag på att kirurger inom samma specialitet kan frammana bildsekvenser i huvudet som överensstämmer med verkligheten. Operationsberättelser är ofta kortfattade och det händer att viktig information från operationen inte noteras. Avsaknad av bildmaterial från operationen försvårar förmedling av kunskap som kirurgen erhållit under operationen. Idag bygger en kirurg upp erfarenhet av hur anatomiska defekter ser ut och bör åtgärdas genom årtionden av praktisk träning och tusentals operationer. Kärnan i denna inlärningsprocess är se och lär under en pågående operation. Tillvaratagandet på erfarna kirurgers kunskap är idag dålig i och med att dokumentationen av ingrepp är bristfälliga. Detta medför återkommande bortfall av viktig kunskap och erfarenhet. För att öka patientsäkerheten behövs nya innovationer som kan ta tillvara på erfarna kirurgers kunskap. Detta kan åstadkommas genom att öka insynen i hur operationerna genomförs genom att spela in bilddata från operationer.

Dokumentation av operationer i form av bilddata kommer ge fler möjlighet att ta del av operationer och därmed öka kunskapspridningen. Genom att kunna återge bildmaterial från operationer kommer den kognitiva kopplingen mellan dagens indirekta bilder och verkligheten kunna ökas vilket kommer att underlätta det kliniska arbetet. Den bildliga dokumentationen av operationer ger möjlighet att i efterhand noggrant kunna analysera och korrekt kategorisera anatomiska defekter, fånga upp oavsiktliga händelser i själva genomförandet av kirurgin och jämföra resultatet av det kirurgiska hantverket. Detta ger även större möjlighet till att dra korrekta slutsatser om orsak-verkan samband inom kirurgisk vård. Genom att utnyttja stora mängder av bildmaterial som inhämtats från verkligheten kan maskininlärningsalgoritmer tränas till att känna igen anatomiska strukturer såväl som riskfyllda situationer. Maski-

Inlämnat den 5 juni 2017

Emejladress: {bte13ean@student.lu.se, mte14awi@student.lu.se}

Teknisk handledare: Charlotta Johnsson, Institutionen för Reglerteknik, Lunds Tekniska Högskola

Klinisk handledare: Phan-Kiet Tran, Barnhjärtcentrum, Skånes Universitetssjukhus, Lund

ninlärningsalgoritmerna kommer kunna överträffa den mest erfarna kirurgen i fråga om tolkning och analys av kroppens anatomi eftersom algoritmerna har möjlighet att analysera data från en större mängd operationer än en kirurg kan erfara under en livstid. Dessa algoritmer kommer även kunna användas till att skapa operationssimulatorer som erbjuder obegränsade variationer av övningsfall vilket kommer att öka kirurgens förmåga att navigera i operationsfältet. I framtiden kommer även maskininlärningsalgoritmerna kunna bygga upp avancerat beslutstöd åt kirurgen och ta oss ett steg närmare autonom robotkirurgi. Det finns ett tydligt behov av en teknisk plattform som kan inhämta och visualisera bilder ur verkligheten. Mer tillförlitlig dokumentation i form av bilder och samförstånd om hur verkligheten ser ut kommer att leda till bättre förståelse av operationsfältet och därmed säkrare kirurgiska ingrepp.

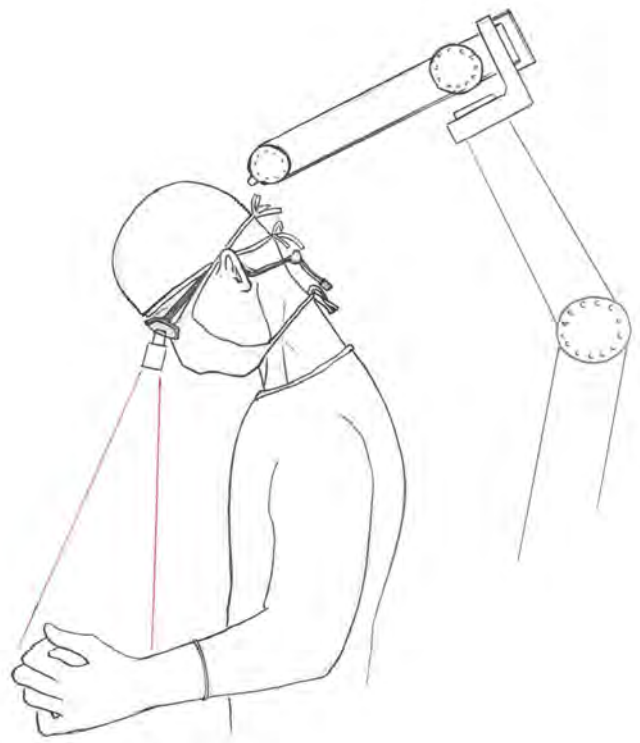
Inspelning av bilddata måste ske från samma vinkel som kirurgens blick för att återge det som kirurgen ser under en operation. Inspelning av det som kirurgen ser under en operation kräver att en kamerauppställning utvecklas. Kamerauppställningen består av kameror, en robotarm och en kamerahållare. Denna kamerauppställning får inte inskränka på säkerheten i operationssalen eller påverka kirurgens arbetssätt.

Optimal placering av kamerorna är framför kirurgens ögon eftersom kamerorna då spelar in exakt det som kirurgen ser. Med dagens teknik är det inte möjligt att placera kamerorna framför ögonen på kirurgen utan att störa kirurgens synfält under operationen. Kamerorna placeras istället i nära relation till kirurgens ögon och utifrån de inspelade bilderna kan man beräkna hur operationen såg ut ifrån kirurgens synfält. Denna teknik gör att ingen fysisk kamera behöver befinna sig framför ögonen på kirurgen för att kunna återge kirurgens synfält. Kamerorna som ska användas är av typen Teledyne Dalsa, Genie Nano C-1940. Dessa kameror spelar in bilder med ljusfältteknik. Denna bildteknik spelar in en 4D-representation av alla ljusstrålar i fältet och tillåter noggrann rekonstruktion av 3D-objekt [2].

Robotarmen till kamerauppställningen är placerad på golvet bakom kirurgen. För att se en kirurgs arbetsställning och robotarmens tänkta placering se figur 1. Robotarmen ska bära kamerahållaren för att säkerställa bildstabilitet och se till att kamerahållaren inte tynger ner kirurgens huvud. Robotarmen ska följa kirurgens huvudrörelse och styrs därför med ett sensorsystem som känner av sitt förhållande till kirurgen. Vilket sensorsystem och vilken robotarm som kommer användas till denna kamerauppställning är ännu inte bestämt.

Syftet med projektet är att ta fram kamerahållaren till kamerauppställningen. Det som undersöks är hur kamerahållaren bäst ska utformas för att återge kirurgens synfält utan att störa befintligt arbetssätt. Denna kamerahållare behövs för att kunna återge kirurgens synfält under operation.

För att utforma kamerahållaren på bästa sätt har en designprocess och metoder noggrant valts ut. Tre kompetensråden har varit inblandade och kontinuerlig kontakt med dessa har hållits för att säkerställa att en fungerande kamerahållare har tagits fram. Tillvägagångssättet av utvalda metoder i designprocessen är beskrivna. Varje utförd metod har lett fram till delresultat som har påverkat kamerahållarens utformning. Beskrivning av utförandet och erhållna resultat följer kronologisk



Figur 1. Illustration över en kirurgs arbetsställning och robotarmens tänkta placering under operation. Kirurgens synfält markeras ut av röda linjer i bilden. I regel bär kirurger glasögon med luppar under operation, vilket bilder visar. Illustration är ritad av kirurg Phan-Kiet Tran.

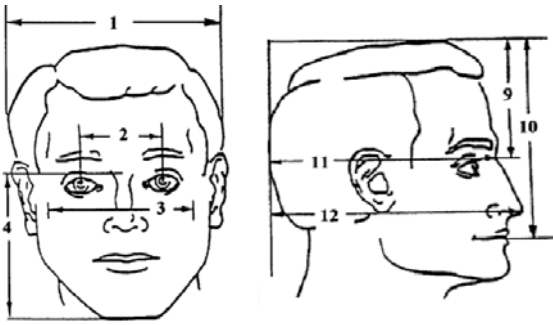
ordning i hur projektet genomfördes eftersom resultat från föregående steg i processen påverkar nästa. Vi presenterar här en kamerahållare som möjliggör inspelningen av bilder från kirurgens synfält.

II. DATA

Databladet Human Factor Design Standard [3] innehåller data över människohuvudets fysiska karakteristik från män och kvinnor och representerar statistik för 1:a, 5:e, 50:e, 95:e och 99:e percentilen. Två percentiler, 1:a och 99:e, och tre olika mått, 1, 2 och 9, betraktades. Mätvärdena är återgivna i tabell I och förtydligande av vilka mått som avses anges i figur 2.

Tabell I
MÄNNISKOHUVUDETS FYSISKA KARAKTERISTIK

Percentil	1:a	99:e
1 - Avstånd mellan öron		
Man	13,9 cm	16,5 cm
Kvinna	13,3 cm	15,7 cm
2 - Avstånd mellan pupiller		
Man	5,7 cm	7,4 cm
Kvinna	5,5 cm	7,0 cm
9 - Vertikalt avstånd mellan hjässa och näsrot		
Man	9,7 cm	12,9 cm
Kvinna	9,0 cm	12,2 cm

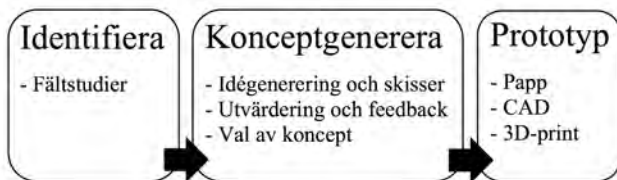


Figur 2. Illustration över människohuvudets fysiska karakteristik med utritade mått. Illustrationer, relevanta för projektet, är inhämtade från databladet [3].

Tillhörande datablad [4] till kamerorna, Genie Nano C-1940, och färdigritad CAD-modell [5] från tillverkaren, Teledyne Dalsa, har använts. Databladet innehåller kameraspecifikationer såsom mått, vikt och dimensioner på skruvhål. CAD-modellen är en 3D-skiss av kameran som kan integreras i andra 3D-ritade skisser.

III. METOD

För att skapa en väl utformad kamerahållare genomfördes en designprocess som bestod av att identifiera krav, generera koncept och skapa prototyper. Olika metoder inom varje delmoment användes, se figur 3. Detta upplägg på en designprocess är ett erkänt bra tillvägagångssätt i framtagning av nya produkter [6]. Under processens gång har kontinuerlig kontakt hållits med de tre kompetensområdena i projektet för att stämna av och få återkoppling på processens förlopp.



Figur 3. Blockdiagram över designprocessen och inkluderade metoder.

Identifiera

För en väl genomförd identifiering av krav som ställs på kamerahållaren genomfördes omfattande fältstudier. Fältstudierna genomfördes inom tre olika kompetensområden som alla berör utformningen av kamerahållaren. Utifrån dessa fältstudier kunde krav från respektive kompetensområde identifieras.

Fältstudier

Fältstudier på Barnhjärtcentrum, Skånes universitetssjukhus i Lund, genomfördes vid flertal tillfällen. Fältstudierna innefattade observation av arbetsflödet i operationssal under pågående operation. Under pågående operation intervjuades personal från operationsteamet angående deras arbetssätt under operationen. Mer djupgående intervju angående kirurgens

arbetssätt under operation genomfördes med barnhjärtkirurg Phan-Kiet Tran, överläkare på Barnhjärtcentrum. Öppna frågor användes och arbetsflödet observerades från pre- till postoperation. Syftet med att genomföra fältstudier i operationssal var att få förståelse om arbetsmiljön som råder och utifrån denna förståelse identifiera och formulera krav som kamerahållaren måste uppfylla.

Fältstudier med djupgående intervjuer genomfördes med docent Jonas Unger, forskningsingenjör Per Larsson och forskningsingenjör Andrew Gardner, från Institutionen för teknik och naturvetenskap inom Datorgrafik och Bildbehandling på Linköpings universitet, vid träff i Lund och via videosamtal. Öppna frågor användes vid intervjutillfällena. Syfte med att genomföra dessa fältstudier var att få förståelse för kamerorna vilket ledde till identifiering och formulering av de krav som kamerorna ställer på kamerahållaren.

Fältstudier på Institutionen för Reglerteknik på Lunds Tekniska Högskola med docent Charlotta Johnsson genomfördes. Öppna frågor användes och olika robotar studerades. Syftet med att genomföra denna fältstudie var att identifiera och formulera de krav som robotarmen ställer på kamerahållaren.

Konceptgenerera

Efter identifiering av krav som ställs på kamerahållaren genomfördes konceptgenerering för att komma på olika koncept och välja ut ett av koncepten. För en väl genomförd konceptgenerering genomfördes följande steg med utvalda metoder i designprocessen: idégenerering och skisser, utvärdering och feedback samt val av koncept.

Idégenerering och skisser

Utifrån de identifierade kraven, egna observationer och inhämtad kunskap i samband med fältstudier skedde idégenerering för att ta fram primära koncept. Idégenerering utfördes med hjälp av att använda metoderna Relaterade stimuli och Gallerimetoden vilka är några av Ulrich och Eppingers metoder för att generera konceptlösningar [7]. Metoden Relaterade stimuli är till för att komma på nya idéer genom att påverkas av ny stimulans inom ramen för projektet [7]. Båda gruppmedlemmarna skissade ett antal idéer på frihand och därefter utbyttes de genererade idéerna med varandra. Genom att stimuleras av den andra gruppmedlemmens skisser generades nya idéer. Gallerimetoden är till för att spontant generera relaterade koncept och ge förslag på förbättringar [7]. De skissade idéerna hängdes upp på väggarna och varje gruppmedlem fick titta på varje koncept och utifrån det ge förslag på förbättringar eller generera relaterade koncept. Genom att upprepa dessa två metoder vidareutvecklades många nya koncept från de primära koncepten.

Utvärdering och feedback

Som del av konceptvalsprocessen diskuterades för- och nackdelar med respektive koncept i enlighet med Ulrich och Eppingers metod för val av koncept [7]. Dessa för- och

nackdelar baserades på återkoppling från respektive kompetensområde som erhöles under fältstudierna. Syftet med att generera så många för- och nackdelar som möjligt var att på ett tydligt och strukturerat sätt kunna presentera konceptets styrkor och svagheter för utvalda inom de tre kompetensområdena. Efter diskussion med respektive kompetensområde genererades ytterligare för- och nackdelar med koncepten.

Val av koncept

För att välja ut ett av koncepten användes Ulrich och Eppingers metod vid namn Externt beslut. Konceptvalsmetoden innebär att en extern person med god inblick i produktens syfte väljer ut det koncept som verkar mest lovande [7]. Kirurg Phan-Kiet Tran valde ut ett av koncepten som ansågs vara mest lovande baserat på för- och nackdelar.

Prototyp

Papp

För att bestämma kamerahållarens dimensioner användes tabell I med statistiska mätvärden av människohuvudets fysiska karakteristik. Tre mått betraktades; avstånd mellan öron, avstånd mellan pupiller samt vertikala avståndet från näsrot till hjässa. Avståndet mellan öronen studerades för att bestämma kamerahållarens dimensioner så att kirurgens öron kan placeras innanför kamerahållaren utan att vidröra den. Avstånd mellan pupiller samt det vertikala avståndet från näsrot till hjässa studerades för att säkerställa att den del av kamerahållaren som är placerad mellan kirurgens ögon inte hamnar i kirurgens synfält. För att skapa universell design och därmed designa för en bred användargrupp betraktades data från den 1:a respektive 99:e percentilen. Det minsta respektive största tabellerade värdet valdes för att designen ska passa så många användare som möjligt. Utifrån dessa mått skapades en prototyp i papp. Prototypen möjliggjorde känsla för rumslig storlek. Kamerahållarens dimensioner fastställdes efter test av prototypen på flertal huvuden.

CAD

För att tydligare åskådliggöra det utvalda konceptet skissades kamerahållaren i CAD-programmet Fusion 360. För att lättare kunna modifiera och i senare skede kunna 3D-printa kamerahållaren skissades kamerafästena och grundstrukturen upp som egna komponenter i Fusion 360. CAD-modellen möjliggjorde modellering av kamerahållaren tillsammans med kamerorna. För att bestämma kamerafästernas dimensioner användes de inhämtade CAD-modellerna av kamerorna. Första versionen av kamerahållaren modellerades tillsammans med kamerorna och uppvisades för kirurg Phan-Kiet Tran och 3D-printare Marc Isaksson, doktorand på Institutionen för Biomedicinsk teknik på Lunds Tekniska Högskola, för att få feedback på kamerahållarens utseende. Utifrån feedback gjordes modifieringar av kamerahållaren.

3D-print

För att möjliggöra 3D-printning lades CAD-skisserna av kamerafästena och grundstrukturen in i programmet Cura där inställningar inför 3D-printningen bestämdes. Inställningarna som bestämdes i Cura kan ses i tabell III i bilaga. 3D-printning av alla komponenterna gjordes i materialet polylaktid, PLA, med 3D-printern Ultimaker 2+. Kamerahållarens yta efterbehandlades, för att korrigera för 3D-printerns felaktigheter, genom att slipa och fila ytan samt skära rent runt skruvhålen. För slutgiltigt förverkligande av koncept monterades 3D-printade komponenter och befintliga kameror ihop. Syftet med att 3D-printa var att skapa en materiell prototyp och göra ett första test av kamerahållaren.

För att verifiera kamerahållarens lämplighet för ändamålet testades den 3D-printade kamerahållaren i operationssal tillsammans med kirurg Phan-Kiet Tran. Syftet med att testa prototypen var att undersöka om framtaget koncept kan komma att fungera i verkligheten och ta reda på kirurgernas inställning till att arbeta tillsammans med kamerahållaren.

IV. DELRESULTAT

Identifera

Fältstudier

Från samtliga fältstudier formulerades kravspecifikationer som återges i tabell II. Fältstudier på Barnhjärtcentrum resulterade i en förståelse om arbetsmiljön som råder i en operationssal. Fältstudier och intervju med experter inom Datorgrafik och Bildbehandling resulterade i djupare förståelse för kamerorna Genie Nano C-1940. Fältstudie på Institutionen för Reglerteknik resulterade i förståelse för hur en potentiell robotarm skulle kunna se ut.

Tabell II
KRAVSPECIFIKATION PÅ KAMERAHÅLLAREN

Barnhjärtcentrum
- Kamerahållaren ska inte förhindra kirurgens eller övrig personals arbete under operationen. - Kamerahållaren får inte inskränka på säkerhet för patient eller personal.
Datorgrafik och Bildbehandling
- Kamerorna måste ha fri sikt av operationsfältet från kirurgens perspektiv. - Optimal placering av kamerorna, för att kunna återge kirurgens synfält, är så nära kirurgens ögon som möjligt. - Kamerorna ska kunna monteras på kamerahållaren och strömförsörjas. - Kamerahållaren ska kunna bära minst två kameror för att återge kirurgens synfält under operationen men helst fem för att möjliggöra bättre 3D-bildåtergivning.
Reglerteknik
- Kamerahållaren måste kunna fästas på en robotarm.

Konceptgenerera

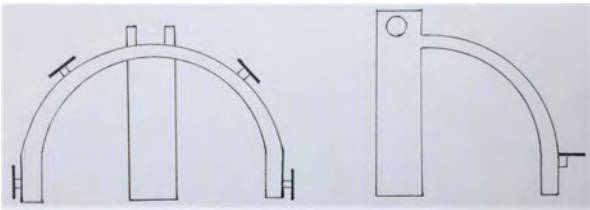
Idégenerering och skisser

Idégenerering för att ta fram primära koncept baserades på kravspecifikation samt egna observationer i samband med fältstudier. En observation från fältstudie i operationssal var att kirurgen bär en lampa på huvudet. Denna befintliga utrustning

var inspiration till utseendet på kamerahållaren. Det är lättare att implementera en ny produkt om den liknar någon som redan är i bruk. Med hjälp av Ulrich och Eppingers metod för relaterade stimuli och Gallerimetoden skissades totalt nio koncept som alla är utformade kring kirurgens huvud.

Utvärdering, feedback och val av koncept

Genom att skapa handritade skisser av koncept och lista dess för- och nackdelar underlättades kommunikation av framtagna koncept med de tre kompetensområdena. Utvärdering och feedback på koncepten bidrog till att legitimera vilket av koncepten som var mest lovande. Externt beslut av kirurg Phan-Kiet Tran ledde till att konceptet i figur 4 valdes ut. Det utvalda konceptet tilldelades arbetsnamnet *Elefanten*.



Figur 4. Skiss av utvalt koncept, kamerahållaren *Elefanten*.

Det utvalda konceptets fördelar är:

- Kan bära fler än två kameror och har möjlighet till infästning av kameror på multipla ställen.
- Kameror kan placeras nära ögonen vilket möjliggör fri sikt av operationsfältet från kirurgens perspektiv.
- Möjliggör placering av kameror så att bildinsamling kan ske i ett plan, vilket ger möjliggör bra bildrekonstruktion.
- Kirurgens huvudlampa skulle kunna bäras av kamerahållaren.

Det utvalda konceptets nackdelar är:

- Kamerahållaren har delar som är placerade framför kirurgens huvud vilket ökar risken för att den inskränker på övrig personals arbetsutrymme.
- Finns risk för att objekt såsom händer hamnar mellan kamera och hjärta och därmed förstör siktlinjen.

Prototyp

Papp

Mått över människohuvudets fysiska karakteristik från tabell I användes för att dimensionera kamerahållaren till att passa så många användare som möjligt. Mått över avståndet mellan öronen togs från den 99:e percentilen för män eftersom det var det största måttet. Eftersom kamerahållaren inte ska tynga ner kirurgens huvud dimensionerades den till att vara lite större än det mänskliga huvudet. Avståndet mellan ögonen och det vertikala avståndet från näsrot till hjässa togs från den 1:e percentilen för kvinnor eftersom det minsta måttet var intressant. Detta avgjorde dimensionerna på den del av kamerahållaren som är mellan ögonen. En prototyp i papp skapades baserat på dessa mått. Efter att prototypen testats på flertal huvuden fastställdes kamerahållarens slutgiltiga mått, se figur 7 i bilaga.

CAD och 3D-print

För att tydligare åskådliggöra konceptet och därefter kunna 3D-printa kamerahållaren skissades den i CAD och modellerades tillsammans med kamerorna. Den första versionen av kamerahållaren, se figur 5, visades upp för kirurg Phan-Kiet Tran och 3D-printare Marc Isaksson för att få feedback på kamerahållarens utseende. Modifieringar i skisserna gjordes för att göra kamerahållaren lättare att printa, mer estetiskt tilltalande samt bättre anpassad till sitt användningsområde. Följande modifieringar av kamerhållarens design gjordes:

- Fyra av kamerorna ändrades från stående till liggande profil för att minska kamerahållarens omfång.
- Tillägg av kurvatur där öronen kommer att placeras för att säkerställa att kirurgens öron inte vidrör kamerahållaren.
- Kamerafästena vinklades nedåt för att vinkla kamerorna i samma riktning som kirurgens ögon.
- Delen mellan kirurgens ögon kortades och vinklades om för att förhindra risken att störa kirurgens synfält.
- Fästet till robotarm ritades om för att minska materialåtgång och därmed tid för 3D-printning.
- Hörn och kanter rundades för att ta bort vassa kanter och göra den mer estetiskt tilltagande.

Slutgiltig version av kamerahållaren modellerad tillsammans med kamerorna återfinns i figur 5.



Figur 5. Rending av kamerahållaren med kameror. Övre bild: första version. Undre bild: modifierad version.

V. RESULTAT

En fungerande kamerahållare har tagits fram som uppfyller samtliga krav och kan återge kirurgens synfält. Efter verifiering av kamerahållarens kompatibilitet i operationssal anser kirurg Phan-Kiet Tran att kamerahållaren är väl lämpad för ändamålet. Kamerahållaren har ett nätt utseende och är väl dimensionerad för att passa det mänskliga huvudet. Avståndet mellan huvud och kamerahållare är litet vilket medför att kamerorna hamnar nära kirurgens ögon. Kamerorna är i linje med kirurgens synfält vilket kan ses i figur 6. Kamerahållaren skymmer inte synen till operationsfältet. Fem kameror kan monteras och strömförsörjas. Fästet till robotarmen kan användas för att montera fast kamerahållaren på en robotarm. Den 3D-printade kamerahållaren fick en skrovlig yta, på grund av 3D-printerns felmarginal, och överensstämmer därför inte helt med CAD-filen. Kamerahållaren ihopmonterad med fem kameror och tillhörande linser väger totalt 1045 g. Fotografi från test av kamerahållare på kirurgs huvud i operationssal ses i figur 6.



Figur 6. Fotografi från test av kamerahållare på kirurgs huvud i operationssal. Hållaren är monterad på en prototyp av robotarmen och två av fem kameror är monterade. Från fotografiet ses tydligt att kirurgens lappar och kameror är riktade åt samma håll vilket gör att kirurgens synfält kan återges.

VI. DISKUSSION

Den utvalda metoden för detta projekt grundar sig i designmetodik som är ett erkänt bra tillvägagångssätt i framtagning av nya produkter. Designprocessen som valdes består av tre delar; identifiera, konceptgenerera och prototyp. De tre delarna och metoder från Ulrich och Eppingers bok om produktutveckling [7] säkerställer att en väl genomtänkt produkt erhålls. Idag finns det inga projekt utöver vårt som har som syfte att ta fram en kamerahållare som är lämpad för att återge operationsfältet

från kirurgens vinkel. Därmed går det inte att finna samband mellan den utförda och existerande metoder.

För en väl genomförd identifiering av de krav som ställs på kamerahållaren genomfördes omfattande fältstudier inom tre kompetensområden. Genom att inkludera expertkunskaper från alla typer av områden som berör kamerahållaren erhålls värdefull kunskap i ett tidigt skede om de krav som produkten bör uppfylla. Negativt med att få expertkunskap i ett tidigt skede kan vara att extremt nytänkande koncept aldrig kommer till ytan eftersom känd kunskap begränsar idérikedom. Genom att ställa öppna frågor under intervju begränsas inte svaren och därmed erhålls mer omfattande svar som ger en djupare inblick i frågan. Eftersom fältstudier enbart har genomförts med en grupp inom varje kompetensområde har koncepten begränsats till krav som de intervjuade har angivit. Fördelaktigt för att få en djupare inblick hade varit att genomföra intervjuer med fler grupper inom varje kompetensområde.

I detta projekt fanns två givna faktorer; kamerorna är av typen Teledyne Dalsa Genie Nano C-1940 Color och kamerahållaren ska hållas av en robotarm. Dessa givna faktorer begränsade idérikedomen i konceptgenereringen eftersom kamerahållaren måste uppfylla de krav som kamerorna och robotarmen ställer på den. Utifrån resultat från kravspecifikationen utformades kamerahållaren så att det finns ett avstånd mellan huvud och kamerahållare. Avståndet måste finnas för att vikten från kamerorna inte ska tynga ner kirurgens huvud eller att värmeutvecklingen från kamerorna skadar kirurgen. Kamerahållaren designades i minsta möjliga dimension för att inte störa eller inskränka på säkerhet för personal i operationssalen. För att möjliggöra optimal bildåtergivning valdes att använda fem kameror som placerades i linje längs med kirurgens synfält. Kamerorna strömförsörjs genom sladdar på kamerornas baksida. Kamerahållaren är designad så att strömförsörjning kan ske. Vidare är att undersöka om sladdarna kan fästas in på ett säkrare sätt för att minska risken att de kopplas ur. Förslag på designåtgärd är att placera klämmor längs med sladdarna. Eftersom kirurgen idag bär en lampa på huvudet ansågs det lämpligt att utforma en kamerahållare som påminner om denna befintliga utrustning. Kamerahållarens utformning gör att befintlig huvudlampa går att integrera med kamerahållaren. Vidareutveckling av kamerahållaren krävs för att möjliggöra detta.

Genom att använda de mest extrema tabellerade värdena och testa prototyp i papp på flertal huvuden blev designen av kamerahållaren anpassad till en så bred användargrupp som möjligt. De tabellerade värdena inkluderar inte hårets omfång. Omfånget på kirurgens hår kan ha påverkan på kamerahållarens lämplighet. Kirurgen bär en operationsmössa som minskar hårets omfång men om kirurgen bär frisyren som är placerade i nära relation till kamerahållaren finns dock risk att frisyren är i vägen för god placering av kamerahållaren. Skapande av enkla prototyper i papp ledde till att designen kunde anpassas i ett tidigt skede vilket minimerade omarbetning. Användandet av 3D-ritverktyg är fördelaktigt då måtten enklare kan ändras än i handritade skisser samt att de ger möjlighet till modellering av konceptet tillsammans med externa komponenter. 3D-modeller är bra hjälpmedel för att visualisera koncept och underlättar kommu-

nikationen mellan olika professioner. 3D-printning är ett bra verktyg för att förverkliga koncept. Printern Ultimaker 2+ som användes är en desktop printer och har därmed begränsning i storlek på objekt och felmarginal. 3D-printerns felmarginal ledde till att efterbehandling av ytstrukturen behövde göras. Kamerahållarens verkliga utformning efter 3D-printning kan också ha påverkats av inställningarna som valdes i Cura, exempelvis printhastigheten och storlek på munstycke. En mer avancerad 3D-printer som använder en alternativ metod för 3D-printning och andra inställningar hade kunnat ge snyggare yta på kamerahållaren. Kamerahållaren måste inte vara steril men den ska vara lätt att rengöra mellan operationer. Den 3D-printade kamerahållaren fick en skrovlig ytstruktur vilket kan göra den svår att rengöra. Kamerahållaren 3D-printades i materialet PLA vilket är lämpligt eftersom material på utrustning i operationssalar ofta är av plast eller blankt rostfritt stål. Vid vidareutveckling av kamerahållaren är det lämpligt att välja material och tillverkningsmetod som ger en blankare ytstruktur än den som erhöles i den 3D-printade prototypen. Kamerahållaren har ett nätt utseende och om den tillverkas i rostfritt stål istället kan den göras ännu nättare.

Viktigt att poängtera är att designprocessen som har genomförts i detta projekt bara är en av många iterationer som kommer krävas för att ta fram en slutgiltig kamerahållare som ska fungera kliniskt. Kamerafästena som har utvecklats till kamerahållaren är fasta. Eftersom varje kirurg har olika operationsstil, vilket påverkar avståndet mellan kirurgens huvud och operationsfält, krävs vidare undersökning av alternativa kamerafästen. Eventuellt bör kamerafästena vara rörliga för att kunna ändra kamerornas vinkel och fokaldjup och därmed säkerställa att hela operationsfältet inkluderas och önskad spatiell upplösning uppnås. Vidare undersökning på hur kamerahållaren ska kunna följa kirurgens huvudrörelser och vilka sensorer som är lämpade behövs genomföras. Hur sensorerna ska fästas på kamerahållaren är ännu inte undersökt. Viktigt att tänka på i designen är att de är placerade så att tillräcklig signal samlas in för att följa kirurgens huvudrörelse. Om robotarmen inte kan följa kirurgens huvudrörelser skulle en potentiell kollision mellan kamerauppställning och kirurg kunna uppstå. Kollisionen skulle kunna bli en fara för kirurgen men även för patienten eftersom en kollision kan leda till att kirurgen begår ett misstag. Legala aspekter kring vem som ska bära ansvaret för om robotarmen agerar felaktigt behöver undersökas när den slutgiltiga kamerauppställningen tas fram. Beroende på vilka sensorer som väljs och hur snabbt robotarmen kan följa kirurgens rörelse kommer utformandet av kamerahållaren påverkas. Viktigt är att avståndet mellan kirurgens huvud och kamerahållare är så pass stort att kirurgen inte störs under pågående operation. Kamerahållaren tillsammans med kameror väger drygt ett kilo och det krävs vidare undersökning om robotarmen klarar av att bära denna vikt. Kamerahållaren har utvecklats och testats i operationsmiljö anpassad för barnhjärtkirurgi. För att verifiera att produkten fungerar inom alla kirurgispecialiteter bör den även testas på andra avdelningar och i olika operationssalar. Den slutgiltiga kamerauppställningen som ska fungera kliniskt behöver en försäkran från tillverkaren om att den överensstämmer med de krav som regelverk ställer på den. Hur detta kommer

att påverka kamerahållaren exempelvis i val av material och tillverklingsprocess är ännu inte undersökt.

Etik

Eftersom kamerahållaren har som avsikt att samla in bilder från operationer måste försiktighetsåtgärder vidtas för att försäkra att detta sker etiskt. Det är viktigt att etiskt tillstånd och samtycke från patienten finns innan bildinsamlingen påbörjas. Vid användandet av insamlade bilder är det viktigt att bilderna är avidentifierade så att obehörig person inte kan härleda bilden till patienten.

Hållbar utveckling

Kamerahållaren kommer att kunna minska antal kirurgiska vårdskador vilket kommer att leda till kostnadsreducering av kirurgisk vård. Effektivare och mer patientsäker vård leder till minskad ekonomisk belastning för samhället. Vid framtagande av prototyper och i senare skede tillverkning av kamerahållaren är det viktigt att tänka på att välja material och tillverkningsprocesser som har så liten miljöpåverkan som möjligt.

VII. SLUTSATSER

Inom vården finns ett behov av att spela in bilder av operationsfältet för att minska antal vårdskador i samband med kirurgisk vård. För att möjliggöra detta behövs en kamerahållare. Designprocessen med utvalda metoder resulterade i en kamerahållare som uppfyller samtliga identifierade krav. Kontinuerlig kontakt med tre kompetensområden som påverkar kamerahållarens utformning säkerställde att en fungerande kamerahållare togs fram. Verifiering av kamerahållarens funktion utfördes i operationssal och visade att den kan återge kirurgens synfält, är kompatibel med befintligt arbetssätt samt är attraktiv för användaren.

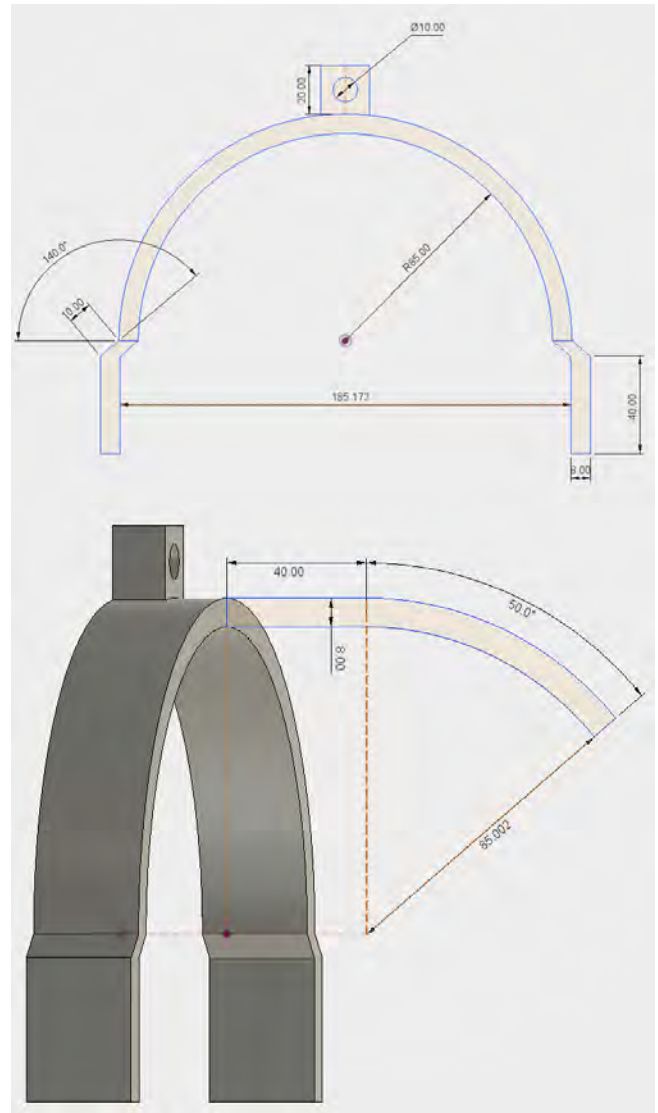
VIII. EFTERORD

Vi skulle vilja rikta ett stort tack till vår tekniska handledare Charlotta Johnsson, vår kliniska handledare Phan-Kiet Tran samt kursledningen Tomas Jansson och Hanna Isaksson. Ett stort tack riktas även till Jonas Unger, Per Larsson och Andrew Gardner från Institutionen för teknik och naturvetenskap på Linköpings universitet, Axel Tojo och Marc Isaksson från Institutionen för Biomedicinsk teknik på Lunds Tekniska Högskola samt all personal som vi har varit i kontakt med på Barnhjärtcentrum, Skånes Universitetssjukhus i Lund, som alla intresserat sig för och medverkat i detta projekt. Författarna till artikeln har bidragit lika mycket under hela projektet.

REFERENSER

- [1] *Skador i vården – skadepanorama och kostnader för kirurgi*, Landstingens Ömsesidiga Försäkringsbolag, Version 2014-12-16, s. 20-23, <http://lof.se/wp-content/uploads/Skador-i-vaarden-skadepanorama-och-kostnader-foer-kirurgi.pdf>
- [2] M. Levoy, P. Hanrahan, *Light Field Rendering*, Computer Science Department, Stanford University, 1996, <https://graphics.stanford.edu/papers/light/light-lores-corrected.pdf>
- [3] *Human Factors Design Standard*, Federal Aviation Administration Technical Center, Atlantic City, New Jersey, 2003, s. 14-14 - 14-17
- [4] *Genie Nano Cameras*, v. 4, Teledyne Dalsa, 2017, <http://info.teledynedalsa.com/acton/attachment/14932/f-0602/1/-/-/-/Genie-Nano-Family-datasheet.pdf>
- [5] *Genie Nano Mechanical 3D Model (STEP)*, [zip-fil med 3D-modell], <http://www.teledynedalsa.com/imaging/products/cameras/area-scan/genie-nano/G3-GC10-C1940/>,
- [6] S. P. Tayal, *Engineering Design Process*, M.M. University, Mullana, Indien, 2013, <http://static.ijcsce.org/wp-content/uploads/2013/06/IJCSCE1040113.pdf>
- [7] K. T. Ulrich, S. D. Eppinger, *Produktutveckling - konstruktion och design*, Upplaga 1:1, Studentlitteratur AB, Lund, 2014, s. 182 & 199.

BILAGA



Figur 7. Kamerahållarens mått angivna i cm.

Tabell III
INSTÄLLNINGAR I CURA VID 3D-PRINTNING

Munstycke	0.8 mm
Lagertjocklek	0.1 mm
Vägg tjocklek	1.6 mm
Topp- och botten tjocklek	1 mm
Fyllnadsgrad	20 %
Fyllnadsmonster	Rutnät
Printhastighet	50 mm/s
Förflyttningshastighet	150 mm/s
Använd kylfläktar?	Ja
Använd printstöd?	Nej

Migration av humana neurala progenitorceller på elektrospunna nanofibrer

Elin Branzell (BME-14), Linnéa Bunse (BME-14)

Sammanfattning—Många neurala sjukdomar uppkommer och utvecklas i hjärnan. En rad av sjukdomarna saknar ännu vetenskapliga belägg för anledning till uppkomst. Mikromiljön som återfinns i hjärnan är ytterst komplex och svår att följa då den består av olika nätverk i nanostorlek. Genom att skapa nanofibrer och studera humana neurala progenitorceller, HNPC, på dessa 3D-ytor kan hjärnans komplexa miljö efterliknas. En ökad förståelse för hur celler påverkas och beter sig i hjärnans naturliga miljö förväntas erhållas. Framsteg inom detta område är mycket intressant för forskning på stamceller, bland annat i syfte att kunna testa nya läkemedel och behandlingsmetoder för neurala sjukdomar. Den här rapporten beskriver hur 3D-fibrer spunnits av en PLLA-lösning och hur HNPC tillåtit migrera på dessa. Resultatet har jämförts med HNPC som under samma förutsättningar fått migrera i strukturlösa petriskålar. Försöket visade att HNPC utför riktad migrering i större utsträckning då de får växa längs plastfibrer. Detta konstaterades genom att cellerna följer fibrernas riktning vid migrering, att cellkärnorna radar upp sig längs varandra och att cytoskelettet påvisar cellernas rörelse i samma riktning. Resultatet i denna studie tyder på att elektrospunna fibersubstrat kan vara ett sätt att återskapa en miljö som i stor utsträckning efterliknar den mänskliga hjärnan.

I. INTRODUKTION

KROPPENS komplexitet har för människan länge varit ett mysterium. Tack vare modern utrustning och teknik har fler och fler frågetecken lyckats rätas ut kring kroppens anatomi, kemiska processer och olika flöden [1]. Stora delar av de frågeställningar som fortfarande kvarstår rör vårt kontrollsystem och centrum för allt skeende, nämligen hjärnan. En stor del av vad som sker i hjärnan är fortfarande ett mysterium för dagens neurologer [2].

En relativt ny forskning inom neurologi påvisar ett samband mellan neurala cellers migration och differentiering i hjärnan och neurala sjukdomar. Genom att studera dessa förlopp förmodas en större inblick ges i de processer som inträffar vid sjukdomar såsom demenssjukdomar, autism och schizofreni. Att studera neurala cellers vandring och utveckling kan därmed vara en nyckel till nästa steg inom modern forskning [3].

A. Bakgrund

1) Migrering

Inne i människokroppen sker ständigt dynamiska processer, inte minst av cellerna. Celler rör sig genom kroppens olika mikromiljöer genom migration över olika typer av strukturer,

där migrationen triggas av kemiska faktorer, styvhet, flöde och struktur [4].

Omogna neurala celler, utför naturligt denna vandring i sin process vid mitotisk delning och för att nå den plats där deras huvuduppgift ska utföras [5]. I människokroppen sker denna migration på 3D-liknande strukturer i nanostorlek. I tidigare forskning har iakttagelse av cellers migration utförts på strukturlösa 2D-ytor, men har sedan några år tillbaka utvecklats till att försöka efterhära kroppens mikrostruktur med 3D-fibrer i stället. Syftet är att återge en miljö in vitro som efterhärrar miljön in vivo på bästa möjliga vis [6].

2) Fibrer

Vid konstruktion av den önskade 3D-strukturen används bland annat en metod som kallas elektrospinning. Elektrospinning utförs genom att applicera ett starkt elektriskt fält över en polymerisk lösning via en nålkonstruktion. Genom att kontinuerligt pumpa ut denna lösning över fältet spinnas fibrer på en yta som applicerats framför lösningen [7]. Strukturen på fibrerna kan anpassas så de blir randomiserade eller parallella.

I tidigare utförda arbeten, däribland från E. Netanyah et al (2016), diskuteras skillnaden i migration på olika strukturer. Fördelen med parallella fibrer jämfört med randomiserade debatteras. Vid migrering på parallella fibrer ses riktad migration, till skillnad från på randomiserade fibrer. Den neuronala formationen blir även mer omfattande och erhåller också en större fenotypisk differentiering på parallella strukturer. Pionerade axon, utskott som rör sig i migreringsriktningen, följer ofta kringliggande nervtrådar så snart de hittat fram. Migrering på parallella fibrer efterliknar alltså det som sker in vivo i större grad än på randomiserade fibrer [8].

I ytterligare studier, däribland i ett arbete utfört av F. Yang et al. (2005), har liknande undersökning genomförts. Här jämförs migrationen av celler på randomiserade PLLA-fibrer med parallella PLLA-fibrer och även vid denna forskning ses en större effektivitet hos neurala cellers migrering och differentiering vid de parallella fibrerna framför de randomiserade [9]. Ytterligare ett arbete som stödjer att nervceller får en ökad tillväxt på rätta fibrer jämfört med randomiserade, är skrivet av L. Yao (2008). I projektet tilläts celler migrera på fibrer spunna i två lager. I det yttersta lagret var fibrerna randomiserade medan det inre lagret bestod av rätta fibrer. Man kunde vid denna studie påvisa en kraftigare tillväxt av celler i det inre lagret [10].

Vid produktionen av de lösningar som använts för spinnningen krävs en polymer och ett lösningsmedel. I projektet har polymererna PLLA (polylactic acid) och PCL (polycaprolactone) utnyttjats. Båda polymererna är

Inlämnat den 7 juni 2017

Emailadress: elinbranzell@gmail.com, linnea.bunse@hotmail.se

Handledare: Fredrik Johansson, Biologiska Institutionen

nedbrytbara, biokompatibla och godkända av FDA för implantation i kroppen [11]. Det som skiljer dem åt är att PLLA ger en mer stabil struktur, då den inte ger lika elastiska fibrer som PCL. Därmed sjunker inte stora nätverk ihop lika lätt. PLLA har även en högre smältpunkt, vilket gör att torkningen av cellerna inför analys i elektronmikroskop kan utföras med hjälp av värme eller annan kemisk torkning. Vid användning av PCL krävs torkning med jonlösning.

3) SEM

Svepelektronmikroskop, SEM (*Scanning Electron Microscope*) är ett mikroskop som använder en svepande elektronstråle, vilken interagerar med föremålets atomer. Detta ger upphov till signaler som beskriver föremålets yttopografi och en bild kan genereras.

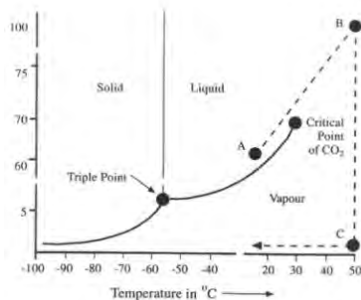
För att kunna nyttja SEM krävs sputtring av fibrerna, vilket innebär att en metallbeläggning läggs på proverna. Sputtringen utförs i syfte att jorda provet och därmed undviks uppladdning av fibrerna. Sputtring sker genom att fiberproverna sätts i en behållare med ett guldbeklätt tak. Proverna utsätts för vakuum och argongas adderas till behållaren. Genom att generera ett elektriskt fält slås argongasens atomer sönder till laddade joner som i sin tur slår loss guldatomer från toppen. Guldatomerna landar på proverna som sedan är klara för att betraktas i SEM [12].

4) Cellerna

Under projektet har humana neurala progenitorceller, *HNPC*, använts. Progenitorceller är mer specifikt utvecklade stamceller. Cellerna differentierar till en grupp målceller, men till skillnad från stamceller kan de inte differentiera obestämt många gånger. Neurala progenitorceller har förutsättningarna att differentiera till olika typer av celler i hjärnans nervsystem.

Cellerna som använts härstammar från en cellinje från ett 7 veckor gammalt fosters framhjärna. Denna cellinje har fått växa tills det att sfärer bildats. En sfär är en klump av celler vars ursprung är en cell som delat sig många gånger. Inuti sfären har utvecklingen av cellerna gått olika långt så att lager av olika nervcellstyper uppstått. Sfärerna förväntas innehålla neuronala celler, samt astrocyter och oligodendrocyter. Dessa sfärer används vid utsädd på fibrer.

5) Critical Point Drying



Figur 1. Critical Point Drying illustrerat i graf. Bildkälla [13]

När en vätska med mycket vatten torkar övergår ämnet från vätskeform till gasform i en viss takt. Vid torkning av prov innehållande små strukturer uppstår ett problem. Ytspänningen i den minskande vätskemängden kommer att utgöra en kraft som drar i dessa mikrostrukturer. Krafterna riskerar att tillföra artefakter på strukturerna. Det är därför viktigt att fasövergången som sker när man torkar utförs utan ytspänningens påverkan. Genom att låta ämnet övergå från vätskefas till gasfas, över den kritiska regionen, kan ytspänningen undvikas och detta utförs med hjälp av en *Critical Point Dryer*.

För att hamna i den kritiska regionen behöver ämnet, i detta fall koldioxid, öka i både temperatur och tryck. Det tillåter ämnet att vara varken i gasfas eller i vätskefas, utan båda på en gång. På grund av den höga temperaturen borde ämnet vara i gasfas, men trycket är för högt. Ämnet blir därmed till en vätska som beter sig som en gas. Då koldioxiden beter sig som en gas finns där heller ingen ytspänning. Trycket sänks medan temperaturen bibehålls, sedan sänks temperaturen under ett konstant tryck. Man har då rört sig runt den kritiska punkten för vätskan, se *Figur 1*. Detta betyder att mediet gått från vätskefas till gasfas utan att provet och dess strukturer påverkas av ytspänning. Strukturerna förväntas därmed vara intakta efter torkningen [13] [14].

B. Syfte

Syftet med projektet är att iaktta HNPCs migrering på två olika typer av ytor. Teorin är att den mänskliga mikromiljön i hjärnan är uppbyggd av 3D-strukturer och vi vill därför försöka återskapa denna miljö in vitro till så stor del som möjligt. Då celler tillåts migrera utan struktur, sker enligt teori radiell slumpmässig migrering, alltså rörelse ut från mitten.

Projektet har i syfte att undersöka hur cellernas uppträdande påverkas beroende på vilken struktur de tillåts växa på. Vi ska därför jämföra cellers beteende på 2D-strukturer med beteendet på 3D-strukturer och därmed förhoppningsvis kunna konstatera cellernas ökade förmåga att utföra riktad migrering på de spunna 3D-ytorna.

C. Disposition

Arbetet är främst indelat i tre huvudsteg som efterföljts under projektets gång:

- Skapandet av fibrerna
- Utsädd av celler på dessa fibrer
- Analys av cellodlingen

Under projektets fortskridning har ett flertal olika metoder utnyttjats för att komma fram till de olika stegen. Stegen är beskrivna i kronologisk ordning under rubriken *Metod* som underrubriker till varje huvudsteg (de tre ovanstående) för att lättare kunna följa den process vi själva utgått från. I *Resultat* har vi främst ägnat oss åt det tredje steget, analys av cellerna, och därefter följer en utvärdering av hur väl vi kommit fram till våra mål utifrån analysen, samt överläggning av felkällor i *Diskussion* och *Slutsats*.

II. METOD

Nedan följer de väsentliga metoder som använts för att utföra de tre ovanstående huvudstegen.

A. Fibrer

1) Lösning

Initialt preparerades två typer av lösningar, se *Tabell 1*. Det essentiella är att polymeren löses, samt att de lösningsmedel som väljs inte besitter egenskaper som kan komma att komplicera nästkommande steg.

Tabell I
DE TVÅ LÖSNINGAR SOM ANVÄNDES FÖR SPINNING AV FIBRER

	Lösning 1	Lösning 2
Polymer	PCL	PLLA
Lösningsmedel	Metanol, kloroform	Diklormetan
Viktprocent (%)	15	15

2) Elektrospinning

Vid spinning av fibrerna laddades den blandade lösningen i en mindre spruta. Sprutan fästes sedan på en elektrisk pump som kontinuerligt pressade ut lösningen ut ur sprutans kanyl. Spinningen utfördes i ett isolerat skåp under en spänning på 20 kV.

Anordningens läge justerades så att kanylen satt 20 cm framför och i höjd med en centrifug där en PLA-film, *Polylactic-acid*-film, fästes. Kanylen kopplades till en spänningsgenerator samtidigt som centrifugen med plasten jordades. När anordningen var iordningställd slogs centrifugen och pumpen på. Därefter startades spänningsaggregatet.

Kanylen behölls täckt tills centrifugen nått rätt hastighet och spänningsaggregatet kommit upp i 20 kV. Kanylens öppning exponerades så att PLLA-lösningen drogs mot centrifugen. Små nanofibrer producerades då lösningen i sprutan gick över det elektriska fältet. Då filmen var fäst på en hastigt roterande centrifug blev fibrerna parallella på ytan. Spinningen pågick tills ett tillräckligt tätt lager fibrer skapats (ca 0,6 ml av PLLA/PCL-lösningen).

3) Preparation inför utsådd

Ur PLA-plasten med fibrer skars små cirkelformade preparat med diametern 30 mm ut med hjälp av en laserskärare. Dessa steriliserades och placerades i petriskålar med en metallring som tyngd på vardera fiberpreparat för immobilisering.

4) Sputtring och SEM

Proverna med de spunna fibrerna sputtrades för att sedan kunna observeras i svepelektronmikroskopet.

När sputtringen av proverna var klar fördes de in i SEMet som var kopplat till ett datorprogram. Fibrernas struktur betraktes och bilder på dessa togs med förstoring 200, 2000 och 8000 gånger med hjälp av datorprogrammet.

B. Cellerna

1) Utsådd

Processen genomfördes i ett specifikt sterilt laboratorium avsett för användning av levande celler. Två huvudgrupper bestämdes:

- Grupp A: celler som fick växa på strukturlösa 2D-ytor.

- Grupp B: celler som fick växa på 3D-fiberstrukturer.

De två huvudgrupperna delades sedan in i ytterligare tre undergrupper

Fixering efter

- 2 dagar
- 5 dagar
- 10 dagar

Skillnaden mellan dessa undergrupper var alltså hur lång tid de fick på sig att migrera. I varje undergrupp valdes ett antal prover ut för fixering och betraktning i SEM och resterande för infärgning och betraktning i ett fluorescensmikroskop. Till cellerna tillfördes ett expansionmedium före utsådd. Mediumet stimulerar inte differentiering, men triggar delning.

För alla prover i grupp A tillsattes 2-3 sfärer i mitten av petriskålarna. Efter 30 minuter förväntades sfäerna ha fastnat på ytan. Ett tillväxtmedium tillsattes. Detta tillväxtmedium bestod av ett differentieringsmedium utblandat med kalvserum. Cellerna förvarades sedan i en koldioxidinkubator i 37 grader Celcius och migreringen påbörjades.

För alla prover i grupp B tillsattes samma tillväxtmedium 20 minuter innan utsådd. Detta togs sedan bort, två till tre sfärer fästes på fibrerna i mitten av substratet. Efter två timmar tillsattes mediet igen och utsådden var avklarad.

2) Odling av celler

Med hjälp av biologen Helena Fritz på Biologikum sköttes odlingen efter en bestämd tidsplan, se *Tabell 2* för hur denna lades upp.

Tabell II
TIDSPLAN FÖR ODLING AV CELLER

Dag	Aktivitet
1	Ingen aktivitet
2	Byta medium, fixering av 2 dagarskultur
3	Ingen aktivitet
4	Byta medium
5	Byta medium, fixering av 5 dagarskultur
6	Byta hälften av medium
7	Ingen aktivitet
8	Byta hälften av medium
9	Ingen aktivitet
10	Byta medium, fixering av 10 dagarskultur

3) Bedömning av preparat

Inför analys av cellerna gjordes en överblick av samtliga preparat med hjälp av ett ljusmikroskop. De prover där cellerna inte överlevt sorterades bort. Ett antal av proverna hade torkat, vilket syntes på de karakteristiska kristallerna som bildats. Slutsats av detta var att även cellerna i dessa prov torkat.

Till inmärkning av fluorescerande ämnen valdes tre prover ut. Två stycken vardera som fixerats efter 2 dagar respektive 5 och 10 dagar.

4) Critical Point Dryer

Prov till SEM valdes ut, ett prov som fixerats efter 2 dagar, samt två prover från fixering efter 5 och två prover från

fixering efter 10 dagar. Botten ur dessa petriskålar klipptes ut och torkades med hjälp av *Critical Point Dryer*.

Tabell 3 beskriver namngivning av proverna. De prover som användes under analysen listas i Tabell 4.

Tabell III
A,B - 2- RESPEKTIVE 3D-STRUKTUR
2,5,10 - DAGAR INNAN FIXERING
SEM, FLUOR - SEM- RESEPEKTIVE FLUORESCENCEANALYS

Namngivning av preparat - n,i,j	
n	A,B
i	2, 5 eller 10.
j	SEM, FLUOR

Tabell IV
DE PREPARAT SOM VALDES UT FÖR ANALYS

	SEM	Infärgning
2D-struktur	A.2.SEM	A.2.FLUOR
	A.5.SEM	A.5.FLUOR
	A.10.SEM	A.10.FLUOR
3D-struktur	B.2.SEMa	B.2.FLUOR
	B.5.SEMa	B.5.FLUOR
	B.5.SEMb	
	B.10.SEMa	B.10.FLUOR
	B.10.SEMb	

5) Infärgning

Infärgning av cellerna gjordes i ett antal steg. Cellerna behandlades med tre olika substanser utblandade med PBS (*Phosphate Buffert Saline*), en vätska med samma pH-värde och osmolaritet som kroppen. Där emellan sköljdes preparaten kontinuerligt med 100% PBS.

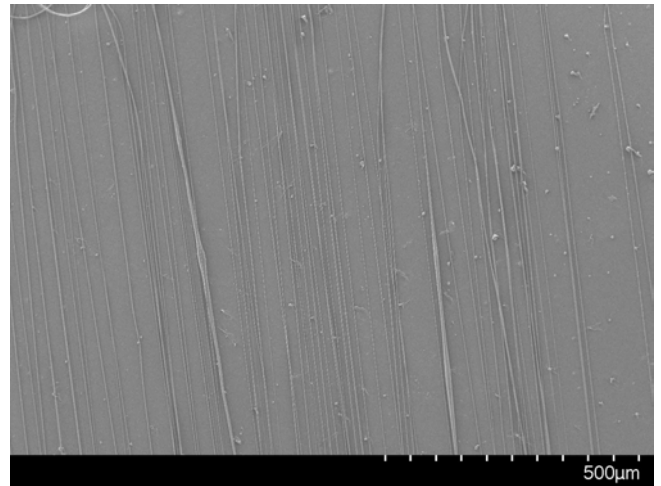
De första lösningen som användes var TritonX i PBS (0.1%), en detergent vilken används för att luckra upp cellmembranet och tillåta insläpp till cellen [15]. Efter detta steget gjordes en lösning Phalloidon i PBS (0.02%), en fluoroserande röd färg som binder till aktinet i cellens cytoskelett [16]. Den sista lösningen som tillsattes var Bisbenzimidlösning i PBS (0.01%), en fluoroserande blå färg som binder in till cellkärnan [17].

När proverna var behandlade klipptes petriskålarnas kanter bort från alla prover A och ett täckglas lades på. För alla prover B flyttades fibrerna till ett mikroskopglas som också de täcktes av ett täckglas. Proverna förvarades sedan mörkt inför analysen för att inte bleka de fluorescerande effekterna.

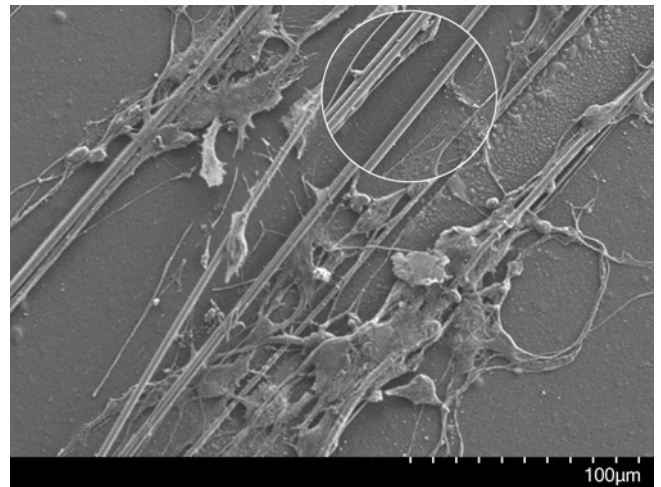
C. Observation

1) SEM

De utvalda proverna, A.2.SEM, A.5.SEM, A.10.SEM, B.2.SEMa, B.5.SEMa, B.5.SEMa, B.10.SEMa och B.10.SEMb fästes på en metallstubbe och fördes in i svepelektronmikroskopet. Varje prov granskades enskilt efter celler och deras migrering och lämpliga bilder togs.



Figur 2. *Provspinning av PLLA* SEM av fibrer som spunnits av en PLLA-lösning med hjälp av centrifugen. Här i 100x förstoring.



Figur 3. *B.5.SEMa* SEM av fibrer där celler fått växa i 5 dagar. I den zoomade delen av bilden kan man se hur cellerna migrerat längs fibern.

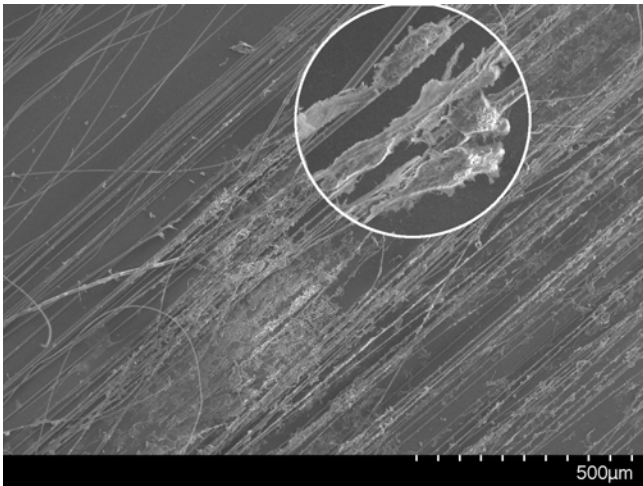
2) Fluorescensmikroskop

I ett nedsläckt rum iaktogs proverna A.2.FLUOR, A.5.FLUOR, A.10.FLUOR, B.2.FLUOR, B.5.FLUOR och B.10.FLUOR. För att se cytoskelettet lades ett rött filter på mikroskopet och ett blått filter för att granska cellkärnan. Bilder för respektive prov togs och med hjälp av ett fotoprogram sammanlänkades bilderna för att påvisa både cytoskelettet och cellkärnan i samma bild.

III. RESULTAT

A. SEM av fibrer innan utsädd av celler

Efter tre skilda spinningstillfällen undersöktes fibrerna i SEM. Ett flertal resultat gavs med varierande tjocklek och täthet. De fibrer som valdes ut för utsädd av celler bedömdes bra i tjocklek (något mindre än en cells diameterstorlek). De bestämdes även besitta lagom balans mellan täthet och porositet. Balansen innebär att fibrerna bedömdes tillräckligt porösa för att tillåta migration mellan fibrerna, men också betryggande täta för att skapa ett nätverk.



Figur 4. B.10.SEMbSEM av fibrer där celler fått växa i 10 dagar. I den zoomade delen av bilden kan man se hur cellerna migrerat längs fibern.

PLLA-fibrerna som spunnits med centrifugen låg i ett parallellt mönster, se *Figur 2*, och valdes framför de spunna PCL-fibrerna med anledning av bättre kemiska förutsättningar vid torkning av preparaten.

B. SEM av fibrer efter utsädd av celler

I svepelektronmikroskopet granskades totalt åtta stycken prover. Tre stycken från grupp A utan fibrer och fem från grupp B med fibrer, se *Tabell 4*.

1) 2D

I grupp A granskades proverna och i samtliga fall (fixering efter 2, 5 respektive 10 dagar) var det problematiskt att hitta celler. I prov A.2.SEM iaktogs en enskild sfär som påvisade orienterad migrering. Cellerna i sfärens ytterkant hade rörts sig radiellt från sfärens mitt, vilket stämde överens med teorin kring cellers beteende på en 2D-yta. De kvarstående proverna uppvisade inga celler och kunde därmed inte utvärderas.

2) 3D

Vid analys av grupp B visade samtliga fall celler som migrerat längs de spunna nanofibrerna. I *Figur 3* uppvisas prov B.5.SEMa där cellernas utskott och orientering längs fibrerna visar hur cellerna vandrar längs med fibrerna. Liknande tillstånd upptäcktes i prov B.10.SEMb, se *Figur 4*, med skillnaden att ett större till antal celler migrerar längs de spunna fibrerna, detta då de haft dubbelt så lång tid på sig att växa.

I samtliga fall påvisades även celler som fallit igenom fibrerna och migrerat på petriskålens botten. Dessa celler skilde sig markant från de som fastnat på fibrerna då de istället för riktad migrering vandrar längs botten i slumpvis riktning från sfären.

C. Fluorescensmikroskop

Nedan följer de bilder som togs med hjälp av fluorescensmikroskopet. Cellkärnorna är infärgade så att de lyser blått i bilderna. Cytoskelettets infärgning gör att det

lyser i rött.

1) 2D

På de 2D ytor där celler låtit växa kunde vi se att sfärerna brett ut sig i radiell riktning. I *Figur 5* och *Figur 6* uppvisas celler en bit bort från sfärerna med infärgad cellkärna och cytoskelettet, där cytoskelettets utseende tyder på att cellerna är påväg åt olika håll. Den orienterade, radiella migreringen syns även *Figur 7*, *Figur 8* och *Figur 9*. Dessa tre figurer (föreställande prov A.2.FLUOR, A.5.FLUOR resp. A.10.FLUOR) utgör en bildserie illustrerande hur celler migrerar ut från en sfär på en plan yta efter 2, 5 respektive 10 dagar.

2) 3D

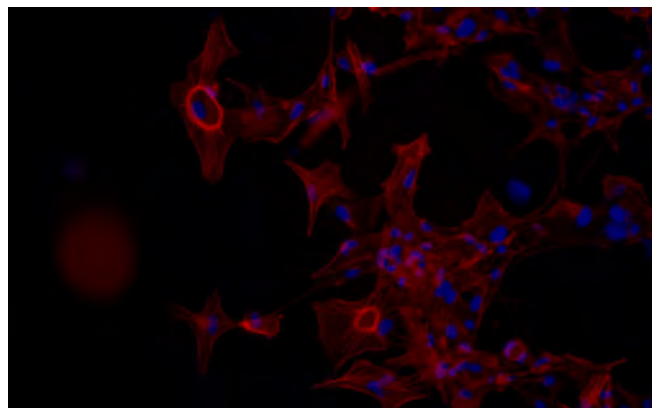
För alla prov med fibrer som observerades kunde celler som migrerat längs med fibrerna påvisas. Detta uppvisades på ett flertal sätt. Infärgningen av cellkärnorna visade hur cellerna arrangerat sig i rätta rader som var en, eller ett par celler tjocka, vilket påvisar riktad migrering, se *Figur 10*.

Infärgningen av cytoskelettet visar hur cellernas utskott arrangerats längs med fibern. Cellerna har därmed klättrat på fibern genom att fästa sina utskott längs med dessa. Även detta indikerar riktad migrering i *Figur 10*.

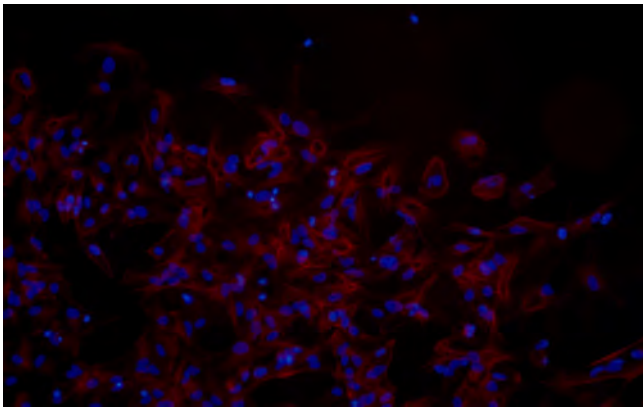
Vid observation av sfärens utbredning efter 2, 5 och 10 dagar bedömdes cellerna ha migrerat ut från sfärens mittpunkt i riktning med fibrerna. I *Figur 10* och *Figur 11*, båda föreställande prov B.2.FLUOR, har cellerna fixerats efter 2 dagar. Här uppvisas tydligt migrering längs fibrernas riktning.

Figur 12 och *Figur 13* (prov B.5.FLUOR respektive B.10.FLUOR) föreställer celler fixerade efter 5 respektive 10 dagar. I dessa bilder är fibrernas riktning markerade med vita referensstreck och således bevisas cellernas vandring parallellt med dessa.

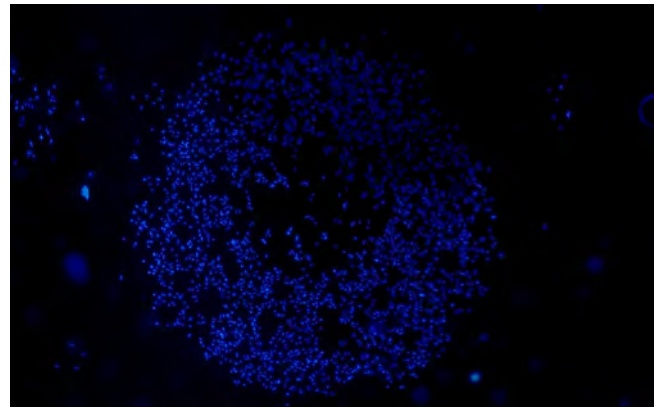
I *Figur 13* uppvisas även att fibrerna i detta prov inte längre var parallella. Detta konstaterades vid observation i fluorescensmikroskopet. Slutsatsen kring riktad migrering kan dock fortfarande fastställas då cellerna migrerat längs med de krökta fibrerna. I denna bild är både krökta och rätta fibrer markerade med vita referensstreck.



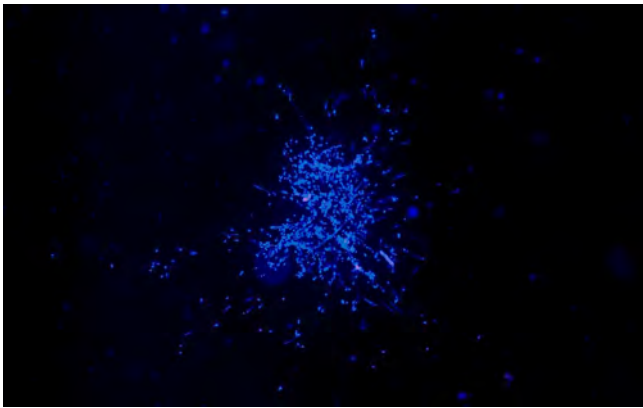
Figur 5. A.5.FLUOR. Celler som fått växa 5 dagar på en slät yta. Cytoskelettet infärgat i rött, cellkärnor i blått.



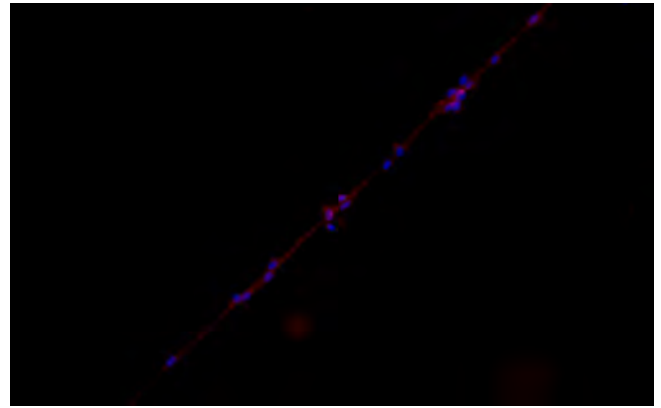
Figur 6. *A.10.FLUOR*. Celler som fått växa 10 dagar på en slät yta. Cytoskelettet infärgat i rött, cellkärnor i blått.



Figur 9. *A.10.FLUOR*. Sfär efter 10 dagar som har fått växa på en plan 2D-yta.



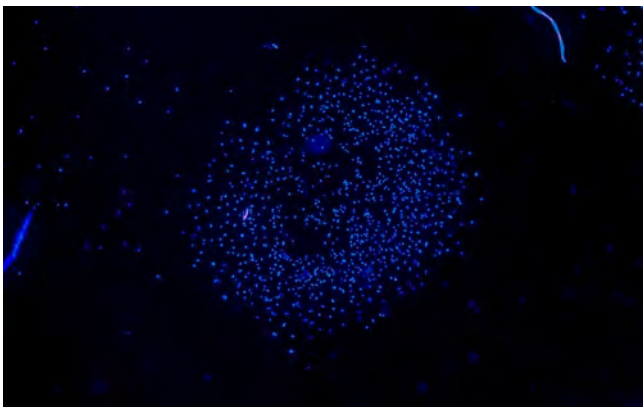
Figur 7. *A.2.FLUOR*. Sfär efter 2 dagar som har fått växa på en plan 2D-yta.



Figur 10. *A.2.FLUOR*. Celler som migrerat längs en fiber. Dessa celler har låtit växa i 2 dagar. Cytoskelettet infärgat i rött, cellkärnor i blått.

IV. DISKUSSION

De observerade resultaten i SEM och Fluorescensmikroskop stödjer teorin om cellernas migration. Vi kunde se att cellkärnorna radade upp sig, att cytoskelettet klättrade längs fibrerna och att cellerna följer fibrerna parallellt. På samma sätt tyder resultaten av vår studie på att celler som får migrera längs 2D-ytor uppvisar en oriktad migration. Detta är ett rimligt och trovärdigt resultat eftersom det liknar resultatet och slutsatserna från tidigare studier som tas upp i introduktionen

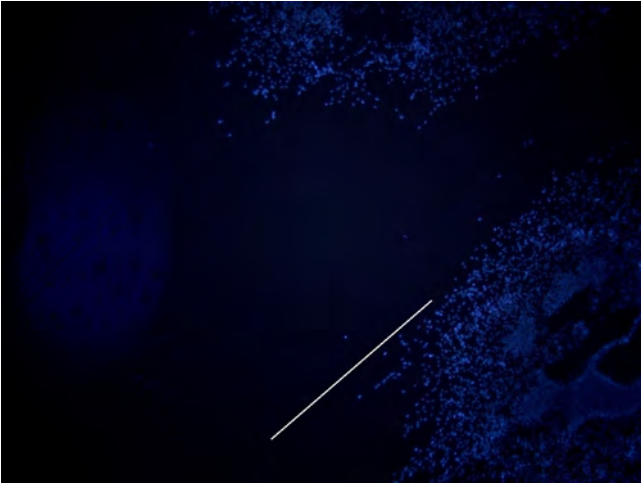


Figur 8. *A.5.FLUOR*. Sfär efter 5 dagar som har fått växa på en plan 2D-yta.

av rapporten [8] [19].

Under analysen upptäcktes en del bortsköljda celler. Bilderna från försöket konstaterade fler fall bland 2D-preparaten där celler sköljts bort än bland 3D-preparaten. Detta skulle kunna tyda på att neurosfärer har lättare att fästa på fiberstrukturer än på en plan 2D-yta. Således stödjer detta ytterligare teorin att neurala stamceller trivs bättre på elektrospunna PLLA-fibrer än på plana ytor, eftersom fibrernas utformning efterliknar strukturer i den mänskliga hjärnan.

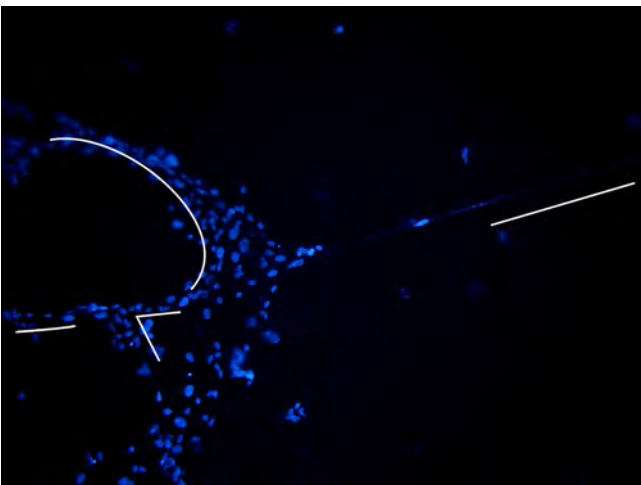
Vid observation av 2D-preparaten avsedda för SEM kunde inga celler återfinnas. Detta beror troligen på att dessa blivit bortsköljda av misstag någon gång under tillväxtfasen då cellernas tillväxtmedium bytts ut. Att celler blir bortsköljda vid byte av medium kan bero på att cellerna i den utplanterade sfären ännu inte hunnit fästa sina utskott i underlaget tillräckligt väl. Då gammalt medium dras upp ur petriskålen med hjälp av en pipett, eller då nytt medium tillförs i skålen uppstår strömningar i mediet. För en cell som ännu inte hunnit fästa sina utskott ordentligt i underlaget kan dessa fysiska krafter bli för påfrestande och cellen släpper från underlaget. De eventuella lösa cellerna riskerar att antingen sugas upp med det gamla mediet, eller att hamna under eller vid sidan av fiberytan om cellerna odlas på en sådan.



Figur 11. *B.2.FLUOR*. Celler efter 2 dagar. Det vita strecket indikerar fibrernas riktning.



Figur 12. *B.5.FLUOR*. Celler efter 5 dagar. Det vita strecket indikerar fibrernas riktning.



Figur 13. *B.10.FLUOR*. Celler efter 10 dagar. De vita strecken indikerar fibrernas riktning.

Eftersom dessa prover var nästintill helt blanka är det också troligt att cellerna sköljts bort under ett tidigt skede i odlingsprocessen. Celler fäster troligtvis bättre i underlaget allt eftersom försöket fortskrider. Det är alltså mer sannolikt att ödelägga ett prov i början av forskningsstudie än i ett senare stadie, då cellerna fått tillfälle att fästa och migrera i upp till 10 dagar.

Då proven torkades med hjälp av en *Critical Point Dryer* påverkades PLA-plasten på ett oväntat sätt genom att preparaten blev kraftigt böjda. Denna deformation orsakade att fibrerna inte längre befann sig i ett spänt läge över PLA-plasten. Vi kunde därmed observera fibrer som inte var räta då proverna kördes i SEM. Det behöver inte betyda att fibrerna inte var räta när cellerna såddes ut, troligen kan de härstamma från artefakter som med största sannolikhet tillkom vid torkningen av proven.

Om försöket skulle upprepas hade det varit lämpligt att hitta ett fungerande sätt att torka preparaten i *Critical Point Dryer* utan att proven deformerades. Det kan handla om att placera preparaten i ett annorlunda läge inuti maskinen, att tillverka mindre preparat eller att testa att torka fler eller färre prov åt gången.

För vissa prover, bland annat *B.10.FLUOR*, uppvisade observationen i fluorescensmikroskop fibrer som inte längre var arrangerade parallellt. Hur detta uppstod kan inte säkert fastställas. Eftersom cellerna har växt längs med de krökta fibrerna, se *Figur 13*, kan slutsatsen därför dras att fibrerna troligen blivit påverkade innan celler planterades ut eller i ett tidigt skede av odlingen.

En trolig bakomliggande orsak till att denna artefakt uppkom är vår måttliga vana i laboratoriet. Nya erfarenheter som stötts på under projektets gång är förmågan att handskas varsamt med känsliga preparat, hantera pipetter och sterila miljöer. Likväl besitter vi bristande kunskap kring att aktsamt selektera och behandla mindre fibersubstrat utan att dessa tar skada. Detta kan vara en ytterligare faktor till att olägenheter uppstått under projektets gång.

Ytterligare en teori om hur artefakten kring de krökta fibrerna uppstått är att enskilda prov har blivit utskurna ur kantbiten från PLA-plasten som fibrerna spänns på. I ytterkanten av plasten finns större risk att fibrerna rubbas vid förflyttning av preparatet mellan olika platser, eller då de mindre 30mm preparaten skurits ut från denna plast. Artefakten kan också ha tillkommit vid sterilisering av preparatet.

Ett annat möjligt alternativ är fibrerna blivit drabbade av stötar eller utsatts för andra krafter som de inte klarade av. Detta kan ha skett genom tillstötning med en pipett eller liknande vid byte av medium, eller att metallringen, som användes för att förhindra att fibrerna skulle flyta, har skavt mot de känsliga fibrerna och fått dessa att hamna i oordning.

V. ETIK

De riktlinjer som bestämmer kring genetisk integritet fastslogs 2006 i Sverige (lag SFS 2006:351). Där innefattas frågor om embryonal stamcells forskning och regleringen kring dessa. Lagen tillåter forskning på befruktade ägg, vid tillfälle av

godkänd etikprövning av forskningen i förväg. De ägg som används är vanligen de som blivit över vid provrörsbefruktnings och är tillåtna att användas för forskning fram till 14 dagar efter befruktning, med godkännande från donatorer [18].

Stamcellerna som använts under projektets gång härstammar från framhjärnan från ett 7 veckor gammalt bortabortat foster. Cellinjen producerades på Karolinska Universitetssjukhuset i Stockholm av L. Wahlberg, Å. Seiger med kollegor år 1998 [19]. Cellinjen producerades under NIH:s (biosäkerhetsguidning med syfte att skydda forskare, allmänheten och miljön) och svenska statens riktlinjer, samt en lokal etikkommitté och lämpliga samtyckesformulär [20]. Den cellinje som används är endast avsedd för forskning och alltså inte i diagnostiskt eller terapeutiskt syfte. Slutsatser kring cellernas beteende har gett (och ger fortfarande) god kunskap för forskning inom neurologi, men kommer alltså inte användas för behandling för någon patient.

VI. HÅLLBAR UTVECKLING

Då befolkningen i Sverige förutspås att bli äldre och äldre, är ett välkänt problem ökade kostnader inom sjukvården och bristande sjukhusplatser. Det finns i dagsläget varken botemedel eller bromsande medicin för ett flertal neurala sjukdomar vilket, förutom svårigheter för patienten själv och anhöriga, innefattar stora kostnader och belastningar för Sveriges sjukvård.

Genom att fortskrida med forskningen kring neurala stamcellers beteende kan framtiden sannolikt erbjuda större kunskap i ämnet och därmed förhoppningsvis också medföra en del av lösningen på Sveriges framtida problematik inom sjukvården.

Plasterna som används är godkända av FDA samt nedbrytbara [11] och i kombination med lösningsmedlet utgör de ingen fara för miljön. Då forskningen som bedrivits i detta projekt är relativt billig och enkel, är utvecklingen inom detta området också försvarbar att finansiera och låta fortskrida.

VII. SLUTSATSER

Neurala stamceller som tillåts växa på strukturer tenderar att utföra en riktad migrering i större utsträckning än på strukturlösa ytor. Den riktade migreringen liknar i högre grad det naturliga skeendet i den mänskliga hjärnan under utveckling än vad slumpmässig radiell migrering gör. Artificiella, parallella 3D-strukturer skapade med hjälp av elektrospinning är en relativt enkel metod för att efterlikna den mänskliga mikromiljön. Genom förhållandevis enkla tillvägagångssätt erbjuder metoden en inblick i hur neurala celler beter sig inuti vår kropp.

VIII. EFTERORD

Vi skulle vilja rikta ett stort tack till vår kliniska handledare Per Fredrik Johansson som har följt och stöttat oss genom hela projektets gång. Vi vill också tacka Ulrica Englund Johansson som visat stort engagemang i vårt projekt och som visat oss vägen i processen och även odlat celler på fibrerna. Tack till Maximilian Ottosson och Albin Jakobsson som guidat oss i labbet, hjälpt oss med våra fibrer och tagit sig tid att ge oss tips på vägen. Även Helena Fritz, som hjälpt oss att så ut och

sköta cellerna under tillväxtfasen, samt Marina Castro Zalis som odlat sfärerna ska ha ett stort tack för hjälpen.

Under projektets gång har arbetet, dels det kliniska samt det teoretiska, fördelats jämnt mellan de två skribenterna Elin Branzell och Linnéa Bunse.

REFERENSER

- [1] John C McLachlan, Debra Patten (2006). *Anatomy teaching: ghosts of the past, present and future*. Medical Education, Volume 40. Issue 3. DOI:10.1111/j.1365-2929.2006.02401.x
- [2] James Olds, U.S. National Science Foundation (2015). *Unlocking the Brain, Earth's Most Complex Biological Structure*. <http://www.livescience.com/50273-unlocking-the-brain-and-its-complexity.html>, 2017-05-12
- [3] Silvia Budday, Paul Steinmann, Ellen Kuhl (2015). *Physical biology of human brain development*. *Frontier in Cellular Neuroscience*. DOI: 10.3389/fncel.2015.00257
- [4] P. Rakic (1990). *Principles of neural cell migration*. Cellular and Molecular Life Sciences, Volume 46. Issue 9. DOI:10.1007/BF01939380
- [6] Sharonna Even-Ram, Kenneth M Yamada (2005). *Cell migration in 3D matrix*. *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 17. DOI: 10.1016/j.ceb.2005.08.015
- [7] Nandana Bhardwaj, Subhas C. Kundu (2010). *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*. *Biotechnology Advances*, Volume 28. Issue 3. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>
- [8] Ulrica Englund-Johansson, Eitan Netanyah, Fredrik Johansson (2016). *Tailor-Made Electrospun Culture Scaffolds Control Human Neural Progenitor Cell Behavior—Studies on Cellular Migration and Phenotypic Differentiation*. Scientific Research Publishing, Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2017, 8.
- [9] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna (2004). *Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering*. *ScienceDirect*, Volume 26, Issue 15, May 2005.
- [10] L. Yao, N. O'Brien, A. Windebank, A. Pandit (2008). *Oriented Neurite Growth in Electrospun Fibrous Neural Conduits*. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. Volume 90B, Issue 2, August 2009.
- [11] Lin Xiao, Bo Wang, Guang Yang, Mario Gauthier (2012). *Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials: Synthesis, Modification and Applications*. *InTech*, 2012-01-20. DOI: 10.5772/23927.
- [12] Susan Swapp, *Scanning Electron Microscopy (SEM)*, University of Wyoming, http://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html 2017-04-27
- [13] PST - ProSciTech, Laboratory Equipment, Critical Point Dryers. https://proscitech.com/?navaction=show_pagechapter=kpage=3 2017-05-08
- [14] Micro to Nano, Innovative Microscopy Supplies. <https://www.microtonano.com/Overview-Tousimis-Critical-Point-Dryers.php> 2017-05-08
- [15] Sigma - Sigma Products Information Sheet, Triton X-100. <https://www.snowpure.com/docs/triton-x-100-sigma.pdf> 2017-05-08
- [16] Cell Signaling Technology - Alexa Fluor® 488 Phalloidin, <https://www.cellsignal.com/products/buffers-dyes/alex-a-fluor-488-phalloidin/8878> 2017-05-02
- [17] <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Usage/b1155use.pdf> 2017-05-02
- [18] *Codex - Regler och riktlinjer för forskning*. Centrum för forsknings- och bioetik, BMC Uppsala. <http://www.codex.vr.se/medicin2.shtml> 2017-04-03
- [19] Albin Jakobsson, Maximilian Ottosson, Marina Castro Zalis, David O'Carroll, Ulrica Englund Johansson, Fredrik Johansson. *Three-dimensional functional human neuronal networks in uncompressed low-density electrospun fiber scaffolds*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, Volume 13. Issue 4. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.12.023>
- [20] Melissa K. Carpenter, Xia Cui, Zhong-yi Hu, Jennifer Jackson, Sandy Sherman, Åke Seiger, Lars U. Wahlberg (1999). *In Vitro Expansion of a Multipotent Population of Human Neural Progenitor Cells*. *Experimental Neurology*, Volume 158. DOI: 10.1006/exnr.1999.7098

Software tool for obstetric Doppler ultrasound research on prenatal blood circulation

Emil Nilén (BME14), Olle Oswald (BME14)

Abstract—Blood flow measurement in the umbilical cord with Doppler ultrasound is a common diagnostic method in obstetrics, when a fetus is deviating from the standard growth curve. The aim is to determine if the circulation between the fetus and the placenta is impaired, by studying the waveforms of the blood flow. The standard characterization method today is pulsatility index (PI), but a new complementary method is currently being researched at the Faculty of Medicine, Lund University, which utilizes the Doppler audio spectrum of the flow measurement. The idea of the new method is to find the frequency where the amplitude has decreased by 15 dB from maximum.

This report presents a software tool, which is meant to aid the research of the new method by making the conversion and editing of Doppler sound sequences more automated. The software allows the user to select sequences from .vob-, .avi- and .wav-files and analyse them with the new method. Because of the automated steps, time is saved which allows for a more effective work process. The software is created in MATLAB using GUIDE, the graphical user interface toolbox for MATLAB. The software is distributed as an application which does not require a MATLAB installation or a license to run.

I. INTRODUCTION

IN the southern health care region of Sweden, approximately 1300 pregnant women each year are referred to a more thorough clinical investigation of their pregnancy, when the routine ultrasound examination performed in week 18-19 of the pregnancy has revealed that the fetus deviates from the standard growth curve. One of the examinations which is then performed is measurement of the circulation between the fetus and the placenta through the umbilical cord using Doppler ultrasound. [1]

The umbilical cord connects the fetus to the mother's placenta and consists of the umbilical vein which provides the fetus with oxygen and nutrient-rich blood as well as two umbilical arteries, which carry blood with waste products and low oxygen content back from the fetus to the placenta. [2]

If the circulation is impaired the result can be a reduced supply of oxygen to the fetus (fetal hypoxia), and if the circulation is severely impaired there is an imminent risk of fetal asphyxiation. A severely impaired circulation therefore requires immediate delivery of the fetus. While this procedure is necessary to save the fetus, preterm delivery is also associated with a risk for its continued development. The timing of the delivery is therefore important and not always easy to decide. [1]

Submitted June 8, 2017

E-mail: {emil.n@hotmail.com, olleoswald@hotmail.com}

Technical supervisor: Tomas Jansson, Lund University, Faculty of Engineering, Department of Biomedical Engineering

Clinical supervisor: Jonas Brännström, Lund University, Faculty of Medicine, Department of Logopedics, Phoniatrics and Audiology

A. Description of Doppler ultrasound

The principle of flow measurement with Doppler ultrasound is a physical phenomena known as the Doppler effect. If a light- or sound wave of frequency f_0 is sent towards an object moving with velocity v , the returning reflected wave will have a slightly different frequency f , which depends upon the velocity of the reflector. In the case of flow measurement the ultrasound transducer is stationary, and the relationship is described by the formula:

$$\Delta f = \frac{2f_0 v}{c} \cos(\theta) \Leftrightarrow v = \frac{c \Delta f}{2f_0 \cos(\theta)} \quad (1)$$

where Δf is the difference between the reflected and the original frequency, f_0 is the original frequency, c is the propagation speed of the ultrasound wave and θ is the angle between the direction of the ultrasound wave and direction of the blood flow, known as the insonation angle. The reflectors in blood are typically red blood cells.

The dependence of the angle θ illustrates an important practical aspect of flow measurement. If the ultrasound transducer is held perpendicular to the flow, $\cos(\theta) = \cos(90^\circ)$ and the Doppler signal will constantly be zero, regardless of the blood flow. A smaller insonation angle yields a stronger signal and a more reliable measurement of the velocity. An ideal insonation angle is between 0° and 15° . [1]

B. Description of PI

The standard method today for characterizing the placental circulation and thereby estimate when to deliver the fetus is called pulsatility index (PI). PI uses flow measurements in the umbilical arteries with Doppler ultrasound, and is defined as the difference between the maximum systolic velocity and the minimum diastolic velocity, divided by the mean flow velocity:

$$PI = \frac{v_{max} - v_{min}}{v_{mean}} \quad (2)$$

Because of the pulsating nature of blood flow, the velocity has a distinct waveform, as is shown in figure 1. Though PI uses measurements from the umbilical artery, it reflects upon the overall placental resistance to flow. The resistance decreases with gestational age, and the PI-value must therefore be related to a reference curve to enable evaluation. A benefit of using PI is that the insonation angle θ does not affect the ratio (see equation 1 and 2).

The flow can be divided into five blood flow classes (BFC), which determine how frequently the pregnancy is examined to monitor its progression and determine the time of delivery

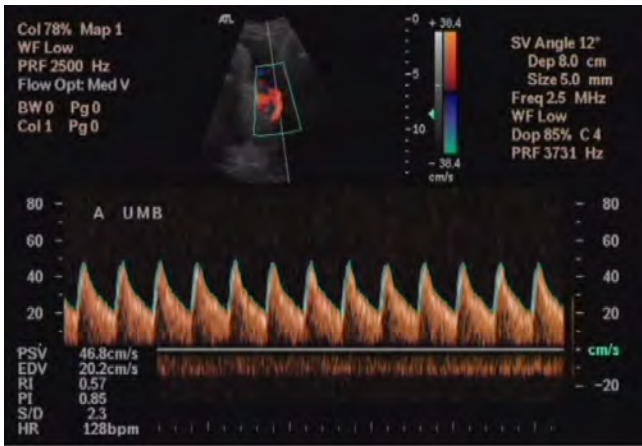


Figure 1. The display of a Doppler ultrasound machine during a blood flow examination of the umbilical artery. The velocity (y-axis, cm/s) changes over time (x-axis, s) and is at its maximum during the systolic phase, and at its lowest during the diastolic phase.

to avoid fetal asphyxiation. The five classes are:

- **BFC normal** Positive diastolic flow, $PI \leq \text{mean} + 2 \text{ SD}$. Cases with BFC normal are examined every second week.
- **BFC I** Positive diastolic flow, $\text{mean} + 2 \text{ SD} < PI \leq \text{mean} + 3 \text{ SD}$. A BFC I case is examined twice a week.
- **BFC II** Positive diastolic flow, $PI > \text{mean} + 3 \text{ SD}$. Examination three times a week.
- **BFC IIIA** No positive diastolic flow. BFC III almost always leads to immediate delivery of the fetus.
- **BFC IIIB** Reversed diastolic flow (back flow during diastolic phase). BFC III almost always leads to immediate delivery of the fetus.

While PI is a well established method for characterizing the placental circulation, there have been cases where the PI method failed to detect a severely impaired umbilical circulation. For this reason, an alternative method is currently being investigated by Ann Thuring at the Faculty of Medicine, Lund University. [1]

The alternative method takes advantage of the fact that the blood flow does not have a single uniform velocity but rather a spectrum of many different velocities, as is illustrated in figure 2. [3] Note that in the figure a general flow profile has been chosen as an example, and the exact profile for the blood flow may differ. Provided a good insonation angle is used, it is possible to measure the entire spectrum. A high flow resistance in the umbilical artery will correspond to a lower amount of high velocities, whereas lower resistance allows for a larger amount of high velocities. In the new method, the distribution of high and low velocities is being used to characterize the placental circulation.

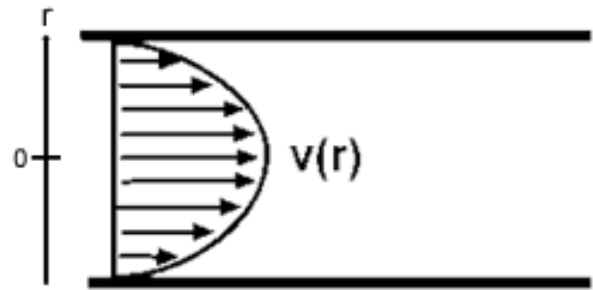


Figure 2. An illustration of a general velocity profile of a pressure driven flow through a circular cylinder. The velocity $v(r)$ changes with the radial distance r from the center of the cylinder. The exact form of the profile depends upon the fluid-dynamic properties of blood, the size and curvature of the blood vessel and the oscillations in blood pressure, and this figure is an approximation of the actual flow profile of blood. [3]

C. The audio spectrum analysis method

Because of the multiple velocities in blood flow, measurement with Doppler ultrasound does not only yield a single shifted frequency but a whole spectrum of frequencies. The difference between spectra can to some extent be discerned by the human ear, which is the discovery that has led to a desire to further investigate if the audio spectrum can be used as an alternative or complement to PI for clinical diagnostics of the fetus-placenta circulation. It is problematic however to use a subjective parameter such as interpretation of sound timbre to develop a diagnostic method, because different listeners will perceive the sound differently. It is also difficult to compare Doppler sound against a reference value by ear for clinical purposes.

An algorithm to quantify the characteristics of the Doppler sound was developed in 2016 by Fredrik Hammar and Johan Flinke, students at the department of Biomedical Engineering at LTH. The algorithm uses a Welch method Fast Fourier Transform to analyse the distribution of frequencies in the sound. By identifying the cutoff frequency where the amplitude has decayed by 15 dB from the maximum amplitude, a value is obtained which can be compared against the sound obtained from other examinations. [4] The algorithm is MATLAB based, and requires some manual preparations before it can be used. The audio must be extracted from video recordings from the ultrasound machine using a third party video editing software. Some editing must also be performed to select a sequence of useful Doppler sound, as high quality flow measurements can be hard to obtain because of the fetus moving around during the examination.

The ambition of this project is to create a MATLAB [6] based software tool and a graphical user interface that can handle data from a Doppler ultrasound examination. The software should let the user select a disturbance-free sequence, apply the frequency profile generating algorithm on the sequence and then visually display the result to the user. It will be distributed as an application which does not need a MATLAB

installation to run. The purpose of the software is to remove time-consuming manual operations and make the process more automated. This would allow large-scale management of Doppler ultrasound data, which enables research and clinical trials that could potentially lead to a clinical approval and acceptance of the frequency profile as a method to characterize the circulation between the fetus and the placenta.

This report will present the methods used to create a MATLAB based user interface, as well as the resulting software. In the Methods section, solutions to the different programming obstacles will be presented and explained. In Results, the finished user interface is presented and viewed from the perspective of the user. Finally, the software and suggestions for future improvements will be discussed, as well as ethical considerations. To assist the end user of the software, a user manual has been created which is presented in Appendix.

II. METHOD

The user interface was created in GUIDE [5], the graphical user interface development environment of MATLAB. Implementation of the callback functions was made in MATLAB R2016b.

Before the data can be used by the software there are a few steps that need to be done. The software cannot get examination data directly from the Doppler ultrasound machine. The solution is to record the audio from the Doppler shift on the ultrasound machine, store it on a DVD and then reconstruct the Doppler profile in the user interface.

A. FFmpeg conversion

The data from the ultrasound machine is initially stored on a DVD as .vob-files. The first task for the software is to convert the data into .wav-format, which is supported by MATLAB. The chosen method is using FFmpeg, a software that can convert media files into many different formats. [8] FFmpeg is accessed by MATLAB by using the computer systems command prompt (cmd). It works by creating a string in MATLAB with a command to cmd, which then runs the conversion in FFmpeg from .vob to .wav. A temporary .wav-file is created, which enables the software to access the audio data. The temporary file is deleted when it is no longer needed, once again by sending a string to the command prompt.

B. Audioread

The .wav-format makes it possible to use the MATLAB function Audioread. Audioread extracts the audio from the .wav-file and creates a vector with the sampled data. [7] The audio originally have two channels, with one channel containing data from blood flowing towards the transducer, and the other channel containing data from blood flowing away from the transducer. It is difficult to decide which channel corresponds to the arterial blood flow, as this depends on both the orientation of the transducer as well as the umbilical cord. The chosen solution is to use the audio channel with the most energy, as it most probably corresponds to the arterial blood flow. [4]

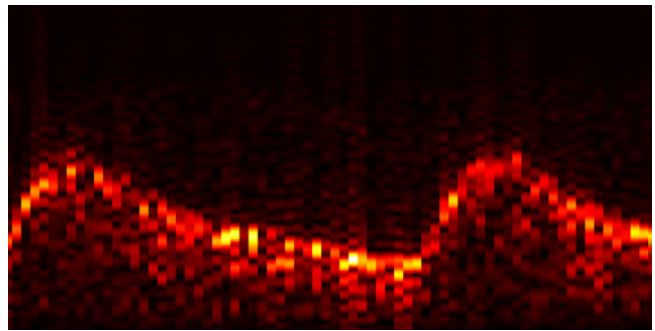


Figure 3. Blood flow waves where each step on the x-axis represents a 10 ms segment of an audio sequence, and the y-axis represents the frequency content for that segment as calculated with FFT. The brightness of a pixel is related to the intensity of a particular frequency. Because only the relative frequency (high/low) is needed to plot the waveforms, the scale has been omitted.

C. Fast Fourier Transform (FFT) of time segments

The ultrasound machine displays a live view of the blood flow velocity in the umbilical cord over time. A similar visualization of the Doppler profile in the user interface is needed, to allow the user to select a high quality sequence of the Doppler data for further analysis. The velocity is proportional to the Doppler frequency shift, as can be seen in equation 1, which means that a high velocity corresponds to a high frequency and vice versa.

To reconstruct the velocity waveforms displayed by the ultrasound machine, the software uses a Fast Fourier Transform on 10 ms time segments of the recorded audio data. This transforms the audio segments from time domain to frequency domain, creating a vector for each individual segment with the audio spectrum for that particular segment. Each transformed time segment is represented by a column of pixels in figure 3, where the color of a pixel corresponds to the intensity level of a particular frequency. A darker color equals a lower intensity and vice versa. By stacking the column vector for the first 10 ms, then the vector for the next 10 ms and so on next to each other, a graph of the Doppler profile is created with time on the x-axis (in 10 ms intervals), frequency on the y-axis and the intensity of that frequency on the “color-axis”. The displayed sequence in the user interface is equivalent to the representation on the Doppler ultrasound machine.

D. Sequence selection

To allow the user to select an audio sequence to analyse, a function is used which is triggered when the user clicks on the window with the reconstructed Doppler profile. The function registers the x-coordinate of the mouse relative to the Doppler profile graph, and also if the left or right mouse button was clicked. The x-coordinate refers to which 10 ms segment of the Doppler profile was selected, and the left/right click variable refers to if it is the starting point or the endpoint of the desired sequence. To provide feedback to the user, a green line is drawn in the window to mark a starting point, and a red line is drawn to mark an endpoint.

The selected sequence in the Doppler profile graph has a corresponding sequence in the Doppler audio vector. To relate

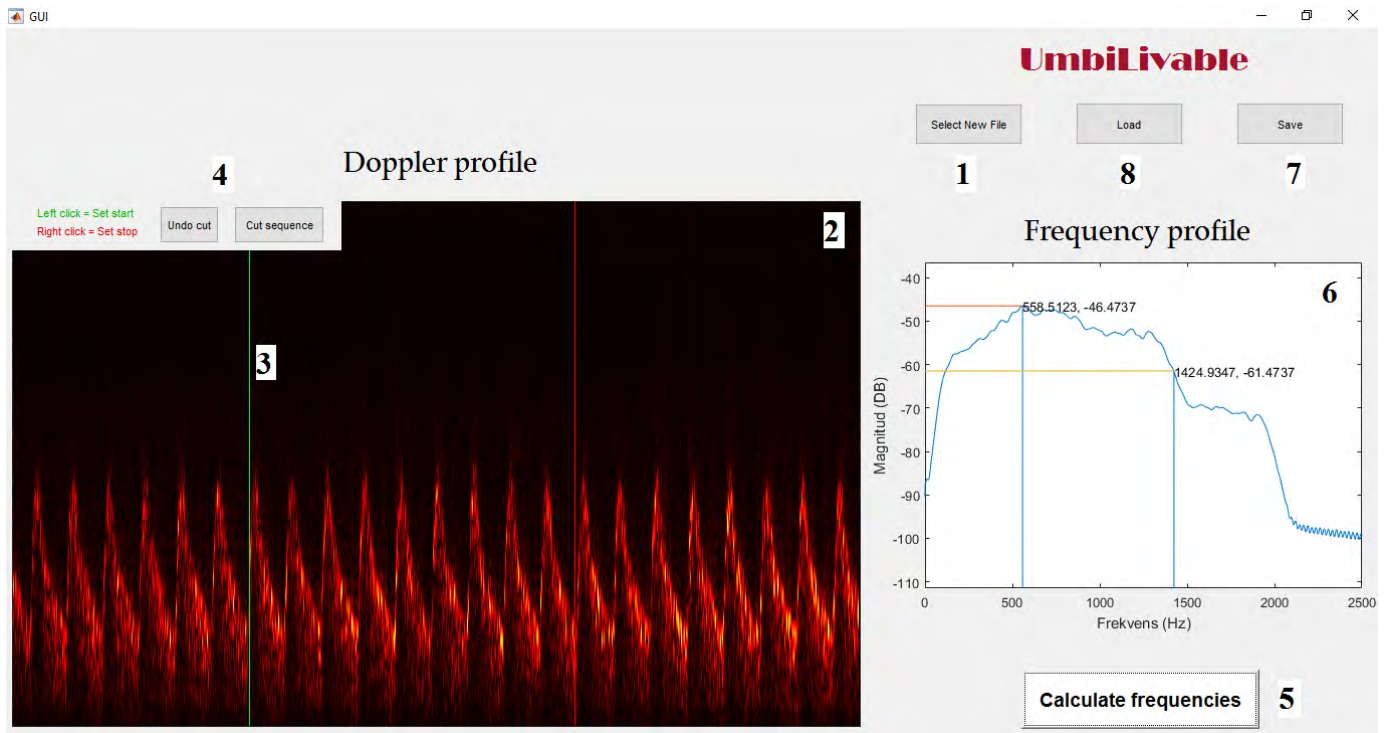


Figure 4. A screenshot of the user interface *Umbilivable* with numbers highlighting the different steps from selecting the file to displaying a frequency profile.

the starting-/endpoint in the graph to starting-/endpoint in the audio vector, the following conversion is made:

$$x_{audio} = x_{graph} \Delta t f_s \quad (3)$$

where x_{audio} is the element index in the audio vector, x_{graph} is the selected x-coordinate, Δt is the amount of time each column in the graph corresponds to (10 ms) and f_s is the sample rate of the audio vector. The multiplication $x_{graph} \Delta t$ is equal to a position in time, which is then multiplied with the sample rate to obtain the index of the desired element in the audio vector.

When the start/end indices of the Doppler audio vector have been calculated, the vector can be truncated to correspond to the interval selected by the user.

E. Algorithm usage and display of the frequency profile

The software's main task is to make it easy for the user to select a representative sequence of the Doppler audio, and analyse it with the algorithm which was presented by F. Hammar and J. Flinke. [4] A copy of the audio vector is created and truncated according to the sequence specified by the user. The edited vector is then analysed by the algorithm, which creates a frequency profile and displays it in the user interface.

F. Implementation of Save and Load functions

It is a desirable feature to be able to save the result of an analysis, together with the data and the exact settings which were used to generate the result. For example, in case a new

algorithm is developed, being able to load the exact settings makes it possible to compare the outcome of both algorithms with the same input. The solution is to save the defining variables, most importantly the audio vector, its sampling rate, the time interval used in generating the Doppler profile and the start/end markings placed by the user, in a .mat-file which can be read by the software at a later stage. For time efficiency, the Doppler profile graph is saved as well rather than being regenerated upon load. When load is used, the saved values for these variables replace the current ones, and the user interface is updated with the saved graph and markers.

III. RESULT

The result is a standalone MATLAB application which has been given the name *Umbilivable*. The software can be used on any modern computer and the user only needs to download the MATLAB Runtime Compiler to be able to run the code. [9] The compiler download starts the first time the user clicks on the *Umbilivable* icon. In figure 4 an overview of the user interface is shown, with numbers highlighting its functions. A detailed description of the functions follows here:

- 1) **Select new file button:** When the button *Select new file* is pressed the user is shown a window where any .vob-, .avi- or .wav-file can be selected from the computer. A file that does not meet the file type requirement will not be presented in this window. The software will automatically convert the file into a readable format which is used for calculations.

- 2) **Doppler profile:** The selected file is plotted in the left part of the user interface, and the user can see the waveformed Doppler profile. The x-axis represents time and the y-axis represents frequency, which is proportional to the blood flow velocity. A brighter color indicates a higher intensity level.
- 3) **Markers:** By left and/or right clicking with the mouse on the Doppler profile sequence, the user can select the wanted sequence to avoid disturbances or non relevant data. The green marker indicates where the sequence starts, and the red marker indicates where the sequence ends.
- 4) **Cut/Undo button:** By pressing the *Cut sequence* button the plotted sequence will be cut into a smaller section depending on where the markers are. After the cut the new sequence will fill up the Doppler profile window. Therefore *Cut sequence* can be used to zoom as many times as needed. The user can also undo the cut by pressing the *Undo cut* button. It is only possible to use *Undo cut* to return one step back in time.
- 5) **Calculate frequencies button:** The selected sequence that will be processed by the algorithm is the sequence between the markers. If no markers are placed on the Doppler profile, the algorithm will use the whole sequence that is shown in the user interface. If only the starting marker is used, the sequence runs from the marker to the end. If only the end marker is used, the sequence will run from the beginning to the end marker.
- 6) **Frequency profile:** The algorithm will generate a frequency profile that is presented in the right part of the user interface. The left mark on the curve corresponds to the frequency with the highest amplitude. The right mark on the curve corresponds to the cutoff frequency. The cutoff frequency is the first frequency on the curve with an amplitude that is 15 dB less than the frequency with the highest amplitude.
- 7) **Save button:** The progress can be saved on the computer as an .mat-file. The saved .mat-file will contain all the data from the Doppler profile and the frequency profile. This makes it possible to change the algorithm and still be able to use the saved .mat-files, for example to compare the results of different algorithms with the exact same sequence.
- 8) **Load button:** A saved .mat-file from an earlier session can be loaded into the user interface. Profiles and markers will be recreated exactly as they were when they were saved, and the user can continue to work on the saved content.

IV. DISCUSSION

The success of the software tool relies on two important parameters: How well it functions from a technical point

of view, and how well it functions together with the user. It is important that the program can generate accurate and reliable data, especially in an application where the outcome of the performed analysis might affect the outcome of future pregnancies and, potentially, save lives. At the same time the software must also be user friendly, easy and comfortable to use and perform its task efficiently without taking unnecessary time. The software will need to be tested for some time before we can say how well we have managed with the user experience. It is possible that new user needs are found which could lead to modifications and improvements. During the development of our software we have had meetings with our main user from the hospital continuously to get feedback about different functions. This information has helped us to avoid creating unnecessary features and to focus on what is really important for the user.

One of the purposes of the software is to save time for the users who are working with the frequency profile method. How fast the software is able to perform is in part dependent of the hardware upon which it is installed. However, we have identified that the algorithm which performs the frequency calculations is the main obstacle, as it largely affects the time it takes to perform an analysis. When a ten second sequence of audio is selected for analysis, the calculations might take up to half a minute. Shorter sequences take less time, but on the other hand this might also affect the reliability of the result. It is possible that using an alternative to the Welch method Fast Fourier Transform in the algorithm might improve run time, but once again this might come at the cost of reduced accuracy.

The primary usage for the software is to simplify the analysis of recorded and new cases of pregnancies with impaired placental circulation with regard to the frequency content of the Doppler sound. Hopefully, new information might be obtained from these cases to further the understanding of how they develop and what the causes are. By increasing the quantity of frequency analyses, it might be possible to establish a database with enough statistical material to improve the decision of when to deliver the fetus, to keep the risk of adverse outcomes as low as possible. Studies have indicated that by combining the well established method of measuring pulsatility index (PI) with the frequency analysis, the predictive performance is improved, meaning that the combination is both more sensitive and more specific in predicting adverse outcomes (see figure 5). It appears as though the frequency content of the Doppler sound contains additional information about the hemodynamics of the placental circulation, which is not entirely captured with PI alone. [10]

A. Development potential

While the developed software simplifies the process of analysing the frequencies of single cases, it is currently not linked to a database where data from many analyses can be stored. We believe that the next important step would be to develop such a database and create a link between it and our software. Apart from the results of the frequency analysis (the

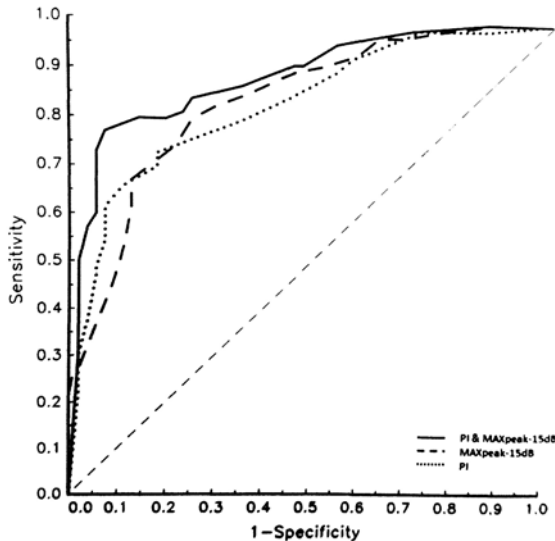


Figure 5. This graph shows the specificity vs the sensitivity in predicting adverse outcomes using the PI method, the frequency profile method and a combination of both methods. Specificity is the proportion of cases correctly predicted as not being at risk for adverse outcome. Sensitivity is the proportion of cases correctly predicted as being at risk for adverse outcomes. A combination of PI and frequency profile makes the prediction more sensitive. The graph is retrieved from [10]

-15 dB frequency), the database could also contain the PI measurement of the same Doppler data, as well as relevant information about the patient and perhaps data from earlier examinations of the patient, enabling the study of how PI and the frequency profile changes with gestational age.

The focus currently lies on using Doppler frequency spectra to analyse circulation between the fetus and the placenta, but the software we have developed is not limited to that particular area. It could for example be used to analyse the circulation in the brain of the fetus or the circulation between the mother and the placenta, in case the frequency content of these areas might contain clinically significant information.

Before the software can be used, the user needs to collect data from the ultrasound machine on a DVD, and transfer it to a computer where the data can be accessed by the software. This step can be automated if the software is integrated in the Doppler ultrasound machine, but convincing a company which manufactures these machines to integrate the software requires more studies and development.

B. Sustainability and ethical considerations

An important aspect of designing software for medical applications is the protection of personal information about the patient. Our software is in contact with material from patients, but currently it does not save information which can be connected to a specific person. Therefore, encryption and data security has not been prioritized in the development of this software. However, if the software should eventually be connected to a database containing more details about patients, the security of the system would have to be considered to ensure patient confidentiality.

The establishment of a database will require many examinations of both normal and high risk pregnancies. While the risk of causing damage to the fetus with diagnostic ultrasound is low, there is still an increased risk as opposed to not exposing them to ultrasound. The Swedish Radiation Safety Authority recommends that pregnant women should only be exposed to ultrasound when there is a medical purpose and the medical benefit is greater than the risk. [11] This needs to be considered if studies of the audio spectrum are to be conducted on normal pregnancies, as flow measurement could be an unnecessary exposure to ultrasound.

If the circulation between the fetus and the placenta is too impaired, the fetus needs to be delivered prematurely to avoid asphyxiation. But early delivery of a fetus increases the risk of adverse perinatal outcomes, which makes this an ethical dilemma for the medical staff. Therefore, it is important to continuously improve methods for examining the circulation, so that there is reliable data upon which they can support their decisions. It is beneficial both for the parents, the fetus and the medical staff. *UmbiLivable* is a step in that direction.

V. CONCLUSIONS

The ambition of this project was to create a software that can handle Doppler ultrasound data, let the user make cuts in the audio sequence to avoid low quality data and generate the Doppler audio spectrum by using the algorithm. The software *UmbiLivable* is capable of doing all of the above and creates an opportunity for the main user Ann Thuring, Biomedical analyst at Department of Obstetrics and Gynaecology (Lund, Sweden), to continue her research on the audio spectrum analysis without wasting time on doing unnecessary manual operations. We hope that the time gained by using *UmbiLivable* can be used to develop a database with normal and abnormal frequency profiles and in the long run facilitate the research on getting an improved clinically approved method to determine whether a fetus should be immediately delivered or not.

VI. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank our project supervisors Tomas Jansson and Jonas Brännström, who have been an invaluable resource for us in the realization of this project. Many thanks also to Ann Thuring, who have inspired us with her enthusiasm and great interest in the creation of this software. Thank you also Fredrik Hammar and Johan Flinke, who created the algorithm which our software uses for generating a frequency profile.

REFERENCES

- [1] A. Thuring, "Audio spectrum analysis of umbilical artery Doppler ultrasound signals", *Lund University, Faculty of Medicine Doctoral Dissertation Series 2015:10*, pp. 11–16, 2015.
- [2] E. P. Widmaier, H. Raff and K. T. Strang, *Vander's Human Physiology - The mechanisms of body function*. 13th ed. New York: McGraw-Hill, 2014.
- [3] G. A. Truskey, F. Yuan and D. F. Katz, *Transport Phenomena in Biological Systems*. New Jersey: Pearson Education, Inc. 2004.
- [4] F. Hammar and J. Flinke. "Utveckling och automatisering av flödesmätning med doppler-ultraljud inom fosterövervakning", *Proceedings of clinical innovations - Bachelor of Science Projects in Biomedical Engineering, Lund University*, vol. 3, pp. 82–90, 2016.

- [5] Mathworks MATLAB Documentation, “Create a Simple App Using GUIDE”, https://se.mathworks.com/help/matlab/creating_guis/about-the-simple-guide-gui-example.html [[Accessed 2017-05-16]].
- [6] MATLAB Release 2016b The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States.
- [7] Mathworks MATLAB Documentation, “Audioread”, <https://se.mathworks.com/help/matlab/ref/audioread.html> [[Accessed 2017-05-16]].
- [8] FFmpeg, “About FFmpeg”, <https://ffmpeg.org/about.html> [[Accessed 2017-05-16]].
- [9] Mathworks MATLAB Documentation, “MATLAB Runtime” <https://se.mathworks.com/products/compiler/mcr.html> [[Accessed 2017-05-16]].
- [10] A. Thuring, K. Källén, J. Brännström, T. Jansson and K. Marsal. “Doppler audio signal analysis as an additional tool in evaluation of umbilical artery circulation”, *Ultraschall in der Medizin (Stuttgart, Germany : 1980)*, 2015
- [11] Svenska Strålskyddsmyndigheten, “Ultraljud”, <http://www.stralsakerhetsmyndigheten.se/start/Vard/Ultraljud/> [[Accessed 2017-05-18]]

APPENDIX USER MANUAL

Welcome to *UmbiLivable* - the software tool that helps you create frequency profiles from your Doppler ultrasound examinations. The software can handle any of the following file formats: .vob, .avi or .wav. We are two engineering students at Lunds Tekniska Högskola, and we hope our software will help you with your research or work. If any problems should occur, please contact us by email:

Emil Nilén emil.n@hotmail.com

Olle Oswald olleoswald@hotmail.com

Installing *UmbiLivable*

MATLAB Runtime

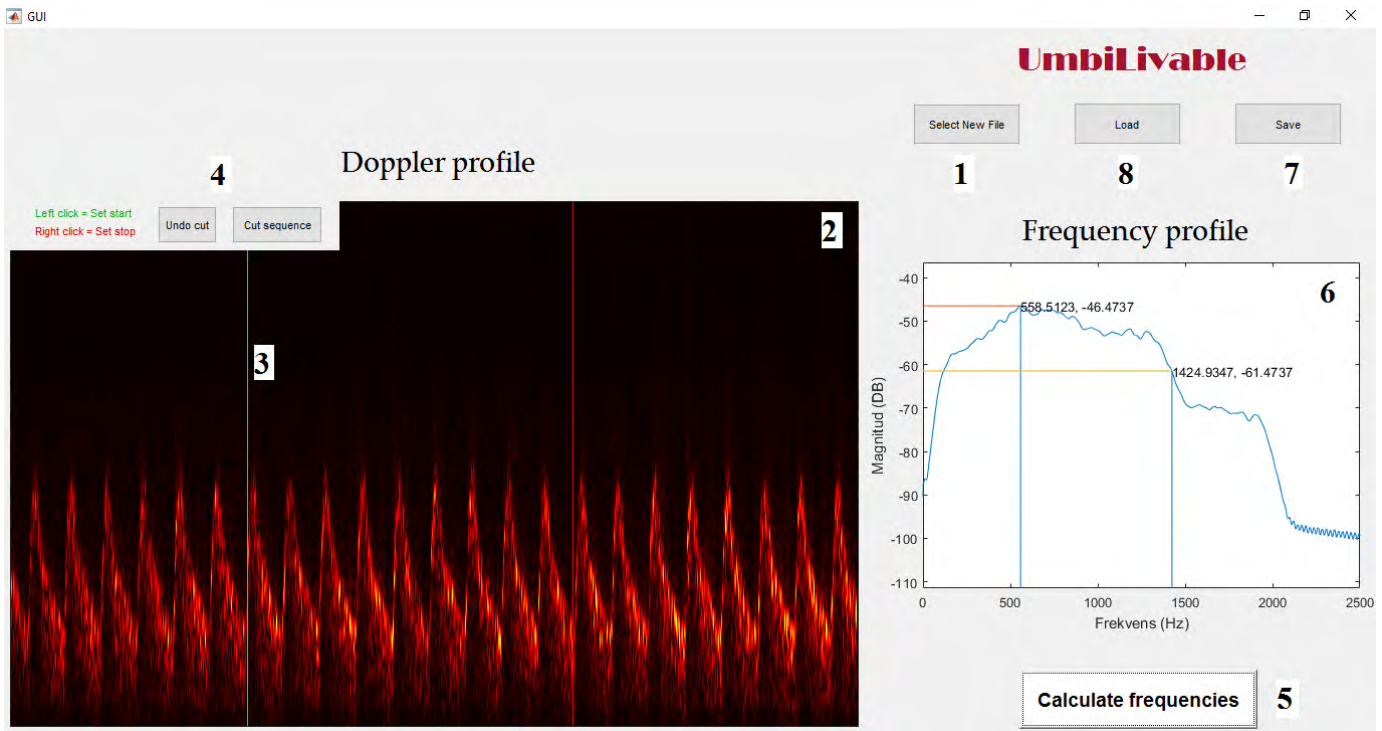
The MATLAB Runtime Compiler is free of charge and necessary to be able to compile the Matlab code in the program without buying the full MATLAB program.

- 1) Transfer the *Umbilivable.exe*-file to any suitable place on the computer.
- 2) Click on the *Umbilivable.exe*-file. Now a download of MATLAB Runtime Compiler will start.

Configuring FFmpeg

To be able to use .vob files with *UmbiLivable*, the program FFmpeg (included on the memory stick) must be added to the search path of your PC. For Windows 8 or 10, follow these steps to add FFmpeg to the search path:

- 1) Copy the entire folder *ffmpeg* to the root drive of your PC (C:\)
- 2) Open the *Windows Start Menu*, and search for *System* to open the *System* window.
- 3) In the *System* window, click on *Advanced System Settings* (on the left side). This will open the *System Properties* window.
- 4) In the *System Properties* window, choose the *Advanced* tab and click on *Environment Variables*.
- 5) In the *Environment Variables* window, highlight the field *Path* in *User Variables for [username]*. Click *Edit*. Be careful not to alter any existing text.
- 6) In the field *Variable value*, paste the following text AFTER any existing text: `;C:\ffmpeg\bin`
- 7) Click OK. Now FFmpeg will be accessible by *UmbiLivable*.



Using *UmbiLivable*

Select new file: Press *Select new file* (1) to choose any .vob-, .avi- or .wav-file from the computer.

Select a sequence: Left/right click with the mouse on the Doppler profile window (2) to select a sequence. Left click to select the starting point (green marker) and right click to select the endpoint (red marker). (3)

Cut/undo cut: Press the *Cut sequence*-button (4) to cut the sequence between the markers and zoom in on the selected sequence. Undo the cut by pressing the *Undo cut* button. It is only possible to use undo to return one step backwards.

Calculate frequencies: Press *Calculate frequencies* (5) to get the frequency profile of the sequence between the markers. If no markers are placed on the Doppler profile, the algorithm will use the whole sequence that is shown in the user interface. If only the start marker is used, the sequence runs from the marker to the end. If only the end marker is used, the sequence will run from the beginning to the end marker.

Frequency profile: The frequency profile will be shown in the Frequency profile window (6). The left mark shows the frequency with the highest amplitude. The right mark shows the the cutoff frequency, where the amplitude has decreased by 15 dB from the maximum.

Save: To save your progress, press the *Save button* (7). The saved .mat-file will contain all the data from the Doppler profile and your sequence selection.

Load: Load an earlier analysis by pressing the *Load button* (8). The Doppler profile and markers will be recreated exactly as they were when they were saved.

Nanowire based retinal implants: an evaluation of PMMA, OSTE+ and Topas as base polymers

Ayla Borglund* (BME-14), Elisabeth Klint* (BME-14)

Abstract—Retinitis Pigmentosa is a group of inherited retinal diseases where functions of the retina are lost, which eventually may cause complete blindness. Existing treatments for later stages of the disease are retinal implants, which today have low resolution and lose stability over time. A novel technique using light sensitive nanowires to replace the lost function of the retina, have been considered. As the nanowires are created on an array which is thick and may damage the retina, a more suitable implant base is needed for the nanowires to be transferred to. Desired qualities for this material were identified as biocompatibility, transparency, flexibility and stability. Therefore, the polymers PMMA, OSTE+ and Topas were chosen. The polymers were fabricated through spin-coating and evaluated regarding light transmittance, autofluorescence, cell culture of retinal cells and immunohistochemistry. Two of the polymers, PMMA and Topas, showed high light transmittance, low autofluorescence as well as a first indication of biocompatibility based on high cell adhesion and many visible processes for cells examined with two neural markers. OSTE+ had relatively high light transmittance but performed poorly in the other tests. PMMA and Topas are promising candidates that should be further tested in vitro and as a base for the nanowires.

I. INTRODUCTION

A. Background

1) *The eye:* The eyes are complex organs which provide vision, the sense that occupies the biggest part of the human brain [1]. Consequently it is easy to understand that every other swede is afraid of suffering from an eye disease [2]. In a healthy eye, the incoming light is processed by a thin layer of tears followed by the cornea. Furthermore, the light travels through a chamber filled with aqueous humor, the pupil, the lens and the vitreous body [3]. The cornea and lens focus the light on the retina. In this 0.1 mm thin layer of light sensitive cells, the complex process of transforming the light energy into electrical impulses takes place. Behind the retina, the light is absorbed by the retinal pigment epithelium (RPE) and choroid (Figure 1, [4]). The retina consists of photoreceptor cells (rods and cones, in the outer nuclear layer, ONL), bipolar, horizontal and amacrine cells (in the inner nuclear layer, INL) and ganglion cells (in the ganglion cell layer, GCL), see Figure 1 [5]. When incoming photons stimulate the photoreceptors, they are hyperpolarized and phototransduction is initiated. The hyperpolarization activates specific bipolar cells, which activate ganglion cells that carry the electrical signal along the optic nerve to the brain, where it is later interpreted as

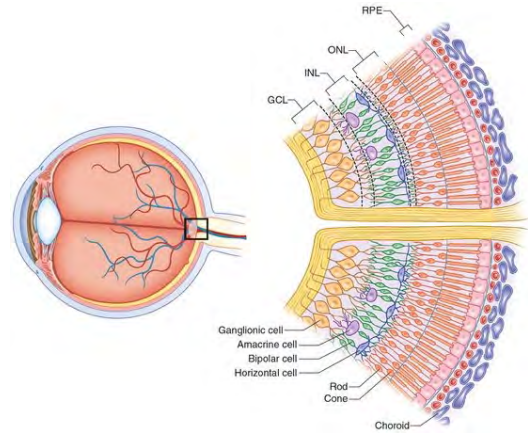


Figure 1: Cross section of the eye and retina (enlargement). Modified based on image from the website "The Retina Reference" [4].

vision [6]. In an eye with reduced or loss of vision due to an eye related disease or injury, as for 10 % of the Swedish population [2], parts of this function is lost. Of these, many are the result of degeneration of cells of the retina.

2) *Retinal diseases:* A category of irreversible eye diseases are those that affect the retina, for example Retinitis Pigmentosa, Age-related Macular Degeneration (AMD), glaucoma and cone-rod dystrophy. In this project, the focus has been Retinitis Pigmentosa due to its many existing models, early prevalence in humans as well as animals and lack of treatment for later stages of the disease. The first symptoms of Retinitis Pigmentosa is night vision loss, followed by a gradually decreasing visual field caused by death of rod cells. If the fovea, the cone-rich region of the retina, is unaffected, the quality of vision remains sharp. In most cases, the degeneration eventually reaches the fovea, leading to complete blindness [7]. Existing treatments that decrease the progression of the disease have been developed for early stages; neuroprotective therapies [8] and corrective gene therapy (in a few cases) [9]. A recommendation from The National Institute of Health in the USA is a daily dose of 15000 international units of vitamin A palmitate. However, results vary between individuals [10]. CRISPR technology for one gene mutation in Retinitis Pigmentosa is also being tested [11]. Options for later stages, when most photoreceptors are already lost, are cell transplantation, to replace the lost cells, or retinal implants to replace the function of the lost cells.

3) *Existing implants:* Several research groups are currently working on or have developed retinal implants [12], [13]. The

Handed in June 6, 2017

Email: aylaborglund@gmail.com, elisabethastridklint@gmail.com

Technical mentor: Martin Bengtsson, LTH

Clinical mentor: Maria Thereza Perez, BMC

*The two authors contributed equally to the work.

two major categories are: subretinal and epiretinal implants. The major difference between the two is the placement relative to the retina (Figure 2), which in turn affects the properties regarding the implant base. A subretinal base would not need a high light transmittance, it may even be preferable with a low transmittance, while an epiretinal base would require a high transparency.

Subretinal implants are placed between the RPE and the ONL. Their functionality relies on bipolar cells and ganglion cells being mostly unaffected despite that the photoreceptors are lost. Their advantages are their relative simplicity and that they do not necessarily need an external camera to gather information. Their disadvantage is that they often need an external power source to amplify the incoming light in order to provide sufficient visual information [14].

Epiretinal implants are placed in front of the retina, bypassing the bipolar cells. An advantage is that this implant works even if the only functioning cells of the retina are ganglion cells. Their disadvantages are that epiretinal implants today need an external camera to gather visual information. Consequently, the users need to move their whole head in order to change visual perspective, instead of just their eyes [15].

One existing epiretinal implant for primary Retinitis Pigmentosa patients is ARGUS II, developed by Second Sight (USA). With the implant, which consists of light sensitive electrodes, an external computer and a camera attached to a pair of glasses, some vision can be restored through transmitting signals from the camera, via the electrodes, to the brain. ARGUS II allows patients to read large letters and navigate without a cane or guiding dog, which otherwise are recommended, and often necessary aids for Retinitis Pigmentosa patients [16]. Other upcoming retinal implants are Retinal Implant AG (Germany), Alpha-IMS (Germany) and IRIS Retinal Implant System (France). AG and Alpha-IMS are subretinal microchip implants that are powered by a small power source behind the ear. The AG can also be controlled by a small, handheld device [17]. IRIS is similar to ARGUS in its approach and requires a pair of glasses in order to produce images [12]. All retinal implants today have in common that they have low resolution and lose functionality over time.

4) *Biocompatibility*: Biocompatibility is a broad and complex term, often addressing what a material should not do; for example “not harmful or toxic to living tissue” [18], or not cause a local nor systemic response when implanted. In this project, the biocompatibility of a material is defined as the sum of properties that allow cells of interest to adhere and create clusters when cultured on the material surface. Meaning the in vitro aspects to prevent above mentioned unwanted reactions when implanted in the human body.

B. Thesis

The overall idea of this project is to develop an array consisting of vertical nanowires that are light sensitive and can therefore be used as electrodes to stimulate directly the bipolar cells (subretinally) or the ganglion cells (epiretinally) (Figure 2). The nanowire array is, however, relatively thick and will

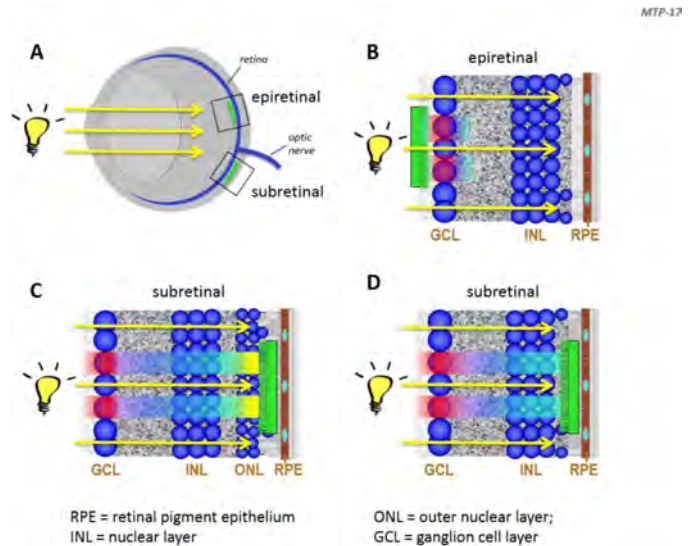


Figure 2: Illustration of epi- (B) and subretinal (C and D) implants. Subretinal implants with remaining photoreceptors of outer nuclear layer (C) and without (D). Image provided by Maria Thereza Perez.

cause unnecessary damage of surrounding tissue. This specific project aims to evaluate the suitability of PMMA, OSTEO+ and Topas as a polymer base to which the nanowires can be transferred. [19]

All the important criteria for the polymer are not yet established, but clearly interesting parameters are: (i) biocompatibility, to allow the cells to adhere and grow processes to connect to each other on the surface; (ii) transparency, to allow both epi- and subretinal placement; (iii) flexibility, in order to provide a good platform for the nanowires and also not to damage the eye; (iv) stability, to ensure the functionality (attachment between cells and the implant surface) is maintained over time. These four properties will be addressed in this report.

C. Agenda

To explore the suitability of a polymer platform for the nanowires, several methods have been used: spin-coating, light transmittance test, autofluorescence test, cell culture and immunohistochemistry. These methods are introduced under Data, explained in detail under Materials and Methods, their findings presented under Results and evaluated under Discussion. Ethical and environmental aspects concerning this project are also discussed. Lastly, future steps are presented.

II. ETHICAL AND SUSTAINABILITY ASPECTS

A. Ethics

When animal sacrifices are involved in a project, it is extremely important to consider ethical aspects. In the world of experimental biology, whether an experiment is worth implementing or not is based on the consideration of the three R's; Replacement, Reduction and Refinement [20]. In order to test the polymers biocompatibility, it was not possible to use an immortalised cell line since these only consist of one kind

of cells and does not behave like normal cells. A complete set of retinal cells were necessary for this project. The retinal cells needed could therefore not be obtained in any other way than through animal sacrifice, and the number of animals could not be reduced to less than two mice. They were sacrificed according to approved methods after ethical approval by the local committee for animal experimentation and ethics.

B. Sustainability

Several of the experiments in this project were made in clean rooms and other laboratory context, meaning demands of sterile equipment and no contamination between samples. This has resulted in a lot of disposable plastic pipettes, containers and gloves. At BMC there is a system to sterilize through autoclaving several products to decrease the overall use of disposables, but the system could be developed further to ensure minimal plastic waste.

III. DATA

Data for this report has been collected through a literature study and experiments. In the literature study several abstracts were read to identify the relevant articles, which were read in more detail. Articles were found through Google Scholar and LUBsearch. Common search-terms were “Topas coc cell culture”, “PMMA implant”. The principles of each experiment are shortly described below.

A. Polymer fabrication

Spin coating is used to create an even material coating with a specific thickness. By placing the material on a rotating plate, the polymer is forced to spread evenly on the surface. The resulting thickness is given by the spinning rate and the viscosity of the fluid.

B. Light properties

Measuring the light transmittance counts the number of photons that pass through an object for a specific wavelength. The setup consists of a light source, a collimator, a holder for the examined object, a fiber spectrometer and an analyzing computer program.

When exposed to light, some materials autofluoresce, meaning the materials themselves emit light back at the observer. This phenomenon can differ in intensity depending on the wavelength. However, this is not thought to be a limitation of the material, but limits the use of other methods, in this project the use of immunohistochemistry (see III-C). Exposure times for this evaluation are longer than normally used in other methods.

C. Biocompatibility

Biocompatibility can be examined through the well established methods cell culture and immunohistochemistry. The interaction between the cells and the given surface is evaluated regarding cell adhesion, number of clusters and expression of specific proteins. This is enabled by extraction, culture and fixation of cells on the surface. An antibody with fluorescent dye is attached to the protein of interest through a direct or indirect method.

IV. MATERIALS AND METHODS

The polymers tested in this project were OSTE+, PMMA and Topas. As a reference, in some of the experiments the polymer Polyimide (Durimide 7505, FujiFilm, Belgium), which is a photosensitive polymer that has shown promising results in previous tests [21], was used.

PMMA, polymethyl methacrylate (Evonik industries, Darmstadt, Germany), is an acrylic, transparent polymer that today is used for, among others, intraocular lenses. PMMA is a good candidate since it has already been used in eye applications for a long time [22], showing stability *in vivo*.

The second material, OSTE+ (Off-Stoichiometry Thiol-Enes + Epoxy) is a polymer that changes Young’s modulus, depending on temperature. For 10 °C, the Young’s modulus is 1.9 GPa and 50 MPa for 37 °C [23]. OSTE+ is a perishable material, meaning it has to be produced right before its intended usage. OSTE+ has shown promising results as a CNS implant in mice [24]. In this project OSTE+50%, which is flexible at 37 °C, was used.

The third material, Topas (TOPAS Advanced Polymers GmbH, Frankfurt Germany), is a type of cyclic olefin copolymer (COC). It was chosen due to its optical clarity, inert properties and successful implants in bones and the spine [25], [26].

A. Polymer fabrication

PMMA, Polyimide and Topas were prepared according to parameters shown in Table I. OSTE+ was prepared according to Table II, and half of the glass coverslips used for OSTE+ were treated with oxygen plasma for 3 minutes, giving the glasses a hydrophilic surface. Then a spin shuck and, on top of that, a glass coverslip (16 mm in diameter) was placed at the centre of a spin-coater (fabricated in-house), the coverslip held in place by a vacuum pump. Correct settings were calculated and chosen depending on respective material properties, see Table I. An excess of the dissolved polymer was placed on the glass coverslip with a pipette. The spin-program was started. A lid was positioned on top to prevent scattering.

Table I: Spin coating and treatment for each material.

Material	PMMA	Polyimide	OSTE+	Topas
Solvent / concentration of polymer	Dichloromethane / 10 %	Cyclopentanol (supplier)	-	Toluene / 5 %
Spin velocity (rotations / minute)	1000	500	1000	1000
Spin time (minutes)	1	1	1	1
Hardening, UV (exposure time)	-	1 minute	5 minutes	-
Hardening, heat (temp/time)	80 °C / 3-5 minutes	90 °C / 3-5 minutes	80 °C / 120 minutes	80 °C / 1-5 minutes

When the spinning ceased, the polymer coated glass coverslip was collected. This was repeated 3-6 times for each evaluated polymer.

Table II: Recipe for OSTE+ mixture.

Chemical name	Name	Amount (g)	Fabricator
Lucirin TPO-L	TPO-L (2 %)	0.100	BASF, Germany
tris[2-(3-mercaptopropionyl)ethyl] isocyanurate (90 %)	TriThiol	2.800	Sigma-Aldrich, Germany
trimethylolpropane diallyl ether (90 %)	DiAllyl	0.579	Sigma-Aldrich
2,4,6-triallyloxy-1,3,5-triazine (97 %)	Tri-Allyl	0.500	Sigma-Aldrich
1,5-diazabicyclo[4.3.0]non-5-ene (98 %)	DBM (0.2 %)	0.100	DBN, Sigma-Aldrich
D.E.N 341 Epoxy Novolac	Epoxy	0.993	Dow Chemicals, USA

After spin-coating, Polyimide and OSTE+ were first cured by UV light (KARL SUSS Ma4), and then the materials were heat-cured on a hot-plate (CEE 100CB hot-plate). PMMA and Topas were only hardened on the hot-plate. The specific times for curing and hardening of each material can be found in Table I. Lastly, OSTE+ was rinsed with Acetone.

A spin coated glass coverslip was taken for each polymer and a few millimetres by the edge was scraped off to expose the glass coverslip, before being placed in a profilometer (Ambios Technology XP-1). The coverslip was placed in the middle and the program was started. The acquired thickness was registered.

B. Light properties

The light transmittance of the three polymers (PMMA, OSTE+ and Topas) was measured by placing the polymers in a holder that positioned them in a straight line between a white aluminum light source (AvaLight-HAL, Avantes, Netherlands), a 5 cm collimator and a fiber spectrometer (AvaSpec, Avantes, Netherlands) connected to a computer using the program AvaSoft. The light source was heated to 2850 K. The computer was set to measure the light through the polymer for 180 ms and average the measurements 20 times. For each polymer, 3 samples were measured and, as a reference, the transmission through an uncoated glass coverslip was measured. The light transmittance for each polymer was computed in MatLab where two measurements for each polymer were averaged and normalized relative to the light transmittance of the glass coverslip. A graph containing the relative light transmittance for all three polymers, for wavelengths 200-1100 nm was created.

Glass coverslips with each of the polymers were placed under an epifluorescence microscope. The autofluorescence was studied in ISO 800 for three different filter sets (DAPI, FITC and Texas Red) with exposure times as seen in Table III. For each polymer a photo was taken regarding each exposure time and filter set.

Table III: Exposure times for each evaluated material.

Material/ Exposure time	PMMA	Polyimide	OSTE+	Topas
DAPI	20.6 ms	15.0 ms	20.6 ms	20.6 ms
FITC	100.0 ms	1.0 ms	100.0 ms	100.0 ms
Texas Red	189.7 ms	13.1 ms	189.7 ms	189.7 ms

C. Biocompatibility

A well established protocol was followed during the preparation before the cell culture [27]. First a solution was prepared with papain (18 Units/ mL, Worthington Biochemical Corp, USA; code LS003118) and L-cystein (Sigma-Aldrich Sweden AB, Sweden; code C7477). The complete cell culture medium was prepared by mixing with DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen Life Technologies, USA), B27 (Invitrogen Life Technologies, Sweden; code 17504-044) and 2 % L-glutamine-penicillin-streptomycin solution (Sigma-Aldrich Sweden AB, Sweden; code G6784) and placed in an incubator. The polymers were prepared by 70 % ethanol sterilization for 10 minutes and air-dried. Then two 4-day-old mice were sacrificed by cervical decapitation. The four retinas were dissected from respective lens and vitreous body in one piece. The retinas were placed in the complete cell culture medium and rinsed several times to wash away all but the retinas. Then the retinas were dissociated to single cells by adding the enzyme cocktail and placing the retinas in an incubator at 37 °C. The enzymes were given a specific time to process before they were rinsed from the solution. The cells were mixed with 50 ml of complete cell culture medium followed by mechanic dissociation consisting of pushing and pulling the cells up and down a glass pipette. Next, the cell solutions were put in a centrifuge (5702, Eppendorf), for 5 minutes with a rotation speed of 0.9 rcf. The cells were pushed together to the bottom of the tube and the excess liquid was discarded. The cells were again exposed to mechanic dissociation and then rinsed through a fine filter before more complete medium was added. The cell density was measured in a BioRAD, TC20 Automated Cell Counter to 1.785×10^6 cells/ml with a live cell rate of 77.5 %. The cells were placed onto polymer coated glass coverslips that had been placed in chamber slides, 2 ml on each substrate. Lastly they were placed in the incubator at 37 °C for 3 days in vitro (DIV).

The cells were then fixed using 4 % paraformaldehyde (PFA) for 30 min and subsequently rinsed 3 times with phosphate buffer saline (PBS). The cells were then incubated overnight with PBS containing a primary antibody against β -tubulin-III, a neuronal marker [Mouse monoclonal anti-tubulin isotype III, clone SDL.3d10 (Sigma, USA; code: T 8660), 1:1500] together with an antibody against glial fibrillary acidic protein, a glial cell marker [GFAP; Rabbit polyclonal anti-GFAP (DAKO, Denmark; code: Z0334), 1:1500]. The next day, the secondary antibodies: Goat Anti-Mouse IgG HL [DyLight 594: Excitation: 593nm, Emission: 618nm, (Abcam, USA; code: ab96873), 1:600] and Donkey Anti-Rabbit IgG HL preadsorbed [DyLight 488: Excitation: 493nm, Emission: 518nm, (Abcam, USA; code: ab96919), 1:600] were diluted with complete PBS. The cells were viewed under the epiflu-

orescence microscope with three filter sets (DAPI, FITC and Texas Red). The glasses around the substrates were used as a reference in order to see if there was a difference between how the cells appeared on the glass versus on the associated polymer. Pictures were saved for each polymer, glass and filter.

V. RESULTS

A. Polymer production

The spin-coated polymers varied in surface structure. PMMA and Topas were fairly smooth while OSTE+ was irregular. On all three polymers there was a visible edge effect, which was noticeable in the thickness measurement. PMMA varied in thickness from 4 to 12 μm . OSTE+ gave an approximate edge-measure of 200 μm . Topas varied from 12 to 18 μm from center to edge. See Table IV.

Table IV: Measured thickness for spin coated PMMA, OSTE+ and Topas.

Material	PMMA	OSTE+	Topas
Thickness (min, μm)	4	-	12
Thickness (max, μm)	12	≈ 200	18

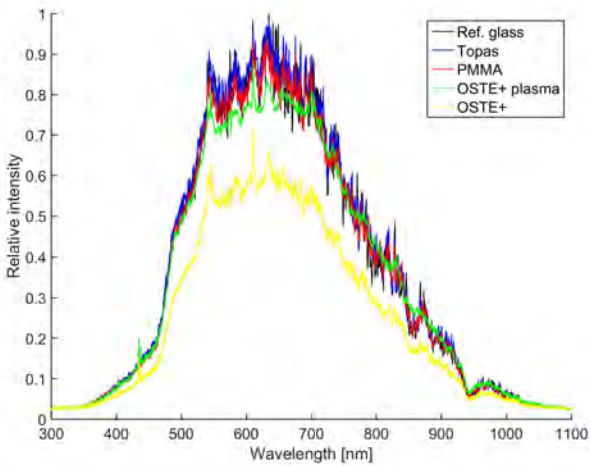


Figure 3: Light transmittance for reference glass, Topas, PMMA, OSTE+ and OSTE+ plasma, with glass coverslip as normalization reference.

B. Light properties

From the light transmittance test, Figure 3 was obtained. Topas had the highest transmittance curve overall, followed by PMMA, OSTE+ plasma and lastly OSTE+. PMMA and Topas were both very similar to the curve of the reference glass.

In the DAPI filter set, neither PMMA nor Topas did autofluoresce except in a few spots. Polyimide was very bright, even with 15 ms of exposure time, see Table III. OSTE+ showed some autofluorescence and also photobleaching. See Figure 4. With FITC filter set, the same result was given; PMMA and

Topas autofluoresced only in a few spots, Polyimide was bright with 1 ms exposure and OSTE+ did autofluoresce with 100 ms exposure time, see Figure 5. The Texas Red® filter set showed a visible autofluorescence for PMMA, OSTE+ and Polyimide, in an increasing scale. No autofluorescence for Topas, again, except for certain marks. See Figure 6. Photobleaching of OSTE+ was most prominent in the Texas Red® filter set.

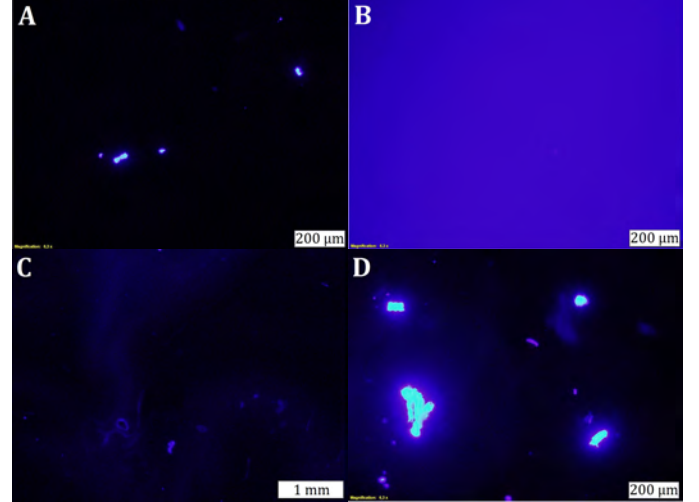


Figure 4: DAPI filter. (A) PMMA, (B) Polyimide, (C) OSTE+ and (D) Topas.

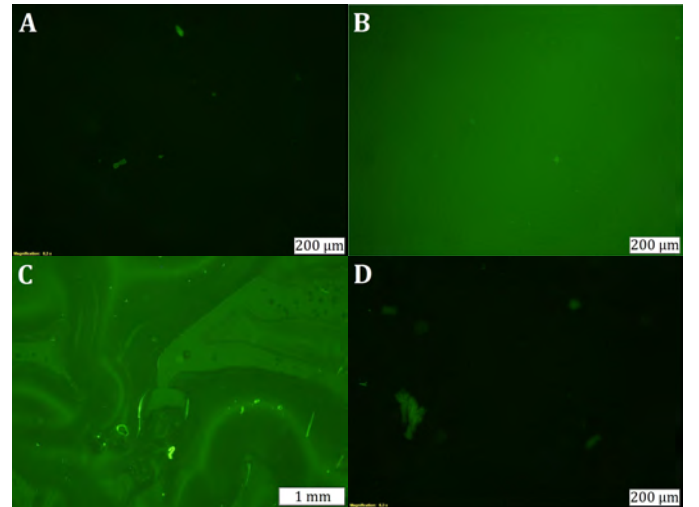


Figure 5: FITC filter. (A) PMMA, (B) Polyimide, (C) OSTE+ and (D) Topas.

C. Biocompatibility

All three polymers and reference glasses provided high cell adhesion, seen with the DAPI filter set. On both PMMA and Topas many clusters of cells were visible as well as on all reference glasses. OSTE+ had no significant amount of clusters. See DAPI staining in Figure 7.

With the FITC filter set, GFAP-positive glial cell bodies and processes were prominent for PMMA and Topas. For OSTE+ occasional cell bodies and no processes were seen. On all the reference glasses GFAP labeled cell bodies were seen. For the

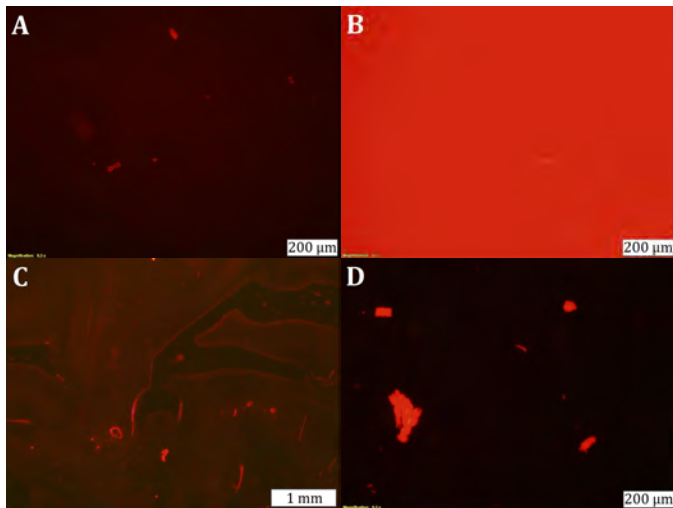


Figure 6: Texas Red® filter. (A) PMMA, (B) Polyimide, (C) OSTE+ and (D) Topas.

PMMA and OSTE+ reference glasses short processes were visible, as opposed to Topas', where several long processes were visible. See FITC staining in Figure 7.

PMMA and Topas showed many β -tubulin positive cell bodies and processes in the Texas Red® filter set, to a higher extent with Topas. The same was acquired for their respective reference glasses. OSTE+ had occasional β -tubulin positive cell bodies but no visible processes. On the reference glass for OSTE+ both numerous cell bodies and processes were identified. See Texas Red® staining in Figure 7.

The signal-to-noise ratio was low for PMMA and its reference, very low for OSTE+ and high for Topas as well as the reference glasses for OSTE+ and Topas. See Table V.

VI. DISCUSSION

The aim of this project was to evaluate the suitability of PMMA, OSTE+ and Topas as polymer bases, to which nanowires can be transferred, with either epi- or subretinal placement. Clearly interesting parameters were biocompatibility, transparency, flexibility and stability, which all have been addressed in this report. Flexibility and stability were considered in the choice of polymers, see IV.

A. Polymer fabrication

When spin-coating polymers, it is important that the polymer is completely dissolved in its solvent, or, regarding OSTE+, that it is mixed correctly. PMMA was easy to dissolve and no traces of solid PMMA could be distinguished before spinning. Topas was more difficult and time consuming to dissolve, which led to visible traces of Topas in the final solution. This presumably led to remaining solid pieces in the polymer films after coating and hardening. This may have affected its thickness, light transmittance, autofluorescence (discussed in VI-B) and biocompatibility. Consequently, for further evaluation of Topas, another solvent could be considered. Unfortunately, in this project, the time frame prevented this from being further investigated.

OSTE+ was the only one of the three chosen polymers that was cured by UV light after spin-coating. During the UV

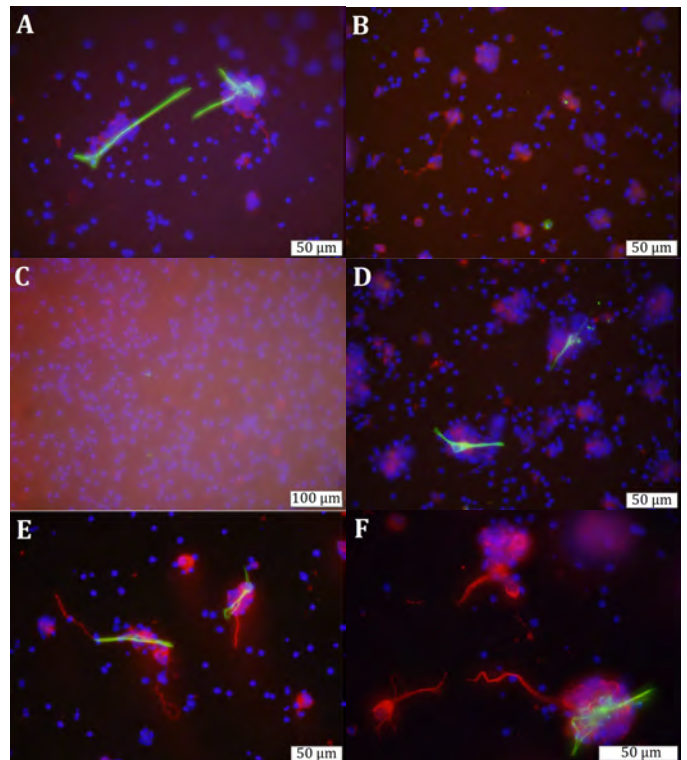


Figure 7: (A) PMMA, (B) reference PMMA, (C) OSTE+, (D) reference OSTE+, (E) Topas, (F) reference Topas. DAPI, FITC and Texas Red® filter sets are merged. Cell bodies (blue), glial cell-specific protein, GFAP, (green) and β -tubulin (red).

exposure, the polymer had to be shielded off from oxygen [28]. An attempt to protect OSTE+ through using a thin film of polyeten was made. This method was sufficient enough to exclude the oxygen, but it resulted in creased films, which may have affected the surface biocompatibility, see VI-C. A method that would exclude the oxygen without affecting the polymer surface would be preferable. For example, if there is room in the UV and hardening apparatus, the polyeten film could be strapped up in a frame to ensure a flat surface.

When measuring the polymer thickness, both PMMA and Topas were simple to measure and the results showed only a few μm difference between the middle and edge, see Table IV. OSTE+ was difficult to measure due to an uneven and adhesive surface, causing the probe in the profilometer to stick to the surface and dragging the coverslip with it. An approximate thickness was achieved through use of a caliper, which was not ideal, but provided a rough sense of the polymer thickness (200 m). It should be noted that this only measured the highest point of the polymer, which was at the edge.

B. Light properties

Both PMMA and Topas had a light transmittance very similar to the glass coverslip, which shows a high transparency to incoming light. This conforms with earlier findings of Topas' optical clarity [29] and PMMA's usage in intraocular lenses [22]. OSTE+'s optical transparency [30] showed high transmittance for OSTE+ plasma. Therefore, these polymers are good candidates for an epiretinal implant, see reasons in

Table V: Evaluated biocompatibility parameters for PMMA, OSTE+, Topas and respective reference glass. Cell adhesion and clusters, GFAP-positive cell bodies and processes, β -tubulin-positive cell bodies and processes, and signal to noise ratio, all graded from very high (++) to very low (-).

Material / Parameter	PMMA	Ref. PMMA	OSTE+	Ref. OSTE+	Topas	Ref. Topas
Cell adhesion	+	+	+	+	+	+
Cell clusters	+	+	-	+	+	+
GFAP (cell bodies)	+	+	-	+	+	+
GFAP (processes)	+	+	-	+	+	+
β -tubulin (cell bodies)	++	++	+	+	++	++
β -tubulin (processes)	++	+	-	+	++	+
Signal-to-noise ratio	-	-	- -	+	+	+

I-A3. OSTE+ (without plasma treatment) had relatively low transmittance, contradicting before mentioned findings. This is probably caused by the uneven surface structure and OSTE+ is arguably better suited for a subretinal implant. It should be noted that the layers of PMMA and Topas were several times thinner than OSTE+ plasma and OSTE+, which has been shown to be a substantial factor for transmittance in other polymers [31]. The spinning velocity could be increased to create thinner OSTE+ layers, however, due to contraction of the polymer on the glass coverslip, this will not entirely solve the problem. Furthermore, the plasma treatment prevented some of the contraction.

The findings of this report conforms with earlier findings of the high autofluorescence of Polyimide [21], even for short exposure times, making it difficult to distinguish cells from the background. PMMA was not considered autofluorescent [25]. However, a few brighter spots could be seen, most likely dirt on the polymer or between the polymer and the glass coverslip. OSTE+ did autofluoresce, especially in the FITC filter set. With the Texas Red filter set the background was bright at first, but decreased over time due to photobleaching, most likely of its component Lucirin® TPO-L [32]. This was most prominent with the Texas Red® set but was also observed with the DAPI and FITC filter sets. This is not a problem if not fluorescent antibodies bind to the surface, or if a solvent prevents the bleaching. Topas had low background autofluorescence, complying with previous reports [25]. The exception being a few bright spots, see Figure 4, which most likely were remaining solid pieces of Topas or effects of dry cracks and tensions in the material.

C. Biocompatibility

The cells on PMMA and Topas adhered, made clusters, created processes and expressed GFAP and β -tubulin-III proteins after 3 DIV, see Table III. Both polymers have therefore shown the first indication of being biocompatible. This is consistent with previous findings in other application areas [22], [26].

For OSTE+, on the other hand, no clusters were observed, no processes developed and the expression of the tested proteins was not significant. This indicated that OSTE+ is not biocompatible. This contradicts previous findings [24]. The reason for difference could be a varying biocompatibility for OSTE+50 (used in this report) and OSTE+ (hard and soft) (used in mentioned study). The difference could also depend on the different cell types studied, as OSTE+ (hard and soft)

has shown promising results in vivo as a CNS implant, but has not been tested for retinal cells. It could also depend on the surface structure, due to creases and air bubbles, which may have created an undesirable environment for the cells.

Despite the good results for PMMA in the autofluorescence study, a relatively low signal-to-noise ratio was observed (Figure 7). The cause might be pieces of PMMA dissolving during the cell culture (mainly the sterilization), which is likely since the reference glass around PMMA also indicated a lower signal-to-noise ratio. The potential leakage is probably not directly harmful to the cells, since they thrived on the PMMA surface, but could be harmful over time. Therefore longer DIV-studies are encouraged.

OSTE+ had a very low signal-to-noise ratio, see Figure 7, probably due to its autofluorescence, photobleaching and feasably because of secondary antibodies binding to the polymer. The reference glass, however, had high signal-to-noise ratio, indicating that the surrounding environment was unaffected.

The signal-to-noise ratio for Topas remained high, see Figure 7, allowing the tagged proteins to be distinguished. This is consistent with previous tests regarding Topas' excellent optical properties [29]. The expression on the reference glass for Topas was similar to that on the polymer, confirming that no leakage had occurred.

VII. CONCLUSIONS

The findings of this report show good optical properties for PMMA and Topas, together with a first indication of biocompatibility for retinal cells after 3 DIV. However, OSTE+ showed some good optical properties, such as relatively high light transmittance, but did not indicate biocompatibility for retinal cells. To further address the suitability of the polymers as a base for nanowires, longer DIV-studies must be made. This first study shows positive results for PMMA and Topas, which should be considered for nanowire testing.

VIII. ACKNOWLEDGEMENTS

This project could not have been done without rewarding discussions with Maria Thereza Perez, Martin Bengtsson and Neven Ibrakovic. We would like to extend our gratitude to Maithe for her outstanding knowledge and many hours of sharing it, Martin for his technical support and insightful articles, Neven for his helpfulness and patience.

REFERENCES

- [1] National Geographic, 2017. "Facts About Perception: Fun Facts About Perception And How We "See" The World." *National Geographic*, 2011-09-16. <http://channel.nationalgeographic.com/brain-games/articles/brain-games-watch-this-perception-facts/> (Obtained 2017-02-08)
- [2] Novus. 2013. "Rapport - Ögonsjukdomar, December 2013". Ögonfonden, Synfrämjande forskning.
- [3] D.Purves et al. 2001. "Anatomy of the Eye". *Neuroscience, 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.*
- [4] "The Retina Reference" <http://www.retinareference.com/> (Obtained 2017-05-15).
- [5] LifeMap Sciences Inc. "The Cellular Structure of the Retina". <https://discovery.lifemapsc.com/library/images/the-cellular-structure-of-the-retina> (Obtained 2017-05-15)
- [6] V.Y. Arshavsky et al. 2000. "The Gain of Rod Phototransduction." *Neuron* 27 (3): 525–537. doi:10.1016/S0896-6273(00)00063-5.
- [7] A. Openshaw et al. 2008. "Understanding Retinitis Pigmentosa". *University of Michigan Kellogg Eye Center* (2)
- [8] V. Sánchez-Vallejo et al. 2015. "Neuroprotective actions of progesterone in an in vivo model of retinitis pigmentosa". *Pharmacological Research* 99 (September): 276-288
- [9] H. Petrs-Silva, R. Linden. 2013. "Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa". *Clinical Ophthalmology* 8: 127-136
- [10] National Eye Institute. 2014. "Facts About Retinitis Pigmentosa". National Institutes of Health. https://nei.nih.gov/health/pigmentosa/pigmentosa_facts (Obtained 2017-02-21)
- [11] A. G. Bassuk et al. "Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells". *Scientific Reports* 6 doi:10.1038/srep19969
- [12] Fighting Blindness. 2017. "Retinal Implant Technology". <https://www.fightingblindness.ie/cure/retinal-implant-technology/>. (Obtained 2017-05-05).
- [13] K. Maitheson et al. 2012. "Photovoltaic retinal prosthesis with high pixel density". *Nature Photonics* 6: 391–397 doi:10.1038/nphoton.2012.104
- [14] E. Zrenner et al. 2010. "Subretinal electronic chips allow blind patients to read letters and combine them to words" *The Royal Society Publishing* doi: 10.1098/rspb.2010.1747. 3 November 2010.
- [15] P. Walter, W. Mokwa. 2005. "Epiretinal visual prostheses". *Ophthalmology* 102:933 doi:10.1007/s00347-005-1250-2
- [16] A.C. Ho et al. 2015 "Long-Term Results from an Epiretinal Prosthesis to Restore Sight to the Blind". *Ophthalmology* 2015 : 1-8
- [17] K. Stingl et al. 2013 "Artificial vision with wirelessly powered subretinal electronic implant alpha-IMS". <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/280/1757/20130077> *Royal Society* 280:1757 doi: 10.1098/rspb.2013.0077
- [18] Oxford Dictionaries. [2017]. Biocompatible. *Oxford University Press* <https://en.oxforddictionaries.com/definition/biocompatible> (Obtained 2017-05-12)
- [19] I. Ahnen et al. 2015. "Transfer of vertical nanowire arrays on polycaprolactone substrates for biological applications" *Microelectronic Engineering* 135: 52-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mee.2015.03.007>
- [20] M. Balls. 2010. "The Principles of Humane Experimental Technique: Timeless Insights and Unheeded Warnings". *ALTEX* 27, Special Issue 2010: 19-23
- [21] X. Jiang et al. 2013. "In vitro and in vivo evaluation of a photosensitive polyimide thin-film microelectrode array suitable for epiretinal stimulation". *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation* 2013, 10:48, doi: 10.1186/1743-0003-10-48
- [22] G-Q. Wang et al. "In Vitro Evaluation of the Effects of Intraocular Lens Material on Lens Epithelial Cell Proliferation Migration, and Transformation" *Current Eye Research*, 42:1, 72-78 doi: 10.3109/02713683.2016.1156133
- [23] F. Ejserholm et al. 2015 "Biocompatibility of a polymer based on Off-Stoichiometry Thiol-Enes + Epoxy (OSTE+) for neural implants". *Biomaterials Research* 2015, 19:19 doi: 10.1186/s40824-015-0041-3
- [24] H. Chang Lee, F. Ejserholm et al. 2017. "Histological evaluation of flexible neural implants: flexibility limit for reducing the tissue response?". *Journal of Neural Engineering*. 14(3):036026. doi: 10.1088/1741-2552/aa68f0
- [25] A. Piruska et al. "The autofluorescence of plastic materials and chips measured under laser irradiation". *Lab Chip*, 5: 1348-1354, 10 October 2005.
- [26] Q.U. Ain et al. 2017. "Enhanced mechanical properties and biocompatibility of novel hydroxyapatite/TOPAS hybrid composite for bone tissue engineering applications". *Materials Science and Engineering: C* 75, June: 807-815 doi:10.1016/j.msec.2017.02.117
- [27] G. Piret et al. 2012. "Neurite outgrowth and synaptophysin expression of postnatal CNS neurons on GaP nanowire arrays in long-term retinal cell culture" *Biomaterials* /10.1016/j.biomaterials.2012.10.042 *Biomaterials* 34(4): 875-887 doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.042
- [28] C. Errando-Herranz et al. 2013. "Biocompatibility of OSTE polymers studied by cell growth experiments". *17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences*: 143-145, 27-31 October 2013, Freiburg Germany.
- [29] P.S. Nunes et al. 2010. "Cyclic olefin polymers: emerging materials for lab-on-a-chip applications". *Microfluid Nanofluid* 9:145 doi:10.1007/s10404-010-0605-4
- [30] N. Sandström et al. 2015. "Reaction injection molding and direct covalent bonding of OSTE+ polymer microfluidic devices". *Journal of Micromechanics and Microengineering* 25(7) doi: 10.1088/0960-1317/25/7/075002
- [31] A. Ram. 1997. "Fundamentals of Polymer Engineering". *Technion-Israel Institute of Technology: PLenum Press* 4:3: 89.
- [32] C.F. Carlborg, A. Vastesson et al. 2014. "Functional Off-Stoichiometry Thiol-ene-epoxy Thermosets Featuring Temporally Controlled Curing Stages via an UV/UV Dual Cure Process". *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 52: 2604–2615 doi: 10.1002/pola.27276

Rescueeffekten - Celltäthetens effekt på cellöverlevnad

Linnea Hellholm (BME-14), Cornelia Sjöberg (BME-14)

Sammanfattning—Strålbehandling är en frekvent använd metod vid cancerbehandling. Strålningen leder till att cancercellers DNA förstörs, vilket i lyckade fall sedan leder till celledöd. Cellerna kommunicerar med varandra genom fysiska sammanbindningar samt signaler som färdas genom cellmediumet omkring dem. När en cell skadas, kommunicerar cellen med sin omgivning. Därigenom skickas och mottas signaler vilka gör att även celler i omgivningen skadas av strålningen. Denna effekt kallas bystandereffekten. Även signaler från de friska cellerna sänds ut, vilket kan göra att de skadade cellerna överlever. Denna effekt har namnet rescueeffekt.

Denna undersökning genomfördes på Lunds Universitetssjukhus, med syftet att undersöka rescueeffekten och skapa en matematisk modell som kan prediktera cellernas överlevnad beroende på stråldos och celltäthet.

Cancer celler bestrålades med röntgenstrålning och överlevande cellkolonier beräknades. Dessa analyser visar samband mellan celltäthet och cellernas överlevnad. Tydliga tendenser visar att det finns en effekt som innebär att ju större cellantalet är desto större andel celler överlever. Det går också att utläsa ett samband mellan stråldosen och cellernas överlevnad, där högre stråldos innebär att den tidigare nämnda effekten har ännu större påverkan.

Kunskap om rescueeffektens inverkan på cancer cellers överlevnad kan ändra sättet som behandlingen utförs på, därför finns det signifikans för resultaten i framtiden. Om kommunikationen mellan cellerna kan påverkas kan det förbättra effekten av behandlingen.

Slutsatsen är således att ju högre celltätheten är, desto större blir andelen överlevande av cancer cellerna efter bestrålning.

I. INTRODUKTION

CANCER är en grupp sjukdomar som kännetecknas av okontrollerbar celltillväxt, med potential att invadera samt sprida sig till andra delar av kroppen. Strålbehandlingar är en viktig del av utvecklingen av behandlingar mot cancer och idag blir 50 % av alla cancerpatienter någon gång behandlade med strålning. Behandling med hjälp av joniserande strålning är under ständig utveckling. De tre senaste decennierna har forskning inom området lett till en märkbar förbättring när det gäller förståelsen av respons från både friska och sjuka celler [1].

A. Bakgrundsteckning

Sedan tidigare är bystandereffekten ett erkänt fenomen. Det är ett fenomen där celledöd kan uppstå hos celler efter påverkan av bestrålning av närliggande celler. När en cell skadas av

strålningen, kan effekten av det spridas genom kommunikationen till cellerna i omgivningen som inte blivit utsatta för strålningen. Resultatet blir att även dessa obestrålade celler kan uppvisa tecken på bestrålning. Det är ännu inte känt exakt hur denna mekanism fungerar eller vilken den största betydelsen av fenomenet är. Vissa studier har visat att denna effekt uppstår även när ett cellmedium från bestrålade celler överförs till obestrålade celler. Andra visar att effekten syns tydligare när cellerna är fysiskt sammankopplade med bestrålade celler. Båda resultaten visar dock att cellerna signalerar till varandra och därmed påverkar överlevnaden vid bestrålning [2].

Rescueeffekten upptäcktes år 2011 och visar en motsatt effekt till bystandereffekten. Fenomenet innebär att celler kan påverka varandra på ett sätt som gör att bestrålade cellerna med större sannolikhet kan överleva bestrålning. När celler i ett område blivit bestrålade, skickar cellerna i omgivningen signaler till de skadade, vilket gör att skadorna minskas. Därav namnet "rescueeffekt" [3].

Celler in vivo beter sig inte alltid som de gör in vitro, varför man inte alltid kan anta att samma effekter kommer ske in vivo som visats in vitro. Till exempel finns tecken på att celler som bestrålas in vivo till större del överlever jämfört med de som bestrålas in vitro.

Den mest vedertagna teorin till att celler in vivo överlever strålningen i högre grad är att cancer celler där har en trängre omgivning än vad cellerna har in vitro. Den trängre omgivningen leder då i större utsträckning till syrebrist, in vivo, än vad som sker in vitro. Detta har effekt eftersom celledöd hos cancer celler kan ske genom att strålning skapar DNA-radikaler som fixeras av syre, O_2 , och skadar cellens DNA. Detta får som följd att cellen dör. Vid syrebrist får denna process svårare att ske vilket leder till att fler celler överlever strålningen. Trängre omgivning och mindre syre in vivo ger alltså högre cellöverlevnad än för celler som lever på plattor in vitro där det är större tillgång till syre [4].

Även om det finns skillnader mellan resultat in vivo och in vitro, ses ofta att resultaten pekar åt samma håll. Därför ger resultat från undersökningar in vitro indikationer till kliniska resultat.

Forskning på celler använder ofta etablerade cellinjer. Dessa är en viss typ av celler som tagits från en patient och odlats vidare till att bli stabila och dela sig konstant.

Då rescueeffekten ännu är ett nyupptäckt fenomen är det intressant att undersöka hur denna effekt påverkar cellernas överlevnad vid strålbehandling av cancer. Nya möjligheter skapas och det behövs mer förståelse för hur det påverkar behandlingen och hur denna vidare ska kunna förbättras.

Inlämnat den 3 juni 2017

E mejladress: {mte14lhe@student.lu.se, mte14csj@student.lu.se}

Teknisk handledare: Crister Ceberg, Lunds Universitet

Klinisk handledare: Gabriel Adrian, Lunds Universitetssjukhus

B. Tes

Denna rapport undersöker och kartlägger rescueeffekten, med hypotesen att ju högre celltäthet, desto större andel celler överlever bestrålning. Tesen är alltså att högre celltäthet ökar cellöverlevnaden på grund av rescueeffekten.

C. Agenda

Detta arbete behandlar cellers överlevnad vid bestrålning. Den första sektionen av metoden förklarar därför den laborativa delen av undersökningen, med beskrivning av hur celler såddes ut och bestrålades. Nästa stycke fortsätter att beskriva hur de data som fått in behandlades matematiskt och hur grafer och trender skapades. Vidare i rapporten visar resultatdelen grafer som skapats och resultaten från dessa. Första sektionen i diskussionen resonerar kring graferna och drar slutsatser från resultatdelen, följt av en kort diskussion av skillnader med in vivo och in vitro-undersökningar. Därefter diskuteras vad resultatet i denna rapport kan komma att leda till och överläggningar om framtiden. Nästa stycke behandlar problem med undersökningen och möjliga förbättringar. Diskussionen följs av ett stycke om hållbar utveckling och etik kopplat till detta arbete, där cellinjier, antibiotika och förbrukningsmaterial är viktiga begrepp. Rapporten avslutas med slutsatser och efterord, där viktiga personer tackas.

II. METOD

A. Laborativ metod

Cellöverlevnaden bestäms genom "clonogenic assay". Detta innebär att celler, i detta fall från en etablerad cellinje med melanom, MM576, tvättas rent från cellmedium och täcks med trypsin för att de ska lossna. Flaskorna med cellerna placeras i en inkubator och tas ut efter 5 minuter då cellerna lossnat och dragit ihop sig. De tvättas sedan rent från trypsinet och placeras i nytt cellmedium.

Innan cellerna placeras i nya flaskor räknas andelen celler i en viss volym av medium med hjälp av Bürker-glas i ett mikroskop. Där bestäms hur stor volym som krävs i varje flaska för att nå ett specifikt antal överlevande kolonier efter bestrålning. En cellkoloni är en grupp av celler som skapas då den ursprungliga cellen delar sig. Nya flaskor fylls därefter med celler samt medium och återsluts omedelbart. Flaskorna placeras i en inkubator i ca 4 timmar för att cellerna ska fästa på den nya ytan.

När cellerna fäst på ytan bestrålas flaskorna med röntgenstrålning. Olika flaskor bestrålas med olika stråldoser; 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, 8, 10 och 12 Gy. Den stråldos som mest data samlas in för är 5 Gy. För att veta vilket monitorvärde röntgenapparaten behöver för att få den önskade dosen strålning på cellerna, används en tabell som finns standardiserad, det vill säga individuellt utmätt för varje strålarapparat, fältstorlek, energi etc.

Efter bestrålning av cellerna inkuberas dessa i 10-14 dagar. Etanol tillsätts därefter i flaskorna för att döda cellerna, som färgas in med metylenblått. Cellerna har då format kolonier. Flaskorna scannas och förs in i ett datasystem för att en algoritm ska kunna räkna kolonierna. Som kontroll räknas

kolonierna sedan även manuellt. För varje experiment framställs även oexponerade kontrollflaskor med celler. Även dessa räknas och används för att räkna ut en utsäddseffektivitet, plating efficiency (PE), för flaskorna.

Denna process görs med minst 3 upprepningar med 3 flaskor per upprepning [5].

B. Analys av data

Celltäthetseffekten undersöks genom att bestråla cellodlingar med varierande stråldos. Detta görs för att få data över överlevnadsfraktion (survival fraction, SF), plating efficiency och antal celler från start. Formeln för att beräkna överlevnadsfraktionens kurva vid olika stråldoser visas i ekvation (1), där alpha och beta är värden som sedan även används för att bestämma stråldos kliniskt i praktiken och d är dosen.

$$SF = e^{-\alpha d - \beta d^2} \quad (1)$$

Alpha/beta-kvoten bestäms genom att skapa en matematisk anpassning till kvoten i MatLab. Initialt görs en gissning på alpha- och betavärdena, för att sedan genom iterativ beräkning av minsta kvadrat-metoden få fram värden på alpha och beta från data.

Resultatet från datan vid bestrålning av 5 Gy och 12 Gy plottas i en graf med celltätheten på x-axeln och överlevnadsfraktionen på y-axeln för att undersöka hur celltätheten påverkar överlevnadsfraktionen.

En grafisk anpassning till datan görs sedan även som 3D-graf, för att se celltäthetens variation vid olika doser. Mätvärdena logaritmeras för i anpassningen och minsta kvadrat-metoden används. Både alpha och beta antas vara cellantal-beroende i denna modell.

Normerade värden används på cellantalet. Normeringen fås genom att utgå från PE för varje försök och räkna fram ett teoretiskt värde för cellantalet, istället för att utgå från resultatet från titreringen vid utsädden av celler och beräkningen av dessa.

En standardkurva skapas för att få en visualisering av de överlevande kolonierna. Standardkurvan är en anpassning till de 50 överlevande kolonierna och antal utsädda celler som krävs för att just det antalet ska överleva vid olika stråldoser. Överlevnadsfraktionen ses som en linjär linje vid skapande av denna anpassning, se ekvation (2)

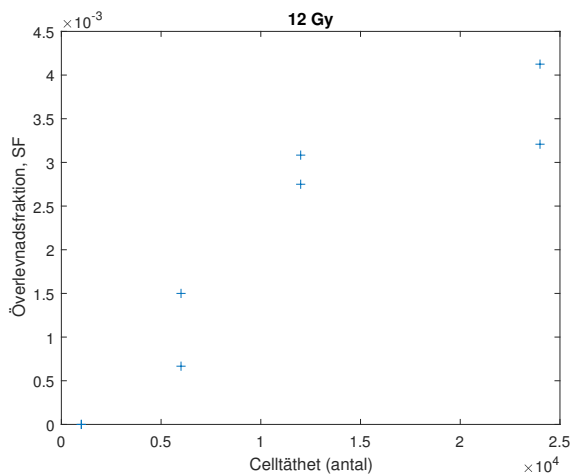
$$SF = k * N_0 + m \quad (2)$$

där k och m får olika värden för de olika doserna. Dessa räknas fram för att kunna sättas in i följande ekvation (3), från vilken rötterna räknas fram och kan sättas in i en plot. N sätts till 50, då det är plotten för 50 överlevande kolonier som vill fås fram.

$$N_0^2 + \frac{m}{k} N_0 - \frac{N}{k * PE} = 0 \quad (3)$$

Rötterna ger ett värde för N_0 på varje dosnivå, som sedan plottas i en graf med dos på x-axeln och N_0 på y-axeln, se figur 4.

Efter att detta gjorts för 50 överlevande kolonier ($N = 50$), utförs beräkningarna även för 10 och 500 överlevande kolonier. De två senare jämförs sedan i graf 9. Där divideras



Figur 1. Överlevnadskvot som funktion av celltätheten för celler bestrålade med 12 Gy. En tydlig trend av att cellöverlevnaden ökar med celltätheten kan avläsas.

antal utsådda celler som krävdes i figur 6 för varje stråldos, med antal utsådda celler som krävdes i figur 5, vilket sedan plottades.

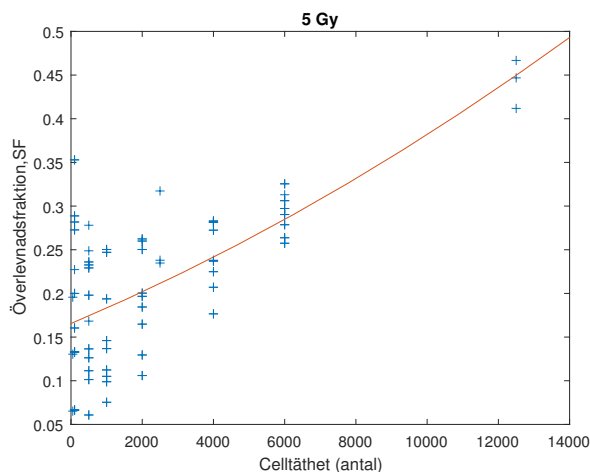
III. RESULTAT

Undersökningen resulterade data som här representeras i flertalet grafer över celltäthet och överlevnadsfraktion vid olika stråldoser. Dessa jämförs både enskilt inom varje graf och med varandra för att undersöka celltäthetseffekten.

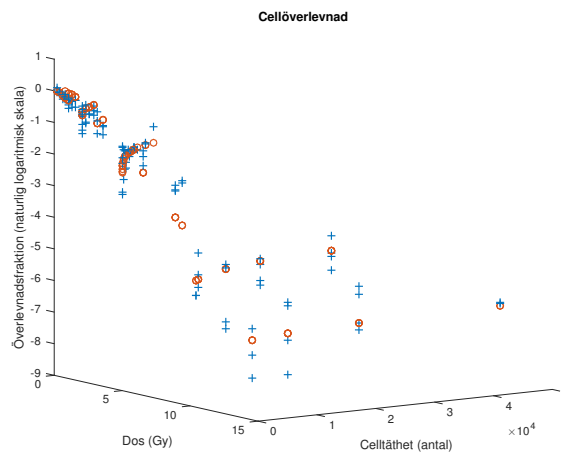
A. Celltäthetseffekt för bestrålning med 5 och 12 Gy

Överlevnadsfraktionen är en kvot över hur stor andel celler som överlever bestrålningen, vilken förväntas öka då rescueffekten är närvarande. I figur 2 ses överlevnadsfraktionen för cellerna vid bestrålning av 5 Gy relativt celltäthet, det vill säga antal celler som är närvarande innan bestrålningen. Det ses att överlevnadsfraktionen ökar när celltätheten är högre, jämfört med för ett färre antal celler. Ju fler celler som är närvarande, desto högre andel av cellerna överlever bestrålningen, vilket indikerar en rescueffekt. Om fenomenet inte vore närvarande vore förväntan att överlevnadsfraktionen var konstant och därmed oberoende av celltätheten. Istället ses ett samband som visar att cellöverlevnaden är beroende av celltätheten.

Samma fenomen som beskrivs ovan ses också i figur 1 för 12 Gy. Då celltätheten ökar, blir överlevnadsfraktionen högre. Rescueffekten syns tydligt hos de högre cellantalerna och högre stråldoserna. Där ses en celltäthetseffekt. Grafen visas dock utan anpassad trendlinje, eftersom det är få mätvärden som ligger till grund för denna graf. Antal mätvärden för 12 Gy respektive 5 Gy skiljer sig kraftigt åt, vilket gör en jämförelse mellan de två graferna osäker. Det går dock att se en tydlig rescueffekt där celltäthetseffekten påverkar, vilket gör att överlevnaden blir större när antalet celler ökar.



Figur 2. Överlevnadskvot som funktion av celltätheten för celler bestrålade med 5 Gy. En tydlig trend av att cellöverlevnaden ökar med celltätheten kan avläsas.



Figur 3. Överlevnadsfraktionen som funktion av dosen med celltätheten på z-axeln. Blå kryss visar uppmätt data, orangea cirklar är modellens anpassning. Daten för antalet utsådda celler är här normerat.

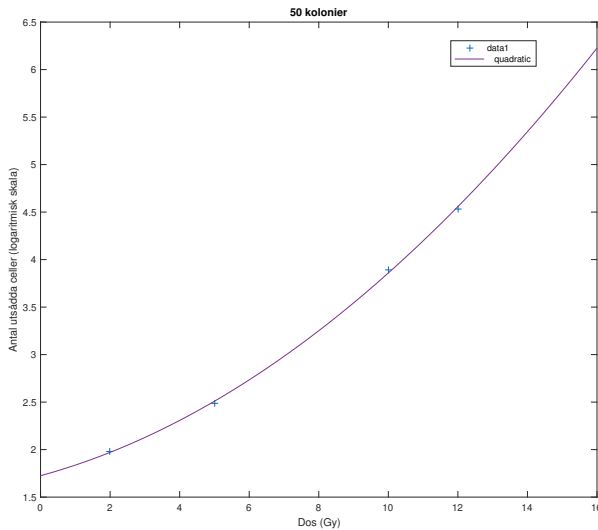
B. Celltäthetseffekten i 3D

En sammanfattande bild över relationen mellan överlevnadsfraktion, stråldos och celltäthet ses i figur 3. De orangea cirklarna visar den anpassade matematiska modellens datapunkter, medan de blå kryssen är de faktiska mätvärdena. Modellens anpassning stämde väl överens med de uppmätta värdena. Figur 3 visar att rescueffekten, i form av celltäthetseffekt, finns hos alla försök som gjorts för de olika stråldoserna. Vid varje stråldos ses att när antalet celler ökar, ökar även överlevnadsfraktionen. Det innebär alltså att ju fler celler som är närvarande, desto högre andel av dessa överlever.

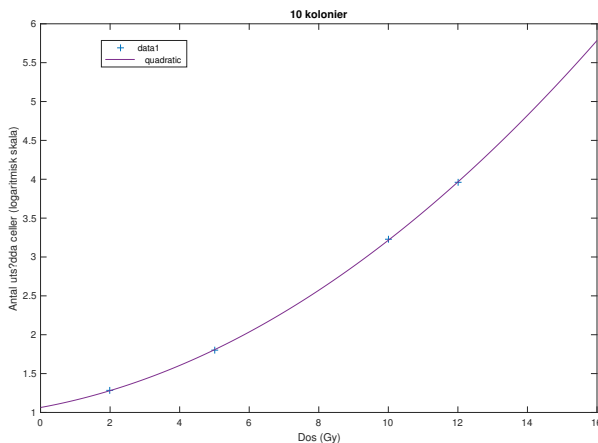
C. Laborativ tillämpning

Figur 4 visar ytterligare vilken celltäthet som krävs för att för olika stråldoser få ett önskvärt antal cellkolonier efter strålningen. I detta fall undersöktes hur många celler som

behövde sås ut för att få 50 kolonier kvar efter bestrålningen. Denna graf visar hur resultatet kan användas för en laborativ tillämpning för att estimerar hur många celler som kan förväntas överleva en viss stråldos. I denna graf ses även att ju högre celltätheten är, desto fler celler överlever strålningen och desto högre stråldos behövs för att få ett visst antal celler efter bestrålningen. Relationen mellan dos och antal utsådda celler som krävs för att få ett visst cellantal är exponentiell och rescueeffekten, alltså att fler celler överlever, blir därmed tydligare ju högre stråldosen och cellantalet är.



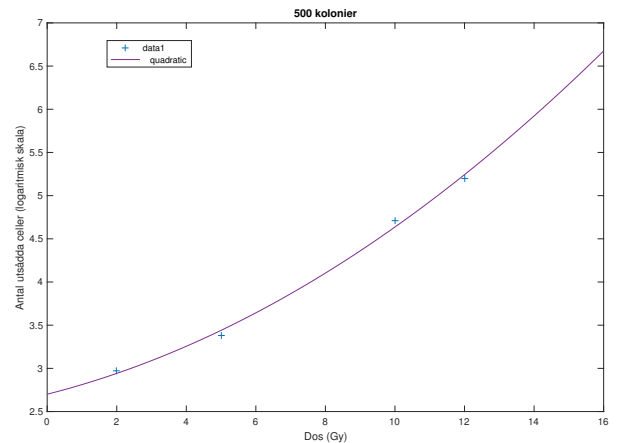
Figur 4. Graf över antal utsådda celler som behövs för att få 50 kolonier efter strålningen.



Figur 5. Graf över antal utsådda celler som behövs för att få 10 kolonier efter strålningen.

D. Kvot mellan 10 och 500 kolonier

Figur 5 och 6 visar samma resultat som figur 4 över 50 kolonier, men med 10 respektive 500 kolonier som resultat



Figur 6. Graf över antal utsådda celler som behövs för att få 500 kolonier efter strålningen.

istället. Värdena från dessa kurvor användes för en jämförelse mellan skillnaden för låg och hög celltäthet i figur 9. Båda graferna med låg respektive hög celltäthet visar ett tydligt exponentiellt samband likt figur 4. Även här blir resultatet att ett färre antal celler än förväntat behöver sås ut före bestrålning, för att efter behandlingen få ett önskvärt antal kolonier, när stråldosen ökar. Det betyder att fler celler än vad som tidigare förväntats överlever strålningen, samt att effekten blir tydligare när celltätheten och stråldosen ökar.

Figur 7 och figur 8 visar bilder på flaskorna där approximant 10 och 500 cellkolonier har mätts upp efter bestrålning och inkubering. Varje blå prick på bilden representerar en cellkoloni. Just dessa två flaskor är bestrålade med 5 Gy, men liknande bilder scannades för alla stråldoser som använts, och det är detta som är det direkta resultatet av laborationen med cellerna. Dessa bilder är grunden till resten av den insamlade datan, då det är från detta som koloniantalen har beräknats.

Kvoten mellan det utsådda cellantalet som krävs för att få 500 kolonier, figur 6, och antalet som krävs för att få 10 kolonier, figur 5, visas i figur 9. Antal utsådda celler för varje stråldos där resultatet är 500 kolonier divideras med antal utsådda celler för varje stråldos där resultatet är 10 kolonier, vilket representeras av den röda kurvan. Kvoten anger hur många gånger fler celler som behöver sås ut för att få ett visst antal gånger större koloniantal efter strålningen. Den blå linjen är med som referenslinje, för att visa vad värdet på kvoten borde varit om ingen rescueeffekt skulle uppvisats. Alltså att kvoten för antal utsådda celler vore konstant och därmed inte beroende av celltäthet. Den resulterande kvoten visar skillnaden mellan dessa två. Differensen mellan värdet för 500 kolonier och 10 kolonier blir mindre när stråldosen ökar, vilket ses genom att kvoten minskar. Det är även det som gör att det går att tolka en celltäthetseffekt och rescueeffekt.

IV. DISKUSSION

A. Celltäthetseffektens påverkan på överlevnad

Resultatet visar fenomenet rescueeffekt på celler in vitro och därmed inte in vivo. Även om detta då innebär att resultatet



Figur 7. Bild på en flaska där ca 10 cellkolonier finns kvar efter strålbehandling och inkubering. Dessa celler bestrålades med 5 Gy.

fortfarande har många steg kvar innan det kan påverka kliniska förändringar, blir det genom att förstå hur det fungerar in vitro, enklare att fortsätta utvecklingen från forskningstadiet till verklig behandling. Det är det långsiktiga målet med denna kartläggning av hur kommunikation mellan cellerna och dess överlevnad ser ut idag.

Resultatet visar att rescueeffekten påverkas av celltäthet och stråldos, figur 9. Där ses att rescueeffekten blir större när dosen ökar. Om denna rescueeffekt inte skulle påverkas vore förväntat resultat en rak, horisontell linje, vilket representeras av den blå linjen i grafen. Cellantalet före strålning borde då öka linjärt med önskvärt kolonialantal efter strålning, vid olika doser. Eftersom detta inte är fallet innebär det att cellerna samarbetar och kommunicerar. På det sättet överlever fler celler när celltätheten ökar eftersom samarbetet mellan dem blir större. Då kvoten anger hur många gånger fler celler som behöver sås ut för att få ett visst antal gånger större kolonialantal efter strålningen, blir den blå linjen en referens till den röda linjen, vilken visar hur cellerna faktiskt beter sig. I detta fall innebär det att utan celltäthetseffekten borde 50 gånger fler celler än det antal som användes i försöket med 10 kolonier behöva sås ut för att få 500 kolonier efter strålning. Den röda kurvan i grafen borde alltså följt den blå, horisontella linjen. Det är inte vad som skett, utan grafen visar att det behövs en mindre andel celler för att få 500 kolonier att överleva än 10 kolonier. Det är så pass stor skillnad att det endast behövs ca 7,8 gånger fler utsädda celler vid bestrålning av 16 Gy för att



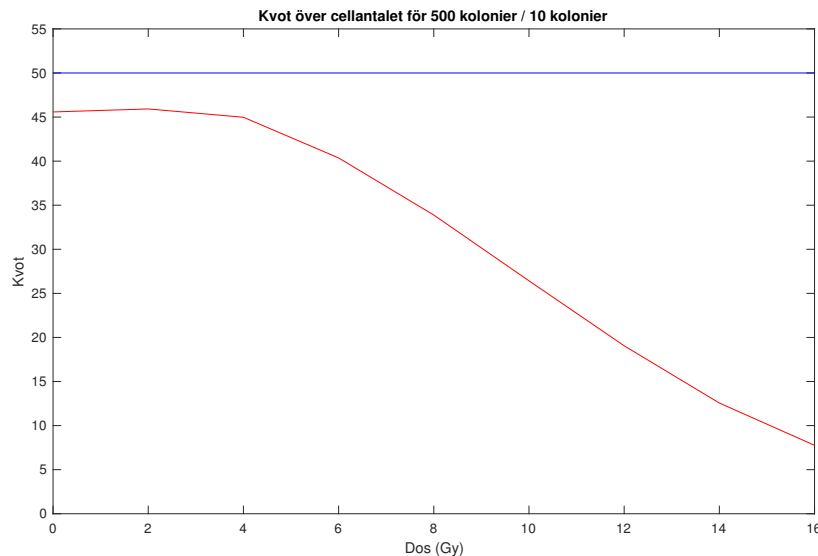
Figur 8. Bild på en flaska där ca 500 cellkolonier finns kvar efter strålbehandling och inkubering. Dessa celler bestrålades med 5 Gy.

till slut få 500 kolonier istället för 10. Förväntat resultat på denna kvot vore 50 om rescueeffekten inte skulle påverkas av celltätheten. Anledningen till denna stora skillnad är som sagt att cellerna samarbetar och fler celler överlever strålningen när celltätheten ökar. Fenomenet blir också tydligare och starkare när dosnivån ökar, vilket ses i figur 9 eftersom kvoten blir lägre då dosnivån ökar. Därmed ses en rescueeffekt som påverkas av celltäthet och blir tydligare och effektivare vid högre stråldos och celltäthet.

B. *In vitro* kontra *in vivo*

Problem med att få fram resultat in vitro genom laborationer är att celler ofta reagerar annorlunda jämfört med hur de reagerar in vivo. Även om dessa resultat pekar åt ett visst håll så är det inte säkert att det ger resultat i samma utsträckning vid tester in vivo. Detta är något som man är väl medveten om inom forskning vid bestrålning.

Från resultatet ses att högre andel celler överlever när celltätheten är högre, jämfört med överlevnaden då färre celler är närvarande. Detta är ett resultat baserat på in vitro-undersökningar. Det går sedan att diskutera hur resultatet skulle skilja sig om man istället skulle göra detta in vivo. I introduktionen nämns en teori om att hypoxi kan förklara varför fler celler överlever strålbehandling in vivo jämfört med in vitro. Med resultatet från detta arbete lyfts tanken om att detta fenomen även skulle kunna bero på celltätheten och rescueeffekten. Detta då det är många fler celler i ett organ



Figur 9. Graf över kvot mellan hög och låg celltäthet och hur stråldosen är relaterad till detta. Den blå linjen visar det förväntade resultatet utan celltäthetseffekt, medan den röda linjen visar det faktiska resultatet där celltäthetseffekten spelar in.

in vivo jämfört med cellerna på en platta i laboratoriet. Detta kan vara en förklaring till varför cellerna får lättare att överleva i kroppen.

Fallet med denna undersökning är att de resultat som fås här, inte går att koppla direkt till hur resultatet kommer bete sig in vivo. Resultatet som nåtts är dock viktiga då in vitro-studier indikerar hur celler in vivo kommer bete sig. Ett vidare steg är att se hur pass starka tendenserna som upptäckts här visar sig vara in vivo.

C. Celltäthetseffekten framöver

Resultatet i denna rapport kan påverka hur stråldos bestäms i praktiken i framtiden. Detta eftersom stråldosen bestäms med hänsyn till hur många cancersjuka jämfört hur många friska celler som tar skada av dosen strålning. Vid förståelse av hur cellerna i och kring det bestrålade området kommunicerar med varandra så kan man lättare förstå hur man bör gå tillväga för att få en mer effektiv dosering av stråldos.

Det långsiktiga målet som fortsättning på denna forskning kan ses som grenat åt två håll. Genom bättre förståelse av hur cellernas kommunikation går till och hur man kan påverka denna, öppnas nya möjligheter. Det optimala vore om det skulle finnas ett sätt att stänga av, eller åtminstone minska, den icke önskvärda kommunikationen mellan tumörceller. På det sättet skulle fler cancerceller kunna elimineras med en mindre dos strålning, eftersom rescueeffekten då inte skulle ske i lika stor utsträckning. För att detta ska vara möjligt måste det finnas en förståelse för exakt hur denna kommunikation går till, samt varför den finns.

Det är en lång väg att gå innan cellernas kommunikation kommer kunna påverkas på den nivå detta hanteras. Däremot finns det också en annan tänkvärd väg att fortsätta på dessa resultat. Den andra grenen handlar därför om att arbeta för att kunna anpassa beräkningarna av dosnivåer under

strålbehandling enligt denna celltäthetseffekt och rescueeffekten. Detta skulle kunna öppna upp för att beräkna en mer optimal dos som patienterna blir utsatta för. Ett sådant arbete skulle bland annat kunna ske genom att en ny matematisk modell tas fram för att beräkna en dos för varje enskilda patient som beror på fler parametrar än i dagsläget. Ett försök till detta gjordes i denna undersökning, där en matematisk modell skapades av cellöverlevnaden som var beroende av celltätheten. På detta sätt skulle dosen bli mer optimerad. Att använda celltätheten som en parameter fungerar in vitro, men in vivo blir det genast krångligare. I en tumör hos en patient är det i princip omöjligt att veta hur hög eller låg celltätheten är. Detta medför därmed vidare nya utmaningar om hur det senare problemet ska tacklas.

D. Analys av arbetet

Vid sådd av celler är det svårt att så ut ett exakt antal celler. Metoden innebär att ett antal droppar av lösningen med celler pipetteras på en yta. Antalet celler som ska finnas i varje droppe är ett framräknat antal på det vis att det är en kvoträkning av vad som finns i hela lösningen. Det faktiska antalet celler kan variera från det som används i beräkningarna och metoden ger därför skiftande resultat. Detta är anledningen till att det i denna undersökning ibland valdes att använda ett normerat antal utsädda celler i beräkningarna. Denna metod var effektiv, men det skulle vara en förbättring av metoden att hitta ett sätt att räkna antal utsädda celler mer exakt, och då kunna använda exakt antal utsädda celler istället för ett teoretiskt antal. En förbättring inom detta området hade förhoppningsvis lett till ett ännu tydligare resultat.

Vidare var ett problem den ojämna fördelningen av mätvärden för olika stråldoser. Exempelvis fanns mycket fler data för stråldosen 5 Gy, medan det var drastiskt färre värden och undersökningar för de högre stråldoserna såsom 12 Gy.

Detta berodde på att resultaten från försöken där cellerna bestrålades med högre doser, var spretiga och gjorde det svårt att få fram data. Samtidigt utfördes färre undersökningar vid de högre doserna, jämfört med lägre doser, vilket gav ett sämre underlag. Att en ojämn mängd data används för olika stråldoser resulterade i viktade resultat. Det är inte önskvärt då det inte ger en rättvis bild över anpassningen och resultatet. Detta behövdes ta hänsyn till genom att plocka bort viss data från 5 Gy i figur 2. På det sättet nåddes en graf som inte längre var viktad, men som då istället har färre mätvärden, vilket i sin tur är en annan nackdel.

Eftersom det var svårt att få många data för högre stråldoser var det också svårt att få grafer med resultat för de högre stråldoserna som visade någon trend. Detta eftersom det var alldeles för få punkter. Figur 1 visar resultatet för 12 Gy där man kan se en tydlig tendens på att överlevnadsfraktionen ökar med celltätheten, men mätvärdena är så få att det är diskutabelt om det går att lita på resultatet. Motsatsen är motsvarande graf för den lägre dosen, 5 Gy, figur 2, där resultatet är enhälligt och en stabil trend är tydlig. Önskvärt vore att göra fler undersökningar för olika celltätheter vid 12 Gy och se hur resultatet från det stabiliserar sig. Det borde visa på en överlevnadsfraktion för cellerna som liknar den som presenterades i resultatet av denna undersökning i figur 1, men att celltäthetseffekten blir ännu tydligare.

Resultatet från den matematiska anpassningen uppfyllde tesen och styrker att det finns en celltäthetseffekt hos celler.

V. ETIK OCH HÅLLBAR UTVECKLING

A. Etiska risker för forskning på cellinjer

Det finns ett krav att forskning som innefattar fysiska ingrepp, eller innebär någon risk för den person som deltar, ska prövas av etikprövningsnämnden. Prövning är även nödvändigt om forskningen hanterar känslig information som innefattas av personuppgiftslagen, PuL, samt om det material som används går att koppla till en specifik individ. I denna undersökning laboreras det på celler som härstammar från en etablerad cellinje vilken har ursprunget från en enda person. Att bedriva forskning på cellinjer innebär att väldigt få ingrepp görs på patienter eftersom det inte finns något behov då cellinjen kan förökas och leva vidare. På detta sätt sparas tid, pengar och lidande då varken djur eller människor utsätts för tester i detta stadie, samt att man inte behöver fokusera på att söka efter nya celler.

För att använda mänskliga celler i forskning krävs samtycke från den individ det berör. Samtycket kan dock vara svårt att genomföra då det gäller cellinjer som funnits under väldigt lång tid, flera decennier. Det kan även vara ett problem vid omfattande registerstudier eller biobanker. Personen måste själv ta ställning till om att delta eller inte i forskningen, samt vara medveten om att det när som helst går att avsluta deltagandet. Då det gäller cellinjer uppstår dock en etisk fråga. Linjen kan komma att överleva individen, samt så skulle ett beslut att avbryta medverkan i forskningen innebära att forskning världen över, som kan ha pågått i flera år, stoppas. Det kan innebära att det byggs upp en press mot individen, och att denna känner ett ansvar att fortsätta i studien, även

om det står tydligt i avtalet att det går att avbryta studien när som helst. Dock innebär forskning på cellerna i slutändan inte att någon tar skada, utan det öppnar upp möjligheter för forskning och upptäckt av ny information som kan leda till ny behandling. Det är därför mycket värdefullt. Att detta går att genomföra utan att människor eller djur tar skada på ett tidigt stadie, gör att den vetenskapliga nyttan är större än den etiska risken.

B. Undersökningens hållbara utveckling

När man genomför laborationer med levande celler måste man vara oerhört noggran med desinfektion och att arbeta i en steril miljö för att undvika smittospridning och se till att cellerna mår bra. Det innebär olika saker, men en av de mest utmärkande ur perspektivet hållbar utveckling är att de flesta av de verktyg man använder är engångsartiklar. Till exempel pipetter är vanliga förbrukningsvaror. De har en löstaggbar spets, och så fort spetsen nuddar något annat än den vätska som är tänkt att pipettera, ska denna spets slängas. Eftersom man använder sig av antibiotika som inte ska komma ut i avlopp eller liknande, rengörs och återanvänds inte dessa spetsar. De skickas istället iväg till en speciell station där de förstörs. Detta är en process som sker för många material på sjukhus just för att undvika både smittospridning och att antibiotika ska komma ut i naturen.

Denna process är definitivt diskutabel då det innebär att mycket plast och glas som rent praktiskt är möjliga att återanvända, slängs och måste produceras på nytt. Förbrukningsvaror är ett problem i en värld där det inte finns oändligt med naturresurser, och skulle även kunna vara ett ekonomiskt problem då man ofta kan tjäna på att återanvända material. Den ekonomiska aspekten beror dock på priset för rengöring och sterilisering, vilket kan vara dyrt för den höga kontrollen som krävs.

Det är även alltid kontroversiellt att använda antibiotika då det i slutändan leder till resistens. I detta fall är det nödvändigt att använda det, just för cellernas överlevnad och för att minska smittospridning. Hur hållbart det är i längden är diskuterbart, men tills det finns ett annat alternativ är det en nödvändighet. Avfallet hanteras på ett ansvarsfullt sätt, men risken med antibiotika är alltid närvarande.

VI. SLUTSATSER

Alla data i detta arbete pekar på samma slutsats; ju högre celltäthet, desto större andel celler överlever strålningen. Detta på grund av en rescueeffekt som beror på celltäthet. Det innebär att cellerna kommunicerar med varandra och samarbetar. Det ger en högre andel överlevande celler efter att dessa har blivit utsatta för strålning. Resultaten visar även att effekten blir större och tydligare när dosnivån ökar, och slutsatsen dras att ju högre stråldos celler bestrålas med desto större påverkan har celltäthetseffekten.

VII. EFTERORD

Vi skulle vilja rikta ett stort tack till våra handledare som stöttat och hjälpt oss under hela projektets gång. Vår kliniska handledare Gabriel Adrian, ST-läkare vid Onkologi

och Patologi på Lunds Universitetssjukhus, har bidragit med medicinsk kunskap och vägledning vid tolkning av resultaten, och Crister Ceberg, professor i Medicinsk Strålningsfysik på Lunds Universitet, har väglett med det matematiska och kodandet i MatLab.

Författarna till artikeln har bidragit lika mycket under hela projektet.

REFERENSER

- [1] R. Baskar, J. Dai, N. Wenlong, R. Yeo, K. Yeoh, "Biological response of cancer cells to radiation treatment", Department of Radiation Oncology, National Cancer Centre, Singapore, Singapore, Nov. 2014.
- [2] M. Joiner and A. van der Kogel, "When and why cells die after irradiation", in *Basic Clinical Radiobiology, fourth edition*. Great Britain: Edward Arnold, 2009, pp.33-39.
- [3] R. K. K. Lam, Y. K. Fung, W. Han, K. N. Yu, "Rescue Effects: Irradiated Cells Helped by Unirradiated Bystander Cells", Ed. S. E. Eriksson, International Journal of Molecular Sciences. 2015, vol. 16, no. 2, pp. 2591-2609, doi: 10.3390/ijms16022591, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4346853/>
- [4] Holly E. Barker, James T. E. Paget, Aadil A. Khan Kevin J. Harrington, "The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence", Nature reviews cancer, vol. 15, 409-425, August 2015, doi: 10.1038/nrc3958, <http://www.nature.com/nrc/journal/v15/n7/full/nrc3958.html>
- [5] N. A. P. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman and C. van Bree, "Clonogenic assay of cells in vitro", Nat. Protocols, Nature Publishing Group, vol.1, no.5, pp.2315-2319, December 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.339, <http://www.nature.com/nprot/journal/v1/n5/abs/nprot.2006.339.html>

Teckenspråkstolkning med hjälp av Matlab för framtida användning i mobilapplikation

Benjamin Luikert (BME-14), Carl Sjögren (BME14)

Sammanfattning—Syftet med projektet var att skapa en metod för de som enbart talar teckenspråk att kommunicera med de som endast behärskar talat språk, och vice versa. Detta enligt förhoppningen att kunna minska den sociala isolering som bland annat dövfödda barn kan känna, och förbättra deras sociala utveckling. Med hjälp av matlab har en matematisk modell för teckenspråkstolkning som är baserad på multivariat normalfördelning använts. I projektet har fyra tecken tolkats med en hundra procent träffsäkerhet då bilder för testet kommer från samma bildgrupp som träningsbilderna. Så fort testbilder från en annan grupp används så sjunker träffsäkerheten till högst sjuttio procent. Med tillgång till större beräkningskraft som till exempel cloud-tjänster skulle algoritmen kunna tränas med större dataset och med högre hastighet för att uppnå en förbättrad träffsäkerhet. Metoden som användes för maskinlärningen är dock inte optimal som resultaten visar. För att förenkla för hörselskadade i samhället i deras kommunikation med hörande medmänniskor krävs ytterligare utveckling utav teknologi som automatiserar teckenspråkstolkning. Vidare skulle även kommunikation på distans mellan teckenspråkutövare förenklas.

I. INTRODUKTION

A. Bakgrund

Enligt World Health Organisation [1] är cirka fem procent av världens population hörselskadad och av dessa är ca. trettiofem miljoner barn. Dessutom så har antalet hörselskadade ökat stadigt sedan 80-talet, se Figur 1. Barn som föds döva med föräldrar som inte är teckenspråkstalare, vilket gäller majoriteten av dövfödda, lider av en försenad språkutveckling. Barnen får även en försenad social utveckling, vilket är starkt knutet till den språkliga utvecklingen. Utöver detta kan en känsla av social isolering uppstå om barnets föräldrar inte talar teckenspråk [2].

Döva barn isoleras även socialt av sina jämnåriga kamrater, eftersom att kommunikationsbarriären kombinerat med ett barns bristande tålamod gör att det hörande barnet helt enkelt slutar ta social kontakt. Denna bristande sociala interaktion och ivägskyggning från jämnåriga barn kan ge upphov till ett försämrat självförtroende, och i förlängning problem med ångest och depression [3]. Kommunikationstjänster så som Facetime via Facebook eller Microsofts Skype [4] ger även en möjlighet för döva personer att kommunicera smidigt på avstånd, något som tidigare varit begränsat till vanliga telefonsamtal för de hörande. Denna kommunikation kräver dock att båda deltagarna är införstådda i det talade teckenspråket, medan skriven och talad kommunikation kan översättas med hjälp



Figur 1. Statistik över hörselskadade från SCB

av exempelvis Skypes inbyggda översättarfunktion [5]. Det finns alltså inte någon etablerad kanal för teckenspråkstalare att tala sitt modersmål till en person som inte behärskar det språket, utan istället får man hålla sig till skriven kommunikation.

Utöver hörselskada så finns det andra anledningar till att en person inte kan ta till sig det talade språket. Till exempel så kan barn med diagnosen autism finna det svårt att kommunicera sina tankar med ord. Detta kan leda till frustration hos barnet som inte får sin röst hörd när det vill. Idag används så kallade tecken som kompletterande kommunikation (TAKK) för barn med autism, vilket hjälper dem att förmedla tankar och önskemål till personer i sin närhet. Man använder även pekspråk, där barnet pekar på en bild i t.ex. en bildpärm eller app, för att underlätta kommunikationen. Denna inlärningsprocess kan ta lång tid för barnen, särskilt så kan sammanlänkningen mellan tecken och resultat förstöras om personen som barnet försöker kommunicera med inte reagerar så som är förväntat. En teknik som förenklar kommunikation mellan ett autistiskt barn och en vuxen ovan vid dess tecken hade kunnat minska den frustration som uppstår till följd av missförstånd. [6]

B. Utmaningar och tidigare försök

Utmaningarna med automatisk teckenspråkstolkning är många; till att börja med finns det minst 160 olika teckenspråk i världen [7]. Av dessa finns många dialekter där olika

Inlämnat den 9 juni 2017

E-mejladress: psy11cs1@student.lu.se, mte14blu@student.lu.se

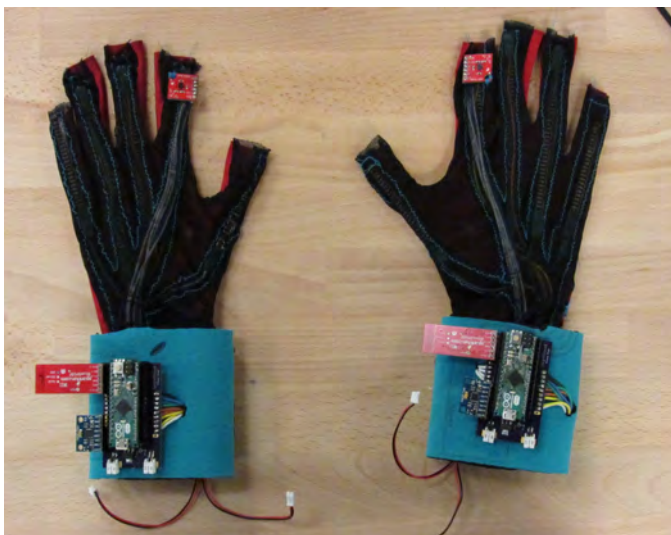
Teknisk handledare: Kalle Åström, Matematikcentrum på LTH

tecken betyder olika saker. Förutom själva tecknet beror ett teckenspråk även på hastigheten med vilken en rörelse utförs och ansiktsuttrycket som följer med rörelsen, precis som ton och hastighet har betydelse för talad kommunikation.

Sedan finns det även de tekniska utmaningarna; tecknen måste kunna tolkas i olika ljusförhållanden med olika bakgrunder, handens avstånd till kroppen måste tas med i beräkningar, dessutom så krävs att algoritmen känner igen vad som är en hand och vad som inte är det. Vidare ska algoritmen inte ha problem med att tolka handtecken om personen har smycken eller handskar på sig. Det kräver också att man inte ordagrant översätter teckenspråk utan även har rätt grammatik.

Det finns flera metoder på dagens marknad som används för att förstå och tolka handtecken. Av dessa är dock ingen både billig och portabel. Därför var målet med projektet att skapa en algoritm som sedan kan göras till en app som är tillgänglig för smartphones över hela världen. Detta skulle också kunna göra automatiserad teckenspråkstolkning mer tillgänglig för utvecklingsländer. Länder med flest hörselskadade är för det mesta utvecklingsländer, eftersom de ofta inte har tillgång till rätt preventiv vård i tidig stadium, vilket leder till att hörselskadande sjukdomar inte behandlas. Dessutom är industrin i dessa länder ofta av ett äldre mer bullrigt slag. Men även i dessa länder har de flesta tillgång till en mobil [8].

En av teknikerna som utvecklas består av att använda handskar [9] med rörelse- och böjsensorer för att avgöra vilket tecken som användaren gör, rörelseinformationen tolkas i sin tur och omvandlas till en text- eller ljudsignal. Denna metod har kommit långt och kan användas oberoende av ljus- och bakgrundsförhållanden. Den kan även tolka ens hands position och rörelser. Problemet med denna teknologi är att den kräver att användaren bär handskar med sig, som enkelt kan tappas bort eller gå sönder. Ett par studenter vid MIT (Massachusetts Institute of Technology) provade även denna teknik för teckenspråkstolkning [10], vilket finns att beskåda i figur 2.



Figur 2. Teckenspråkstolkande handskar skapade av studenter vid MIT

En annan metod [11] använder sig av kameror och computer vision, där en dator utför beräkningar och tolkning av bild

eller video för att avgöra vad olika tecken betyder. I patentet är tanken att använda informationen för människa-maskin interaktion. Metoden innehåller igenkänning av en människa och dess kroppsdelar samt hens handrörelser. Detta är mer i stil med projektet, men den slutgiltiga målet här är inte att göra en mobilapp av det, och dessutom är grammatiken här oviktig.

Det finns även ett patent för en version av computer vision där programvaran [12] börjar tolka handtecken efter att ett första start-handtecken känns igen. Speciellt för denna metoden är också att den fungerar med olika människors händer, inklusive de som har handskar på sig, och att den fungerar även om det råder dåliga ljusförhållanden, denna tekniken är mycket lovande och skulle teoretiskt kunna användas som en app, frågan är hur billig den skulle bli.

Flera patent [13], [14] använder liknande principer, computer vision, för att samla data och använder sedan mjukvara för att jämföra tecken med tecknen som kom innan och efter så att grammatisk korrekt kommunikation kan uppnås.

Man har även använt sig utav Microsoft Kinect för att tolka teckenspråk [13] kombinerat med ett CNN (convolutional neural network), där algoritmen plockar ut identifierare för olika tecken och lagrar dessa i olika klasser för jämförelse.

Computer vision är ett brett fält som har många olika applikationsområden. Till exempel används detta verktyg för att assistera robotar som ska orientera och navigera i rummet, interaktiva reklamskärmar [15] och som hjälpmedel vid medicinska ingrepp [16].

Gemensamt för alla computer vision-system är att en dator lärs att tolka bild eller video genom att behandla bilden, känna igen kanter, former och andra identifierare. För att en dator ska kunna göra detta används statistiska verktyg. De bästa och mest avancerade metoderna, som t.ex. deep learning, är över gruppens akademiska nivå. Därför har en något enklare version använts.

C. Mål och användningsområden

Förutom projektets syfte, att underlätta för hörselskadade i deras kommunikation med omvärlden så finns det även andra applikationsområden för teckentolkning. Redan idag används tolkning av kroppsrorelser i tv-spel så som kinect eller Wii, men om en metod för bättre tolkning av finmekaniska rörelser utvecklats så skulle även mer avancerade spel av denna sort utvecklas. I spel som använder sig av virtuell verklighet så används för nuvarande kontroller för att hålla reda på hur spelarens händer förhåller sig till kroppen och den virtuella världen, men om detta inte behövdes så hade spelaren kunnat få en mer verklighetstrogen känsla.

Kommunikationsproblemen som följer hörselskada påverkar inte bara den hörselskadade individen utan även familj, vänner, kollegor och andra människor i deras omgivning [17]. Utan ett effektivt sätt att kommunicera försvinner interaktionen mellan två personer. Det framgår alltså att kommunikation mellan hörselskadade och deras omgivning kräver vidare hjälpmedel och kommer dessutom att vara bra för höjandet av livskvaliteten hos hörselskadade. Detta i kombination med att kamerabaserad teckenspråkstolkning har multipla användningsområden

gör att det finns en tydlig marknad för produkter och mjukvara som gör det enklare för hörselskadade att kommunicera.

D. Teori

I projektet användes multivariat normalfördelning för jämförelse av bilder och deras handtecken. I detta projekt så antas det att en bilds pixlar är normalfördelade för ett visst handtecken. Detta beskrivs med hjälp av en vektor med väntevärden för varje enskild pixel och en matris med varje pixels kovarianser. Kovariansen mellan två variabler är definierad som så att

$$\text{Cov}(X_1, X_2) = E(X_1 * X_2) - E(X_1) * E(X_2) \quad (1)$$

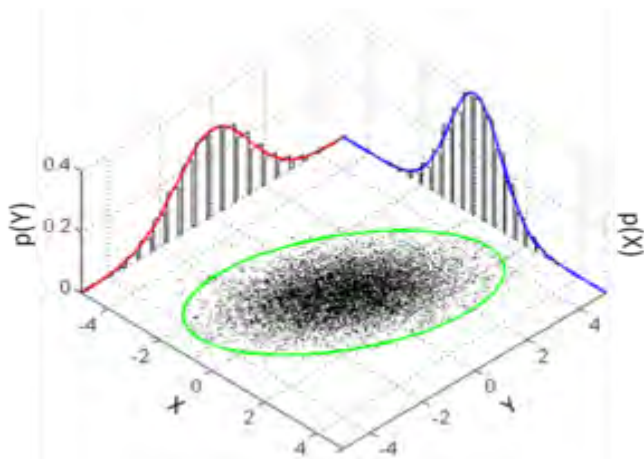
där $E(i)$ är väntevärdet för variabeln i . Jämför detta uttryck med uttrycket för varians hos en normalfördelning med en variabel:

$$V(X) = E(X^2) - E(X)^2 \quad (2)$$

Den multivariata normalfördelningens sannolikhetsfördelning beskrivs med funktionen

$$p(x; \mu, \Sigma) = \frac{1}{(2\pi)^{n/2} |\Sigma|^{1/2}} e^{-\frac{1}{2}(x-\mu)^T \Sigma^{-1} (x-\mu)} \quad (3)$$

där Σ är kovariansmatrisen. Förhållandet i en bivariat normalfördelning finns att beskåda i figur 3. Detta kan



Figur 3. Multivariat normalfördelning

jämföras med normalfördelningen med en variabels sannolikhetsfördelning, som beskrivs med funktionen

$$p(x; \mu, \sigma^2) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{1}{2\sigma^2}(x-\mu)^2} \quad (4)$$

där σ är variansen. Kovariansmatrisen som skapats innehåller då alla element $\text{Cov}(X_i, X_j)$ för samtliga variabler. Exempel: kovariansmatris för 3 variabler. Notera att $\text{Cov}(X_i, X_i) = \text{Var}(X_i)$.

$$\Sigma = \begin{bmatrix} \text{Cov}(X_1, X_1) & \text{Cov}(X_1, X_2) & \text{Cov}(X_1, X_3) \\ \text{Cov}(X_2, X_1) & \text{Cov}(X_2, X_2) & \text{Cov}(X_2, X_3) \\ \text{Cov}(X_3, X_1) & \text{Cov}(X_3, X_2) & \text{Cov}(X_3, X_3) \end{bmatrix} \quad (5)$$

För att kunna bilda en kovariansmatris som inte består av egenvärden med värde noll så krävs det att man använder

$n+1$ antal bilder vid beräkningen av kovariansmatrisen, där n är antalet pixlar. Detta innebär att datamängden som krävs snabbt ökar i takt med att upplösningen ökar. Detta går dock att kringgå genom doping av egenvärden, vilket beskrivs i metoddelen av denna rapport.

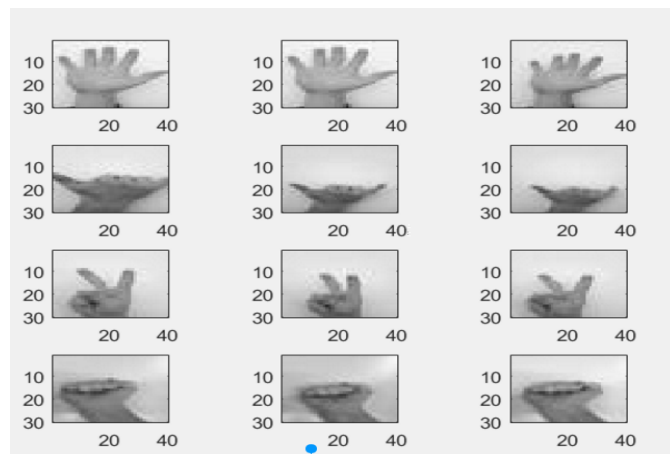
Sedan jämförs ett nytt bildvärde med denna normalfördelningen. Avstånden mellan bildens värde från de olika områdena beräknas. Det avståndet som är minst innebär att bilden är mest trolig att vara det tecknet.

För att göra denna beräkning så sker en invertering av kovariansmatrisen som skapas. Om man har för få bilder kommer denna kovariansmatris att få egenvärden som är 0, vilket innebär att matrisen inte uppfyller de kriterier som ställs upp för inverterbarhet. [18]

II. METOD

Den data som användes för både träning och testning av algoritmen inskaffades med en mobilkamera, med 12 megapixels (3024x4032) upplösning. Till en början togs stillbilder, men senare i projektet spelades även videoklipp in för att öka mängden data som användes till träningen. Ur dessa videoklipp plockades sedan varje bildruta ut och lagrades. För projektet användes fyra olika handtecken som finns att beskåda i figur 3.

Detta laddas sedan upp i matlab. Varje bild omvandlas till gråskala för att minska mängden data som behöver behandlas.



Figur 4. Testbilder med gråskala

Därefter skalades bilderna ner från en 3024x4032-matris till 3x4, 9x16 respektive 30x40. Detta då det inte är rimligt att behandla fullskaliga bilder på grund av tidsåtgången. Ytterligare en komplikation med att använda för stora matriser (för stort antal pixlar) i beräkningarna är att det ger egenvärden med värde noll vid uträkning utav kovariansmatrisen.

Detta kompenseras för genom att höja upp alla egenvärden av bildmatrisen till ett minvärde, så att kovariansmatrisen uppfyllde kraven för inverterbarhet. Detta värde, även refererat till som dopingvärde, hittades genom att titta på de icke nollvärddiga egenvärden som bildmatrisen hade. Dopingvärdet valdes till att vara den ungefärliga medianen hos dessa egenvärden. Bildmatrisens värden omvandlades därefter

från Uint8 till double-variabler, för att kunna applicera matematiska verktyg på dem. Varje bild gjordes om från en matris till en kolonnvektor, och alla kolonnvektorer lagrades i en matris. Från denna matris av kolonnvektorer beräknades kovariansmatrisen och en vektor med varje pixels väntevärde för respektive klass. Dessa värden för vardera tecken lagrades sedan på datorn för framtida användning.

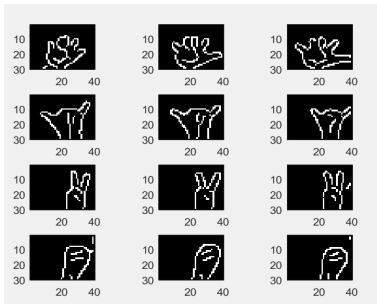
För att beräkna om en bild innehöll ett visst tecken så matades bilden in och skalades ner till samma pixelantal som fanns lagrat. För varje försök med olika upplösning krävdes först en omkalibrering av de lagrade värdena så att den lagrade upplösningen stämde överens med testbilden. Vid beräkning av sannolikheten för att den inmatade bilden tillhörde ett visst tecken så användes exponentdelen i den multivariabla sannolikhetsfördelningen i (3), det vill säga beräknades avståndet mellan inmatad testbild och den i förväg genererade fördelningen för vardera tecken med hjälp av

$$-\frac{1}{2}(x - \mu)^T \Sigma^{-1}(x - \mu), \quad (6)$$

där x syftar till testbildens pixelvärden. Eftersom att den första delen utav uttrycket för den multivariabla normalfördelningen,

$$\frac{1}{(2\pi)^{n/2} |\Sigma|^{1/2}} \quad (7)$$

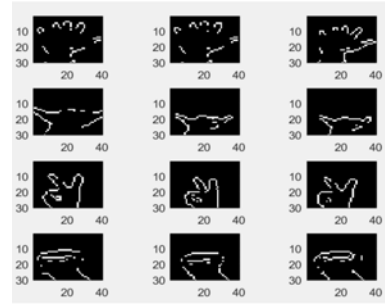
endast är en viktning som inte varierar med avseende på testbildens värde som matas in så ansågs denna vara oviktig vid jämförelsen mellan de olika bilderna. Utöver det varierade



Figur 5. Testbilder med Canny kantbehandling och skuggreducering

pixelantalet så användes även två olika filter för att upptäcka kanter i bilden. Detta för att ta bort mittpartiet i varje handtecken, och på så sätt skifta fokus till var fingrarna ligger i bilden. Två kantmetoder användes, Canny och Sobel, för att skilja handens kantlinjer från bakgrunden. Effekterna av dessa filter finns att beskåda i figur 5 och figur 6 Eftersom att bilderna togs mot en vit bakgrund så identifierade kantfunktionerna även skuggan som handen skapade, och gav således felaktiga representationer av hur handen skulle se ut. För att motverka detta sattes ett minimumvärde för bildens pixlar. Effekten av detta blev att både bakgrund och skugga släcktes ut, vilket gjorde handtecknet mer framstående.

Dessa olika filter och pixelvärden, kombinerat med variation av användning av skuggbehandling, lade sedan grunden för försöken som utfördes. Även antalet bilder som användes för träning, det vill säga för skapandet av normalfördelningen, varierades mellan 30, 90 och 270.



Figur 6. Testbilder med Sobel kantbehandling och skuggreducering

III. RESULTAT

A. Resultat med upplösning 30x40 och 270 träningsbilder

Upplösning	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40
Edgemetod	Canny	Canny	Canny	Canny	Sobel	Sobel	Sobel	Sobel	ingen	ingen
Doping	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	15	15
Skuggreducering	ja	nej	ja	nej	ja	nej	ja	nej	nej	nej
Testbilder från samma set som träningsbilderna	ja	ja	nej	nej	ja	ja	nej	nej	ja	nej
Träffsäkerhet (%)	83.3	83.3	25	25	25	41.7	25	25	75	50

B. Resultat med upplösning 30x40 och 90 träningsbilder

Upplösning	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40
Edgemetod	Canny	Canny	Canny	Canny	Sobel	Sobel	Sobel	Sobel	ingen	ingen
Doping	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	15	15
Skuggreducering	ja	nej	ja	nej	ja	nej	ja	nej	nej	nej
Testbilder från samma set som träningsbilderna	ja	ja	nej	nej	ja	ja	nej	nej	ja	nej
Träffsäkerhet (%)	58.3	50	41.7	25	16.7	83.3	25	25	33.3	25

C. Resultat med upplösning 30x40 och 30 träningsbilder

Upplösning	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40	30x40
Edgemetod	Canny	Canny	Canny	Canny	Sobel	Sobel	Sobel	Sobel	ingen	ingen
Doping	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	15	15
Skuggreducering	ja	nej	ja	nej	ja	nej	ja	nej	nej	nej
Testbilder från samma set som träningsbilderna	ja	ja	nej	nej	ja	ja	nej	nej	ja	nej
Träffsäkerhet (%)	50	58.3	25	25	25	41.6	25	25	50	8.01

Figur 7. Resultat med upplösning 30x40

Resultaten sammfattades i figur 8 och 7. Datan för 3x4 pixels upplösning togs inte med då det visade sig att alla bilder tolkades fel med denna upplösning, se figur 9 för förklaring. I denna del redovisas endast resultaten för olika mängd träningsbilder och upplösningen 9x16 samt 30x40.

Genom att testa på samma bilder som använts i träningssetet så kan 100% träffsäkerhet uppnås för 90 respektive 270

A. Resultat med upplösning 9x16 och 270 träningsbilder											
Upplösning	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16
Edgemetod	Canny	Canny	Canny	Canny	Sobel	Sobel	Sobel	Sobel	ingen	ingen	
Doping	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	15	15	
Skuggreducering	ja	nej	ja	nej	ja	nej	ja	nej	nej	nej	
Testbilder från samma set som träningsbilderna	ja	ja	nej	nej	ja	ja	nej	nej	ja	nej	
Träffsäkerhet (%)	66.6	100	25	25	50	58.3	25	33.3	75	50	

B. Resultat med upplösning 9x16 och 90 träningsbilder										
Upplösning	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16
Edgemetod	Canny	Canny	Canny	Canny	Sobel	Sobel	Sobel	Sobel	ingen	ingen
Doping	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	15	15
Skuggreducering	ja	nej	ja	nej	ja	nej	ja	nej	nej	nej
Testbilder från samma set som träningsbilderna	ja	ja	nej	nej	ja	ja	nej	nej	ja	nej
Träffsäkerhet (%)	66.6	100	25	16.7	25	25	25	25	50	25

C. Resultat med upplösning 9x16 och 30 träningsbilder										
Upplösning	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16	9x16
Edgemetod	Canny	Canny	Canny	Canny	Sobel	Sobel	Sobel	Sobel	ingen	ingen
Doping	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	15	15
Skuggreducering	ja	nej	ja	nej	ja	nej	ja	nej	nej	nej
Testbilder från samma set som träningsbilderna	ja	ja	nej	nej	ja	ja	nej	nej	ja	nej
Träffsäkerhet (%)	41.6	16.6	16.6	8.01	33	58.3	25	33	41.6	25

Figur 8. Resultat med upplösning 9x16

träningsbilder. Mellan 90 och 270 träningsbilder så syns antingen en förbättring av träffsäkerheten eller en oförändrad träffsäkerhet.

IV. DISKUSSION

Projektets mål var att hitta ett sätt att tolka teckenspråk för framtida användning i appformat. Detta i syfte att underlätta kommunikationen mellan de som enbart kommunicerar via teckenspråk och de som inte förstår teckenspråk, utan att behöva ta till skriven kommunikation. Detta utfördes genom att använda en multivariat normalfördelning för att representera varje pixels förväntade värden och varians för de olika handtecken som använts.

Vid användning utav samma testbilder som programmet tränats på kunde som högst 100% träffsäkerhet uppnås, med en minskning till 70% om testbilderna istället var bilder som inte används för träning. Det visade sig även att en nedskalning till 9x16 pixel gav bättre resultat än 30x40 eller 3x4.

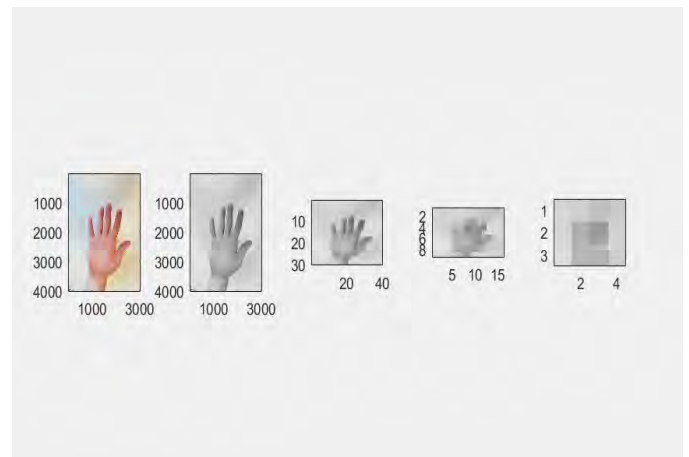
När det gäller kantigenkänning gav Canny bättre resultat än Sobel, då det är en känsligare metod som ger fler kantlinjer. Detta finns att beskåda i figurerna 5 och 6. Dock ger Sobel

ett litet bättre resultat överlag om testbilderna kommer från en annan källa än träningsbilderna. Antingen beror det på en svaghet i algoritmen eller på att det ger mer spelrum då Sobel inte är lika känslig för olikheter.

Bäst resultat för bilder från en annan källa än träningssetet ger algoritmen om varken skuggbehandling eller kantidentifiering används. Detta kan bero på att kantmetoderna släcker ut delar av bilderna helt vid uppträning, för att sedan få kantlinjer på helt andra positioner vid behandling utav testbilderna.

Om nedskalningen är för liten (3x4) finns inte tillräckligt med information för att algoritmen skulle kunna urskilja mellan de olika handtecken och därför tolkar den alla som samma handtecken. Förhållandet mellan upplösning och information i bilden visas i figur 9.

Något som också visades under projektets gång var att andelen korrekta gissningar kan bero på andra faktorer än att algoritmen fungerat bra. Detta särskilt för upplösningen 3x4 pixlar då alla gissningar blev öppen högerhand, vilket gav en träffsäkerhet på 25%. Om testbilderna inte hade bestått av några öppna högerhänder hade däremot precisionen sjunkit till 0%. Ett sätt att motverka denna interaktion mellan inkorrekta gissningar som leder till en överskattad träffsäkerhet hade varit att använda fler tecken. Detta skulle i så fall minska sannolikheten att en kedja av felgissningar till slut ger en korrekt gissning.



Figur 9. Jämförelse i datainnehåll för olika upplösningar med originalbild i färgskala som referens

För att förbättra algoritmen borde fler bilder användas, flera tiotusental istället för flera hundra. Detta skulle kunna göra algoritmen mer robust då medelvärdet blir mer exakt ju mer värden det skapas av. Dock så skulle större mängder av bilder leda till långa pass av väntetid då den tillgängliga beräkningskraften var begränsad.

Utöver detta så minskar även varje pixels varians i takt med att fler bilder används för träning. I projektet gjordes det inte då tiden som det skulle ta att testa koden blir längre ju mer bilder som används.

Enligt professor Åström finns det kraftfullare verktyg i Matlab i form av deep learning-toolboxar som skulle uppnå bättre resultat. Dessa används dock inte i detta projekt då gruppen inte har tillräckligt med bakgrundskunskap i toolboxens

algoritmer för att förstå vad som händer i koden och kunna förklara det i denna uppsats.

V. ETISKA ASPEKTER

Även om projektet inte kunde slutföra utvecklingen utav en teckenspråkstolkning i appformat så är det tydligt att det finns ett behov av liknande teknologi. Utöver att göra vardagen enklare för teckenspråkstalare så öppnas andra möjligheter upp av sådan här teknik.

Till exempel kan språkbarriären mellan tecknare och talare ge upphov till missförstånd, att den hörselskadade individen inte får de vaccinationer som de behöver och dylikt [19]. Detta skulle kunna åtgärdas om tecknaren hade en applikation i sin mobiltelefon som kan översätta teckenspråket till exempelvis skriven text.

Förutom på sjukhus används tolkar även för rättegångar, vilket kan vara väldigt kostsamt [20]. Dessa skulle kunna ersättas med en app för översättning men om detta infördes skulle en viktig länk mellan det döva samhället och det talandet förminska, då de monetära incitamenten minskas.

Bilderna på studenters händer som användes i projektet togs endast efter givet samtycke, utan något sätt att identifiera personen utifrån händerna. Eftersom att endast ett fåtal sorters händer användes i projektet så löper algoritmen en risk att vara helt funktionslös för exempelvis mörkhyade individer, då den skuggbehandling som applicerades på bilderna skulle ta bort den mörkare handen. Detta behöver tas i åtanke om framtida försök utförs.

VI. HÅLLBAR UTVECKLING

För projektet behövs endast datorer och slutprodukten är mjukvara som kan användas av vanliga mobiltelefoner. Detta innebär att ingen ny hårdvara måste produceras, vilket i sin tur gör projektet hållbart ur en materialsynpunkt. När det gäller samhället är målet med programvaran att integrera teckenspråkstalare i arbetsplatser och skolor. Av denna interaktion kan både teckenspråkstalare och resten av samhället dra nytta och det skapar ett mer hållbart och utvecklat samhälle.

VII. SLUTSATS

Metoden som användes för projektet gav relativt bra träffsäkerhet med förhållandevis få bilder. Den skulle kunna förbättras med större mängd bilder som används för träning av algoritmen. För detta behövs dock mer beräkningskraft i form av exempelvis molntjänster för att träningen annars skulle ta alldeles för lång tid.

Algoritmen visar att konceptet, tolka handtecken med hjälp av kamera och matlab, fungerar. Den har dock flera svagheter som måste åtgärdas; kunna använda den när händerna är i rörelse, tolka tecken med olika bakgrund, högre träffsäkerhet med mera. Därför är slutsatsen att bildbehandlings verktygsåldor som finns i bland annat matlab är bättre att använda.

Tekniker för tolkning utav handgester har en stor potentiell marknad och behöver utforskas ytterligare. För att dels förbättra livet för hörselskadade, men även för att kunna förbättra kommunikationen mellan autistiska barn och folk i deras närhet. Utöver detta finns en möjlighet att använda

teckenspråkstolkning i spel som baseras på kroppens rörelse och placering som exempelvis Wii eller spel baserade på virtuell verklighet.

A. Slutord

Vi skulle vilja tacka professor Kalle Åström från Lunds Matematikcentrum som var vår mentor i detta projektet. Tomas Jansson vid Lunds medicintekniska avdelning gav oss även tillståndet att göra projektet då det kom från oss och tipsade oss att ta kontakt med professor Åström, detta tackar vi hjärtligt för. Arbetsuppdelningen i projektet var likafördelat. Om det ska delas så gjorde Carl Sjögren lite mer av programmeringen och Benjamin Luikert kom med ideer och skrev lite mer i rapporten.

REFERENSER

- [1] Centre, W. M. (2017, February 05). Deafness and hearing loss. Retrieved May 03, 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>
- [2] S. (2017, May 15). Deafness. Retrieved May 15, 2017, from <http://www.sanda.org.za/index.php/resources-links/deafness>
- [3] Hall, W. C. (2005, November 01). Decrease of Deaf Potential in a Mainstreamed Environment. Retrieved May 15, 2017, from <http://www.personalityresearch.org/papers/hall.html>
- [4] <http://blog.aarp.org/2015/11/18/the-skype-solution-for-the-deaf-and-hard-of-hearing/>
- [5] S. (2017, January 01). How do I set up and use Skype Translator? Retrieved May 15, 2017, from <https://support.skype.com/en/faq/FA34542/how-do-i-set-up-and-use-skype-translator>
- [6] Rosmarie. "Kommunikation del 2. Ällt om autism » Kommunikation del 2. N.p., n.d. Web. 19 May 2017.
- [7] W. (2011, July 20). Sveriges Dövas Riksförbund - Teckenspråk i världen. Retrieved May 04, 2017, from <http://www.sdr.org/teckensprak/teckensprak-i-varlden>
- [8] Mobile Phone Access Reaches Three Quarters of Planet's Population. (2012, July 17). Retrieved May 03, 2017, from <http://www.worldbank.org/en/news/press-release/2012/07/17/mobile-phone-access-reaches-three-quarters-planets-population>
- [9] Patterson, R. (2002, October 17). US20020152077A1 - Sign language translator. Retrieved May 03, 2017, from <https://patents.google.com/patent/US20020152077A1/en?q=handsign>
- [10] U. (2016, April 12). UW undergraduate team wins \$10,000 Lemelson-MIT Student Prize for gloves that translate sign language. Retrieved May 15, 2017, from <http://www.washington.edu/news/2016/04/12/uw-undergraduate-team-wins-10000-lemelson-mit-student-prize-for-gloves-that-translate-sign-language/>
- [11] Fujimura, K. (2007, December 11). US7308112B2 - Sign based human-machine interaction. Retrieved May 03, 2017, from <https://patents.google.com/patent/US7308112B2/en?q=handsigns>
- [12] Antoniac, P. (2015, January 08). US20150009124A1 - Gesture based user interface. Retrieved May 03, 2017, from <https://patents.google.com/patent/US20150009124A1/en?q=handsigns&page=1>
- [13] Tardif, J. (2011, December 08). US20110301934A1 - Machine based sign language interpreter. Retrieved May 03, 2017, from <https://patents.google.com/patent/US20110301934A1/en?q=human>
- [14] Sakiyama, T., Oohira, E., Sagawa, H., Ohki, M., Sagara, K., Inoue, K., . . . Abe, M. (1999, September 14). US5953693A - Sign language generation apparatus and sign language translation apparatus. Retrieved May 03, 2017, from <https://patents.google.com/patent/US5953693A/en?q=human>

- [15] <http://www.reactrix.com/>
- [16] <http://www.clarontech.com/>
- [17] Lehane, Christine M., Jesper Dammeyer, and Peter Elsass. Sensory loss and its consequences for couples' psychosocial and relational wellbeing: an integrative review. *Äging and Mental Health*. N.p., 07 Jan. 2016. Web. 19 May 2017.
- [18] Halilovic, A. (2011, October 05). EGENVÄRDEN och EGENVEKTORER. Retrieved May 15, 2017, from http://ingforum.haninge.kth.se/armin/ALLA_KURSER/SF1624/EGENVEKTORER.pdf
- [19] McKee, Michael M., Steve L. Barnett, Robert C. Block, and Thomas A. Pearson. "Impact of Communication on Preventive Services Among Deaf American Sign Language Users." *American journal of preventive medicine*. U.S. National Library of Medicine, July 2011. Web. 19 May 2017.
- [20] Svanberg, N. (2015, April 9). Dyr anställa döva. Retrieved May 15, 2017, from <https://www.svt.se/nyheter/inrikes/dyr-anstalla-dova>
- [21] H. (2007). äh, det var inget viktigt. Retrieved May 04, 2017, from <https://hrf.se/wp-content/uploads/2016/06/rapport07.pdf>

Unexpected similarities: Learning about how brain cells communicate from the venus fly trap

Giulia Core (BME-16), Valentina Vitali (BME-16)

Abstract—Electrical signals and rapid closure of the carnivorous plant venus fly trap (*Dionaea muscipula*) have been attracting the attention of researchers since the 19th century. Many similarities exist between fast processes involved in carnivorous plants and electrical signals of the human nervous system. In our project we took advantage of these similarities to create a lab experiment that introduces children to the mysterious field of the brain. The experiment consists in the stimulation of the plant by mechanical stimuli, in the recording and amplification of the signal and in the visualization of the result through a graphical user interface. In order to record and amplify the electro-chemical signal of the stimulated venus fly trap, an electrical circuit was built and an Arduino UNO board was used to convert the analog signal into a digital one. Furthermore, we investigated some characteristics of the signal elicited in the venus fly trap in order to confirm results described in the literature, and compare these characteristics to the action potential of the human nervous system. The average duration of the action potential of the plant was calculated to be 3.3 s, and the average peak-to-peak amplitude to 58 mV. These values are in the range of what is reported in the literature, and thus show that this experiment can be used for educational purposes to introduce children to the field of neuroscience from an easy and playful point of view.

I. INTRODUCTION

IN living beings a fast signal communication is necessary to provide a rapid response to the environment. In particular, in the animal kingdom, the coordination of motor responses and the communication among organs is based on ion movements and, thus, on electrical signals. Contrary to what one might think, electrical signals do not belong exclusively to the animal kingdom, and many similarities exist between fast processes involved in carnivorous plants and signals of the nervous system [1]. The carnivorous plant that has aroused scientists curiosity since the time of Charles Darwin is the Venus Fly Trap (*Dionaea muscipula*).

A. Background

The possibility that a neurotransmission mechanism similar to that in higher animals also exists in the venus fly trap (VFT) was first suggested in 1873 [2], and the existence of receptor potentials was found in 1965 [3]. Moreover, the action potential (AP) mechanism in *Dionea* was shown to be an “all or nothing” process [1], similar to APs in certain animal cells such as neurons. All these observations led to think

that plant and animal neurotransmissions could have similar general mechanisms.

Thanks to further studies it was demonstrated that the VFT has a nerve-like cellular equipment that does not have the same level of great complexity as in animal nerves, but that enables an efficient long distance signal communication [4], useful to respond rapidly to environmental stress factors.

In order to investigate the conduction of the electrochemical excitation in animal cells, the recording electrode needs to be brought very close to the cells eliciting the APs, and the invasive techniques required would not be feasible in a teaching context. Therefore, our project wants to raise children’s interest in the human brain and its mechanisms by using the similarities between our nervous system and the pathways for electrical signal transmission in the VFT. These similarities make the explanation of the human nervous system easier and make it more interesting from a children’s point of view.

The project focuses on the detection of the biological signal that elicits the trap closure: we provide a circuit to record and amplify the signal and a graphical user interface (GUI) to visualize it.

The aim of our project is to create an easy lab experiment that arouses people’s curiosity to the mysterious field of the brain by allowing them to record the AP and observe the electrophysiology of the venus fly trap. Our attention was also focused on guaranteeing the reproducibility of the experiment, which will be used for educational purposes in *Vattenhallen Science Centre* (Lund, Sweden). The experiment will address children from the age of 8 years.

B. The venus fly trap

The venus fly trap is an insectivorous plant that catches insects using a pair of leaves that act as a trap [5]. The leaves of the VFT have two parts: the upper leaf, in which the trap is located, and the lower leaf. The trap is a shell-like ‘open mouth’ composed of a pair of symmetrical lobes with three sensitive hairs protruding from the inner side of each lobe. Numerous cilia are located on the edge of each lobe and do not allow the prey to escape (Figure 1). Bending the trigger hairs through an external mechanical stimuli leads to the activation of mechanosensitive ion channels and the generation of receptor potentials, which induce an AP [6]. The AP propagates throughout the upper leaf causing a rapid closure of the lobes and can be recorded from all the major tissues of the trap [7]. At least two consecutive touches within 20 s are needed for trap closure and this mechanism ensures that the plant does not waste energy on capturing non-living-prey [8]. However, when the temperature is higher than 35 °C

Submitted June 9, 2017

Email address: {giulia.core@mail.polimi.it, valentina.vitali@mail.polimi.it}

Technical supervisor: Anders J. Johansson, Department of Electrical and Information Technology, Lunds Universitet

Technical supervisor: Ulrike Richter, Faculty of Medicine, Lunds Universitet



Figure 1. Adult and healthy venus fly trap.

only one stimulus is required for the closure of the trap [9]. The mechanism of the VFT closure is still unclear and many conflicting models have been proposed, stretching from a rapid loss of turgor pressure in ‘motor cells’ to the snap-buckling instability [10]. The biochemical mechanisms behind the trap movement, instead, have been extensively studied, showing that the generation of the AP in *Dionea* is strictly dependent on both potassium [11] and calcium [7] ions. In particular, the trap closure is triggered by a rise in the cytoplasmic concentration of Ca^{2+} or a Ca^{2+} -activated regulatory complex. When a concentration threshold is overcome, the trap closure is elicited. The influx of Ca^{2+} into the cells with one mechanic stimulation is not sufficient to exceed the concentration threshold and to cause the trap-closing movement, therefore, two stimulations of the sensory hairs are necessary within a certain range of time. The “concentration-threshold” mechanism in [7] was the first attempt to explain the “memory” of the *Dionea* that was successively confirmed to be attributed to a stepwise accumulation of a trap-closing factor in [1]. Many measurements of the AP in the VFT were performed, pointing out different amplitudes (from 10 mV to 150 mV) and durations (from 100 ms to 10 s) [12]. Once the trap is closed, digesting mechanisms take place.

In this paper the attention is focused on the electrophysiology of the trap-closing mechanism.

C. Project Review

A lab experiment to investigate the biochemical signal that causes the trap closure in *Dionea* has previously been created by *Backyard Brains* (BYB) [13], and was used as a starting point in this project.

In order to reach our aim, we started from building the electrical circuit following the circuit schematics provided by BYB [13]. We ensured that the circuit worked properly for sinusoidal signals with a frequency in the bandwidth of 0.2-130 Hz and with an amplitude similar to the minimum amplitude of the AP that was recorded in previous studies (about ± 10 mV) [12] (see section III-B). We used an Arduino

board to convert the analog signal to a digital signal, and we enabled the communication between MATLAB and Arduino with the *MATLAB® Support Package for Arduino® Hardware*. We then created a GUI in MATLAB in order to visualize the recorded signal (see section III-C). Once all the circuitry was working and the GUI was ready, we started recording the AP of *Dionea* so that it was possible to observe the mechanism of signal transmission (see section III-D). The last part of the project consisted in evaluating and improving the performance of the circuitry, and in evaluating the reproducibility of our experiment. Finally, we analysed the AP of the VFT and pointed out similarities and dissimilarities between the AP of neurons and of the VFT.

II. ETHICAL AND SUSTAINABILITY ASPECTS

A. Ethics

The investigation of electrical transmission mechanisms in animal cells requires invasive techniques in which the recording electrodes need to be brought very close to the cells eliciting the APs. Therefore, ethical guidelines should be carefully followed in this measurement context. In our project, plants were used in order to explain the human neurotransmission mechanisms and in this way it was possible to avoid ethical issues. The VFT could be easily purchased in common flower shops, without any particular permit.

B. Sustainability

Our experiment was conducted in lab rooms and in our apartments without demands of sterile equipment or usage of disposable objects. The main plastic components used in the experiment were the plastic pots in which the plants were purchased.

III. MATERIALS AND METHODS

A. Plants

The *Dionaea muscipula* were purchased from Lilla Fiskaregatans trädgårdsbutik (Lund, Sweden) and grown in plastic pots of 3.5 cm in depth. The soil was treated with distilled water (as suggested in [14]) and the plants were located in places exposed to sun light. All experiments were performed on healthy adult specimens.

B. Data acquisition

The main purpose of the circuit for data acquisition is to amplify the signals and reduce the noise. The circuit consists of three main parts: an instrumentational amplifier buffer, a band-pass filter and amplification step, and a final amplification stage (Figure 2). The buffer was used to isolate the power source (the plant) from the remaining part of the circuit and to reproduce the same voltage signal as output. It also ensures that the power of the circuit is disturbed as little as possible. The second stage provides a filter with a 0.2-130 Hz band-pass and a 22 times amplification of the input signal. The band-pass was chosen according to the circuit provided by BYB. The last operational amplifier (Op-Amp) was used in an inverting configuration in order to allow a

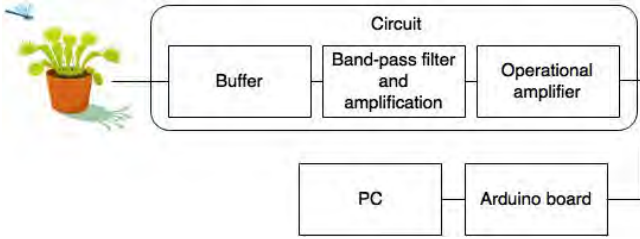


Figure 2. Block diagram of the signal transmission from the plant to the PC.

correct successive visualization of the signal. The details on the circuit components can be found in appendix A.

The built circuit was tested using a power generator (*Powerbox 3000 B*), a function generator (*LFG-1300*) and an oscilloscope (*LeCroy WaveAce 202*). The power generator was used to set the reference voltages for the Op-Amps, while the function generator to create sinusoids with amplitudes between 10 mV to 150 mV and different frequencies. The oscilloscope was used to observe the output signal of the circuit and to compare the actual output with the expected output signal.

After a number of modifications (see section IV-A) the circuit was linked to the Arduino UNO board. Arduino UNO is a microcontroller board based on the ATmega328P [15] and to use it, it is necessary to download the open-source Arduino software. The 5 V and ground pins of the Arduino board were used to set the voltage references of the single-supply Op-Amps and the function generator was used to produce a sinusoidal signal (as shown before). The output of the circuit was connected to one of the analog inputs of the board and the board was connected to the computer through a USB connection (Figure 2). A built-in example (`AnalogReadSerial`) enabled the serial communication between Arduino and the computer, so that it was possible to verify the sampling rate of the Arduino UNO ADC and the signal acquisition. The Arduino UNO board was used to convert the analog signal to a digital one, it has a 10 bits ADC and the ADC clock is set by default to 125 kHz.

The communication between the Arduino board and MATLAB was enabled using the *MATLAB® support package for Arduino® Hardware*. This support package allows to read and write sensor data through Arduino and see the results in MATLAB without having to compile Arduino itself. In order to acquire signals with a higher sampling frequency without losing important information, a serial communication between Arduino UNO and MATLAB of 115200 baud was set. In this way the Shannon's theorem, which states that the sampling rate must be at least twice the maximum frequency contained in the signal (130 Hz in our case), was fulfilled.

Finally the built circuit was tested using the VFT. To measure APs in the VFT, non-invasive surface potential electrodes were used. One tin solid core wire (electrode) was fixed with an electrode holder to the outer trap surface, and the electrical connection was improved by applying a droplet of a conductive gel (Blågel eletrodgel by Cefar) (Figure 3). A second wire was put into the soil of the plant and set as the reference ground of the circuit.



Figure 3. Surface potential recording.

C. Data visualization

A GUI was developed using the development environment GUIDE of MATLAB R2016b. The main purpose of our GUI is the visualization of the APs of the VFT in real-time in such a way that children's attention can be caught. Furthermore, we aimed for the GUI to allow to save the recorded data such that signal processing methods can be applied following the experiments.

D. Signal processing

The recorded signals from the VFT were analysed in order to verify what was previously assessed in the literature and to study the reproducibility of the proposed experiment. Our investigation was especially focused on the duration and the amplitude of the APs.

The first steps in the preprocessing of the recorded signals were the application of a forward-backward IIR notch filter in order to remove the power-line interference at 50 Hz and a 50-point moving average filter to smooth out the signals.

The circuit described in III-B introduces a DC component in the output signal and it is necessary to take its value into account in order to determine the real amplitude of the APs. Once the recording started we always waited 10 s before bending the VFT's hairs, these 10 s were used to compute the real DC of the signal. The DC offset was obtained computing the average of the first 10 s of each recording and was then subtracted from the total signal. In this way the obtained signal is centred around ~ 0 V.

The maximum and minimum amplitude of the recorded signal were found and their values were divided by the gain of our circuit to obtain the amplitude of the original signal of the plant. The found values were also used to compute the peak-to-peak (PP) amplitude of the APs.

Moreover, the duration of the APs was computed. The start of the AP was defined to be at 20% of the maximum amplitude value. Similarly, the end of the APs was defined as the point where the amplitude of the signal overcomes 20% of the minimum amplitude value. The two time instants found for the start and end of the AP allowed us to compute the duration of the AP.

The measurements were conducted in different environments (laboratory and our apartments) at a room temperature that oscillated between 20 °C and 22 °C. All the signals were recorded from different plants and leaves. Signals from the same leaves were taken so that some of them were obtained bending the hairs on the lobe on which the recording electrode was attached, while some others on the opposite lobe (see section IV-C).

IV. RESULTS

A. Data acquisition

The built circuit was tested in order to analyse it and improve its performance. After different trials, we decided to use the Op-Amp in the last stage of the circuit with a unitary gain, thus not introducing any further amplification of the signal. The final version of the circuit is shown in appendix A.

B. Data visualization

A screenshot of the developed GUI is shown in Figure 4. In order to catch the attention of children, images and bright colours were added. It contains zoom in and zoom out functionalities, and three buttons: the *start* button, the *marker* button and the *save* button. The first button is a toggle button marked with the word *start* written in green bold letters, and it allows to begin the recording. Once the “start button” is pressed, the same button displays the word *stop* in red bold letters in order to indicate that if the button is pressed a second time the recording will be interrupted. The second button is a push button marked with the word *marker* and allows the user to draw a red vertical line in the same plot that shows the voltage of the VFT. The last button is also a push button and displays the word *save*. It gives the possibility to save figures and the data. The visualized data are saved in a table both in the Excel Workbook format and with the extension *.mat*, in four columns: hours, minutes, seconds and voltage values. When the “start button” is pressed for the first time, the time is set to 00:00:00 (hh:mm:ss) and the visualization of the signal starts.

In our GUI the recorded signal is plotted in real-time and it is possible to visualize it sliding on the screen within an interval of 10 s. The VFT signal is also displayed in an amplitude interval of 0-5 V according to the voltage references specified in III-B. This interval does not correspond to the real values of the signal, therefore, the displayed signal is amplified and has a DC component of ~ 2.5 V.

Finally, we observed that real-time plotting of the recorded signal leads to a loss of information in the frequency content. The sampling rate of the visualized and successively saved signal is, indeed, very low but it is sufficient to visualize the morphology and the duration of the AP of the VFT.

C. Signal processing

A total of 29 signals were acquired from 6 different leaves belonging to four different VFTs. As already stated in section III-D, signals from the same leaves were taken from the two

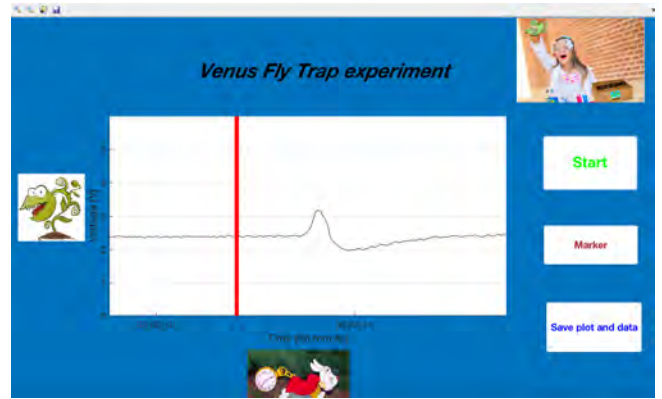


Figure 4. GUI window.

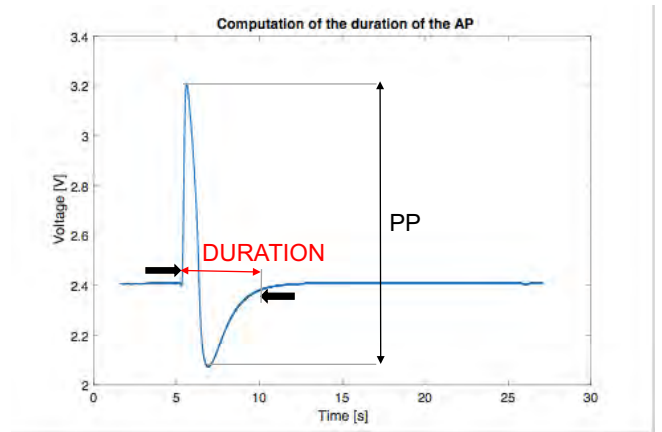


Figure 5. Peak-to-peak amplitude and duration of the APs. Computation of the duration of the AP: the start point is at 20% of the maximum amplitude and the end point is at the 20% of the minimum amplitude. These two time instants allowed us to compute the duration.

different lobes in order to investigate if there were some differences between signals with respect to the location of the recording electrode.

The average sampling frequency of the signals recorded through the serial communication between Arduino UNO and Matlab (see section III-B) was 773 Hz.

The maximum and minimum amplitudes of the acquired APs were computed as explained in section III-D and were used to investigate the PP amplitude (Figure 5). In order to evaluate the conduction of the electrochemical excitation inside the lobes of the trap, we computed the box plots of the PP amplitude of the APs recorded from the two different lobes of the same leaf and we performed an independent t-test. In Figure 6 an example of a PP box plots is provided: the PP amplitudes in the two lobes do not differ significantly. The independent t-test (5% significance level) allowed us to assess that the mean PP amplitude of the APs belonging to the two different lobes were equal. After observing the PP measurements from different lobes and leaves and performing the independent t-test, we arrived at the conclusion that the APs remain the same strength as they travel through the upper leaf, confirming what has been already assessed in the literature [12].

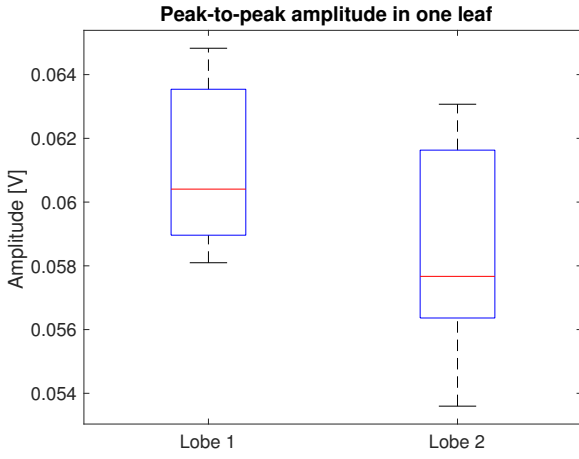


Figure 6. Box plots of the peak-to-peak amplitude of two lobes belonging to the same leaf. *Lobe 1* (left) is the lobe where the recording electrode is attached, *Lobe 2* (right) is the opposite lobe with respect to the recording electrode. The box plot is a standardized and short way of displaying the distribution of data, based on the five number summary: minimum, first quartile, median, third quartile and maximum.

As regards the maximum amplitude of the APs, the interquartile range (IQR), which is defined by the first and third quartile, is between 34 mV and 39 mV (Figure 7) and also reflects the described values in the literature [12].

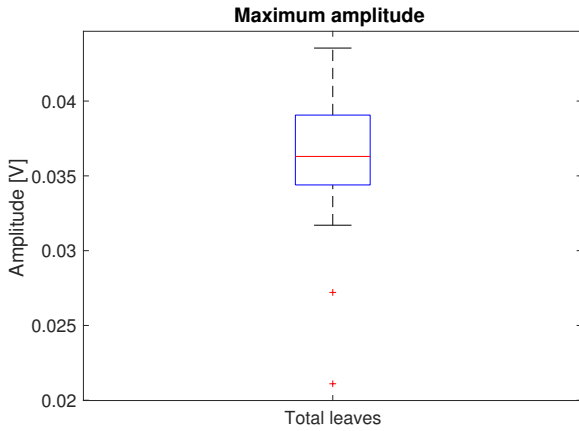


Figure 7. Box plot of the maximum amplitude detected for each leaf during an AP.

Unlike for the amplitude values of the APs, we do not expect the AP duration to change during the conduction in the upper leaf, i.e., the AP duration is expected to be independent of the location of the recording electrodes. The duration of the APs was computed as explained in section III-D (Figure 5). In Figure 8 a summary of the AP duration distribution is shown. It is possible to observe that the IQR is between 2.6 s and 4.0 s with the median value of 3.5 s. Moreover the mean value of the AP duration resulted to be 3.3 ± 0.9 s. The obtained values confirm the evaluated range in the literature [12].

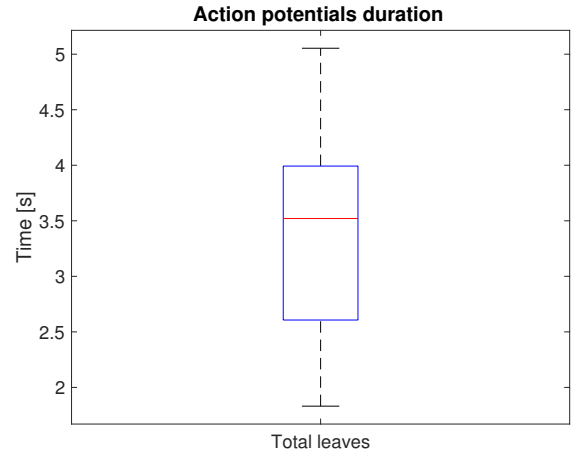


Figure 8. Box plot of the AP durations in the different measurements.

Interestingly, the PP amplitude of APs does not change during consecutive mechanical stimuli, while the APs duration does (Figure 9). In the literature this phenomenon is not discussed and we could not find a reasonable explanation to this.

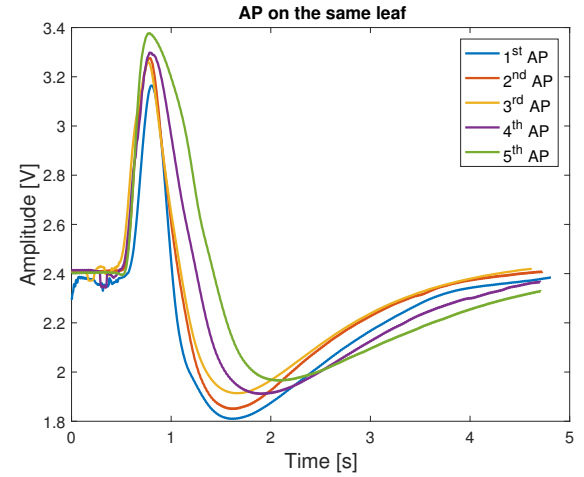


Figure 9. Five consecutive APs, recorded from the same leaf. Between two consecutive mechanical stimuli more than 20 s passed.

Finally, during our experiment we observed that the amplitude of the recorded signal depended upon the strength of the stimulus just for very light touches, while if the VFT was stimulated by more than a very slight touch, the effect was independent of the degree of bending of the triggering hairs. This conclusion confirms what was assessed in [8].

V. DISCUSSION

A. Data acquisition

The present work shows a lab experiment that can be used for educational purposes. Since our attention was also focused on guaranteeing the reproducibility of the experiment, we point out some important and practical points in order to acquire

data with as little noise as possible.

First of all, during the acquisition, the recording and the reference electrodes should be kept as close as possible to each other and to the leaf of the plant. In this way the signal is less affected by noise. Secondly, the reference electrode should be placed where the soil is humid and well uniform in the pot.

B. Data visualization

We decided to develop the GUI in MATLAB because it is an environment we are familiar with. However this decision introduces a limitation to our lab experiment: the teachers and the people who would like to reproduce our experiment need a MATLAB licence.

The lab experience we developed is thought to be used by adults, but we think it is important that children can take more actively part in the experiment. For this reason, the “marker button” was added to our GUI. The teacher, for example, can ask one of the children to push this button when the mechanical stimulus is applied to the hairs of the VFT, and once the button is pushed, that time instant will be marked by a vertical red line on the plot. In fact, the vertical red line can be used for different purposes, stretching from having a reference point for further investigations to visualizing the latency between the mechanical stimulus and the AP.

Furthermore, the push button that displays the word *save* gives the possibility to save figures and the data. We decided to save the recorded data in two different formats (Excel Workbook format and with the extension .mat) in order to respond to different skills and needs of the person who is using the experiment.

C. Signal processing

In our project a great attention was focused on guaranteeing the reproducibility of the proposed lab experiment. In order to investigate this we evaluated the possibility of obtaining measurements similar to the ones shown in the literature, acquiring the VFT signals in everyday life environments. We decided to acquire the signals in different conditions and places: some measurements were performed in the university laboratory, some others in our apartments and at temperature varying between 20 °C and 22 °C. We observed that it was always possible to acquire signals if the guidelines suggested in section V-A were followed.

Obviously, if a more in-depth study of the electrophysiology of the VFT is needed, the measurement conditions should be kept the same, and often the usage of a Faraday cage is suggested [9].

D. Similarities and dissimilarities between the action potential of the plant and of the neurons

Electrical processes associated with rapid closure of the carnivorous plant VFT have been widely investigated for centuries [4]. Even if this type of plant has been known since Darwin’s time, insights about the electro-chemical coupling associated with the trapping behaviour of *Dionaea* remained limited. However, many similarities between fast processes

involved in the VFT and signals of the human nervous system exist. Indeed, ion channels and chemical factors are at the basis of triggering mechanisms in both systems, but while Na^+ and K^+ play the most important role in humans’ nervous system [16], Ca^{2+} [11] and K^+ [7] cover the main function in the activation of the AP in the VFT.

In our nervous system there are important differences between graded potentials and APs of the neurons. Graded potentials have an amplitude proportional to the strength of the stimulus and their amplitude is generally small. They can be summed over time (temporal summation) and across space (spatial summation). Graded potentials should increase the membrane potential of the neuron until the voltage threshold value before an AP can be elicited. The existence of receptor potentials in the VFT was found in 1965 [3] and it was also demonstrated that a receptor potential always precedes an AP [9].

Moreover, the generation of the AP in animal cells is an “all or nothing” process [16], and also the AP mechanism in the VFT was shown to be an “all or nothing” process [1].

A similarity between the “memory capability” of the VFT [1] and the spatial and temporal summation of receptor potentials in neurons can also be evaluated. Spatial summation in the nervous system is the mechanism of achieving an AP in a neuron which receives simultaneous input from several cells via its dendrites, which are branch-like extensions from the cell body. The spatial summation takes place when the potentials from the dendrites are summated, and the AP in the neuron will be generated only when the summed potential reaches the threshold. The spatial summation in the VFT can be seen as the mechanism thanks to which the trap closes when two different trigger hairs are bent once, within a 20 s interval. Temporal summation in the nervous system, instead, is the additive effect produced by a number of successive inputs arriving at the same part of the dendritic branch. In the VFT, temporal summation occurs when a single sensory organ is bent twice within 20 s and, thus, the trap closure is elicited.

We acquired the AP signals waiting more than 20 s between two consecutive bending of the hairs and we observed that the trap closes after a number of stimula bigger than two. Therefore, even if ones waits more than 20 s between two consecutive stimulations, the plant will close at some point. This finding agrees with [8], in which a relation between the number of stimulations needed for the trap closure and the time interval between two consecutive stimulations was discovered. In [1] it was assessed that the trap closure relies on a rise in the cytoplasmatic concentration of a trap-closing factor and is triggered when a concentration-threshold is overcome (Figure 10). Therefore we can suggest that in the VFT the process of re-establishing the initial chemical and electrical conditions is long, and a slow stepwise accumulation of the trap-closing factor occurs causing the trap to close after many stimuli. However, to investigate this phenomenon in depth, more biological studies should be performed.

Finally, we must point out the first evident difference between the AP of the VFT and of our neurons: the duration. The AP of our neurons lasts 2 ms while the signal of the VFT has a duration of in average 3 s (Figure 11).

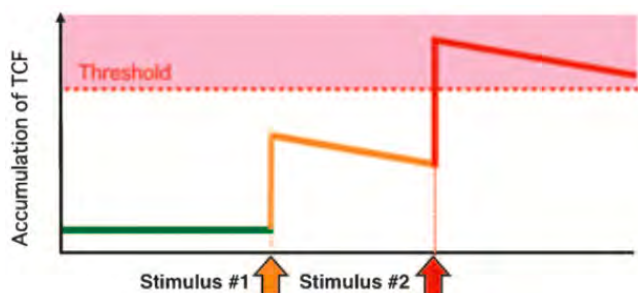


Figure 10. “Memory” in the VFT attributed to stepwise accumulation of a trap-closing factor (TCF). Taken from [1].

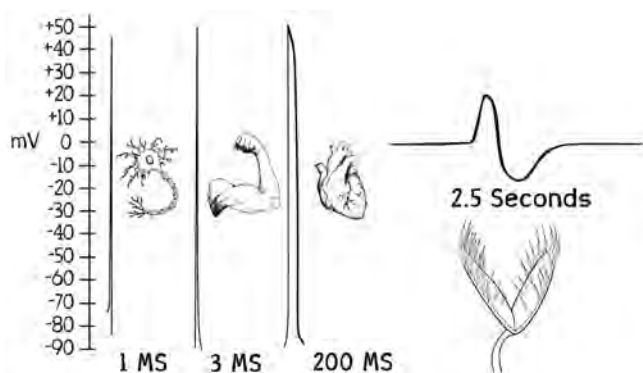


Figure 11. Action potentials of neurons, muscular cells, heart and VFT. Taken from [13].

All the similarities listed above show that even if the nerve-like equipment of the VFT has not reached the same level of great complexity as in animal nerves, a simple neural network has been formed enabling an efficient communication over longer distances.

E. Further developments

Various enhancements are necessary to create a real lab experiment and to make it accessible to e.g. school teachers and their classes.

The main development regards the production of a kit that allows people to reproduce the experiment on their own. The first step is the production of a printed circuit board (PCB) that will replace the breadboard. The second step is the creation of a GUI that does not depend on MATLAB, so that it will not be necessary to have a MATLAB licence to reproduce the experiment. Finally, a nice and colourful box will be designed in order to contain all the equipment for the venus fly trap experience. The estimated price for the kit (including the Arduino UNO board, PCB and conductive gel) is 500 kr and it will be available at *Vattenhallen Science Centre* (Lund, Sweden). In September 2017, in occasion of the “Amazing brain week”, our project will be presented and the lab experiment performed in order to arouse children’s curiosity in the field of neuroscience.

A second development involves the possibility of finding an alternative stimulus to the mechanical one. Indeed, it has been demonstrated that the closure of the trap in VFT can be triggered by other kind of external stimuli other than mechanical, such as electrical [12]. Some investigations can be conducted in order to perform an electrical stimulation of the plant and to add the possibility of stimulating the plant to our experiment.

VI. CONCLUSIONS

The development of a lab experiment that can arouse people’s curiosity to the mysterious field of the brain was carried out, and similarities and dissimilarities between the AP of the VFT and humans’ neurons were investigated. Our results pointed out that the experiment can be used for educational purposes to introduce children to the field of neuroscience from an easy point of view. This project has offered us a chance to work with different subjects, stretching from biology to electronics, which helped us to build up a practical experience of a real-life problem as biomedical engineers.

VII. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Prof. Anders J. Johansson and Ulrike Richter, who always supported the project with their concrete suggestions and enthusiasm.

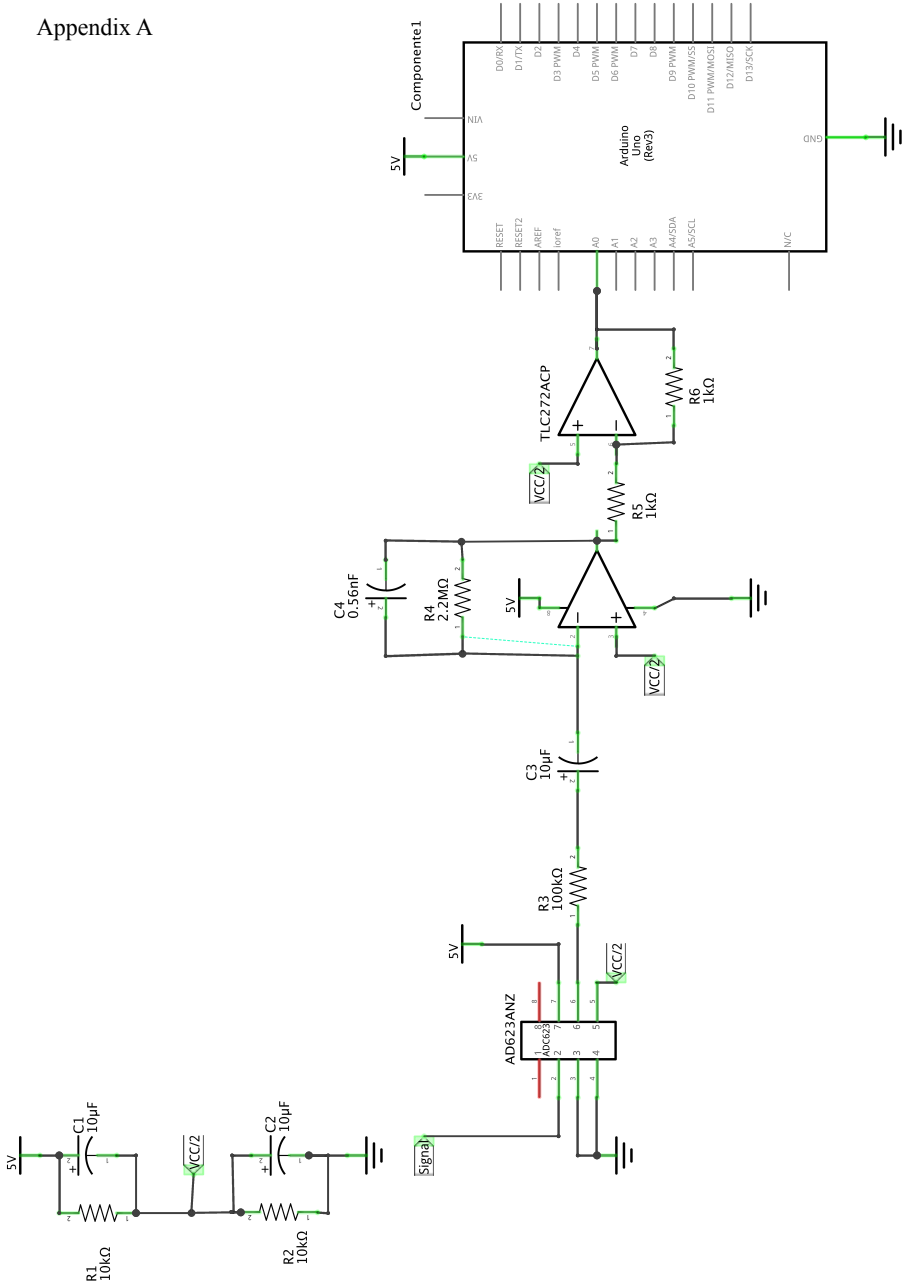
APPENDIX

A. Schematic of the built circuit.

REFERENCES

- [1] M. Ueda, et al. *Trap-Closing Chemical Factors of the Venus Flytrap (Dionaea muscipulla Ellis)*. *ChemBioChem* 11. 17 (2010): 2378–2383.
- [2] J. B. Sanderson, *Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of Dionaea muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London* 21.139-147 (1872): 495-496.
- [3] S. L. Jacobson, *Receptor response in Venus’s fly-trap*. *The Journal of general physiology* 49.1 (1965): 117-129.
- [4] A. G. Volkov, et al. *Biologically closed electrical circuits in Venus flytrap*. *Plant Physiology* 149.4 (2009): 1661-1667.
- [5] C. Darwin. *Insectivorous Plants*. London 1875. Deutsche Übersetzung, Stuttgart (1876).
- [6] M. Escalante-Pérez, et al. *A special pair of phytohormones controls excitability, slow closure, and external stomach formation in the Venus flytrap*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.37 (2011): 15492-15497.
- [7] D. Hodick, and A. Sievers. *The action potential of Dionaea muscipula Ellis*. *Planta* 174.1 (1988): 8-18.
- [8] W. Brown, *The mechanism of movement and the duration of the effect of stimulation in the leaves of Dionaea*. *American Journal of Botany* (1916): 68-90.
- [9] A. G. Volkov, et al. *Kinetics and mechanism of Dionaea muscipula trap closing*. *Plant physiology* 146.2 (2008): 694-702.
- [10] Y. Forterre, et al. *How the Venus flytrap snaps*. *Nature* 433.7024 (2005): 421-425.
- [11] S. L. Jacobson, *Effect of ionic environment on the response of the sensory hair of Venus’s-flytrap*. *Canadian Journal of Botany* 52.6 (1974): 1293-1302.
- [12] A. G. Volkov, et al. *Closing of Venus flytrap by electrical stimulation of motor cells*. *Plant signaling & behavior* 2.3 (2007): 139-145.
- [13] <https://backyardbrains.com/experiments/Plants>
- [14] <https://www.flytrapcare.com/venus-fly-trap-water>
- [15] <https://www.arduino.cc/en/Main/arduinoBoardUno>
- [16] D. Purves, et al. *Neuroscience, 2008*. De Boeck, Sinauer, Sunderland, Mass (2014).

Appendix A



Utilization of Electrospinning and Electrospray for the creation of Bioresorbable 3D Scaffolds

Thomas Syski (BME-13), Simon Bakran (BME-13)

Abstract—3D scaffolds are an interesting concept with the promise of contributing to research and development in tissue engineering and for improving the overall results of in-vitro studies. This paper describes the proceedings of developing a protocol allowing the creation of a 3D bioresorbable scaffold containing a fibrous porous network intended to mimic the native ECM (Extracellular matrix). This is done by combining electrospinning and electro spraying techniques. Substances used for spinning and spraying are reviewed and initially sprayed and spun independently and then simultaneously. Samples are examined in a SEM (Scanning electron microscope), analyzed using ImageJ and insights of the findings are discussed.

I. INTRODUCTION

A. Background

THE utilization of synthetic nano-structure scaffolds to grow cells have become a widespread method. The ability to control the nano-topography of the scaffold allows affecting the cellular response, since the response is dependent on the cell interaction with its environment on a nano-scale level [1] [2]. One of the techniques that show great promise is the creation of a scaffold using so-called electrospinning to form a fibrous layer [3].

1) *Electrospin and Electro spray - Two sides of the same coin:* The technique referred to as electrospinning was derived from a similar technique called electro spraying. Electro spraying is a technique that is used extensively in the industry and for research purposes. It was developed in the 1960's after Taylor formulated the fundamental physical concepts required. Since then the usage and number of applications has grown in an almost exponential fashion. The basic layout of the method is to propel a substance through an electric field onto a collector of some kind. The substance is dissolved in a suitable solvent and stored in some form of a syringe. When the syringe is exposed to the electrical field, the solution will be propelled towards the collector and the substance will decompose into tiny fractions that are sprayed over the collector while the solvent evaporates [4]. Electrospinning uses the exact same technique but (possibly) alters the parameters and uses a specific substance - often a type of polymer. The polymer will not simply decompose and be sprayed when affected by the electrical field but will instead form a continuous fiber that is propelled onto the collector [5].

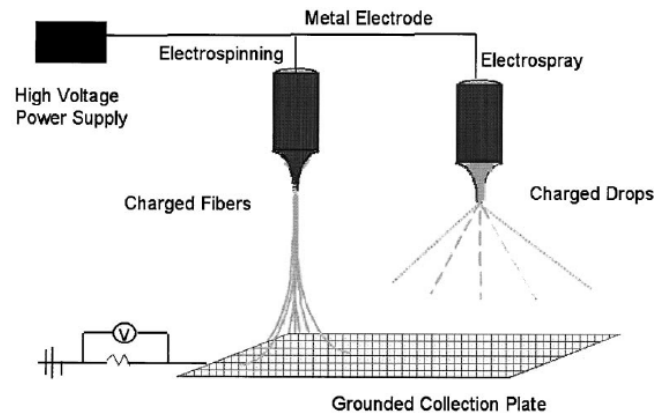


Figure 1. The basic principle of both electrospinning and electro spraying [6].

2) *Electrospun scaffolds:* When electrospinning is utilized to create a fibrous scaffold used for cell growth, the functional parameters can be varied to affect the cellular response which allows the creation of tailored scaffolds. This in turn promotes a desired effect and/or functionality. These scaffolds can support the growth of cells and also promote their maturation into specific tissue lineages, for example neurons, bone or skin. One downside with this technique is that the formation of the fibrous layers becomes tightly packed resulting in cell-growth only on the surface of the scaffold. On the other hand, fibrous scaffolds with pores that allow the cells to migrate between the layers of the scaffold have been shown to increase cell growth [7]. A fibrous, porous scaffold should mimic the ECM (extracellular matrix) in a more accurate way, and thus, should provide a notable improvement in the effectiveness of in-vitro studies, to name one example. The scaffold itself, could be created with a bioresorbable material, similar to what is currently used in surgical sutures. Consequently, this would enable a wide range of future applications such as implants in Tissue Engineering. A number of methods to create these so-called 3D scaffolds have been developed: Electrospinning fibers into a yarn-like structure using, for example, needles as a collector, water flow, or a charged electrode. These methods show promise but have not been successful in the transition from lab-production to a production on an industrial scale [8].

Submitted 2017-06-09

E-mail: {mte13tsy@student.lu.se, mat12sba@student.lu.se}

Supervisor: Fredrik Johansson, Department of Biology Lund University

B. Purpose of study and agenda

The aim of this study is to explore the possibility of using both electrospinning and electro spraying to create 3D scaffolds that mimic the native extracellular environment. The basic plan is to combine electrospinning and electro spraying in order to obtain pores of sufficient size, about 5-10 μm in diameter. This is motivated by the fact that the cell diameter of an average human cell is somewhere around 5-50 μm . Since cells have the ability to "squeeze" through spaces of substantially smaller diameter than the cell itself [9], the size of the pores can be somewhat smaller than the cell itself. The matrix or structure is to be made with a bioresorbable material to allow possible future applications in implants or Tissue Engineering, as was discussed in I-A. As a result of creating a scaffold using electrospinning, the fibers become densely packed and pores of sufficient size cannot be obtained as stated earlier in I-A. Electro spray is then used to introduce beads of a water-soluble substance between the fibers. Hypothetically, this should lead to a greater distance among individual fibers and the beads can then be washed out with the remaining fibrous structure left intact. This would create a fibrous and porous 3D scaffold with the appropriate characteristics for applications in in-vitro studies, or serving as a scaffold used for implants. Additionally, this study could also serve as a starting point for continued development of these scaffolds if the method shows to be viable.

II. MATERIALS AND METHOD

A. Research review

Firstly, substances and parameters used for electrospinning and electro spray were reviewed independently of each other so that they may be combined later on.

As a first step poly- ϵ -caprolactone (PCL) was chosen as the polymer used to create the fibers. It has many advantages like low cost, it is non-immunogenic, resorbs naturally in the human body, and has previously been used in biomedical applications [10].

Then through reviewing of research articles regarding water-soluble substances that could be used for electro spray, three "candidates" were found to be suitable. All three indicating the possibility of forming beads with a diameter of around 5 μm .

- 1) Polyvinyl alcohol (PVA) dissolved in water, acetic acid and ethanol with a solvent ratio of 47:3:50.
- 2) Polyethylene oxide (PEO) dissolved in water.
- 3) Gelatin (cold water fish skin) dissolved in water and acetic acid with a solvent ratio of 4:1.

In the research review, the parameters that affect the size and shape of beads formed using the "candidates" above were indicated to be the *molecular weight of the substance* - written as M_w , and the *concentration of the substance in the solvent*, weight/volume percentage - abbreviated as w/v , or g/100ml. Decreasing the molecular weight and increasing the concentration seems to increase the size of the beads. Also, as the concentration is increased there is a certain point where fibers are formed instead of beads. However, lowering the molecular weight allows for larger concentrations without

the formation of fibers and thus allowing larger beads [11] [12] [13] [14]. Therefore, the molecular weight was kept as low as possible and the concentrations of the substances were the parameters being altered. Furthermore, all voltage levels, deposition speeds and distances were adapted from the protocols of the above cited papers regarding spraying with the water-soluble substances. This was done as an attempt to replicate the resulting bead sizes they had produced.

B. Electro spraying

The protocols used for preparing the solutions were also adapted from the above cited papers [11] [12] [13], again to attempt to replicate their results. PEO (M_w :100000, Sigma Aldrich, USA) is stirred in distilled water at room temperature (23°C) for 24 hours. Gelatin (Gelatin from cold water fish skin, Sigma Aldrich, USA) is dissolved and stirred in acetic acid (EMD Millipore Corporation, 100%) and distilled water for 24 hours and heated to 60°C. PVA (M_w :10000, Sigma Aldrich, USA) is initially stirred in distilled water for 24h at 60°C and, finally, ethanol (CCS Healthcare AB, 95%) and acetic acid are added. Then the solution is stirred for 1 hour at 60°C. The solutions were heated and stirred using a magnetic stirring heater (MR 3001K, Heidolph, Germany). Refer to Table I for the solutions used in the first session of spraying.

The solutions are filled in 1 ml syringes with 22 gauge blunt tip needles (Nordson EFD, USA) and attached to a syringe pump (Aladdin-1000, World Precision Instruments, USA). The electrical field is generated through attaching the positive terminal of a high voltage power supply (HCP 35-35000, FuG Elektronik GmbH) to the needle and the negative terminal to the collector. The collector is made up of a simple metallic board covered by aluminum foil. See Figure 2 below. The substances are sprayed using the parameters found in Table III. The scaffolds are then sputter coated with a thin layer (15 nm) of gold/palladium (Cressington Sputter Coater 108 auto, Cressington Scientific Instruments, UK) before imaging in a Scanning Electron Microscope (SU3500, Hitachi, Japan) at an accelerating voltage of 5 kV commences. Three images with 1000x and 3000x magnification each are taken from every scaffold and using ImageJ software (NIH, USA) the bead diameters are estimated, see Figure 3 and 4 for examples of the image analysis.

The SEM-images were initially converted into 8-bit size and then a threshold was applied to make the image binary, using the default thresholding technique available in the software. Later the software feature "Particle Analysis" was used using a cutoff of $0.0695 (\mu\text{m})^2$ and roundness 0.1-1.0. After evaluating the results, the same procedure was repeated but with different solutions, refer to Table II. Acetic acid is abbreviated as AA* in Table I and II.

After analysis of the first set of images, the concentration of PEO was significantly increased to form sample (7) in order to investigate if it would produce any interesting results. This was motivated by the fact that the resulting beads produced by the PEO solutions shown in Figure 5 and 6 were deemed too small based on the estimated mean diameter together with the hypothesis stated in II which suggested that increased concentration gave increased bead size. Sample (5) had the highest estimated mean diameter of the beads during the 1st session and since there was a sample of gelatin with a higher concentration, namely sample (6), the concentration of gelatin was decreased to form sample (10) to investigate if there was a connection. Another angle was tested, again based on the hypothesis discussed above in II. The concentration of gelatin was increased which led to the formation of sample (9). Furthermore, sample (4) was omitted due to its high viscosity rendering it unusable and because of the relation between viscosity and the concentration of PVA was lowered to form sample (8).

Note that the humidity levels on Table III were simply measured at the given time and do not constitute a part of the planned setup. This is due to the fact that the available facilities did not allow maintaining a constant air humidity level.

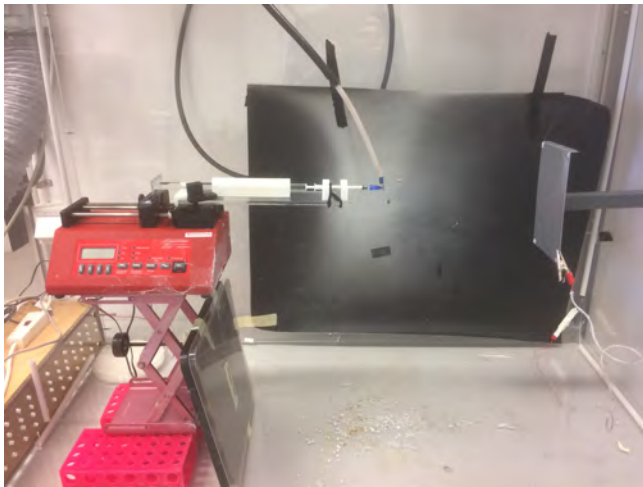


Figure 2. Device and setup used for electrospraying and electrospinning.

Table I
SUBSTANCES USED AND TESTED DURING THE FIRST ROUND.

Electrospin		
PCL (Polycaprolactone) (1)	1.24g PCL	8.95ml water
Electrospray		
PEO (Polyethylene oxide) (2)	0.12g PEO	10ml water
PEO (Polyethylene oxide) (3)	0.20g PEO	10ml water
PVA (Polyvinyl alcohol) (4)	4g PVA	7ml water
	0.45ml AA*	7.5ml EtOH
Gelatin (5)	0.4g	4ml water
	1ml AA*	
Gelatin (6)	0.5g	4ml water
	1ml AA*	

Table II
SUBSTANCES USED AND TESTED DURING THE SECOND ROUND.

Electrospray		
PEO (Polyethylene oxide) (7)	0.5g PEO	10ml water
PVA (Polyvinyl alcohol) (8)	2.25g PVA	7 ml water
	0.45ml AA*	7.5ml EtOH
Gelatin (9)	0.6g	4ml water
	1ml AA*	
Gelatin (10)	0.3g	4ml water
	1ml AA*	

Table III
PARAMETERS OF THE DEVICE AND SETUP USED DURING ELECTROSPINNING/ELECTROSPRAYING FOR EACH SAMPLE.

Electrospray				
Sample	Speed (ml/h)	Distance (cm)	Voltage (kV)	Humidity (%)
(2)	0.15	10	20	29.4
(3)	0.15	10	20	29.4
(4)	N/A	N/A	N/A	N/A
(5)	0.2	10	15	20
(6)	0.5	10	20	18
(7)	0.3	10	20	18
(8)	0.3	10	15	20.3
(9)	0.2	10	15	18.9
(10)	0.2	10	15	19.4

Table IV
PARAMETERS OF THE DEVICE AND SETUP USED FOR ELECTROSPINNING/SPRAYING ON EACH CONSECUTIVE SAMPLE DURING THE COMBINED RUN.

Electrospin				
Sample	Speed (ml/h)	Distance (cm)	Voltage (kV)	Humidity (%)
(1)	2	20	20	N/A
Electrospray				
Sample	Speed (ml/h)	Distance (cm)	Voltage (kV)	Humidity (%)
(10)	0.5	20	20	N/A

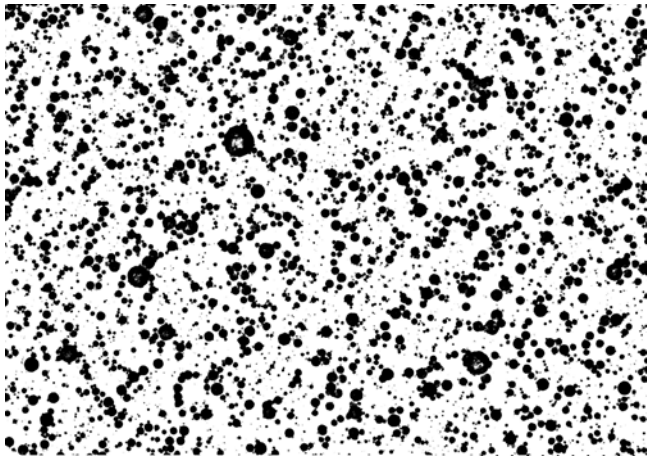


Figure 3. Example of ImageJ analysis using thresholding to separate particles from each other and background - here analyzing SEM image of sample (9).

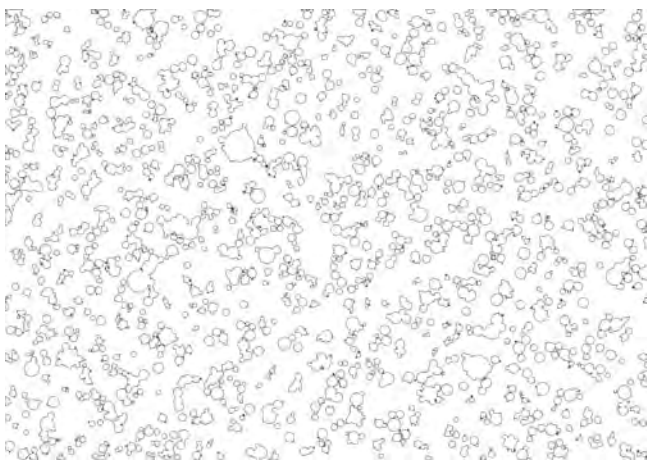


Figure 4. Example of using the "Particle Analyze" plugin in ImageJ to obtain the area of each particle while analyzing a SEM image of sample (9).

C. Electrospraying and Electrospinning combined

Thereafter, when sufficient results had been obtained, electrospay and electrospinning were combined. PCL (M_w : 80000, Sigma Aldrich, USA) was dissolved in acetone (Kebo AB Stockholm, 99%) and stirred for 24 hours in room temperature (23°C), see Table I for weight of substance and volume of solvent. Then another batch of sample (10) was prepared as above in II-B.

The scaffold was made through spraying and spinning every other 100 ml of deposited solution, with parameters and setup shown in Table IV. This was done 3 times and the resulting scaffold was analyzed with the same instruments, software and parameters as in previous rounds.

III. RESULTS

The results of the sprayed solutions shown in Table I and II. The result produced from sample (8) contained fibers instead of beads, as can be seen in Figure 10. The estimated average diameters of the sprayed beads in both sessions are shown below in Table V.

1st Round: For the first round, Figure 5 and 6 show the results utilizing PEO in the creation of beads, stemming from sample (2) and (3), whereas Figure 7 and 8 correspond to the use of gelatin, stemming from samples (5) and (6).

2nd Round: During the 2nd round, when parameters were refined, utilization of PEO gave rise to the result presented in Figure 9, stemming from sample (7), and the subsequent use of gelatin displayed in Figure 11 and 12, stemming from sample (9) and (10).

Combined use: Finally, the result of the combined electrospinning and electrospaying, utilizing sample (1) together with sample (10), is displayed in Figure 13.

Table V
ESTIMATED AVERAGE DIAMETER FROM EACH SAMPLE CONTAINING BEADS.

Bead size		
Sample		Average diameter (μm)
(2)	PEO (polyethylene oxide)	0.428
(3)	PEO (polyethylene oxide)	0.442
(5)	Gelatin	0.645
(6)	Gelatin	0.648
(7)	PEO (polyethylene oxide)	0.707
(9)	Gelatin	0.691
(10)	Gelatin	0.854

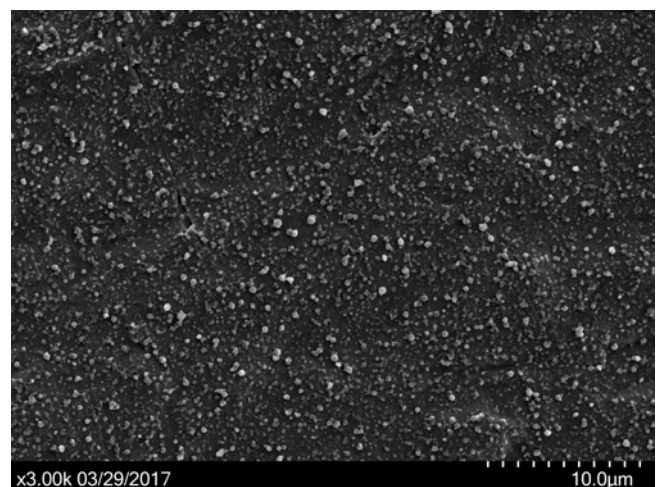


Figure 5. Results from electrospaying with PEO (Polyethylene oxide) (2) shown in Table I.

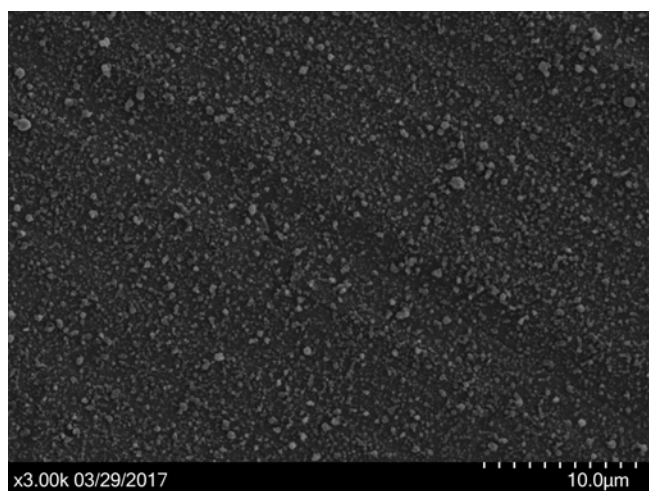


Figure 6. Results from electrospaying with PEO (Polyethylene oxide) (3) shown in Table I.

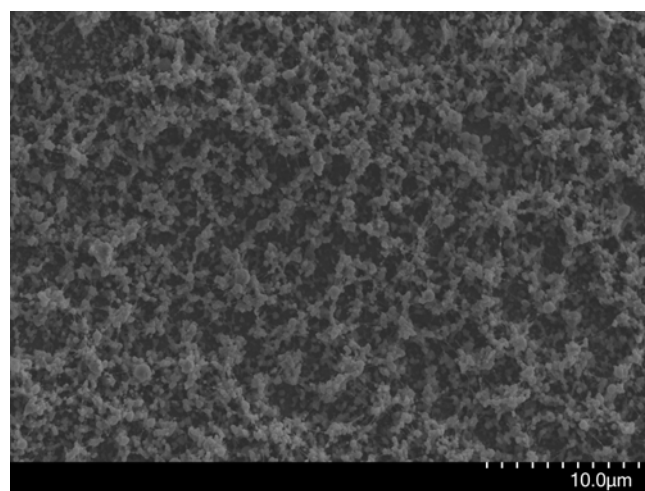


Figure 9. Results from electrospaying with PEO (Polyethylene oxide) (7) shown in Table II.

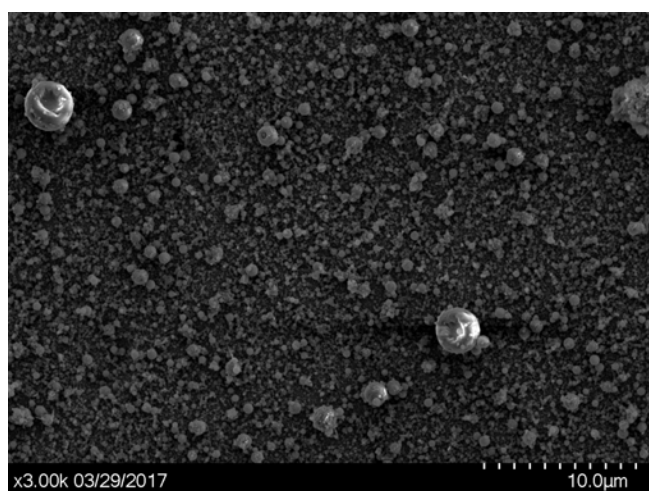


Figure 7. Results from electrospaying with gelatin (5) shown in Table I.

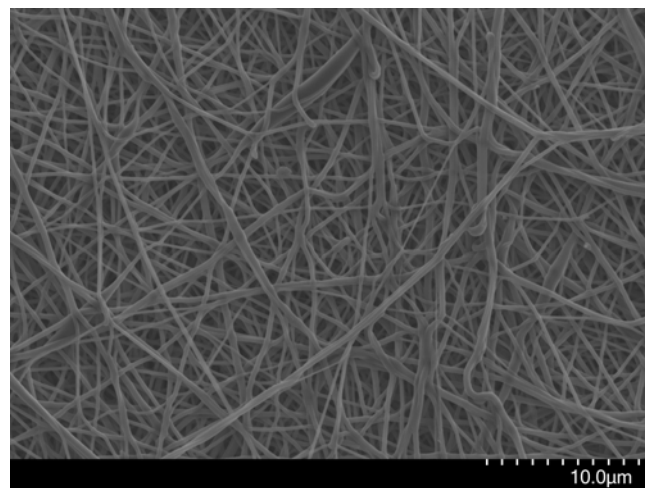


Figure 10. Results from electrospaying with PVA (Polyvinyl alcohol) (8) shown in Table II.

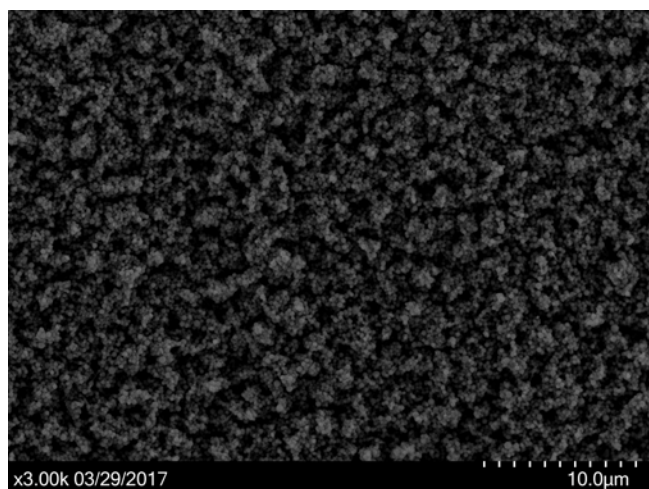


Figure 8. Results from electrospaying with gelatin (6) shown in Table I.

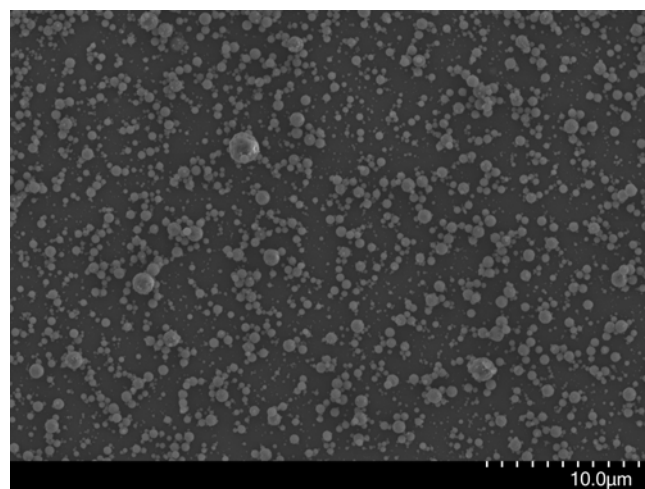


Figure 11. Results from electrospaying with gelatin (9) shown in Table II.

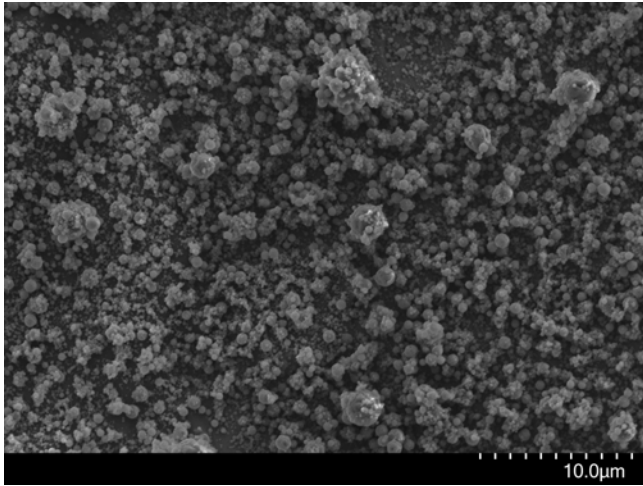


Figure 12. Results from electro spraying with gelatin (10) shown in Table II.

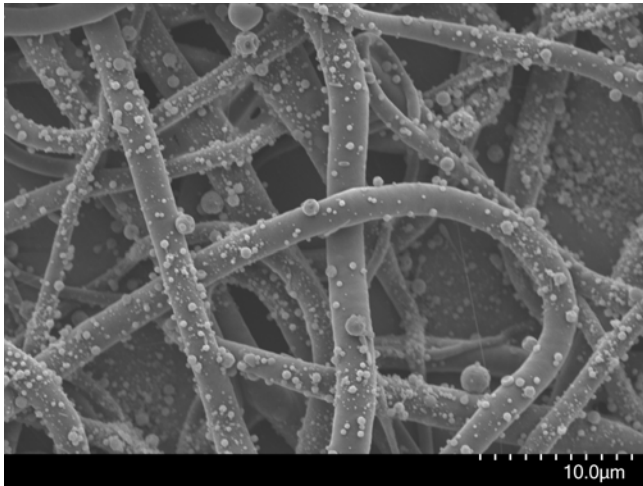


Figure 13. Results from simultaneous electro spinning and electro spraying. Sample (1) and (10), shown in Table II.

IV. DISCUSSION

As can be seen on Figure 13, the parameters of the fibers and beads are not optimal. Although it has been shown that electro spin and electro spray can be combined, the results were not satisfactory when considering the size of the beads and fibers. The beads should optimally be around x2 larger and the diameter of the fibers should both be thinner and more consistent throughout the scaffold. The reason for this is that it would mimic the native ECM (extracellular matrix) in a better way, as stated by our supervisor (F. Johansson, 2017-05-11).

As our hypothesis stemmed from the research review described in II-A, it seems like our results does not directly support it since the lowest concentration of gelatin among our samples gave rise to the largest beads. However, the highest concentration of PEO showed the largest size of the beads - but it might be due to other factors as well.

Another interesting finding is shown in Figure 10 where sample (8), the solution containing PVA, is giving rise to fibers. This renders it unusable to use for spray with this set

of parameters shown in Table III and this concentration and solution (shown in Table II). However, when reviewing the literature, it was actually PVA that exhibited the best potential to consistently form beads exceeding $5\mu\text{m}$. If future research projects were to replicate the results in [11] and apply it to the method of combining electro spray and electro spin, it might produce some very interesting results.

As for PEO, it seems that it is hard to attain beads large enough. The sample (7) did have a large estimated average (see Table V) but this is most likely due to the fact that the images were hard to analyze. Looking at Figure 9, it can be seen that the particles are clumped together making it difficult to separate them from each other when using thresholding techniques in ImageJ. Consequently, the real average diameter of sample (7) is probably smaller than estimated. Also, if examining Figure 9 and comparing it with the beads produced by gelatin presented in Figure 7, 8 and 12, it would seem that the beads from PEO are somewhat smaller.

As the largest beads were produced from sample (10), an interesting find can be seen in Figure 7. There, a small number of large beads can be spotted. If the cause of these large beads could be identified, and beads of that size could consistently be reproduced on a scaffold with higher regularity, it might be a suitable "candidate" for a spin/spray method.

V. ETHICS AND SUSTAINABLE DEVELOPMENT

Since the 3D-scaffold that is the end product, is meant to be used in Tissue Engineering and in-vitro studies, it will have to undergo rigorous evaluation. Especially if it is going to be used in medical implants, it has to undergo clinical trials as well. If the scaffolds reach sufficient efficiency, they might partially reduce and/or replace drug testing currently conducted on animals. This could contribute to a more ethical industry with regards to the "the three R's" (*Replacement, Reduction, Refinement*), where *replacement* stands for alternatives to animal testing, *reduction* for limiting its use, and *refinement* where consideration is taken to ensure the tests are performed in an ethical way with as little pain and/or discomfort as possible. The two latter could also be concerned with the use of gelatin. It is important to make sure that the gelatin originates from a safe source and is extracted in a sustainable manner without causing harm to the environment. As for any harmful or environmentally dangerous substances, only mild chemicals in small quantities are used, for example acetic acid (in addition to PEO and PVA).

VI. CONCLUSION

The results obtained in this project show that it might be possible to use electro spinning and electro spraying for the production of scaffolds that could be used in applications for tissue engineering and in-vitro studies. Considering the purpose of this project, the results can be deemed as satisfactory for the reason that the technique attained the goal of producing a bioresorbable scaffold with embedded water soluble beads. However, further research and testing in this area is required to determine the most favorable parameters of

the solutions and the setup itself to create a scaffold with the desired characteristics.

Considering the different substances used for electrospraying in this project, PVA shows the least promise as it is difficult to work with and did not result in any beads during our testing. The possibility still exists that parameters could be altered in order to generate useful results as the research review suggests. In contrast, a conclusion could be drawn that while both PEO and gelatin do have the ability to give rise to beads in our samples, gelatin produced the largest ones. The optimal results to aim for in regards to future development, considering Figure 13, would be thinner fibers (diameter of 1-2 μm) and beads of approximately 5 μm . This is motivated by the desired pore size of 5-10 μm as described earlier in I-B.

VII. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to extend our gratitude to our supervisor Fredrik Johansson from the Department of Biology at Lund University. We would also like to thank Maximilian Ottosson and Albin Jakobsson from Cellevate for their assistance and input to this project.

REFERENCES

- [1] E.K.F. Yim, K.W. Leong, (2005), *Significance of synthetic nanostructures in dictating cellular response*, Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine, vol. 1, p. 10-21
- [2] C.J.Bettinger, R. Langer, J.T. Borenstein, (2009) *Engineering Substrate Topography at the Micro- and Nanoscale to Control Cell Function*, Angew. Chem. Int. Ed., vol. 48, p. 5406-5415
- [3] D.I. Braghioroli, et al., (2014), *Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics*, Drug Discovery Today, vol. 00, p. 1-3
- [4] O. Salata, (2005), *Tools of Nanotechnology: Electrospay*, Current Nanoscience, vol. 1, p. 25-33
- [5] N. Bhardwaj, S.C. Kundu, (2010), *Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique*, Biotechnology Advances, vol. 28, p. 325-347
- [6] https://www.researchgate.net/figure/222683611_fig1_Fig-1-Schematic-diagram-of-the-electrospinning-and-electrospray-processes, 2017-05-05
- [7] B.A. Blakeney, A. Tambrelli, J.M. Anderson, A. Andukuri, D. Lim, D.R. Dean, H. Jun, (2011), *Cell infiltration and growth in a low density, uncompressed three-dimensional electrospun nanofibrous scaffold*, Biomaterials, vol. 32, p. 1583-1590
- [8] W. Teo, R. Inai, S. Ramakrishna, (2011), *Technological advances in electrospinning of nanofibers*, Science and Technology of Advanced Materials, vol. 12, p. 2-21
- [9] A.Schwab, A. Fabian, P. Hanley, C. Stock, (2012), *Role of Ion Channels and Transporters in Cell Migration*, <http://physrev.physiology.org/content/92/4/1865>, 2017-05-18
- [10] S.R. Baker, Sr Banerjee, K. Bonin, M. Guthold, (2016), *Determining the mechanical properties of electrospun poly- ϵ -caprolactone (PCL) nanofibers using AFM and a novel fiber anchoring technique*, Materials Science and Engineering: C, vol. 59, p. 203-212
- [11] B. Felice, M.P. Prabhakaran, M. Zamani, A.P. Rodriguez, S. Ramakrishna, (2015), *Electrosprayed poly(vinyl alcohol) particles: preparation and evaluation of their drug release profile*, Polymer International, vol. 64(12), p. 1722-1732
- [12] L.G. Gómez-Mascaraque, J.M. Lagarón, A. López-Rubio, (2015), *Electrosprayed gelatin submicroparticles as edible carriers for the encapsulation of polyphenols of interest in functional foods*, Food Hydrocolloids, vol. 49, p. 42-52
- [13] K. Morota, H. Matsumoto, T. Mizukoshi, Y. Konosu, M. Minagawa, A. Tanioka, Y. Yamagata, K. Inoue, (2004), *Poly(ethylene oxide) thin films produced by electrospray deposition: morphology control and additive effects of alcohols on nanostructure*, Journal of Colloid and Interface Science, vol. 279(2), p. 484-492
- [14] G.C. Ingavle, J.K. Leach, (2013), *Advancements in Electrospinning of Polymeric Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering*, TISSUE ENGINEERING: Part B, vol. 00(00)

Development of Quick Test to measure the efficiency of the immunoglobulin G-degrading enzyme, IdeS

Paula Carlsson (BME14), Michelle Chin (BME14)

Abstract—Antibodies are part of the immune system and play an important role in the defense against foreign microorganisms. Gamma immunoglobulin (IgG) antibodies protect against bacterial and viral infections. If a person has developed pathogenic IgG, this could cause an autoimmune disease or acute transplant rejection.

Hansa Medical is a biopharmaceutical company, and their lead project is the Immunoglobulin G-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes* (IdeS), which is a candidate drug presently in Phase II trials for kidney transplantation. IdeS has the ability to inactivate human IgG antibodies. It can therefore be used to treat patients that may develop or have already developed IgG against the kidney donor.

Today, there are methods to measure the efficacy of IdeS in patients, but they are relatively slow and require access to special equipment. This project aims to develop a quick test, which can be used without special equipment and quickly tell if the IdeS treatment has been effective enough. The concept of the quick test is based on a lateral flow assay due to its benefits of being fast and easy to use. Different matrixes for separation of the samples and antibodies for measurement were evaluated, using gel electrophoresis and electrochemiluminescence (ECL) immunoassay, in order to find the most suitable ones for the quick test.

The result from this project indicated that CaptureSelect was the most effective matrix and the most beneficial dilution of sample was 1:200 000. This work accomplished a further step towards the development of the quick test.

I. INTRODUCTION

A. IgG and IdeS

Gamma immunoglobulin (IgG) is the quantitatively dominating class of antibodies, and one of the most abundant proteins in human blood, see figure 1 for structure. IgG can be found in all body fluids and protects against bacterial and viral infections. There are four subclasses of IgG in humans and the difference between them is the amount of disulfide bridges, length and flexibility in the hinge region [1].

Hansa Medical is a biopharmaceutical company developing enzymes for treating transplant rejection and acute autoimmune diseases. Their lead project is the immunoglobulin G-degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes* (IdeS), a candidate drug presently in Phase II trials for kidney transplantation [2]. IdeS is an enzyme that has the ability to specifically and effectively inactivate human IgG antibodies. This is used to

treat patients that have developed pathogenic IgG. In some occasions, IgG that binds to the host is developed and this can cause autoimmune diseases. In other occasions, IgG that binds to cells from other humans is developed and this can cause problems in transplantation and may cause acute transplant rejection [3]. The favorable safety profile in combination with the efficient and reproducible activity when injected into patients indicates a therapeutic potential of IdeS. Therefore, IdeS could be used to treat IgG-driven diseases in humans by removal of IgG from the circulating blood [4].

IgG is a barrier to organ transplantation if the receiver has developed antibodies that react with the donor organ, called donor specific HLA antibodies. These antibodies can cause acute kidney rejection, and is a direct obstacle for transplantation. During a kidney transplantation removal of anti-HLA antibodies from the blood circulation is therefore a logical therapeutic strategy. IdeS can rapidly reduce the level of anti-HLA antibodies and make a transplantation possible. This is demonstrated by experiments on serum collected from highly sensitized kidney patients [5].

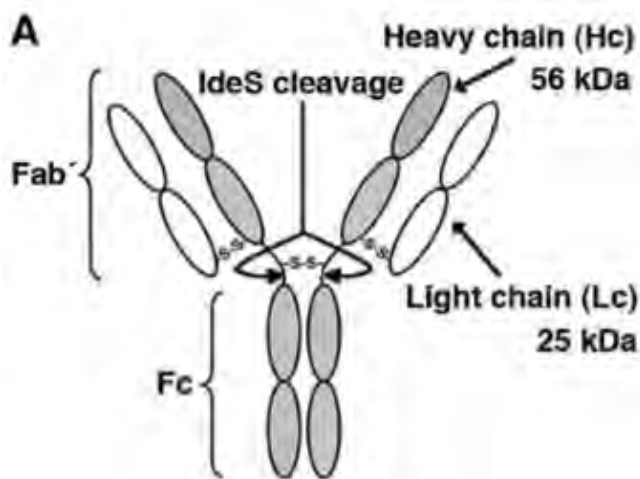


Figure 1. Structure of IgG, two heavy chains and two light chains. The IdeS cleavage (hinge region) sites are indicated as well as the Fab- and Fc-part. Adapted from reference [6].

IgG are molecules built by four peptide chains, two identical heavy chains and two identical light chains. The two heavy chains are bound to each other with disulfide bridges and each heavy chain is also bound to a light chain by a disulfide bridge.

Hand in date: June 12, 2017

Email addresses: kem14pca@student.lu.se, mte14mch@student.lu.se

Clinical supervisor: Sofia Järnum, Hansa Medical AB

Technical supervisor: Pelle Ohlsson, Departement of Biomedical Engineering, LTH

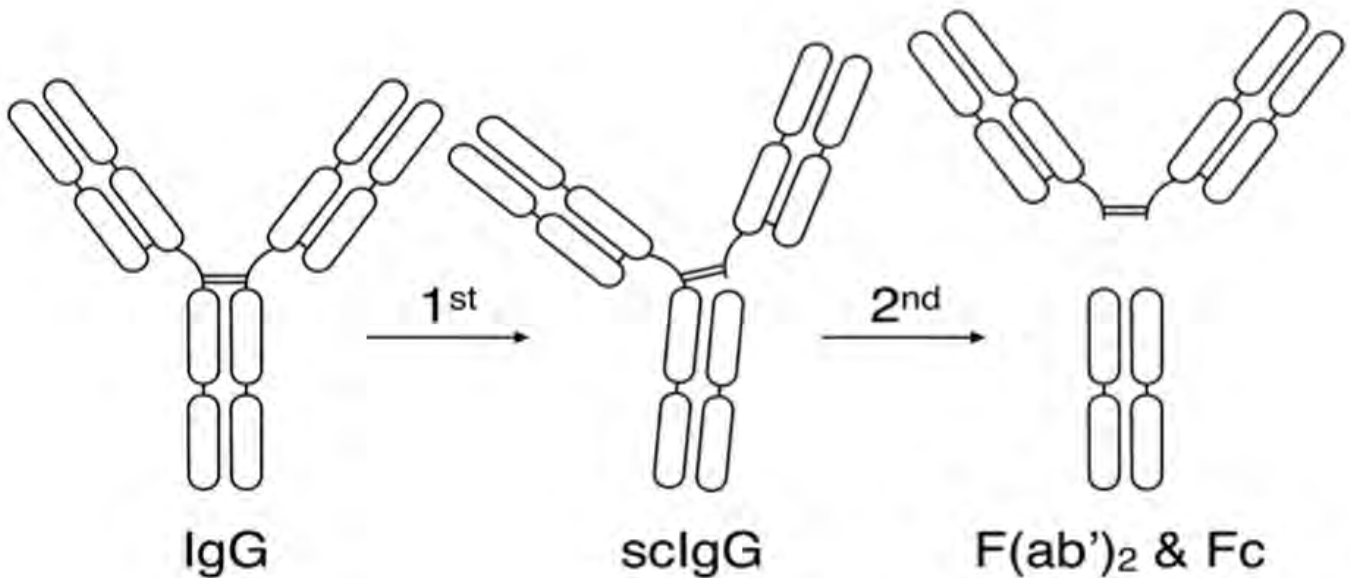


Figure 2. Schematic representation of IgG cleavage by IdeS. Intact human IgG is cleaved by IdeS in two steps. The first step generates a single-cleaved IgG molecule (scIgG) with one intact heavy chain. The second step generates one F(ab')₂ fragment and one Fc fragment. Adapted from reference [7].

The resulting structure looks like a Y and on the top of the Y there are two identical antigen binding sites.

IdeS has to bind to the Fc part of IgG before it can cleave IgG. IdeS cleaves IgG in the hinge region with a unique degree of specificity due to a protein-protein interaction between the enzyme and the Fc region of the antibody. IdeS cleaves IgG in the heavy chains and separates the antigen binding part from the rest of the antibody, resulting in F(ab')₂- and Fc-fragments. The cleavage is done in two steps, where the heavy chains are cleaved one at a time, resulting in one single cleaved IgG molecule (scIgG) formed as an intermediate product. See figure 2 [3].

B. Lateral flow assay

Lateral flow assays (LFA) are used for qualitative and quantitative analysis in different areas, such as in clinical analysis of blood samples. An LFA is performed over a strip, with a plastic backing and with four different areas. Pre-immobilized reagents at different areas of the strip become active upon flow of liquid sample, for example a blood sample. This technique is well suited for rapid tests and is used for instance in home pregnancy tests.

The *sample application pad* is the start of the assay where the sample is applied. The function of this pad is to transport the sample to the other components of the lateral flow test strip. The *conjugate pad* is the place where labeled biorecognition molecules are dispensed. The conjugate pad should release labeled conjugate, upon contact with moving liquid sample. The *nitrocellulose membrane* determines the sensitivity of the LFA. Test and control lines are drawn over this membrane and an ideal membrane should provide support and good binding to capture antibodies. The *absorption pad* helps out in maintaining flow rate of the liquid over the membrane and

stops back flow of the sample to occur. It also works as a sink at the end of the strip. See figure 3.

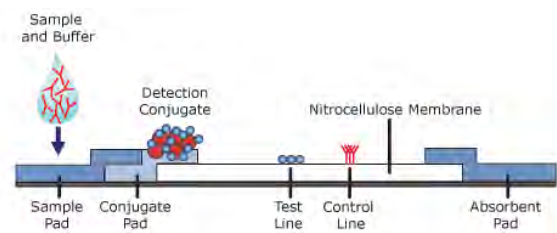


Figure 3. An LFA with the different areas indicated. Adapted from reference [8].

The sandwich format of the LFA is a format where label coated antibody is immobilized at the conjugate pad, see figure 4. This format is used when testing for larger analytes with multiple binding sites, such as antibodies. A primary antibody against target analyte is immobilized over a test line and a secondary antibody against labeled conjugate antibody is immobilized at the control line. The intensity of color at the test line is equivalent to the amount of target analyte [9].

C. ECL

An electrochemiluminescence (ECL) immunoassay is a plate-based assay technique designed to detect and quantify substances such as proteins and antibodies. ECL labels generate light when stimulated by electricity in the appropriate chemical environment. This reaction is incorporated in the immunoassays to provide the light signal used to measure important proteins and other biomedical molecules. An ECL is typically performed on a high binding carbon electrode plate, which will passively bind proteins and antibodies [11].

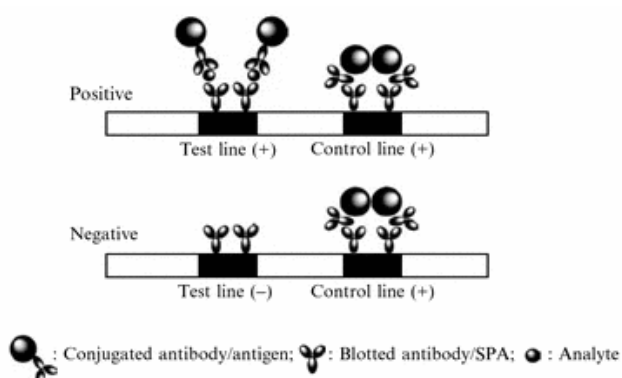


Figure 4. Principles of the lateral flow strip test in sandwich format. When detecting antibodies, targets in the sample fluid are bound with conjugated antigens forming analyte-antigen complexes and immobilized by anti-immunoglobulin antibodies on the test line, while the excess conjugate is trapped by antibodies that recognize the conjugated antigen on the control line. Formation of two colored lines on the membrane indicates a positive result. Adapted from reference [10].

All ECLs rely on the specific interaction between an epitope, which is the antibody binding site on an antigen, and a matching antibody binding site. Sandwich ECL was the format used during this project. This type of ECL requires the use of matching antibody pairs where each antibody is specific for a different epitope of the antigen molecule. The antibody pair consists of a capture antibody and a detection antibody. The capture antibody is coated to the immunoassay plate and then the sample solution is added to the well. A layer of detection antibody is added in order to measure the concentration of the analyte. Since two antibodies are used the antigen is specifically captured and detected, which makes the sandwich ECL highly specific [12].

Using a sandwich ECL, the chosen antibodies can be tested and the results will show if they are suitable for the sandwich LFA.

D. Gel electrophoresis

Gel electrophoresis is a laboratory technique in which charged molecules are transported through a solvent driven by an electrical field. This technique is simple, rapid and a sensitive analytical tool. The type of gel electrophoresis used during this project is called sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). SDS-PAGE separates proteins, such as antibodies, primarily by mass due to the fact that the anionic detergent SDS binds to and denatures proteins to make them negatively charged. Therefore, when a current is applied, all SDS-bound proteins in a sample will move through the gel toward the positively charged electrode. Proteins with less mass will migrate quicker through the gel than the ones with greater mass due to the sieving effect of the gel matrix [13].

E. Thesis/objectives

The aim of this project is to develop a quick test, an LFA, which separates IgG and scIgG from the fully cleaved product.

This would make it possible to measure the concentration of $F(ab')_2$ - and Fc-fragments, and find out if the IdeS treatment has been effective enough to cleave all IgG. To do this, a matrix that separates the IgG and scIgG from the serum sample will be needed as well as suitable antibodies that can be used in the LFA to detect the product.

There are methods to measure the effectivity of IdeS in patients today but they are relatively slow and require access to special equipment. The quick test will be beneficial since it can be used without special equipment and quickly tell if the IdeS treatment has been effective.

II. METHODS

To begin with, IdeS-treated serum samples were needed for the evaluation of the chosen matrixes and antibodies. The samples were treated with different matrixes and evaluated with gel electrophoresis and ECL, in order to investigate their ability to separate the different IgG-fragments. The most beneficial matrix was used to separate the clinical samples for the same purpose.

A. IdeS-treatment of serum

A human serum pool (made up from 100 healthy individuals) was treated with different amounts of IdeS in order to generate several combinations of intact IgG, scIgG, $F(ab')_2$ and Fc fragments. A serial dilution of IdeS was made starting at $900 \mu\text{g}/\text{mL}$ by adding phosphate buffered saline (PBS), and continued with three-fold dilutions until $1.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ (seven tubes in total). $90 \mu\text{L}$ serum was dispensed in eight Eppendorf tubes, sample 1-8. $10 \mu\text{L}$ from each IdeS dilution was added to the tubes as well as PBS to the last tube (sample 8) and the samples were incubated at 37°C overnight. The serum was 10-fold diluted by adding $900 \mu\text{L}$ PBS to each sample. $10 \mu\text{L}$ diluted sample was mixed with $30 \mu\text{L}$ 2x SDS-loading buffer and heated at 92°C for 3 min. A house marker mix (consisting of IgG, scIgG, $F(ab')_2$ and Fc) was heated and $5 \mu\text{L}$ was added to the last lane in the gel and $5 \mu\text{L}$ Precision PLUS marker to the first lane. $10 \mu\text{L}$ of the samples were separated on 4-20% StainFree Mini-Protean gels (200 V, 40 min). Gels were disassembled and scanned using an EZ Imager system (Bio-Rad) and Image Lab 5.0 software (Bio-Rad).

B. Separation method

The next part of the process was to evaluate three different matrixes as clean up steps after IdeS treatment of serum. Either removal of $F(ab')_2$ - or Fc-containing antibodies/antibody fragments were tested. The samples used for this part were sample 1 containing $F(ab')_2$ and Fc-fragments, sample 3 containing scIgG, Fc and $F(ab')_2$ and sample 8 containing intact IgG.

CaptureSelect™ IgG-CH1 Affinity Matrix. The CaptureSelect Matrix binds to an epitope on the Fab-side of IgG in a single step i.e. to IgG, scIgG and $F(ab')_2$ fragments but not to Fc fragments. The affinity matrix recognizes all four subclasses of IgG. Binding potential of the matrix is 22 g fab-containing IgG/liter matrix = $22 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. For $100 \mu\text{L}$ 10x diluted serum, it contains $100 \mu\text{g}$ IgG, therefore it was needed

(100/22) μL = 4.6 μL CaptureSelect Matrix. To assure that all IgG would bind to CaptureSelect, 10x the volume was used, 4.6 μL x 10 = 46 μL .

Protein G Sepharose. Protein G binds to the Fc region of IgG from a variety of mammalian species. Protein G binds to all four subclasses of human IgG. Binding capacity of the matrix is 24 mg/mL. For 100 μL 10x diluted serum, it contains 100 μg IgG, therefore it was needed (100/24) μL = 4.2 μL Protein G Sepharose. To assure that all IgG would bind to Protein G Sepharose, 10x the volume was used, 4.2 μL x 10 = 42 μL .

His SpinTrap (NiNTA). This matrix also binds to the Fc region of IgG where stretches of the amino acid histidine is situated. It has a high protein binding capacity - up to 750 μg pure histidine-tagged protein per column.

For convenience, 50 μL of each matrix was used and 50 μL PBS-buffer, otherwise the samples would end up with different concentrations. The total amount of matrix required for the samples was removed and each matrix was equilibrated in PBS by washing 3 x 1 mL PBS to remove preservatives (ethanol) prior to mixing the matrix with serum. The tubes were centrifuged 1000 rpm for 1 min in-between each wash. The matrices were resuspended in PBS.

100 μL of each sample was treated in four different ways, either with 50 μL CaptureSelect, 50 μL Protein G, 50 μL NiNTA or 50 μL PBS, resulting in 12 Eppendorf tubes. The samples were incubated at room temperature for 30 min with occasional mixing. The tubes were centrifuged at 1000 rpm for 1 min and the serum was removed to new tubes, carefully avoiding the matrix.

10 μL of each serum was mixed with 30 μL of 2x loading buffer, heated for 3 min at 92 °C and separated using 4-20% SDS-PAGE gel. The house marker mix was heated and 5 μL was added to the last lane of the gel and 5 μL Precision PLUS marker to the first lane. Samples were separated using 1x Tris-Glycine-SDS buffer (BioRad) at 200 V for 40 min. Gels were disassembled and scanned using an EZ Imager system (BioRad) and Image Lab 5.0 software (Bio-Rad).

The experiment was iterated, but this time the IdeS treated serum samples were diluted 1:100, 1:1000 and 1:10 000. In this experiment, CaptureSelect, NiNTA and PBS were used.

C. ECL for measuring IgG fragments in human serum

The three matrices were evaluated using ECL to quantify the results from the gel. Samples 1, 3 and 8 treated with CaptureSelect, Protein G, NiNTA and PBS from previous analysis were used for this experiment. Two assay plates were used, one using Fc-Fc set-up (ECL measuring Fc-containing proteins) and one using the Fab-Fab set-up (ECL measuring F(ab')₂-containing proteins). A reagent dilution for Fc-plate was made with 3.3 μL AffiniPure mouse anti-human IgG, Fc fragment specific, a reagent that binds to Fc, diluted with 6 mL carbonate buffer. A reagent dilution for F(ab')₂-plate was made with of 4.6 μL AffiniPure F(ab')₂ fragment goat anti-human IgG, F(ab')₂ fragment specific, a reagent that binds to F(ab')₂, diluted with 6 mL carbonate buffer. The plates were coated with 50 μL /well of their reagent dilution and incubated overnight at +2 – 8 °C.

After each incubation the plate was washed with PBS supplemented with 0.5% Tween-20 using an automated plate washer (Biorad Immunowash 3x 500 μL) before the next loading and before reading the plate. Fish gelatin (0.5 %) was used to block non-specific binding to the assay plate. The samples were pre-diluted, 1:500, 1:5000, 1:50 000 and 1:500 000, with block buffer in a sample dilution plate. 50 μL /well from the dilution plate was transferred to the assay plate and incubated for two hours. A solution of detection antibody mixed with strep-sulfo was needed for both plates. The detection mix for Fc consisted of 12 μL biotinylated mouse anti-human Fc-specific F(ab')₂-fragment, 36 μL strep-sulfo and 6 mL block buffer. The detection mix for F(ab')₂ consisted 6 μL CaptureSelect™ Biotin Anti-IgG-CH1 Conjugate, 36 μL strep-sulfo and 6 mL block buffer. 50 μL /well of the detection mix was added to the plate and incubated for one hour. A 1X Read Buffer T was made with 5 mL Read Buffer T diluted with 15 mL water (MQ). The plate was read immediately after addition of 150 μL /well of 1X Read Buffer T on a MSD sector Imager.

The experiment was iterated with samples 1, 3 and 8 treated with CaptureSelect, NiNTA and PBS but this time the samples were diluted 1:100, 1:1000, 1:10 000, 1:100 000, 1:1 000 000 and 1:10 000 000. For the Fc-plates, another detection antibody was used. The new detection mix consisted 9.2 μL biotinylated goat anti-human Fc-specific F(ab')₂-fragment, 72 μL strep-sulfo and 12 mL block buffer.

D. Clinical samples

Serum from six different patients (approved by the Regional Ethics Committee in Uppsala) was used to evaluate CaptureSelect as a clean up step after IdeS treatment. Six samples pre IdeS treatment and six samples after IdeS treatment were used. The samples were diluted with PBS to 10 000x and incubated in room temperature with 50 μL CaptureSelect for 60 min on a rotor (Roto Shake Genie). The samples were centrifuged at 1000 rpm for 1 min and the serum was removed to new tubes, carefully avoiding the matrix.

An assay plate was used for ECL evaluation. A reagent dilution for Fc plate was made with 3.3 μL AffiniPure mouse anti-human IgG, Fc fragment specific diluted with 6 mL carbonate buffer. The plate was coated with 50 μL /well of the reagent dilution and incubated overnight at +2 – 8 °C. After each incubation the plate was washed with PBS supplemented with 0.5% Tween-20 using an automated plate washer (Biorad Immunowash 3x 500 μL) before the next loading and before reading the plate. Fish gelatin (0.5 %) was used to block the assay and the samples were diluted, 1:10 000, 1:50 000, 1:100 000 and 1:200 000, with block buffer in a sample dilution plate. 50 μL /well from the dilution plate was transferred to the assay plate and incubated for two hours. A solution of detection antibody mixed with strep-sulfo was needed. The detection mix consisted 9.2 μL biotinylated goat anti-human Fc-specific F(ab')₂-fragment, 72 μL strep-sulfo reagent and 12 mL block buffer. 50 μL /well of the detection mix was added to the plate and incubated for one hour. A 1X Read Buffer T was made with 5 mL Read Buffer T diluted with 15 mL water

(MQ). The plate was read immediately after addition of 150 μL /well of 1X Read Buffer T on a MSD sector Imager.

III. RESULTS AND DISCUSSION

A. IdeS-treatment in serum

Serum was treated with different amounts of IdeS. Free Fc was only found in sample 1, 2 and 3 (figure 5). The last line in the gel in the other samples is an unknown protein that can be found in serum already before IdeS addition and has approximately the same size as Fc. By using a computer program IgG, sIgG, F(ab')₂ and Fc were identified, see figure 5. Something odd was observed in sample 7, where most of the sample remained in the well. This was probably caused by a mistake while preparing the sample. The results show that IdeS concentration 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resulted in sIgG, F(ab')₂ and Fc fragments and 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ resulted in complete degradation of IgG into F(ab')₂ and Fc fragments. Hence, the generated samples were used for evaluation of different matrixes: Sample 1 (90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IdeS): F(ab')₂ and Fc-fragments. Sample 3 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IdeS): sIgG, F(ab')₂ and Fc fragments. Sample 8 (serum without IdeS): intact IgG.

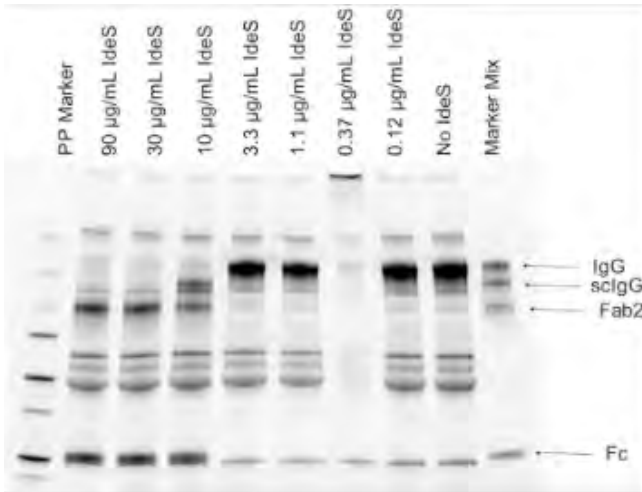


Figure 5. SDS-PAGE separation of human serum treated with different amounts of IdeS.

B. Separation method

Three different matrixes as clean up steps after IdeS treatment of serum were evaluated, CaptureSelect, NiNTA and protein G. CaptureSelect removes F(ab')₂-containing antibodies/antibody fragments, and NiNTA and protein G remove Fc-containing antibodies/antibody fragments. The samples analyzed were sample 1, 3 and 8 treated with CaptureSelect, protein G, NiNTA and PBS.

The results from the gel, see figure 6, indicated the following: CaptureSelect removed the majority of the F(ab')₂ fragments while most Fc remained. In sample 8 the majority of the intact IgG was removed. Protein G removed the majority of the Fc fragments but there was also a decline in F(ab')₂. In sample 8 the majority of the intact IgG was removed, but some was still obviously present. NiNTA removed the majority of

the Fc fragments but there was also a decline in F(ab')₂. In sample 8 substantially all intact IgG was removed. It was also noted that the NiNTA matrix reduced several proteins from all three samples, not only IgG-related proteins and degradation products.

From this experiment it was decided to continue with the samples treated with CaptureSelect and NiNTA since these matrixes seemed to be the most effective ones.

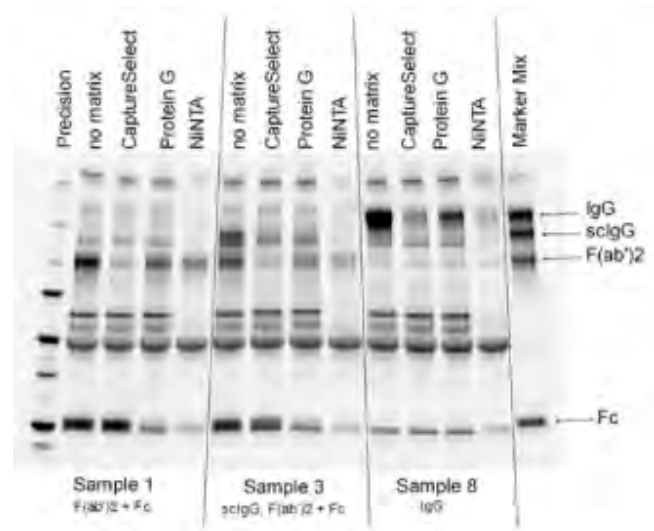


Figure 6. SDS-PAGE separation of human serum treated with different amounts of IdeS and different matrixes.

The gel from the iterated experiment with different dilutions and two matrixes indicated that the matrixes were more effective when applied to the diluted samples. Therefore it was decided to continue with these samples. The samples generated were used in ECL to evaluate which extraction method was likely to be able to identify if there is IgG or IgG-degradations products remaining.

C. ECL for measuring IgG fragments in human serum

Samples 1, 3 and 8 treated with CaptureSelect, Protein G, NiNTA and PBS were tested. The results from the ECL Fc- and F(ab')₂ - plates are presented in figures 7 and 8. The ratio between the cleaved IgG (sample 1) and intact IgG (sample 8) was calculated for the 1:500 000 dilution. A high ratio indicates that sample 1 contains a lot of cleaved IgG, which is wanted.

According to the results from the Fc-plate, the highest value of the ratio between the signal from cleaved IgG and signal from intact IgG was achieved using CaptureSelect. From the F(ab')₂-plate, the highest value of the ratio was achieved with NiNTA. Therefore, CaptureSelect and NiNTA were used for further evaluations.

The results from the iterated experiment with CaptureSelect and NiNTA treated samples with different dilutions showed highest ratio for the Fc-plate with CaptureSelect in a 1:100 000 dilution. This was compared to NiNTA, which did not show as high ratio. It was decided that CaptureSelect was the most effective matrix, and was to be used for the clinical samples.

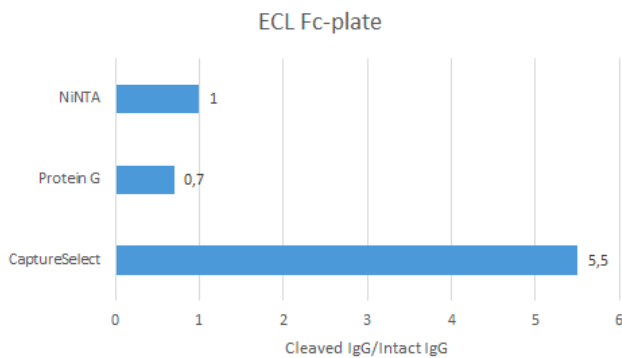


Figure 7. Ratio between signal in sample 1 and signal in sample 8 for the 1:500 000 dilution in the Fc -plate.

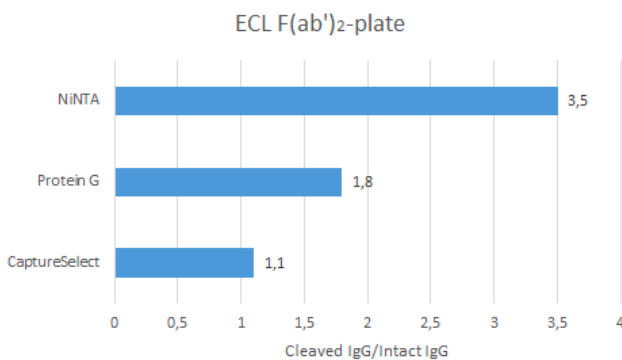


Figure 8. Ratio between signal in sample 1 and signal in sample 8 for 1:500 000 dilution in the F(ab')₂ -plate.

D. Clinical samples

Based on the results from ECL, samples from six patients treated with CaptureSelect, the highest ratio between signal in pre IdeS treatment and post IdeS treatment was achieved with the dilution 1:200 000. This is presented in figure 9. The ratio values varied between 0.9 and 4.7. Patient 921 showed a low ratio which indicated that the IdeS treatment was not enough to cleave all intact IgG. It was later learned that this patient was not treated with a full dose of IdeS and hence this result was expected.

E. Improvement potential

During the experiments the aim was to achieve clean samples, meaning they should mainly contain the fragments that were supposed to be measured in ECL. CaptureSelect was supposed to remove all fragments containing F(ab')₂, i.e. F(ab')₂-fragments, sIgG and intact IgG. The assay would then measure the amount of free Fc. The problem was that CaptureSelect did not seem to be as effective as expected. It is possible that too much matrix was applied to the samples. It is also possible that the samples are not able to be as clean as wanted, and a different matrix that is more effective needs to be used. Another alternative is that when the samples were stored in the freezer and then thawed multiple times, the IgG

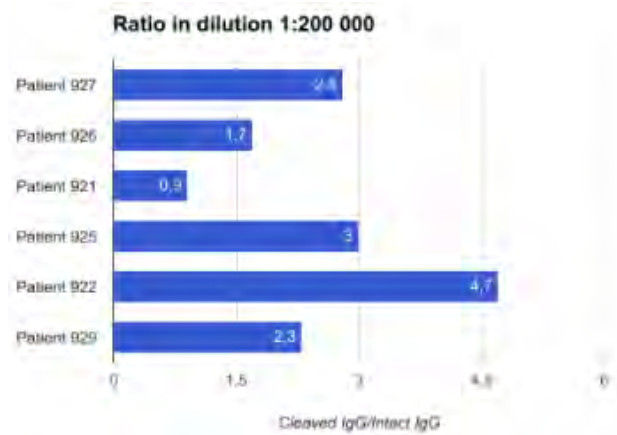


Figure 9. Ratio between signal in pre IdeS treatment and post IdeS treatment for six patients treated with CaptureSelect, for dilution 1:200 000

might have been aggregated or denatured. This could result in CaptureSelect not recognizing the IgG. To try this theory, fresh serum samples would need to be evaluated.

The ratio values between cleaved IgG and intact IgG were lower in the clinical samples compared to the samples from the human serum pool. This is due to the varying concentration of IgG in the different samples. The normal range for IgG in healthy humans varies between 6.7 mg/mL and 14.5 mg/mL. The samples from the human serum pool have the same concentration of IgG (11 mg/mL) and a much higher dose of IdeS was used in contrast to the samples from patients. As every human has different amount of IgG it will be difficult to develop a test that is equally effective for a whole population i.e. full effect in one patient with low IgG concentration will result in less Fc-fragments than full effect in a patient with high IgG concentration. The question is whether the concentration of IgG needs to be known or it is enough to compare the samples before and after IdeS treatment.

The clinical samples used in this experiment were collected before IdeS treatment and 24 hours after IdeS treatment. However, in reality the quick test should be used already a couple of hours after IdeS treatment. To evaluate if this could work, clinical samples pre IdeS and samples collected hourly after treatment would be required.

The results from the gel and ECL differ a bit. The result from the separation experiment showed a great reduction of either Fc or F(ab')₂ fragments with the different matrixes. However, such great reduction was not shown in ECL. There are a few conceivable explanations to this result. One question is if the antibodies were specific enough for this experiment or if the result would be better if other antibodies were used. In addition, some error-handling could have occurred during the preparation of the samples.

The results achieved from the ECL indicate that the setup with antibodies might work in the conjugate pad, test- and control line in an LFA. But to be able to tell if an IdeS treatment has been effective enough, the ratio between cleaved IgG and intact IgG needs to be higher. In an LFA it should be easy to distinguish the positive results from the negative

ones. To accomplish this, the separation step needs to be more effective and even more specific antibodies are required. Hansa Medical is currently developing antibodies that specifically bind to cleaved Fc. These antibodies could be used in an ECL to evaluate if it gives a higher ratio between cleaved IgG and intact IgG than the antibodies used in this experiment.

F. Ethics and sustainable development

The blood samples used in this project came from either healthy volunteers or patients with kidney failure. The samples from healthy volunteers (the human serum pool) were bought by Hansa Medical from a supplier providing consented serum for research (Seralab, US). The clinical samples were collected during a clinical trial (EudraCTnr 2013-005-5417-13) approved by the Regional Ethics Committee in Uppsala (Dnr 2014/131). The samples were later anonymized and used for research purpose. This was also approved by the same ethics committee (Dnr 2014/131-3).

The antibodies used during the experiments are cultivated from animals, in this case from mouse and goat. This could be considered ethically incorrect, but is necessary for the drug- and biotech industry in order to develop new medicines.

A lot of time was spent in the laboratory during this project. Plenty of disposable materials were used in the experiments, such as pipette tips, ECL plates, test tubes, dilution plates and gloves. Some of these are not reusable since they have been in contact with harmful chemicals and must be disposed. Considering the environment, harmful chemicals are forbidden to be poured down the sink and were therefore handled carefully and discarded in a special bin. However, the benefits of the quick test will outweigh the negative effects of the development process, since it will be easy to use, effective and save precious time. It may even save lives.

IV. CONCLUSION

In conclusion, the result from this project indicated that CaptureSelect was the most effective matrix and the most beneficial dilution was 1:200 000. The methods and reagents, i.e. matrixes and antibodies, used during the experiments need to be further evaluated and improved. The development of a quick test, an LFA, is still possible if more time and resources are dedicated to the project. The quick test will be a groundbreaking method to use within autoimmune diseases and transplant rejection.

V. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank our supervisor Sofia Järnum at Hansa Medical AB, for the opportunity and guidance during the project. She provided a lot of useful articles on relevant research to help us gain knowledge. She also helped us during the experiments and interpretation of the results which played an important role in how the project developed. We would also like to thank Annika Sundberg at Hansa Medical AB, who helped us during the experiments involving ECL. Finally we want to thank Pelle Ohlsson, our supervisor at the Department of Biomedical Engineering at LTH, who helped us with the structure of the article.

The authors of the article have contributed equally throughout the project.

REFERENCES

- [1] ThermoFisher.com. *Immunoglobulin IgG Class*. [online] Available at: <http://www.ebioscience.com/knowledge-center/antigen/immunoglobulin/igg.htm> [Accessed 15 Feb. 2017]
- [2] Hansamedical.com. (2017). *Hansa Medical in brief*. [online] Available at: <http://hansamedical.com/en/the-company/hansa-medical-in-brief/> [Accessed 27 Apr. 2017].
- [3] Björck L, Johansson B, Shannon O. (2008). *IdeS: A Bacterial Proteolytic Enzyme with Therapeutic Potential*. [online] Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0001692> [Accessed 9 May 2017]
- [4] Winstedt, L et al. PLoS One. (2015). *Complete Removal of Extracellular IgG Antibodies in a Randomized Dose-Escalation Phase I Study with the Bacterial Enzyme IdeS – A Novel Therapeutic Opportunity*. [online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4503742/> [Accessed 9 May 2017]
- [5] Hansamedical.com. (2017) *About IdeS*. [online] Available at: <http://hansamedical.com/en/pipeline/ides/about-ides/> [Accessed 9 May 2017]
- [6] Björck L, Johansson B, Shannon O. (2008). *IdeS: A Bacterial Proteolytic Enzyme with Therapeutic Potential*. [image] Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0001692> [Accessed 9 May 2017]
- [7] Winstedt, L et al. PLoS One. (2015). *Complete Removal of Extracellular IgG Antibodies in a Randomized Dose-Escalation Phase I Study with the Bacterial Enzyme IdeS – A Novel Therapeutic Opportunity*. [image] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4503742/> [Accessed 9 May 2017]
- [8] sites.path.org *Lateral flow tests*. [image] Available at: <https://sites.path.org/dx/rapid-dx/technologies/lateral-flow/> [Accessed 19 May 2017]
- [9] Daud M, Kawde A-N, Sajid M. (2015) *Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review*. [online] Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S131961031400129X> [Accessed 9 May 2017]
- [10] Rasooly A, E. Herold K. (2009). *Chapter 12 Immunochromatographic Lateral Flow Strip Tests*. In: Zhang G et al. *Methods in Molecular Biology: Biosensors and Biodetection*, Vol. 504. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LCC, pp. 171
- [11] Mesoscale.com. *Electrochemiluminescence*. [online] Available at: https://www.mesoscale.com/en/technical_resources/our_technology/ecl [Accessed 16 May 2017]
- [12] Bio-rad-antibodies.com. *Chapter 2: ELISA Formats*. [online] Available at: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html> [Accessed 18 Apr. 2017]
- [13] ThermoFisher.com. *Overview of Protein Electrophoresis*. [online] Available at: <https://www.thermoFisher.com/se/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-electrophoresis.html> [Accessed 10 May 2017]

Utveckling av system för reglering av pump vid hjärtevaluering

Klara Peraić (BME-14), Ellen Kastensson (BME-14)

Sammanfattning—För att ett hjärta ska transplanteras bör donatorns blodgrupp, kroppsstorlek och eventuellt ålder stämma överens med mottagarens. Metoderna som finns idag är inte tillräckliga för att testa ett hjärtas pumpningsförmåga.

Denna rapport beskriver utvecklingen av ett program i LabView som detekterar snabba viktförändringar vid hjärtevaluering inför en eventuell transplantation. Tidigare har Igelösa Life Science AB utvecklat en uppställning för flödesmonitorering vid hjärtevaluering. Genom att koppla upp det donerade hjärtat till två lastceller och ett pumpsystem med slangar till hålven, lungartär, lungven samt aorta, kan dess vikt kontinuerligt mätas.

Resultatet av projektet blev ett program som kontinuerligt analyserar hjärtats viktförändring. Vid ventrikelflimmer kommer hjärtat snabbt öka i vikt och pumpsystemet kommer då avbrytas. På detta sätt kan hjärtats förmåga att pumpa ut tillräckliga mängder blod till en ny mottagare evalueras.

Uppställningen kommer utgöra en viktig säkerhetsfunktion för att avgöra organets lämplighet för transplantation.

I. INTRODUKTION

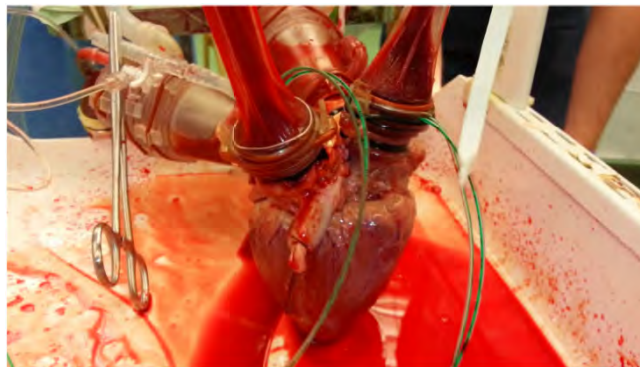
INFÖR hjärttransplantation behöver ett antal kroppsliga parametrar analyseras hos donatorn och mottagaren. Dessa parametrar inkluderar bland annat:

- EKG
- mätning av syreupptagsförmågan
- ekokardiografi
- koronarangiografi
- blodgruppering
- vävnadstypning
- undersökning av njurfunktion
- eventuella virusjukdomar (HIV, hepatit B och C)

Även kön, kroppsstorlek och eventuellt ålder bör stämma överens mellan donator och mottagare. Idag använder läkare sig av dessa parametrar för att bestämma om ett donerat hjärta är lämpligt för transplantation [1]. Ofta kan patienter som fått ett transplanterat hjärta drabbas av hjärtsvikt [2]. Detta projekt syftar till att utveckla en metod som evaluerar ett donerats hjärtas pumpningsförmåga. På så sätt tillförs ytterligare en evalueringsaspekt innan ett hjärta opereras in i en mottagare.

A. Bakgrundsteckning

Inför en transplantation plockas det donerade hjärtat ut från donatorn och spolades med kall kardioplegisk vätska



Figur 1. Uppställning av hjärta med pumpsystem vid experimentellt försök på Igelösa Life Science AB

för att skydda hjärtmuskulaturen. Därefter lagras hjärtat tillfälligt i en kall ischemisk miljö tills det ska opereras in hos mottagaren. Hjärtat måste förses med syresatt blod inom 4 till 5 timmar efter att det plockats ut från donatorn, vilket förklarar varför transplantationen måste ske inom denna tidsram. I en tidigare studie gjord på avdelningen för thoraxkirurgi på Lunds Universitetssjukhus jämfördes två grupper av grishjärtan behandlade på olika sätt efter att ha tagits ut ur donatorn. Den första gruppens hjärtan spolades med St Thomas kardioplegisk lösning och lagrades i ischemisk miljö i 2 timmar. Den andra gruppens hjärtan spolades med samma lösning och lagrades i en ischemisk miljö i 12 timmar. Samtliga hjärtan monitorerades noggrant under en 24 timmar lång reperfusion. Det visade sig att hjärtan som lagrats i 12 timmar följt av en reperfusion på 24 timmar fick allvarligare skador. Därför är det av stor fördel att minimera tiden före transplantation. [3]

Efter hjärttransplantation kan patienter drabbas av hjärtsvikt. När hjärtat överbelastas reagerar det genom att öka i tillväxt. När hjärtat inte längre kan öka i storlek hamnar hjärtat i svikt. Vid hjärtsvikt kan hjärtat inte pumpa runt blodet så effektivt som det brukar göra vilket kan resultera i att donatorn känner sig trött och andfådd. Det händer även ibland att hjärtat inte startar efter operation, att patienter råkar ut för avstötning eller att de drabbas av infektioner. Dessa parametrar påverkar patientens återhämtning och framtida livskvalité. [4] [2]

Som lösning till att ett stort antal donerade hjärtan ej används har Igelösa Life Science AB påbörjat utveckling av ett system som testar hjärtats pumpningsförmåga innan transplantation. Systemet består av ett pumpsystem som hjärtat

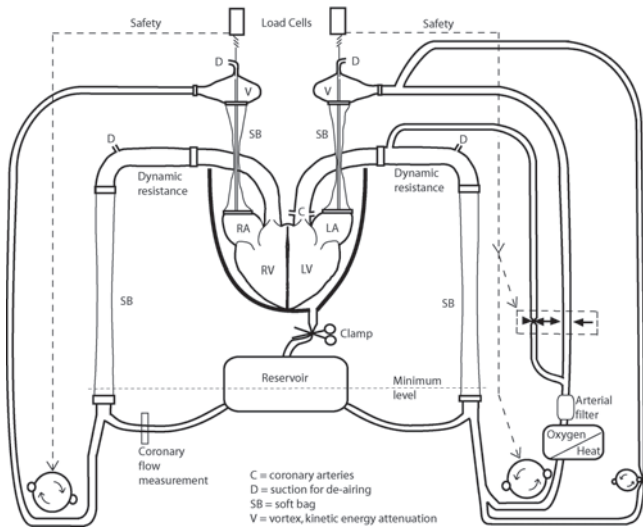
Inlämnat den 5 juni 2017

Emailadress: {mte14kpe@student.lu.se, mat14eka@student.lu.se}

Teknisk handledare: Tomas Jansson, Institutionen för Biomedicinsk Teknik

Klinisk handledare: Trygve Sjöberg, Igelösa Life Science AB

Klinisk handledare: Audrius Paskevicius, Igelösa Life Science AB



Figur 2. Schematisk bild på pumpsystemet tidigare framtaget på Igelösa Life Science AB

hängs upp i, se Figur 1, samt av två lastceller som kopplas till hjärtat: en lastcell fästs vid aorta, den andra lastcellen fästs vid vena cava, se Figur 2. Lastcellerna mäter kontinuerligt vikten på det upphängda hjärtat, och skickar regelbundet mätdata till programvaran som utvecklats till projektet. Uppställningen mäter därmed hjärtats förmåga att pumpa ifrån sig blod. Om hjärtat plötsligt får ventrikelflimmer och därmed svårighet att pumpa runt blod kommer blodet ansamlas i hjärtat och dess vikt kommer öka. Till följd av denna viktökning kommer programmet avbrytas och pumparna som utvecklats av Igelösa Life Science AB stanna. Denna metod ska utföra ytterligare en evalueringsaspekt innan transplantation. Som tidigare nämnts behöver fortfarande andra parametrar som bland annat kön, kroppsstorlek och blodgrupp tas hänsyn till. Genom att använda denna metod kommer chanserna för en lyckad hjärttransplantation öka.

B. Syfte

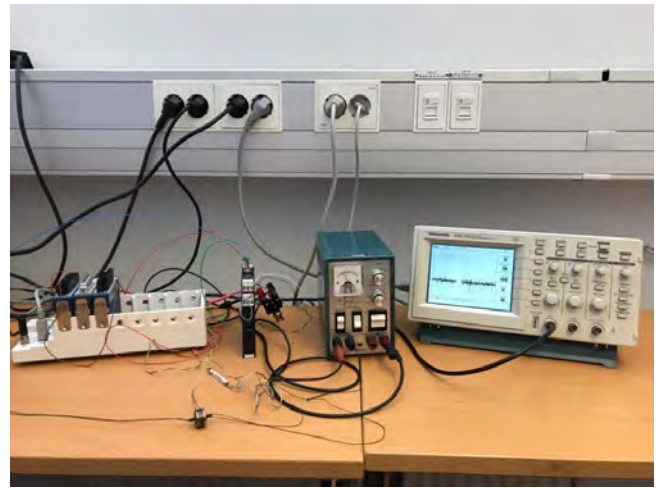
I samråd med våra kliniska handledare från Igelösa Life Science AB bestämdes det att vidareutveckla ett program som tidigare tagits fram till detta projekt. Därför kommer projektets fokus att ligga på framtagandet av programmet som kommer användas i slutprodukten för hjärtevaluering.

II. METOD

A. Förstudie

Studie av tidigare projektrapport samt litteraturstudie av två artiklar som tidigare publicerats inom området gjordes för att få en inblick i ämnet [3] [6].

Ett möte på Igelösa Life Science AB med Trygve Sjöberg och Audrius Paskevicius gjordes i början av projektet för att bestämma uppbyggnaden på programvaran som skulle utvecklas. Efter det påbörjades en studie om användning och implementering i programmet LabView. Användarmanualen *Digital Signal Processing and Digital Communications* [5]



Figur 3. Experimentell uppställning, från vänster till höger: datainsamlingsystem (DAQ), förstärkare, spänningsgenerator, oscilloskop. Längst fram: lastcell

samt olika tutorials på Youtube var till stor hjälp.

I det tidigare projekt som gjorts inom området samlades först 400 sampel in för att skapa ett medelvärde av hjärtats vikt. Detta kallas för nollkalibrering och användes som referensnivå för hjärtats vikt. Därefter samlade programmet kontinuerligt in viktsampel som jämfördes med referensvärdet och fick inte överstiga ett angivet kritiskt värde. [7]

Problemet med tidigare års modell är att den inte tagit hänsyn till att hjärtats vikt fluktuerar under evalueringen. Viktförändringar kan bero på vätskeansamlingar, så kallade ödem, vilket resulterar i att hjärtats totalvikt långsamt kan variera under mätningens gång. För att lösa denna problematik valdes det att nya samlade mätvärden ska jämföras med ett glidande medelvärde som kontinuerligt bildas av de senast insamlade datapunkterna. På så sätt skapas en mer verklig bild av hur hjärtats vikt kan förändras. Samtidigt kan programmet detektera kraftiga viktförändringar.

B. Hårdvara

Hårdvaran i produkten, se Figur 3, består av två lastceller av *Modell 31* från tillverkare Honeywell [8]. Lastcellernas känslighet är 2.243mV/V och har en maximal kapacitet på 4.5kg . Lastcellerna är därefter kopplade till en förstärkare från tillverkare SENECA, *Modell Strain Gauge Converter WZSG* [9]. Signalen som sedan skickas vidare går till en A/D-omvandlare från tillverkare National Instruments med ett datainsamlingskort (DAQ-kort) av *Modell NI-9205* [10]. Datainsamlingsystem, förstärkare, lastcell och spänningsgenerator fanns tillgängliga i början av projektet då de införskaffades av förra projektgruppen. Lastcellernas uppgift är att omvandla vikt till en mätbar elektrisk spänning. På så sätt kan hjärtats vikt kontinuerligt mätas. Vidare används förstärkaren för att amplifiera signalen till det önskade spänningsintervallet

0-10 volt. Rådatan måste omvandlas med hjälp av A/D-omvandlaren innan den är redo att användas och tolkas av programspråket LabView i datorn.

C. Mjukvara

Nedan beskrivs samtliga moment som genomfördes under projektets gång i den ordning som de implementerats. Programmet skapades i LabView2014 [11] och består av två stycken fönster: ett fönster med mjukvara och ett fönster med användargränssnittet. I det första fönstret skapades ett program som kontinuerligt samlade in viktsampel och lade in dessa i två listor, se Figur 7. I försök gjordes en kort lista med de senaste fem insamlade mätvärdena samt en längre lista med de senaste hundra insamlade mätvärden. Vid initialisering av datainsamlingskortet DAQ valdes en sampelhastighet på 500 Hz samt tio "sampel att läsa". Med detta menas att tio följande mätvärden medelvärdesbildas. Det är sedan detta medelvärde som används i listorna. Sampelhastigheten bestämdes sådan att den ska undertrycka interferens med elnätverket. Med en samplefrekvens på 500Hz samplas värden med följande tidsintervall:

$$\frac{1}{500} = 0.002\text{sekunder}$$

Medelvärdesbildningen innebär att listorna fylls på med nya värden med följande tidsintervall:

$$0.002 \times 10 = 0.02\text{sekunder}$$

Den korta listan består av 5 värden vilket motsvarar viktinformation från de senaste 0.1 sekund, enligt:

$$0.02 \times 5 = 0.1\text{sekunder}$$

På samma sätt beräknas den långa slingan på 100 värden innehålla information från de senaste 2 sekunderna, enligt:

$$0.02 \times 100 = 2\text{sekunder}$$

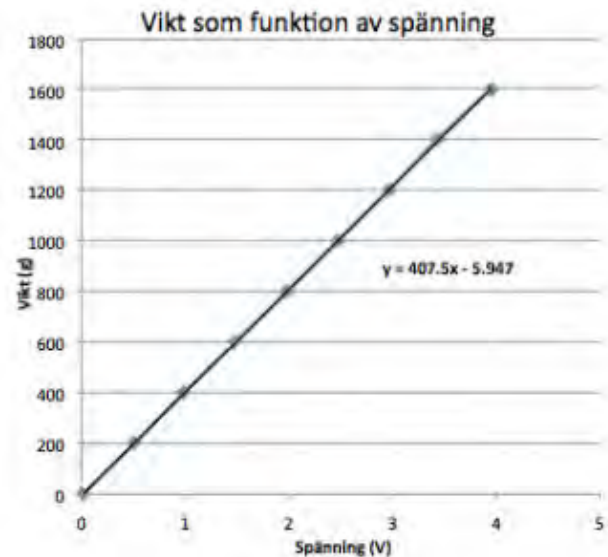
Därmed motsvarar den korta listan i detta försök ett hjärtslag på 0.1 sekunder. Vid färdigt program kan båda listornas längder ställas in så den korta listans längd som visar sig lämpligt utifrån experimentella studier.

När lastcellerna belastas skickas en signal i form av spänning till datainsamlingssystemet DAQ. För att kunna utnyttja denna signal i programmet har tidigare projektgrupp gjort en nollkalibrering mellan vikt (y) och spänning (x) där följande ekvation togs fram:

$$y = 407.5x - 5.947$$

Nollkalibreringen gjordes genom att mäta olika tyngder på en köksvåg för att sedan hänga samma tyngd i lastcellen och plotta motsvarande spänningsvärde. Ett linjärt samband mellan vikt och spänning gavs enligt Figur 4. [7]

Den korta listan som skapats ska motsvara en hjärtslag och den långa listan ska fungera som referensvärde. I försöken bestod den korta listan av fem värden, där ett nytt värde läggs in vid varje nytt sampel och det äldsta



Figur 4. Graf som visar vikt som funktion av spänning vid kalibrering av lastcellen. Grafen är framtagen av BME-studenter som tidigare arbetade med detta projekt, [7].

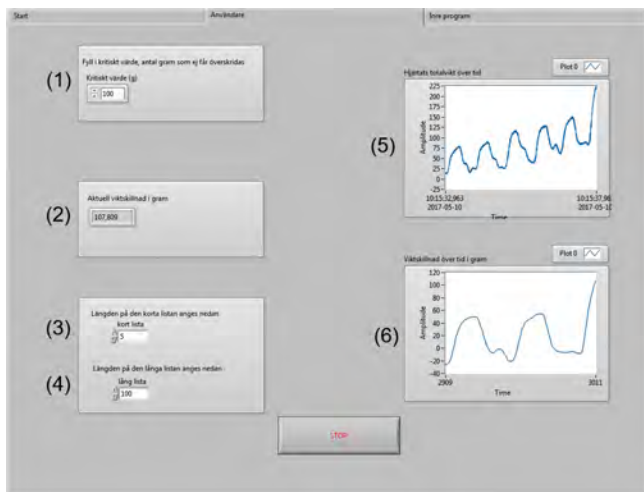
värdet kastas. Den långa listan fungerar likadant fast med hundra insamlade mätvärden, där de senaste fem insamlade mätvärdena motsvarar den korta listans fem mätvärden. Den längre listan fungerar alltså som ett flytande referensvärde som den korta listan ska jämföras med. Differensen mellan medianen av den korta listan och medianen av en längre listan ska sedan jämföras med ett kritiskt värde som användaren själv matar in. Det kritiska värdet är ett gränsvärde i gram på hur stor blodvikt som inte får överskridas i hjärtat.

Ifall differensen inte överstiger det kritiska värdet fortsätter programmet att exekveras. Om differensen plötsligt blir större än det kritiska värdet avslutats programmet, detta för att det skett en drastisk förändring av hjärtats vikt och hjärtat inte längre kan pumpa ifrån sig tillräckliga mängder blod. När programmet avbryts skickas en utsignal i form av en digital etta till digital-till-analog-omvandlaren. Denna signal detekteras och påverkar därefter pumphuset - hur detta går till behandlas ej i detta projekt.

För att testa om uppställning med lastcell, förstärkare, spänningsgenerator och datainsamlingssystem fungerar tillsammans med programmet exekveras programmet samtidigt som lastcellen belastas. Till att börja drog en person i lastcellen för att se förändringar i användargränssnittet, se Figur 5. När resultaten var tillfredsställande testades det även att hängas olika föremål för att efterlikna pulsslåg.

III. RESULTAT

I det första fönstret i LabView2014 visas det kopplingsschema som har programmerats, se Figur 7. Programmet börjar med att skapa två listor utanför en while-loop, som fylls med det första samplade värdet från datainsamlingssystemet. Därefter fylls listorna succesivt



Figur 5. Användargränssnitt i programmet

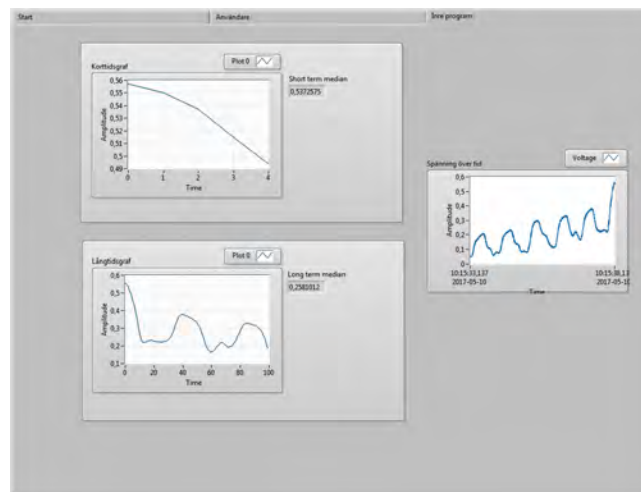
på med nya insignaler och de äldsta mätvärdena slängs. Listornas medianer jämförs och när denna differens överstiger det kritiska värdet avbryts while-loopen, programmet avslutas och en digital etta skickas ut. Denna digitala etta åskådliggörs med hjälp av oscilloskopet, se Figur 3, genom att spänningen på utsignalen plötsligt ändras från 0V till 5V.

Det andra fönstret i LabView2014 visar användargränssnittet, se Figur 5. Det är detta fönster användaren ser och interagerar med. Tre flikar presenteras för användaren, "Start", "Användare" och "Inre program", som innehåller olika typer av information. I den första fliken, "Start", introduceras användaren till programmet enligt:

Välkommen! Detta är ett program utvecklat för kontinuerlig viktmätning vid hjärtevaluering inför transplantation. Projektet utvecklas för Igelösa Life Science Center AB. Bläddra mellan flikarna ovan för att komma till önskad meny. Genom att bläddra vidare till flik "Användare" möts du bland annat av grafer som visar vad som sker i programmet när mätningar utförs.

Användning av programmet sker enligt följande ordning (se Figur 5):

- 1) Användaren möts av en startmeny och klickar sig vidare till fliken "Användare"
- 2) Det kritiska värdet anges i gram i ruta (1) i Figur 5.
- 3) Den korta och den långa listans längd bestäms i ruta (3) och (4).
- 4) Användaren startar exekveringen
- 5) Beloppet på viktskillnaden över tid visas kontinuerligt i ruta (2).
- 6) Två grafer ritas upp: (5) hjärtats totalvikt över tid, och (6) viktskillnad över tid.
- 7) Ifall aktuell viktskillnad understiger det kritiska värdet fortsätter exekveringen.
- 8) När aktuell viktskillnad överskrider det kritiska värdet avslutas programmet och en digital etta skickas ut.



Figur 6. Inre program

- 9) En stoppknapp finns tillgänglig ifall användaren själv vill avbryta programmet.

Grafen med hjärtats totalvikt över tid finns för att användaren ska få en översiktlig uppfattning om hur hjärtats vikt förändras under tiden mätningarna utförs. Grafen för viktskillnaden över tid visar det aktuella tidsförloppet för viktskillnaden mellan den långa och korta medianen. Det är denna viktskillnad som inte får överstiga kritiska värdet.

Den tredje fliken kallas "Inre program", se Figur 6. Här finns ytterligare mätdata som beskriver förloppet i programmeringen. Denna mätdata är väsentlig för att se så att programmet fungerar som det ska. I det inre programmet visas två grafer. Den översta grafen visar hur medianen från den korta listan varierar över tid medan den undre grafen visar hur medianen för den längre listan varierar över tid. Till höger om varje graf skrivs respektive median ut i siffror. Det finns även en graf som visar spänning över tid. Denna kurva visar kontinuerligt spänningssamplerna som kommer in. Motsvarande kurva finns i fliken "Användare" men där har spänningen gjorts om till vikt. Den vanliga användaren, till exempel läkare på sjukhus, som inte har användning av detaljerna i programmet kommer inte heller ha användning av denna flik.

Vid sista testkörningen av programvaran gav det önskad effekt. De små fel som tidigare upptäckts var åtgärdade. Graferna visade korrekt viktförändring över tid. Det kritiska värdet motsvarande verkligt värde i gram. Programmet stängdes även av när differensen översteg det kritiska värdet. Programmet ansågs nu av Igelösa Life Science AB att kunna testas på ett riktigt grishjärta. Dock fanns inte tillräckligt med tid till att genomföra detta.

IV. DISKUSSION

Mycket tid lades på arbetet i början, vilket gjorde att det snabbt visades goda resultat och väldigt tidigt hade ett program utvecklats som i praktiken såg ut att fungera.

Dessvärre testades programmet sent tillsammans med Igelösa Life Science AB vilket gjorde att det slutliga resultatet aldrig hann testas på ett riktigt grishjärta. Dock visade den slutgiltiga produkten lovande resultat och uppfyllde de kriterier som sattes från början.

Olika svårigheter stöttes på under arbetets gång. De flesta motgångarna var inom programmeringen. LabView var för oss ett nytt sätt att programmera vilket innebar att programmering och felsökning tog längre tid än vanligt. Det största problemet som stöttes på i programmeringen var hur den korta listans fem första värden skulle motsvara den långa listans fem första värden. Även problematiken med hur det kontinuerligt skulle kastas ett värde samtidigt som ett nytt likadant värde skulle komma in på första plats i de båda listorna var svår att lösa. Ett antal problem stöttes på vid användning av programmet. I början av utveckling av programmet togs ett absolutbelopp av differensen av medianerna. Efter möte med handledare bestämdes det att ta bort absolutbeloppet. Detta för att det enda som spelar roll är om hjärtat inte kan göra sig av med blod, inte fallet då hjärtat gör sig av med blod väldigt snabbt.

Ett annat fel som upptäcktes var att programmet direkt avbröts då exekveringen startade med hjärtat upphängt. Detta fel berodde på att de båda listorna från början innehöll fem respektive hundra nollor. När sedan kvoten mellan korta listans median och långa listans median jämfördes så översteg den direkt det kritiska värdet då den långa listan fortfarande hade värdet noll som median. Lösning på detta problem var att först fylla de båda listorna med det första samplade värdet från lastcellen innan exekveringen satte igång.

Vid senare testning av det färdigutvecklade programmet insågs det att det skedde en fördröjning av signalen i förstärkaren. Vid belastning av lastcellen dröjde det två sekunder innan signalen gav utslag i användargränssnittet. Två alternativ presenterades för att lösa problematiken, antingen skulle förstärkaren kalibreras om eller behövde en ny förstärkare införskaffas. Vi valde att kalibrera om förstärkaren. Detta gjordes tillsammans med Audrius Paskевичius genom att ladda ner "Easy Setup" från SENECA och ändra ett antal inställningar. På detta sätt kunde fördröjningstid mellan lastcell och dator förbypassas. Att byta förstärkare är en förbättring som kunde gjorts, detta för att helt förbypassa problemet med fördröjning på ett säkrare sätt. I framtiden kan även lastceller med högre känslighet användas för bättre resultat.

Till att börja med utvecklades ett program där en lastcell används. Om detta program visar sig vara tillräckligt bra, skall duplicering av programkod göras så att två lastceller simultant kan användas i slutprodukten.

För att vidare förbättra programmet bör antalet samplade mätvärden som motsvarar ett pulsslag mer djupgående studeras. Den korta listan ska motsvara ett helt pulsslag för ett hjärta. I utveckling av produkten användes fem mätvärden, vilket motsvarar 0.1 sekunder. Denna längd på listan är ej

rimlig då detta skulle motsvara en puls på 600 slag per minut. Vid användning av produkten bör den korta listan anpassas beroende på hjärtats puls och kapacitet. I början av programutvecklingen bestämdes listornas längder till fem respektive hundra värden. Denna inställningen förändrades efter samtal med Audrius så att listornas längd kan ställas in från användargränssnittet innan exekvering av programmet. Människans genomsnittliga vilopuls ligger mellan sextio och åttio slag per minut, alltså mellan 1.0 - 1.33 slag per sekund. [12]. Personer som tränar hårt kan sänka sin vilopuls ännu lägre, då kan den ligga runt fyrtio slag per minut. Det framgår därmed att människors puls är väldigt olika och vid vidareutveckling av produkt bör denna aspekt studeras noggrannare.

V. ETIK

Frågan om etik är ytterst relevant i detta projekt. För att ta fram en färdig produkt som ska användas för hjärtevaluering inför transplantation måste den, förr eller senare, testas med verkliga hjärtan. I utvecklingsstadiet användes lösa vikter för att simulera ett upphängt hjärta, vilket fungerade väl. På så sätt kan programmet och produkten vidareutvecklas utan att några verkliga hjärtan, och därmed djur, används.

För att prova programvaran på ett riktigt hjärta behövs två stycken grisar enligt de tidigare studier som utförts i området. Den ena grisen är den så kallade *Donor Pig*, vilket innebär att hjärtat från denna gris kommer vara upphängt i uppställningen. Den andra grisen, *Support Pig*, behövs för att få en normal syresättning av blodet som går igenom det upphängda hjärtat. Genom att lägga ett snitt i ljumsken på *Support Pig* dras blod från lårartären till det upphängda hjärtat för att sedan tas tillbaka till grisen genom lårvenen. Denna gris, *Support Pig*, är bedövad under hela proceduren [6]. Varje gång produkten testas kommer det krävas två grisars liv. Därför är det väsentligt att endast testa produkten när den visar tillfredsställande resultat i laboratorium.

Då denna produkt är ämnad för att rädda liv anses det nödvändigt att testa produkten på så lika mänskliga förhållanden som möjligt. Ifall produkten inte testas på ett hjärta från ett djur finns det ingen möjlighet att se om produkten uppfyller de bestämda kraven och eventuella fel som endast uppstår med ett verkligt hjärta skulle ej kunna åtgärdas. För att kunna använda denna produkt på ett människohjärta är det alltså nödvändigt att först testa den på ett grishjärta. Dock bör försök med grishjärtan ske så sent i utvecklingen som möjligt för att inte göra onödiga tester och slösa på djurliv. Därmed är det av stor fördel att kunna använda hjärtsubstitut så långt i programutvecklingen som möjligt.

VI. HÅLLBAR UTVECKLING

Hållbar utveckling definieras som "utveckling som tillgodoser dagens behov utan att äventyra kommande generationers möjligheter att tillgodose sina behov" enligt

Brundtlandrapporten, 1987 [13]. Detta refererar till både ekonomisk, ekologisk och social hållbarhet. När hållbar utveckling kopplas till denna produkt så försöker användning, materialuppbyggnad samt nyttan för att rädda liv tillgodoses. En stressfri arbetsmiljö bidrar till hållbar utveckling inom sjukvården. Produkten skall inte förändra läkares arbetssätt. Produkten skall endast utgöra ytterligare en utväreringsaspekt innan det donerade hjärtat opereras in i värdkroppen. Många läkare upplever idag att deras vardag blir allt mer stressig. Miljön kan vara väldigt stimmig och läkare behöver flera gånger ta tuffa beslut mellan liv och död. Med denna produkt kan vårdpersonal känna sig säkrare på att hjärtat kommer uppfylla de krav som ställs av den nya värdkroppen. Då arbetssättet ej förändras, samt ytterligare säkerhet innan operation, finns förhoppningar om att sänka stressnivån hos vårdpersonalen. Komplexierade användargränssnitt ökar stressnivån, detta har tagits till hänsyn och därför är detta användargränssnitt enkelt att interagera med för vårdpersonal.

Tidigare års studenter har vid val av material tänkt på hållbarhet. För att inte slösa på resurser som pengar eller hårdvara krävs att materialet är tåligt och inte går sönder. Lastcellerna behöver vara tåliga mot kroppsliga vätskor. [7]

Denna produkt är utvecklad för att rädd liv. Av alla personer som får ett donerat hjärta dör 15 procent inom ett år, och en så stor siffra som 40 procent dör inom tio år [2]. Med denna produkt blir förhoppningsvis det donerade hjärtat bättre anpassat i mottagaren samt även höja livskvaliteten och livstiden efter operation.

VII. SLUTSATSER

Det utvecklade programmet tillsammans med den experimentella uppställningen (Figur 3, Figur 7) har lovande potential för att i framtiden prövas kliniskt. I detta stadie av utvecklingen fungerar mätsystemet som väntat. Då inga mätningar har utförts på hjärtan är det svårt att förutsäga huruvida programmet och uppställningen är optimala med ett hjärta. Vidareutvecklingen av tidigare års projekt hur lyckats, men det återstår fortfarande arbete innan projektet är helt färdigt. Vi hoppas att andra studenter från Medicin och Teknik på LTH kommer vilja ta sig an denna spännande utmaning.

VIII. EFTERORD

Vi vill tacka de personer som gjort detta kandidatarbete möjligt. Först och främst tackar vi Trygve Sjöberg, docent i thoraxkirurgi på Lunds Universitet, och Audrius Paskevicius, forskningsingenjör i thoraxkirurgi på Lunds Universitet, som båda forskar på Igelösa Life Science AB. Tack vare dem fick vi möjlighet att skriva detta projekt och vidareutveckla produkten för hjärtevaluering.

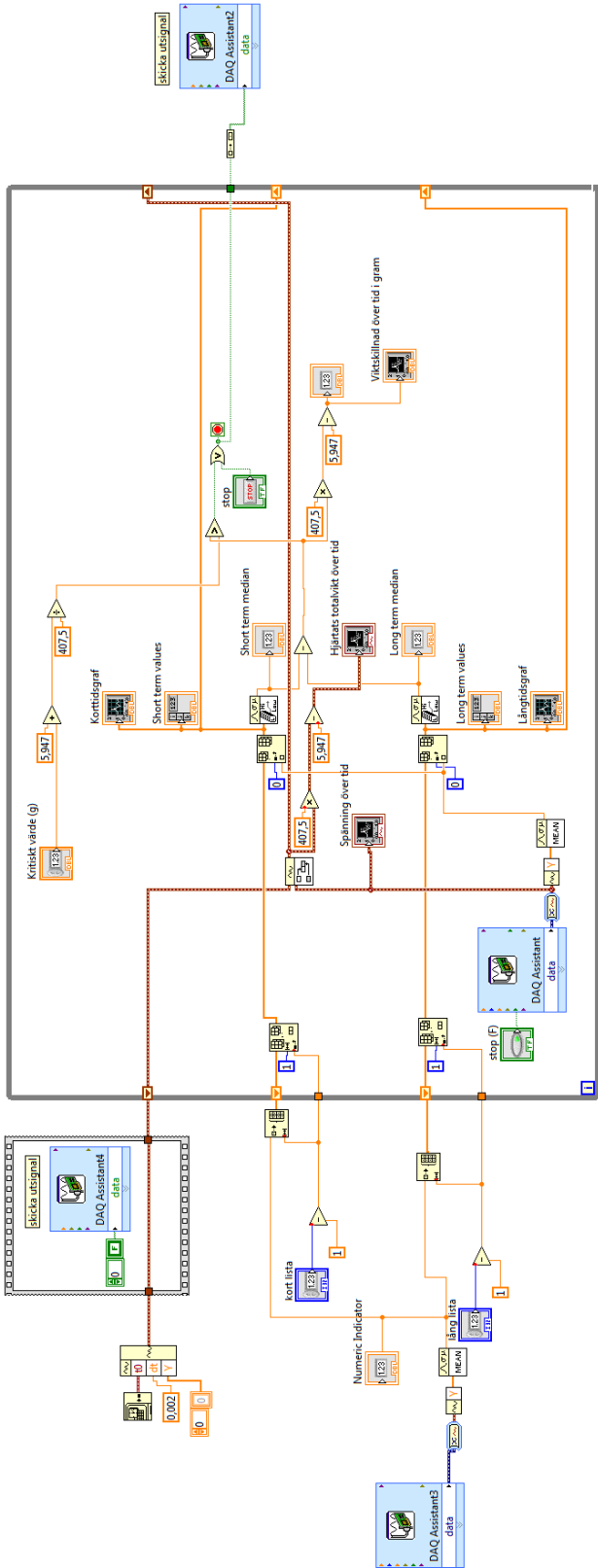
Vi vill även tacka vår tekniska handledare Tomas Jansson, docent i Biomedicinsk Teknik vid Lunds Universitet, som hjälpt oss under projektets gång och svarat på våra frågor. Sist men inte minst tackar vi den Medicintekniska avdelningen på Lunds Universitetssjukhus som lånade ut en lokal och

personalen som hjälpt och stöttat oss i projektet.

Under projektets gång har de mesta av arbetet fördelats jämt mellan studenterna. All implementering och programmering har diskuterats fram och skett i samråd. Under projektskrivningen har E.Kastensson mer fokuserat på tidigare studier och hårdvaran medan K.Peraić beskrivit utvecklingen av programvaran.

REFERENSER

- [1] H. Genberg "Hjärtransplantation", *Netdoktor.se*, 2009. Tillgänglig: [http : //netdoktor.se/hjart - karlsjukdom/artiklar/hjarttransplantation/](http://netdoktor.se/hjart-karlsjukdom/artiklar/hjarttransplantation/) [Hämtad: 2017-05-02]
- [2] V.Sigurdardóttir , "Hjärtransplantation", *Internetmedicin*, 2012. Tillgänglig: [http : //www.internetmedicin.se/page.aspx?id = 1919](http://www.internetmedicin.se/page.aspx?id=1919), [Hämtad: 2017-05-08]
- [3] A. Budrikis, Q. Liam, R. Bolys, B. Westerlaken, S. Steen, "Effects of Cardioplegic Flushing, Storage, and Reperfusion on Coronary Circulation in the Pig", 1999
- [4] "Hjärtsvikt vad är det?", *Hjärt-Lungfonden*, 2016. Tillgänglig: [https : //www.hjart - lungfonden.se/Sjukdomar/Hjartsjukdomar/Hjartsvikt/?gclid = CjwKEAjw9MrIBRCr2LPek5 - h8U0SJAD3jfhtjFTE6GI5B1OsYcKMcAWv0wBIMfmIzmq2ci7dBX - mJR0CURnw_wcB](https://www.hjart-lungfonden.se/Sjukdomar/Hjartsjukdomar/Hjartsvikt/?gclid=CjwKEAjw9MrIBRCr2LPek5-h8U0SJAD3jfhtjFTE6GI5B1OsYcKMcAWv0wBIMfmIzmq2ci7dBX-mJR0CURnw_wcB). [Hämtad 2017-05-06]
- [5] National Instruments, Texas, USA. *Digital Signal Processing and Digital Communication*, 2005. Tillgänglig: [http : //physweb.bgu.ac.il/ bogomole/Books/Labview/LabVIEW %20Digital%20Signal%20Processing.pdf](http://physweb.bgu.ac.il/bogomole/Books/Labview/LabVIEW%20Digital%20Signal%20Processing.pdf). [Hämtad 2017-05-10]
- [6] A. Budrikis, R. Bolys, Q. Liao, R. Ingemansson, T. Sjöberg, S. Steen "Function of Adult Pig Hearts After 2 and 12 Hours of Cold Cardioplegic Preservation", 1998.
- [7] M. Giegold, M. Janson, "Utveckling av system för flödesmonitorering vid hjärtevaluering", 2016.
- [8] Honeywell, USA, Model 31, Part No: 060-1426-04. Tillgänglig: [https : //measurementsensors.honeywell.com/ProductDocuments/ Load/Model31_Datasheet.pdf](https://measurementsensors.honeywell.com/ProductDocuments/Load/Model31_Datasheet.pdf), s.1-3. [Hämtad 2017-05-02]
- [9] Seneca, Padova, Italy, Z-SG Strain Gauge Converter. Tillgänglig: [http : //www.senecainstruments.com/datasheets/modular - converters - isolators/manuals/seneca - z - sg - manual.pdf](http://www.senecainstruments.com/datasheets/modular-converters-isolators/manuals/seneca-z-sg-manual.pdf). [Hämtad: 2017-05-02]
- [10] National Instruments, Texas, USA, "Datasheet NI-9205". Tillgänglig: [http : //www.ni.com/pdf/manuals/374188a02.pdf](http://www.ni.com/pdf/manuals/374188a02.pdf). [Hämtad 2017-05-03]
- [11] National Instruments, Texas, USA "LabView", 2014. Tillgänglig: [https : //www.ni.com/labview](https://www.ni.com/labview). [Hämtad 2017-05-04]
- [12] G. Bjerneröth Lindström, "Hjärta och blodomlopp", *1177.se* 2005. Tillgänglig: [https : //www.1177.se/Tema/Kroppen/Cirkulation - och - andning/Hjarta - och - blodomlopp/](https://www.1177.se/Tema/Kroppen/Cirkulation-och-andning/Hjarta-och-blodomlopp/). [Hämtad 2017-05-10]
- [13] "Hållbarutveckling", *Kungliga Tekniska Högskolan*, 2017. Tillgänglig: [https : //www.kth.se/om/miljo - hallbar - utveckling/utbildning - miljo - hallbar - utveckling/verktysglada/sustainable - development/hallbar - utveckling - 1.350579](https://www.kth.se/om/miljo-hallbar-utveckling/utbildning-miljo-hallbar-utveckling/verktysglada/sustainable-development/hallbar-utveckling-1.350579). [Hämtad 2017-05-02]



Figur 7. Programvara i LabView

Volume Status Estimation Using Arterial Blood Pressure

Ebba Ahlberg (BME-14), Sophia Grimmeiss Gramh (BME-14)

Abstract—Today, most of the organs that are donated in Sweden come from brain-dead patients. It is a very important but difficult process to preserve these organs before transplantation. If the homeostasis is not maintained, organs can be damaged. The preservation is facilitated if fluid balance is maintained. Pulse Pressure Variation (PPV) is a hemodynamic parameter that doctors use in the intensive care unit today to facilitate the assessment of fluid status in both brain-dead and alive patients. The aim of this project was to develop an open algorithm that calculates PPV for researchers to use, since it is a scarce commodity today. A method to calculate PPV using the Lomb-Scargle spectral estimator and ordinary least-squares regression was developed and demonstrated on blood pressure data from pig. The method can provide its output at any stage of the cardiac cycle, and is invariant to phase shifts between the cardiac and respiration cycles. For the most part, the method calculated satisfying PPV values. However, a few sequences of the arterial blood pressure data had outliers that the method was not able to handle. Thus, abnormal PPV values were calculated. The method could be a reliable way to calculate PPV, although it should be improved before being clinically used.

I. INTRODUCTION

A. Donation after Brain Death

In 2015, 764 organs were transplanted in Sweden of which 133 organs came from living donors and 631 came from deceased donors. In the same year 34 patients died while waiting for a new organ. It indicates that the need exceeds the number of organs available for donation today. When it comes to organ donation from deceased donors, Sweden has chosen to apply a process known as DBD, Donation after Brain Death [14].

The main challenge before transplantation is to preserve the quality of the organs. If homeostasis is not maintained the organs can develop irreversible damage. Several pathological changes occur following brain death [10]:

- 1) Hypertension and cardiovascular dysfunction can arise from inhibited circulation to the brain stem.
- 2) Hypothalamus has a subordinate control of endocrine organs. The concentration of posterior pituitary hormones such as ADH decreases quickly in the blood circulation. More than 80% of all brain-dead patients develop diabetes insipidus due to ADH deficiency. Diabetes insipidus causes excessive diuresis, which exacerbates hypovolemia (insufficient blood volume) and

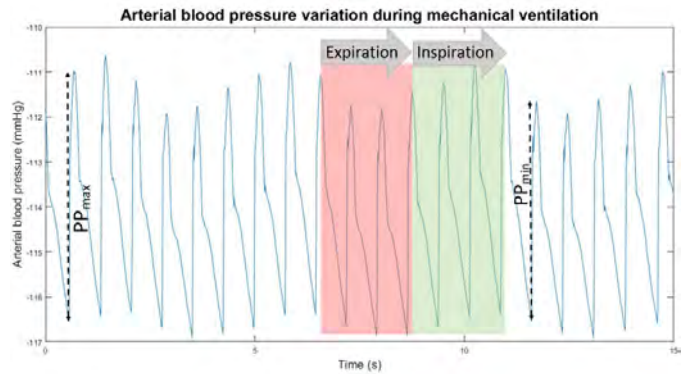


Figure 1. This figure shows how the arterial blood pressure changes in a mechanically ventilated patient. During inspiration and expiration, the diastolic (the local minima) and the systolic arterial blood pressure (the local maxima) will exhibit the sinusoidal shaped variations that can be seen in the signal. The figure also shows how PP_{min} and PP_{max} are defined; PP_{min} is the smallest arterial pressure difference between systole and diastole, and PP_{max} is the largest.

hypotension. Diabetes insipidus is furthermore known to interrupt the body's electrolyte balance.

- 3) Hypothalamus also controls the body temperature. When its function is lost, the patient can develop hypothermia or hyperthermia.
- 4) With a damaged brain stem, the ability for spontaneous respiration ceases. In addition, neurogenic pulmonary edema can arise if the patient has high blood pressure and high sympathetic activity.
- 5) An immunologic response is triggered when the circulation to the brain is inhibited. The concentration of proinflammatory cytokines increases and an immune activation of organs occurs.

To maintain a healthy environment for the organs there is a focus on tissue perfusion, inotropic support, prevention of hypothermia, oxygenation, and ventilation [3]. It is vital to restrain the pathological changes mentioned previously to maintain normal oxygen levels, blood pressure, heart rate, hormones, pH, body temperature etc. Many of these variables, for example heart rate and arterial blood pressure, are already continuously monitored in the intensive care unit (ICU) today [13].

B. Cardiac Output

Cardiac output (CO) is a way of characterizing the efficiency of the heart. It is calculated as stroke volume multiplied by

Submitted June 6, 2017

E-mail: mte14eah@student.lu.se, kem14sgr@student.lu.se

Technical advisor: Kristian Soltesz, Department of Automatic Control, Lund University

Clinical advisor: Stig Steen and Trygve Sjöberg, Igelösa Life Science

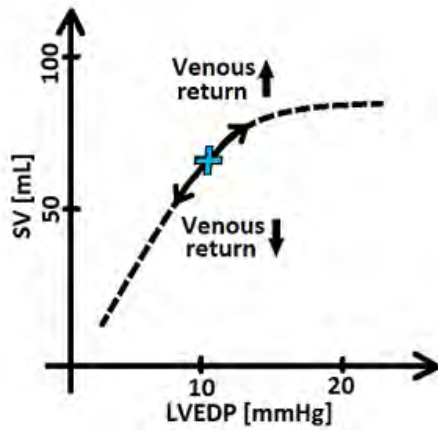


Figure 2. The Frank-Starling relation describes how stroke volume (SV) depends on left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP). On the steep portion of the curve, a small increase in the LVEDP will result in a large increase of SV. However, on the plateau, SV will not change significantly.

heart rate, which gives it the unit of liters per minute. Maximizing CO will therefore maximize the amount of oxygenated blood that is transported to the body and the removal of carbon dioxide. Stroke volume can be regulated by optimizing the patient's fluid balance. It is practically impossible to directly measure a patient's volumetric fluid status (the volume of fluid in the blood circulation). There are, however, some signals that can be used as indicators. One indicator is the variations of the arterial blood pressure due to pressure changes in the airway and the lungs during respiration, see Figure 1. When brain-dead patients are mechanically ventilated these variations are periodic with a deterministic period [7].

C. The Frank-Starling mechanism

The Frank-Starling mechanism relates the end diastolic pressure of the left ventricle to stroke volume, as shown in Figure 2. An increase in the end diastolic volume results in a stretch of the ventricles, which causes the surrounding cardiac muscles to contract more forcefully. This, in terms, increases CO [1].

Hypovolemic patients, i.e., patients with insufficient blood volume, are located on the steep portion of the Frank-Starling curve, see Figure 2. A small increase of the left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), being an effect of an intravenous volume expansion, will result in a relatively large stroke volume increase on this portion of the Frank-Starling curve. Hypovolemic patients are therefore said to be fluid responsive [1]. For high LVEDP, the stroke volume will remain almost constant despite further increases in LVEDP. Consequently, the plateau of the Frank-Starling curve constitutes an upper limit for achievable CO [1]. If more fluid is added, the patient might become hypervolemic, which increases the risks of tissue edema and a reduced ability to absorb oxygen in the tissues [7].

A healthy individual usually operates on the steep portion of the Frank-Starling curve. The person's ventricles have an opportunity to move up and work closer to the plateau in

stressful situations, to increase their stroke volume (SV) and thereby also their CO. Only 50 % of critically ill patients do, on the contrary, respond to a fluid bolus. It is therefore of great value for doctors to be provided with tools to predict whether these patients are fluid responsive or not [7].

D. Pulse Pressure Variation

Pulse pressure is defined as the difference between systolic and diastolic blood pressure. It has been shown that patients with hypovolemia have more prominent arterial blood pressure variations compared to patients with normo- and hypervolemia. Thus, the difference between the maximal pulse pressure (PP_{max}) and minimal pulse pressure (PP_{min}), see Figure 1, is greater for hypovolemia. Pulse pressure variation can therefore be used to predict fluid responsiveness. [1]

There are four reasons as to why the pulse pressure variations change depending on the fluid status [7]:

- 1) The blood vessels' ability to withstand external pressure decreases when the patient is hypovolemic. As a result, the blood pressure in vena cava superior will be affected more by the intrathoracic pressure changes due to respiration.
- 2) The volume of the right atrium decreases as a result of increased pleural pressure. This effect is even greater in a hypovolemic patient since the atrium contains a smaller amount of blood and is easier to compress. It results in a smaller filling of the right atrium and a smaller preload.
- 3) West zone 1 (pulmonary arterial pressure < alveolar pressure) or West zone 2 (pulmonary venous pressure < alveolar pressure) are more likely to occur in a hypovolemic patient. The capillaries in the lung are compressed during inspiration which causes a larger afterload since a smaller amount of blood can exit the right ventricle [16].
- 4) The smaller the preload, the more likely it is that the heart operates on the steep part of the Frank-Starling curve, which makes it more sensitive for changes in preload.

All the above mentioned factors decrease right ventricle output, which leads to a smaller amount of blood in the left atrium, and a decreased stroke volume and cardiac output. In a hypervolemic state these parameters are not as easily affected and the variations in arterial blood pressure will therefore be smaller [7].

E. Pulse pressure variation criteria

To predict if a patient is fluid responsive using PPV, there are some criteria that must be fulfilled. Firstly, the patient must be mechanically ventilated without spontaneous breathing. Otherwise, the pressure variations would not have formed a uniform pattern. Both brain-dead and anesthetized patients are mechanically ventilated. Secondly, the patient must be in sinus rhythm; PPV cannot be used for fluid prediction on patients with severe arrhythmia. Thirdly, the patients' chest and pericardium must be closed. Fourthly, the intra-abdominal pressure value should be normal and a patient's tidal volume

must strictly be ≥ 8 ml/kg of body weight. These criteria are not only fulfilled for brain-dead patients, but also for many other ICU patient groups [1].

F. Technologies today

There are several hemodynamic monitoring systems used on the intensive care unit today that measure PPV or Stroke Volume Variation (SVV) to assess volume status. Some examples are PiCCO (PULSION Medical Systems, Munich, Germany), LiDCO (LiDCO Group PLC, London, Great Britain), and FloTrac (Edwards Lifesciences Corporation, Irvine, California). The PiCCO (Pulse Contour Cardiac Output) system uses two techniques - transpulmonary thermodilution and pulse contour analysis - to assess hemodynamic parameters such as cardiac output, PPV, intrathoracic blood volume (preload), and extravascular lung water (pulmonary edema) [9]. LiDCO (Lithium Dilution Cardiac Output) uses lithium chloride dilution to calculate cardiac output [11], PPV and SVV. The FloTrac system measures arterial blood pressure, vascular compliance, and systemic vascular resistance to calculate SVV and CO [2]. The mentioned monitors rely on proprietary algorithms. Consequently, the availability of open counterparts, as the algorithm presented herein, is of great value to the research community.

G. Thesis

Based on arterial blood pressure data, it is possible to develop a robust and reliable method for quantification of pulse pressure variation using peak detection, spectral estimation using the Lomb-Scargle method, and linear regression.

II. DATA

A single file with arterial blood pressure data from a pig that had been collected during another project was used, sampled at 100 Hz. The underlying experiment was ethically approved by 'Malmö/Lunds Djurförsöksetiska nämnd', case number M174-15.

III. METHOD

It would be preferable to measure PPV momentarily to obtain real-time values and to ensure that a patient's fluid status will not change within an estimation window. That is, however, not practically possible since the algorithm needs a certain number of cardiac cycles to accurately calculate values for parameters such as frequency and amplitude of the blood pressure variations that occur due to respiration, as well as PP_{min} and PP_{max} . The signal was therefore analyzed in sections of 10 seconds to include approximately 2 respiratory cycles. Each section was then processed separately in accordance with the flowchart in Figure 3.

Firstly, all the systolic blood pressure peaks were detected. A prominence-based peak detector was used to distinguish the systolic peak of every heart beat from smaller local peaks, see Figure 1. Together, the peaks formed a sinusoidal shaped curve from which a linear trend was calculated and removed.

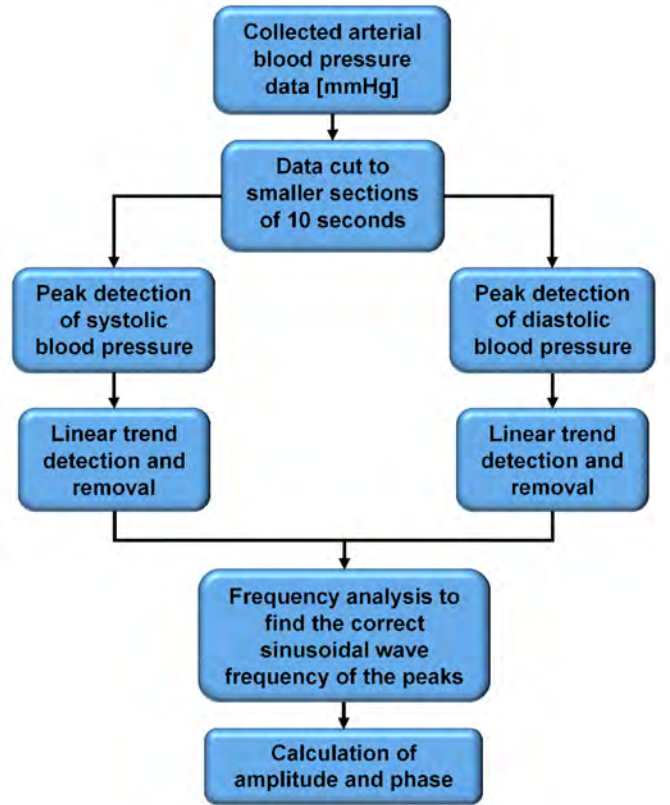


Figure 3. A flowchart of the proposed signal processing method, yielding PPV from arterial blood pressure data.

The linear trend was not of interest but would have affected subsequent frequency analysis negatively if not removed.

In order to find the sinusoid, $A \sin(t + \varphi)$, best fitted to the systolic blood pressure data (maximum values) the frequency, amplitude, and phase had to be determined.

The dominant frequency of the variations was determined using the Lomb-Scargle spectral estimator. Unlike the Fourier transform, the Lomb-Scargle estimator does not rely on evenly spaced samples, and can be used to compute signal power at any frequency [12]. This feature is of great advantage since the heart rate is not always steady and periodic. The blood pressure maximum (and minimum) values might not occur at regular intervals.

The strongest signal component is typically that of the heart beats. To avoid detecting it, in favor of the respiratory variations, an upper boundary on the considered frequency band needs to be set. It was set to the inverse of the double median time difference between two consecutive detected systolic pressure peaks. If the heart rate was fixed, this would correspond to the Nyquist frequency of the heartbeat signal. The lower frequency boundary was set to exclude sinusoidal signals with periods larger than twice the size of the estimation window's time axis, 10 s.

Based on the systolic blood pressure data, the amplitude and phase of the systolic blood pressure variations were estimated using the least-squares method.

An arbitrary sinusoid can be characterized by the parameters

A (amplitude) and φ (phase), or equivalently, by the linear weights a and b in

$$A \sin(t + \varphi) = a \cos(t) + b \sin(t). \quad (1)$$

By weighting the systolic blood pressure data on a sine and a cosine function, using the parameters a and b rather than A and φ , the problem to find the amplitude and phase was transformed into a linear least squares problem.

The phase, φ , and the amplitude, A , were then obtained through

$$\varphi = \arctan\left(\frac{a}{b}\right) \quad (2)$$

and,

$$A = \sqrt{a^2 + b^2}. \quad (3)$$

With the calculated frequency, phase, and amplitude a sinusoidal was fitted to the systolic blood pressure peaks, with more data points than the original peak curve. The linear trend was then added again.

The same process was done for the diastolic blood pressure data, see Figure 3. The pulse pressure was then computed. Pulse pressure variation was thereupon calculated according to the definition [8]:

$$PPV = \frac{PP_{max} - PP_{min}}{PP_{avg}} \cdot 100, \quad (4)$$

where

$$PP_{avg} = \frac{PP_{max} + PP_{min}}{2}. \quad (5)$$

The method was applied to 43 sequences of the signal, where one value of PPV and two frequencies (frequency of the fitted systolic and diastolic sinusoids) were calculated for each sequences.

IV. RESULTS

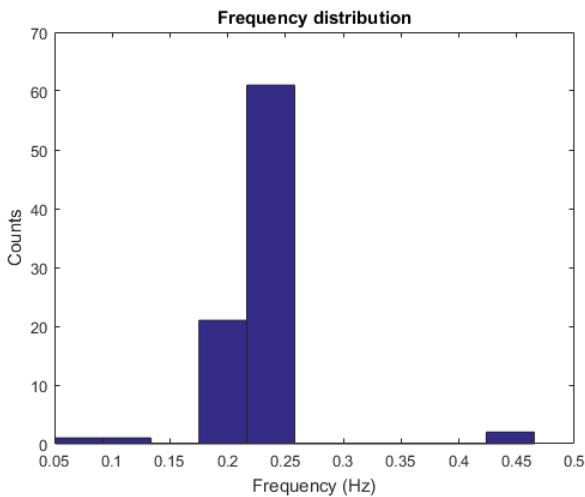


Figure 4. A histogram displaying the distribution of calculated diastolic and systolic frequencies. Four deviant values were collected: Two around 0.45 Hz and two at about 0.1 Hz.

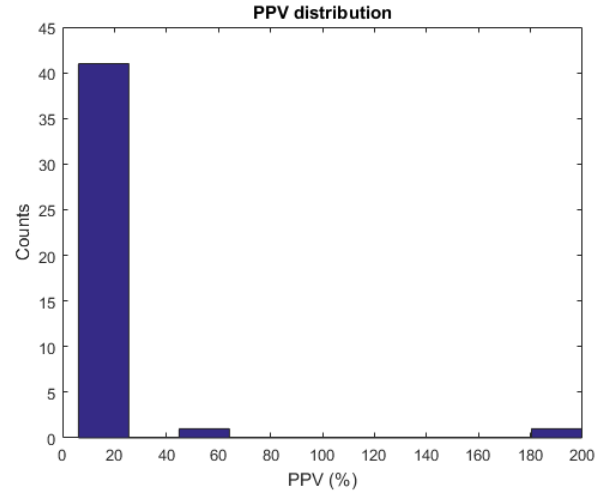


Figure 5. A histogram displaying the distribution of the calculated PPV values. All values except two lied in the interval from 5 % to 25 %. The other two PPV values can be seen at 50 % and 190 %.

The systolic and diastolic frequencies were calculated to 0.223 ± 0.043 . As seen in Figure ?? (Frequency), two deviant values around 0.45 Hz and two around 0.1 Hz ± 4.04 .

A. A representative example

One part of the signal was analyzed where both the diastolic and systolic blood pressure peaks formed regular sinusoidal signals, see Figure 6. Both frequencies were equal to 0.222 Hz. With equation (4) and (5) and the values of PP_{min} and PP_{max} shown in Figure 7, the PPV was calculated to 13.6 %.

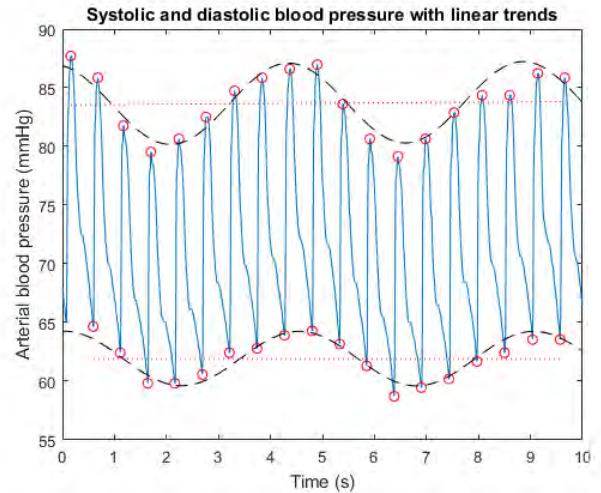


Figure 6. This is the estimation window from Section IV-A. It shows how the arterial blood pressure varies over the time of 10 s. The systolic and diastolic peaks are marked with circles, the calculated sinusoids, and the linear trends are drawn as dotted lines.

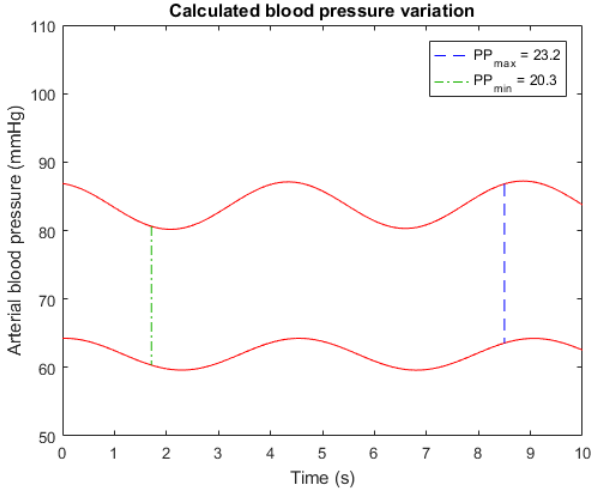


Figure 7. The calculated systolic and diastolic signals from Section IV-A with associated PP_{min} and PP_{max} .

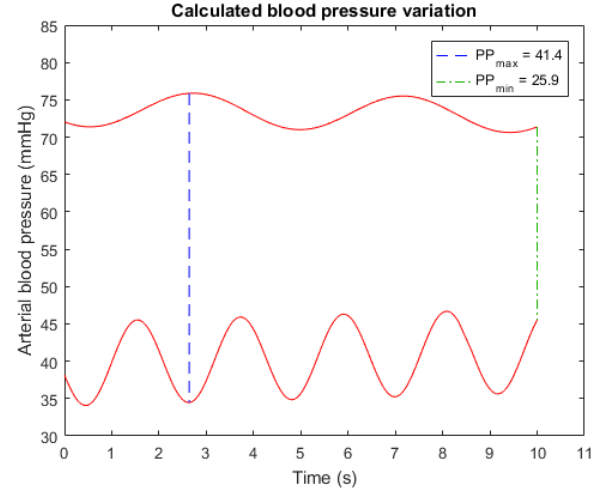


Figure 9. The calculated systolic and diastolic signals from Section IV-B with associated PP_{min} and PP_{max} .

B. A problematic example

The method was also evaluated on a part of the signal that displayed unusually large deviations. The calculated diastolic fit had a much higher frequency than the calculated systolic fit, see Figure 8. The systolic frequency was 0.225 Hz while the diastolic frequency was 0.459 Hz, see Figure 10. With equation (4) and (5) and the values of PP_{min} and PP_{max} shown in Figure 9, the PPV was calculated to 46.2 %.

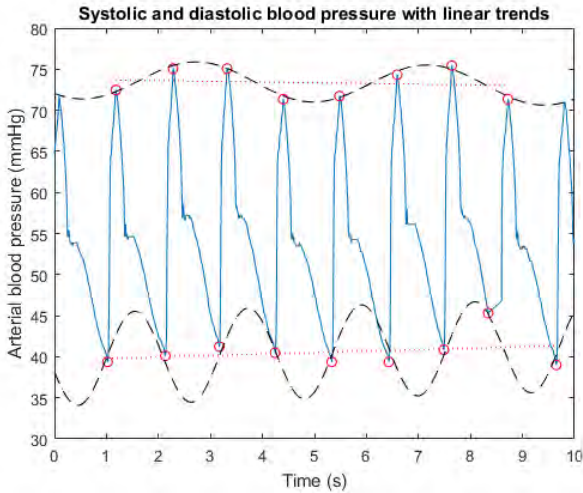


Figure 8. This is the estimation window from Section IV-B. It shows how the arterial blood pressure varies over the time of 10 s. The systolic and diastolic peaks are marked with circles, the calculated sinusoids and the linear trends are drawn as dotted lines.

V. DISCUSSION

A. Interpretation of frequency results

The results in Section IV-A illustrate the frequency and PPV value that was for the most part obtained when the method was tested on different parts of the arterial blood pressure data. In

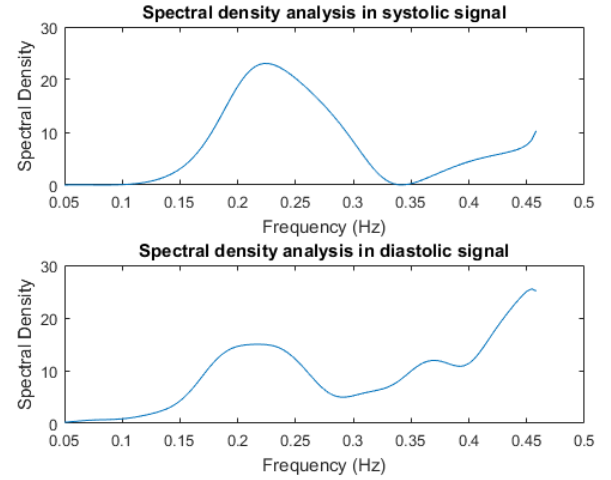


Figure 10. Frequency analysis of the systolic and diastolic blood pressure signals from Section IV-B. As seen in these graphs, the dominant frequency was 0.225 Hz for the systolic signal and 0.459 Hz for the diastolic signal.

Figure 6, the calculated sinusoidal signals follow the systolic respectively the diastolic peaks well. The aim was to find a method that can interpolate and calculate PPV even between measured arterial blood pressure points, and for the most part, the method succeeded. The respiratory frequency estimated in Section IV-A was 0.222 Hz. This value falls within the confidence interval calculated in Section IV. It means that the pig inhaled and exhaled during the time of four and a half second.

The method gave abnormal frequencies for three analyzed signal sequences. As seen in Figure 8, the calculated sinusoidal signal (dotted line) does not follow the variations of the diastolic pressure values well. Based on the peak pattern, it looks like the estimated frequency 0.459 Hz is much too high. In the estimation window, approximately four and a half periods of the calculated signal can be seen in the window. If only the peak values are studied, it looks like a better

estimation would have been a frequency where only one and a half period had been shown. In Figure 8, one of the diastolic peaks has a significantly larger blood pressure value than the other detected peaks. This outlier can be seen after 8 s. Since it is the only value that differs, this alteration should not be interpreted as a fluid status change in the pig. Instead, this outlier has probably occurred due to a temporary disruption of the monitor system. The outlier is the causal factor to the inaccurate frequency estimation during the frequency analysis.

The calculated sinusoidal signal for the systolic peaks can also be seen in Figure 8. In contrary to the calculated diastolic signal, this signal follows the systolic blood pressure peaks well. The frequency of this signal was 0.225 Hz. In line with the frequencies seen in Section IV-A, this frequency value falls under the confidence interval. The diastolic and systolic frequencies should both coincide with the respiratory frequency. If the frequencies are not the same either one or both frequencies must be wrong.

In the diastolic power spectral density diagram from Section IV-B, see Figure 10, most power is distributed on the frequency 0.459 Hz. As seen in the figure, this is a frequency that is located very close to the upper boundary on the frequency band. The upper boundary was, in Section III, defined as the inverse of the double median time difference between two consecutive detected pressure peaks. Hence, not all signal components that arise due to the heart beats were excluded. Signal components with lower pulse frequencies, such as 0.459 Hz, were still taken into account in the frequency analysis. These had an unexpectedly high impact on the result for two of the analyzed signal sequences. The inverse of the double maximum time difference between two consecutive detected pressure peaks, would have excluded all pulse frequencies. Thus, it would have been a better upper boundary.

In the diastolic graph in Figure 10, the frequency 0.225 Hz is also clearly represented. Figure 11 shows the diastolic pressure peaks, but in this graph, the sinusoidal signal with a frequency of 0.225 Hz is applied. In this figure, it is possible to see that a signal with the frequency 0.225 Hz follows the diastolic data point variations much better than the frequency 0.459 Hz (compare to Figure 8). This further emphasizes the fact that the estimated frequency should have been approximately 0.225 Hz and not 0.459 Hz. In this graph, it is much easier to identify the outlier around 8 s.

B. Interpretation of PPV result

Since the estimated frequency of the diastolic signal was incorrect, it had a negative impact on the calculated PPV value. The PPV value of the problematic example was much larger than the representative example (46.2% > 13.6%) and lies outside the confidence interval seen in Section IV. In Section IV-B a new value of PPV was calculated with the frequency 0.225 Hz instead. This resulted in a value of 20.7 % instead of 46.2 %.

For human beings, PPV below 10 % indicates that a patient is not fluid responsive, and a PPV above 13 % is a sign of a preload dependent patient [6]. Unfortunately, the authors are not aware of work reporting PPV values in pigs. However, pigs

and humans share hemodynamic similarities. For instance, the systolic/diastolic blood pressure is around 120/80 mmHg in healthy pigs and humans alike [4] [5]. It is therefore likely that the PPV ranges for pigs are similar to the ones that can be seen in humans. With that in mind, 46.2 % is an extremely large number and 20.7% seems to be more reasonable. Out of 43 analyzed sequences, only two calculated PPV values exceeded 25%, see Figure 5. A next step would be to improve the method to make it even less sensitive to outliers. The method needs to be robust and give true PPV values before it can be of any practical use in the health care.

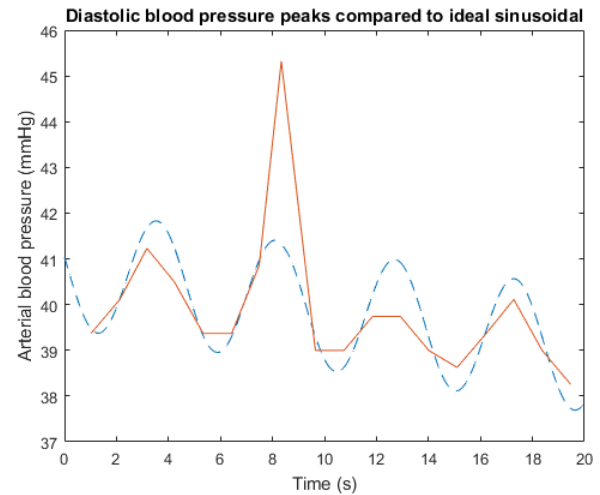


Figure 11. The diastolic blood pressure peaks (continuous line) and a sinusoid with the frequency 0.225 Hz (dotted line) can be seen in this figure.

C. Method improvements

Choosing a larger estimation window with more data points is one way to reduce the destructive effects of such outliers as the deviant value seen in Section IV-B. As mentioned before, in Section IV-B, the calculated diastolic frequency was incorrect. The window width of 10 seconds was in this case not large enough to manage the outlier. However, if the window was increased to 30 seconds, a correct value of the frequency was obtained. With more data points, it would take a little longer to run the program which should not be a problem, as long as PPV can be calculated often enough to be reliable.

Another way to address the problem with outliers might be to calculate the least square residuals. This was tested, but the calculated curve with a frequency of 0.459 Hz managed to fit the data, and even the outlier, well enough that the residuals were not unusually large, see Figure 8. In this case, it would not be possible to detect the outlier only by looking at the residuals. Still, in between the minimum values the calculated sinusoidal did not follow the diastolic signal at all. As mentioned before, improving the spectral density analysis by decreasing the window width would be a way to ensure that the situation in Section IV-B does not happen. If a somewhat correct frequency was obtained, a residual analysis could be used to warn users of the possibly unreliable values of PPV being calculated as a result of outliers.

D. Area of application

Multiple studies have been made, which concludes that fluid monitoring of ICU patients is an effective way to reduce complications and organ dysfunction after extensive surgery [13] [15]. If the organ quality of living patients increased that much by applying fluid therapy, the same can be assumed for brain-dead patients. Since hospitals already monitor the blood pressure of brain-dead patients, the step to integrate software that can calculate PPV and use it to regulate fluid injection is relatively small and would not require additional equipment.

VI. ETHICAL ASPECTS AND SUSTAINABILITY

The arterial blood pressure data used in this project was collected during another, unrelated, experiment. As mentioned before, this underlying experiment was ethically approved by 'Malmö/Lunds Djurförsöksetiska nämnd'. This way, no extra resources had to be used which, is preferable both from a sustainable and ethical perspective.

The method does not affect the environment since it is an algorithm and not a physical product. The aim is that the method will be integrated in products that are already used in hospitals today. The low need of additional equipment and consequently also the low need for material is both economically and environmentally sustainable. There are, however, negative consequences of having a publicly available method. There is no way to control which companies uses it and for what purposes. It is therefore possible for people to use this method in non-serious and unethical projects.

There is also a need for additional tests to secure the reliability of this method before it can be used clinically. Firstly, it should be applied on more, already existing, data. Thereafter, when developing a product that is using this method, more animal testings will have to be made. The ethical aspect of this should be considered beforehand and, if possible, the experiment should be combined with another one. Since the animals will be sedated they will also not be in pain.

The aim is to preserve the quality of donated organs and if possible also increase the health of ICU patients. This is also a product that can aid doctors in their decision-making, which will improve their working conditions. With this in mind, animal testings would be ethically defensible.

VII. CONCLUSIONS

PPV monitoring is a good way to help doctors in their decision-making when it comes to fluid status both in donors and ICU patients. This method could be a reliable way to calculate PPV, although further improvements such as optimizing the window width and reduce the negative effects of outliers has to be done before it can be of any practical use.

VIII. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Igelösa Life Science AB for data files and study visit. Stig Steen and Trygve Sjöberg were very welcoming and guided us well through an experiment where hemodynamic parameters from a pig was studied.

We would also like to thank our supervisor Kristian Soltész for sharing his theoretical knowledge and for guiding us

through this project. Furthermore, we would also like to thank him for his infinite patience to answer our questions not only once, but often multiple times.

Both authors contributed equally in every step of the process to finish this project. We have often focused on different parts of the project but have always updated and helped each other out. This division changed from day to day so that we both got the chance to work with all the elements of this project.

REFERENCES

- [1] M. Cannesson, M. Aboy, C. Hofer and M. Rehman, "Pulse pressure variation: where are we today", *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, vol. 25(1), pp. 45-56, 2011.
- [2] Edwards Lifesciences Corporation, 2014, *The FloTrac System 4.0*. http://ht.edwards.com/scin/edwards/eu/sitecollectionimages/products/mininvasive/ar11444-flotrac_algorithm4.0_8.25x11_1lr.pdf [Accessed 5 May. 2017]
- [3] E.B. Finger, 2015, *Organ Preservation*, Medscape. <http://emedicine.medscape.com/article/431140-overviewa4> [Accessed 15 May. 2017]
- [4] J.P. Hannon, C.A. Bossone, C.E. Wade, "Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research", *Letterman Army Institute of Research*, Institute Report No. 379, San Francisco, California, 1989.
- [5] Hjärt-Lungfonden, 2016, *Högt Blodtryck* <https://www.hjart-lungfonden.se/Sjukdomar/Halsa/Hogt-blodtryck/> [Accessed 15 May. 2017]
- [6] LiDCO, 2017, *Normal Hemodynamic Parameters*, <http://www.lidco.com/education/normal-hemodynamic-parameters/> [Accessed 10 May. 2017]
- [7] P. E. Marik, R. Cavallazzi, T. Vasu, A. Hirani, "Dynamic changes in arterial waveform derived variables and fluid responsiveness in mechanically ventilated patients: A systematic review of the literature", *Critical Care Medicine*, vol. 37(9), pp. 2642–2647, 2009.
- [8] F. Michard, "Changes in Arterial Pressure during Mechanical Ventilation", *Anesthesiology*, vol. 103(2), pp. 419–428, 2005.
- [9] P. Nekić, 2016, *Pulse Contour Cardiac Output (PiCCO) Learning Package*, Liverpool Hospital. https://www.aci.health.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0005/306590/Pulse_Contour_Cardiac_Output_Learning_Package.pdf [Accessed 5 May. 2017]
- [10] Norod, 2016, *Protokoll for organdonasjon*. http://w295938-www.php5.dittomene.no/wp-content/uploads/2016/10/Protokoll_for_organdonasjon181016.pdf [Accessed 19 Apr. 2017]
- [11] R.M. Pearse, K. Ikram, J. Barry, "Equipment review: An appraisal of the LiDCO™plus method of measuring cardiac output", *Critical Care Medicine*, vol. 8(3), pp. 190–195, 2014.
- [12] W.H. Press, G.G. Rybicki, "Fast algorithm for spectral analysis of unevenly sampled data", *Astrophysical Journal, Part 1*, vol. 338 pp. 227–280, 1989.
- [13] T. Scheeren, C. Wiesenack, H. Gerlach, G. Marx, "Goal-directed intraoperative fluid therapy guided by stroke volume and its variation in high-risk surgical patients: a prospective randomized multicentre study", *Journal of Clinical Monitoring and Computing*, vol. 27, pp.255–233, 2013.
- [14] Socialstyrelsen, 2016, *Organ- och vävnadsdonatorer i Sverige 2015*. ISBN: 978-91-7555-393-1.
- [15] J. Rinehart, C. Lee, C. Canales, A. Kong, Z. Kain, M. Cannesson, "Closed-Loop Fluid Administration Compared to Anesthesiologist Management for Hemodynamic Optimization and Resuscitation During Surgery: An In Vivo Study", *Anesthesia & Analgesia*, vol. 117(5), pp. 1119–1129, 2013.
- [16] J.B. West, "Blood Flow to the Lung and Gas Exchange", *Anesthesiology* vol. 41(2), pp. 124–138 1974