



# Proceedings of Clinical Innovation

Bachelor of Science Projects in Biomedical Engineering  
Lund University

Volume 2, 2015

## Editors:

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

**Tomas Jansson**, Associate Professor, Clinical Sciences Lund, Biomedical Engineering,  
Lund University, and Medical Services, Skåne University Hospital

Department of Biomedical Engineering  
Faculty of Engineering, Lund University  
Box 118  
SE-221 00 Lund, Sweden  
[www.bme.lth.se](http://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)

Emelie Holmberg and Louise Wrangé

*A bioinformatic prediction of TFPI genes in mammals*

Malin Magnusson and Elisabeth Vajta Engström

*Automatisk identifiering av råttors vokalisering i ultraljudsområdet*

Mattias Albinsson and John Heerfordt Sjöqvist

*Compartment Model Based Estimation of Myocardial Blood Flow using Dynamic N-13 Ammonia PET*

Ebba Knutsson and Elin Magnusson

*Dieselpartiklars påverkan på baroreflexen studerad med sekvensmetoden*

Sofia Felding and Emma Lundell

*En studie i klinisk användning av hjärnstamsaudiometri i Region Skåne*

Viktor Lundqvist and Mikael Maga

*Kombinerat mfERG och mfVEP för snabbare och säkrare undersökning av oklar synnedsättning*

Erik Gillsbro and Simon Leppänen

*Korrelationsanalys för att studera möjlig synaptisk koppling hos nervcellspar i sensorimotoriska cortex*

Johanna Bergman and Johan Åkesson

*Microindentation on healing fractures: a comparison between healthy and osteoporotic bone*

Sigrid Björnsdotter and Ebba Palenius

*Optogenetik inom epilepsi: Prototyputveckling av trådlös mikro-LED-stimulator*

Anders Persson

*Screening av maligna melanom med hjälp av infraröd avsökning över hudområden*

Isabelle Johansson and Nadia Wåhlin

*SectioPlan - ett elektroniskt bokningsprogram för planerade kejsarsnitt i Region Skåne*

Innas Forsal and Yann Moreau Brunn

*Trigging av aktionspotential i dagmask med hjälp av ultraljud*

Eleni Kamvissis and Lisa Ulfwi

*Utveckling av experimentell utrustning för blodtrycksstyrd reglering av läkemedelstillförsel*



## Preface

The present volume is the second in a series of Bachelor of Science theses authored by students in the Biomedical Engineering program at Lund University. 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. Thirteen projects are presented which cover a wide range of topics ranging from LED-implants for epilepsy control to software for surgical planning. All projects were conducted during the spring 2015 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 4, 2015 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 Sven Olsson and co-workers at Lund University Innovation System 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, the Medical Faculty at Lund University, who have willingly served as initiators and advisors to the projects: Sten Andreasson, Niels Bendsoe, Fredrik Berglind, Jonas Broms, Jonas Brännström, Cecilia Hindorf, Henrik Jörntell, Merab Kokaia, Monica Lilja, Audrius Paskevicius, Emanuel Smeds, Trygve Sjöberg, Stig Steen, Anders Tingström, Magnus Tägil.

We would also like to express our gratitude to the following persons who have willingly served as supervisors: Stefan Andersson-Engels, Fredrik Berglind, Einar Heiberg, Merab Kokaia, Johan Lindström, Neashan Mathavan, Frida Sandberg, Emanuel Smeds, Martin Stridh, Leif Sörnmo, Thomas Winzell, Karl Åström.

Lund, June 2015

Hanna Isaksson

Tomas Jansson



## Lund University Innovation System Prize in Clinical Innovation

Lund University Innovation System 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. Three groups were selected as finalists by the course management, based on the reports handed in at the first deadline. The following criteria were applied when evaluating the finalists: innovation potential, scientific execution, and quality of the report:

- Mattias Albinsson and John Heerfordt Sjöqvist—Compartment Model Based Estimation of Myocardial Blood Flow using Dynamic N-13 Ammonia PET
- Sigrid Björnsdotter and Ebba Palenius—Optogenetik inom epilepsi: Prototyputveckling av trådlös mikro-LED-stimulator
- Isabelle Johansson and Nadia Wåhlin—SectioPlan: ett elektroniskt bokningsprogram för planerade kejsarsnitt i Region Skåne

The jury, consisting of Linus Wiebe, CEO, Lund University Innovation System, and Hanna Isaksson, course manager, selected Mattias Albinsson and John Heerfordt Sjöqvist as the recipients of the prize, after having delivered an excellent pitch for their project *Compartment Model Based Estimation of Myocardial Blood Flow using Dynamic N-13 Ammonia PET*.



Mattias Albinsson and John Heerfordt Sjöqvist receiving the Lund University Innovation System Prize in Clinical Innovation from Linus Wiebe, CEO (far right). Beside Linus is Sven Olsson, also with Lund University Innovation System, who earlier in the spring did an excellent job in teaching how to deliver a convincing pitch.





# A bioinformatic prediction of TFPI genes in mammals

Emelie Holmberg (BME12), Louise Wrange (BME12)

**Abstract**—TFPI, Tissue Factor Pathway Inhibitor, is a protein with many interesting and possible future applications. As it has been shown that TFPI is both anticoagulant and antimicrobial, the protein could be useful for treatment of both infectious diseases and coagulation disorders. Today, many organisms have had their genomes sequenced. However, the interpretation of genomic data is developing slowly. There are plenty of gene prediction software available online, but they have poor prediction accuracy. Therefore, this project conducts a study of the two isoforms of TFPI, TFPI1 and TFPI2. The study investigates the nucleotide sequence and its exon structure for the genes, TFPI1 and TFPI2 respectively, in different mammals. Similarities in nucleotide sequence and exon structure in the different mammals are surveyed.

Based upon the information obtained on TFPI's nucleotide sequence, a gene prediction method for both TFPI1 and TFPI2 was created. The method resulted in two flowcharts, one for TFPI1 and one for TFPI2, that test if an exon structure codes for TFPI.

When developing a gene prediction for TFPI1 and TFPI2, it is of interest to compare existing gene prediction programs. Therefore, this study also examines the accuracy of two existing gene prediction software, Augustus and GENSCAN.

In this project, it is established that the existing gene prediction software have poor accuracy for both TFPI1 and TFPI2. Since the gene prediction flowcharts produced in this report are designed specifically for TFPI1 and TFPI2, they have better prediction accuracy for these genes than the online software have.

**Keywords:** TFPI1, TFPI2, gene prediction

## I. INTRODUCTION

TFPI, Tissue Factor Pathway Inhibitor is the primary inhibitor for initiation of blood coagulation. There are three isoforms of TFPI called TFPI $\alpha$ , TFPI $\beta$  and TFPI $\delta$ . This report focuses on TFPI $\alpha$  and TFPI $\beta$ , also called TFPI1 and TFPI2 [1]. These proteins have similar characteristics but are located on different chromosomes. Thus, TFPI1 and TFPI2 are not two different splittings of the same gene; they originate from two completely different genes.

The initiation of the blood coagulation cascade is blocked by TFPI, due to its high affinity to inhibit two of the coagulation proteases. TFPI inhibits factor Xa, prothrombinase, the enzyme responsible for cleaving prothrombin and creating the active thrombin. Thrombin turns fibrinogen into fibrin, that together with platelets form the clot. In addition, TFPI inhibits Factor VIIa. Factor VIIa is responsible for the transformation of Factor X into Factor Xa [1].

In addition to its anticoagulant activity, TFPI's C-terminal can be cleaved into antimicrobial peptides. These peptides

are designed to eliminate gram-negative and gram-positive bacteria and cancerous cells [2]. The peptides' antimicrobial activity is believed to be connected to the peptides' positive charges [3]. Due to its antimicrobial activity, TFPI could be a possible replacement to antibiotics, and could be of great use for future treatment of both infection and coagulation disorders [4].

Infectious diseases remain a burden to the healthcare system, and are caused by infectious agents such as bacteria. Bacterial infections can lead to sepsis, a serious illness augmenting worldwide. In the US, approximately 700 000 people contract the disease every year, of which nearly 35 % decrease [5]. Statistically, the numbers are the same in Sweden [6]. Sepsis causes an unregulated coagulation and immune response leading to multiple organ failure. Currently, sepsis is treated with antibiotics. However, treating sepsis through antibiotic therapy has many disadvantages. Firstly, the increasing bacterial resistance against antibiotics is a major issue. In addition, antibiotics cannot affect the unrestrained host response caused by sepsis [4]. Furthermore, the treatment has to be given to the patient in an early state of the disease to be efficient. Thus, new approaches are necessary in order to develop and maintain an efficient treatment against infectious diseases and a sustainable healthcare.

Due to TFPI's potential fields of application, it would be interesting to compare different species' TFPI on a nucleotide as well as an amino acid level. However, this project only focuses on finding and comparing similarities and differences in different mammals' nucleotide sequences and not in amino acid sequences. TFPI's exon and intron structure for different mammals are obtained and compared. These structures and the comparisons are used for developing flowcharts for gene prediction of TFPI1 and TFPI2 in different species.

With the world's growing computational capacity and technology, it has become easy and fast to sequence the entire genomes of organisms. Plenty of organisms already have had their genomes surveyed. However, the interpretation of this data is developing slowly [7]. In order to maximise the use of the collected genomic data, the coding regions and the function of the genes have to be determined, which is a complex task. Nevertheless, many gene prediction software are available today. When inserting a genomic nucleotide sequence, the program predicts its coding regions. Software can be developed for different genes and/or animals, as well as for different nucleotide sequence lengths. Therefore, their accuracy vary depending on the input. In this project, the accuracy of two gene prediction software, Augustus and GENSCAN, are evaluated on their certainty for prediction of

Submitted on June 11, 2015

Mail address: mte12eho@student.lu.se, mte12lwr@student.lu.se

Clinical supervisor: Emanuel Smeds, IKVL Lunds Universitet

## TFPI.

In summary, genomic sequences for TFPI in different mammals are obtained to evaluate the accuracy of the online prediction software Augustus and GENSCAN. TFPI's exon structure in different mammals are obtained to develop flowcharts for a more accurate gene prediction of TFPI1 and TFPI2.

## II. DATA

In this project nucleotide sequences were obtained from the databases NCBI [8] and Ensembl [9]. The latter was also used for collecting TFPI1's and TFPI2's exon structures.

Table I  
DATABASES USED

| Database | Use                                     |
|----------|---|
| NCBI     | Nucleotide sequences                    |
| Ensembl  | Nucleotide sequences and exon structure |

The software used in this project and their field of application can be viewed in table II.

Table II  
SOFTWARE USED

| Software              | Use  |
|-----------------------|--|
| Augustus              | Gene prediction                                      |
| GENSCAN               | Gene prediction                                      |
| EMBOSS Needle         | Alignments and calculating identity score.           |
| fancyGENE             | Alignments   |
| ExpASy Translate Tool | Translating DNA or RNA sequence to protein sequence. |
| EMBOSS Backtranseq    | Translating protein sequence to RNA sequence.        |

The accession numbers for the used nucleotide sequences and transcript sequences in this project are presented in table III and table IV.

Table III  
ACCESSION NUMBERS USED FOR TFPI1

| Animal     | Transcript ID (Ensemble) | GeneBank ID (NCBI) |
|------------|--------------------------|--------------------|
| Human      | ENST00000233156          | CM000664.2         |
| Mouse      | ENSMUST00000028487       | CM000995.2         |
| Ferret     | ENSMPUT00000012360       | GL896993.1         |
| Dog        | ENSCAFT00000023418       | CM000036.3         |
| Macaque    | ENSMMUT00000013182       | NC_007869.1        |
| Rat        | ENSRNOT00000006787       | CM000074.4         |
| Chimpanzee | ENSPTRT00000023585       | CM000316.2         |
| Pig        | ENSSSCT00000017457       | CM000826.4         |

Table IV  
ACCESSION NUMBERS USED FOR TFPI2

| Animal     | Transcript ID (Ensemble) | GeneBank ID (NCBI) |
|------------|--------------------------|--------------------|
| Human      | ENST00000222543          | CM000669.2         |
| Mouse      | ENSMUST00000031674       | CM000999.2         |
| Chimpanzee | ENSPTRT00000035917       | CM000321.3         |
| Cow        | ENSBTAT00000021062       | GK000004.2         |

## III. METHOD

### A. Collecting exon structures

TFPI1's and TFPI2's exon and intron structure in different species was obtained through the database Ensembl. This database displays the length and position of introns, translated exons and untranslated exons (UTR) in a specific gene. In this database, a gene's structure is either verified or predicted by other databases through software and/or experiments. Ensembl refers to the database UniProt as a source, where proteins are classified as predicted or verified. If the proteins are labelled as predicted, it means that UniProt has predicted them using different software. If they are classified as verified, UniProt has experimental evidence for the protein either on a transcript or a protein level. In this project, a structure was classified as verified when there was some experimental evidence for the sequence. Otherwise, it was classified as predicted.

For the mammalian species where structures for TFPI1 and/or TFPI2 were available in Ensembl, information about the number of exons and their length was gathered. This information was collected for verified structures. Tables consisting of the exon lengths, for TFPI1 and TFPI2 respectively, were built.

Ensembl shows a transcript sequence, consisting of exons and introns, from the sequence's 5'-end to its 3'-end. Hence, the first exon in a transcript is the exon closest to the 5'-end. This information has been of importance when deciding the exon order for each structure.

The different mammalian structures for each gene were compared by using the online program fancyGENE. This program graphically aligns exon and intron structure for different species. As all animals do not have the same number of chromosomes, TFPI1 and TFPI2 are not situated in the same positions in different species' genomes. Therefore, the positions for each gene and its internal structure were scaled, in order to be able to compare the mammals' different exon structures. A standard intron length of 100 nucleotides was set between all exons. The first nucleotide in the exon first in order was set as the start position. The scaled structure's positions were plotted in fancyGENE. See table V for the settings used for the program.

Table V  
SETTINGS FOR FANCYGENE

|                           |             |
|---------------------------|-------------|
| <b>Gene size</b>          | 30 Px/Pt    |
| <b>Gene padding above</b> | 15 Px/Pt    |
| <b>Gene padding below</b> | 15 Px/Pt    |
| <b>Legend width</b>       | 300 Px/Pt   |
| <b>tr exon color</b>      | 6,145,31    |
| <b>utr color</b>          | 255,127,127 |
| <b>Intron shape</b>       | line        |
| <b>Intron stroke</b>      | 2           |

### B. Comparing online gene prediction software

The accuracy of existing gene prediction software was examined, in order to analyse their accuracy compared with the prediction method, the flowcharts, developed in this project.

The prediction software Augustus and GENSCAN were evaluated. Both their accuracies for predicting RNA and protein sequences were calculated. The input for these software is a genomic nucleotide sequence. Therefore, nucleotide sequences for TFPI1 and TFPI2 genes respectively were entered into each program. See table VI and VII for the settings used for Augustus and GENSCAN.

Table VI  
SETTINGS FOR AUGUSTUS

|                             |              |
|-----------------------------|--------------|
| <b>Organism</b>             | Homo sapiens |
| <b>Report genes on</b>      | Both strands |
| <b>Alternative splicing</b> | Few          |

Table VII  
SETTINGS FOR GENSCAN

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| <b>Organism</b>               | Vertebrate |
| <b>Suboptimal exon cutoff</b> | 1.00       |

The sequences were obtained from the nucleotide sequences in NCBI (National Center for Biotechnology Information) that Ensembl referred to when displaying the exon and intron structure for a transcript, a gene. To evaluate not only each software's capability of predicting a gene's structure but also its capability of finding the gene, each nucleotide sequence was altered in such way that 5000 nucleotides were added 5' and 3' to the gene's start and stop positions respectively.

Augustus predicts both the coding nucleotide sequence (RNA), the number of exons, the length of the exons and the protein sequence for the input sequence. GENSCAN only predicts the number of exons, the length of the exons and the protein sequence. It does not provide the user with a predicted coding nucleotide sequence (RNA). Therefore, the protein sequences predicted by GENSCAN were back-translated into a nucleotide sequence with the program EMBOSS Backtranseq.

To be able to compare the predictions with the verified sequences on a protein level, the verified nucleotide sequences had to be translated into protein sequences. This translation

was made by using ExPASy Translate Tool. Pairwise comparison of the predicted sequences and the confirmed sequences was made through the alignment program EMBOSS Needle. This program provides an identity percentage score for an alignment. That is, it calculates the similarities in identity between two sequences. The pairwise comparison was made for each one of the nucleotide sequences obtained from NCBI.

When comparing the nucleotide sequences, two different alignments were made. One where the entire verified coding sequence was used, and one where untranslated exons were removed from the sequence. The identity scores received when comparing the sequences, on both protein and RNA level, were collected. Since identity scores for different species were obtained, mean values for prediction of protein and nucleotide sequences for both TFPI1 and TFPI2 were calculated. These values were put into table X.

To compare the two programs in more ways than by only using an alignment tool, a comparison algorithm was developed. This formula is based on the obtained verified exon structures for TFPI1 and TFPI2. Two different variations of the formula were created. Formula 1 is developed for internal exons while formula 2 is developed for initial and terminal exons. In formula 1

$$Score = \frac{n - |n - k|}{n} \times (2000 - \sum_{i=1}^z |x_i - y_i|) \quad (1)$$

$n$  is the number of internal exons in the verified structure,  $k$  is the number of internal exons in the predicted structure,  $x$  is the internal translated exon length in the verified structure,  $y$  is the internal translated exon length in the predicted structure and 2000 is the maximum score.  $z$  is the number of verified internal exons if they are a larger amount than the number of predicted internal exons are. Else  $z$  is the number of predicted internal exons.

Two different formulas were created because of the fact that a gene always should have only one initial exon and one terminal exon. That is, a gene should not have more than one initial/terminal exon nor less than one initial/terminal exon. In the formula created for initial/terminal exons, formula 2,

$$Score = (1 - |1 - k|) \times (1000 - |x - y|) \quad (2)$$

$k$  is the number of initial/terminal exons in the predicted structure,  $x$  is the initial/terminal translated exon length in the verified structure,  $y$  is the initial/terminal translated exon length in the predicted structure and 1000 is the maximum score.

The two algorithms are based on calculating the difference in total translated exon length between a verified and a predicted structure. By subtracting this sum from 2000 or 1000 and then multiplying it with a fraction that is related to the difference in number of exons between the two structures, a score is calculated. The two formulas were used for calculating a score for each software's capability of predicting the accurate number of exons and their lengths in TFPI2 and TFPI1 respectively. The verified exon lengths used in this project, are displayed in tables VIII and IX. Mean scores were calculated for initial, internal and terminal exons respectively. These

scores were put into the same table as the identity scores from EMBOSS Needle, table X.

### C. Gene prediction flowcharts

In order to create flowcharts that predict if a certain gene structure is TFPI1 or TFPI2, the tables containing the verified exon lengths for the proteins' genes in different mammals were studied. Through these studies, it was noted how a specific translated exon differs between mammals.

The flowcharts' input is a nucleotide sequence. Firstly, the prediction takes the number of exons in the nucleotide sequence into consideration. If the sequence does not have the correct number of exons, the prediction ends with the result that the sequence probably does not code for the protein. However, if the sequence has the correct number of exons for the protein, the prediction moves on to the next step.

In the following step, the length of a specific predicted exon is examined. The predicted exon is compared to the corresponding verified exon on three different levels. Firstly, it is examined whether the predicted exon length lies in an interval of the verified length  $\pm 5$  nucleotides. If not, the predicted exon is considered to not be an exon for TFPI. If it however lies in the interval it is examined whether the predicted exon has the exact same length as any of the corresponding verified exon lengths.

If the examined exon length was not in the required interval, the user is provided with the score 0. In case the exon length is in the interval, and equals one of the occurring verified exon lengths, the score 1 is obtained. If the exon length is in the requested interval, but not equals any of the occurring verified exon lengths, the score 0.5 is received.

After obtaining the score, the flowchart continues with the next exon, and the procedure above is repeated until all exons are examined. When the terminal exon has been investigated, all scores obtained are added into a total score. Due to the fact that TFPI1 has 7 exons while TFPI2 has 5, the maximum scores are different. For TFPI1, the maximum score is 7. If the total score equals 7, the nucleotide sequence is considered to code for TFPI1. If the score is between 3.5 and 7, it might be TFPI1. If the score is below 3.5, the sequence most probably is not coding for TFPI1. For TFPI2, the maximum score is 5. If the score equals 5, the nucleotide sequence is presumably coding for TFPI2. If the score is between 2.5 and 5, it might code for TFPI2. If the score is below 2.5, it most probably does not code for TFPI2.

## IV. RESULTS

The verified exon lengths for TFPI2 collected from Ensembl is presented in table VIII.

Table VIII  
VERIFIED EXON LENGTHS FOR TFPI2

| Mammal     | Exon 1<br>(Initial) | Exon 2<br>(Internal) | Exon 3<br>(Internal) | Exon 4<br>(Internal) | Exon 5<br>(Terminal) |
|------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Human      | 88                  | 183                  | 189                  | 171                  | 77                   |
| Chimpanzee | 88                  | 183                  | 189                  | 171                  | 77                   |
| Cow        | 88                  | 183                  | 180                  | 171                  | 83                   |
| Mouse      | 88                  | 183                  | 183                  | 171                  | 68                   |

Two different exon alignments were made for TFPI2 with fancyGENE. The alignment consisting of both untranslated and translated exons is presented in figure 1. Figure 2 presents the alignment for translated exons only.

Figure 1. Untranslated and translated exon alignment for TFPI2

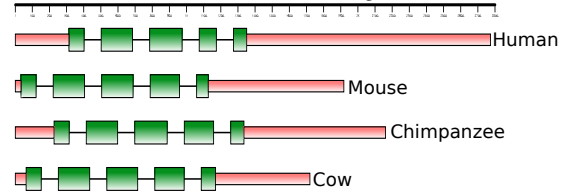
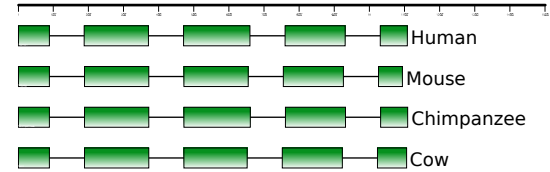


Figure 2. Translated exon alignment for TFPI2



The verified exon lengths for TFPI1 collected from Ensembl is presented in table IX.

Two exon alignments were also performed for TFPI1. In figure 3, the alignment for untranslated and translated exons is presented. The alignment for translated exons only is presented in figure 4.

Figure 3. Untranslated and translated exon alignment for TFPI1

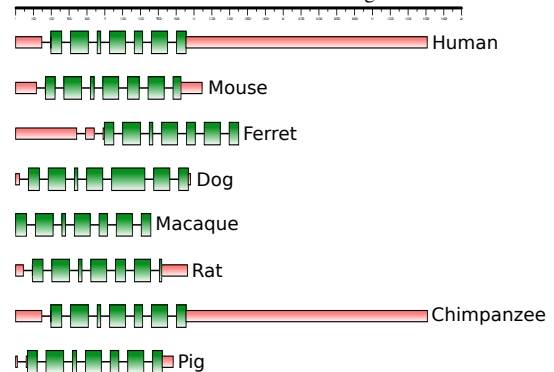
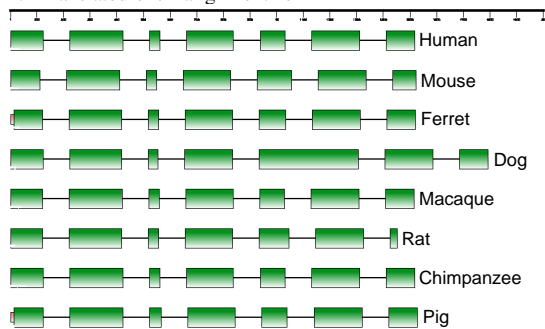


Table IX  
VERIFIED EXON LENGTHS FOR TFPI1

| Mammal     | Exon 1<br>(Initial) | Exon 2<br>(Internal) | Exon 3<br>(Internal) | Exon 4<br>(Internal) | Exon 5<br>(Internal) | Exon 6<br>(Internal) | Exon 7<br>(Terminal) |
|------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Human      | 121                 | 198                  | 39                   | 177                  | 93                   | 180                  | 107                  |
| Chimpanzee | 121                 | 198                  | 39                   | 177                  | 93                   | 180                  | 107                  |
| Macaque    | 121                 | 198                  | 39                   | 177                  | 93                   | 180                  | 107                  |
| Pig        | 109                 | 198                  | 45                   | 177                  | 96                   | 180                  | 107                  |
| Dog        | 121                 | 195                  | 36                   | 180                  | 372                  | 180                  | 107                  |
| Ferret     | 106                 | 198                  | 39                   | 177                  | 99                   | 180                  | 107                  |
| Rat        | 118                 | 198                  | 39                   | 177                  | 111                  | 180                  | 26                   |
| Mouse      | 109                 | 198                  | 39                   | 177                  | 129                  | 180                  | 89                   |

Figure 4. Translated exon alignment for TFPI1



EMBOSS Identity was used to compare the predicted structures with the verified structures for TFPI1 and TFPI2. The mean value of the identity scores, obtained from EMBOSS Identity, are presented in table X. The predicted exon structures were compared with the verified exon structures through the project's scoring formula. The mean value scores from the formula are also presented in table X.

Table X  
EMBOSS IDENTITY VALUE AND SCORING FORMULA VALUE

|  |                |          | TFPI1<br>[%] | TFPI2<br>[%] |
|--|----------------|----------|--------------|--------------|
| <b>Mean value of<br/>EMBOSS identity</b> | Peptide        | Augustus | 53.1         | 91.1         |
|  |                | GENSCAN  | 44.0         | 92.1         |
|  | RNA with utr   | Augustus | 43.2         | 38.1         |
|  |                | GENSCAN  | 35.5         | 31.0         |
| RNA without utr                          | Augustus       | 56.9     | 91.6         |              |
|  | GENSCAN        | 43.1     | 73.8         |              |
| <b>Scoring formula</b>                   | Initial exon   | Augustus | 83.6         | 94.9         |
|  |                | GENSCAN  | 88.2         | 100          |
|  | Internal exons | Augustus | 57.5         | 83.2         |
|  |                | GENSCAN  | 41.1         | 96.5         |
|  | Terminal exon  | Augustus | 81.2         | 91.7         |
|  |                | GENSCAN  | 82.5         | 99.9         |

The two gene prediction flowcharts can be found in figure 5 and figure 6 in *Appendix*.

## V. DISCUSSION

### A. Accuracy of gene prediction software

Augustus has a parameter setting for choosing which species the prediction should be adjusted to. This setting exists in

order to improve the gene prediction. However, there were few mammals to choose from. Therefore, the human setting was used for all species, which also was recommended by the software. Augustus provided both the nucleotide and the peptide sequence while GENSCAN only provided the predicted peptide sequence. It was thus translated and compared to the verified peptide sequence which also was translated from Ensembl. Because of these two translations, there are two possible errors. Since only the peptide sequence was obtained from GENSCAN, the software used for translating had no possibility to find untranslated regions. As Augustus provides both the predicted nucleotide sequence and the predicted peptide sequence, it should also be possible for the software to predict the untranslated regions of the sequence. However, this never occurred. Thus, neither GENSCAN nor Augustus could predict the untranslated regions of a sequence.

As seen in table X, Augustus generally has higher mean values for the different identity scores than GENSCAN. When comparing the scores for TFPI1 with those obtained for TFPI2, the identity scores for the peptide sequences and the RNA, without UTR, sequences are visibly higher for TFPI2 than for TFPI1. It is known that prediction software often makes predictions with higher accuracy for short nucleotide sequences [10]. TFPI2 both has shorter nucleotide sequence and fewer exons than TFPI1, as evident when comparing table VIII with table IX. It is therefore likely that also GENSCAN and Augustus make better predictions for shorter sequences. When analysing the column for TFPI2 it is evident that both software have poor accuracy for predicting RNA sequence with UTR. The difference in identity score is close to 60 percent, with values ranging from 31 to 92 percent. When analysing the corresponding column for TFPI1, none of the identity scores reach over 60 percent. However, the values for the peptide sequence and the two RNA sequences are equally poor. They range from approximately 35 to 57 percent. In other words, the software programs are poor in predicting nucleotide sequence with untranslated exons no matter how long the input sequence is.

When evaluating the scores, table X, from the formula developed in this project, it is once again obvious that the software have better accuracy for making predictions in shorter nucleotide sequences. The scores for all three different exon categories are rather high, especially for the initial and the

terminal exon, for TFPI2. The scores for prediction of initial and terminal exon are quite high for TFPI1 as well. However, the score for internal exons is considerably lower. The explanation to this is once again that the software have lower accuracy for predictions in longer sequences. Another reason for poor prediction of RNA with UTR is probably that the algorithms the software are based on, do not take the UTRs in account when analysing the sequence.

When it comes to the formulas, they give a clear value of how accurate the prediction is and this value is easy to use for comparison. However, a few simplifications were made in order to obtain two fairly simple formulas and to receive a score that was easy to compare. The formulas developed in this project only take the number of exons and the exon length into consideration. They do not examine the exon order in the predicted nucleotide sequence. Occasionally, the prediction software found exons with the correct lengths but in the wrong order. The formulas developed do not consider this an error, which might be desirable.

Another aspect to take into consideration is that the formulas are developed from the obtained exon structures for TFPI. This means that the formulas are optimised for the specific variations in exon length as well as in number of exons found in TFPI1 and TFPI2. Because of this, the formulas only calculate valid scores for gene structures with similar exon structures as the genes collected in this project. To make the formulas more accurate, gene structures for TFPI from more mammals would be needed. However, all verified gene structures that are available today are used in this project.

The result also becomes deceptive if the maximum score has the same value for comparison of initial/terminal exons and internal exons. When comparing the initial and terminal exons, there is one verified initial/terminal exon and the number of predicted initial/terminal exons, variable  $k$ , should also equal one. Thus, a high score, very close to the maximum score, 1000, is obtained even though there often are plenty apparent errors in the gene prediction. In percentage terms, this error provides a higher score than it should. The disadvantage of having different maximum values for different kinds of exons is that it becomes more difficult to compare the scores from the initial/terminal with the scores for the internal exons. However, the scoring becomes more accurate.

### B. Comparing exon structures between different species

The result from fancyGENE shows that the exon lengths are very similar in most species. However, the untranslated regions varies notably in size. Because of this, the gene prediction made in this project disregards the untranslated regions, in order to make a more accurate prediction.

When comparing figure 3 and 4 with figure 1 and 2, it is obvious that the TFPI1 gene structure is much more varied than the TFPI2 gene structure. Because of this, it would be interesting to compare the amino acid sequence for TFPI1 with the corresponding for TFPI2 to see if TFPI1 has more variations on amino acid level as well.

### C. Gene prediction flowcharts

The prediction flowcharts in this project are based on nucleotide sequences from few species, which is a disadvantage. The larger the amount of species the flowcharts are based on, the higher accuracy the charts will have. However, very few species had experimental evidence on either protein or nucleotide level which was the requirement for being able to classify them as verified and thereby use them for prediction. Because of this, optimising the flowcharts has been difficult.

The scoring procedure in the flowcharts allows exons that are similar to the true exon length to obtain a score. This flowchart design was chosen to avoid disregarding exons that actually belong to TFPI1 or TFPI2, as the prediction is based on such few species. In order to still distinguish the exons that are equal in length to the verified exons, they obtain a higher score than those that only have lengths in the interval. The allowed interval was chosen to  $-5$  nucleotides from the shortest exon length and  $+5$  nucleotides from the longest exon length. This nucleotide difference was chosen after having studied how much the exons differ in length in tables VIII and IX. However, since the flowcharts are based on structures from few mammals the interval may be too narrow. Thus, an exon structure that belongs to TFPI but that deviates from the structures used in this project, can falsely be rejected.

Precisely as Augustus and GENSCAN, the flowcharts created in this project do not take the untranslated regions of a nucleotide sequence into consideration. This is important information to obtain from a gene prediction. However, the size of the untranslated regions differs much between the species and a correlation was difficult to detect. It is because of this that the length of the UTRs are ignored in the flowcharts.

### D. The future role of gene prediction in healthcare

Many diseases are caused by variations in the genome. With the growing capacity of collecting and processing data, genome databases are expanding. Because of this, it is now possible to map certain diseases to specific genomic variations. Thereby, the knowledge of how a specific disease is connected to a certain genomic structure is increasing. For example, nowadays medicines exist for treating breast cancer caused by specific genomic variations. However, these medicines are not effective on patients with other genomic variations than the ones the medicines are adapted for. By analysing genomic data for these patients, their cancer therapy can be personalised by selecting the medicine most efficient on their cancer. The analyses can also lead to detecting new treatments that are completely individually adapted for the patients [11].

Many coagulation diseases are inherited. By analysing the genome of patients who have such a disease, it is possible to find a connection between the disease and a variation in the genome. This would be beneficial both for the patient and for the healthcare system. The patient would receive the most suitable treatment faster. In addition, this is both cost efficient and time efficient for the healthcare as less treatments have to be tested before finding the most optimal one. Making the healthcare more effective is of importance since the burden on the healthcare system is augmenting due to the world's

aging population. Thus, genomic analyses and gene prediction are of importance to maintain and develop a better, and also sustainable, healthcare that can handle the challenges of today and tomorrow.

## VI. CONCLUSIONS

The survey showed that the gene prediction software Augustus and GENSCAN were not very good at predicting the exon structure of the genes coding for TFPI1 and TFPI2. The results from the predictions of the TFPI2 gene were slightly better than the corresponding ones for the TFPI1 gene, probably because TFPI2's nucleotide sequence is shorter than that of the TFPI1. Augustus' predictions were generally slightly more accurate than GENSCAN's predictions. However, none of them were able to predict the untranslated regions of the nucleotide sequences.

The gene prediction method made in this project is specific for the TFPI1 and TFPI2 genes, and is therefore considerably better at predicting whether the nucleotide sequence is coding for TFPI1 and TFPI2 than Augustus and GENSCAN.

## VII. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank our project supervisor Dr. Emanuel Smeds at the Department of Clinical Sciences Lund (IKVL) at the Division of Infection Medicine for his continuous and great support. We would also like to thank Dr. Praveen Papareddy at the Department of Clinical Sciences Lund (IKVL) at the Division of Infection Medicine for his valuable comments during our project. In addition, we want to express our gratitude towards Robert Hafthorsson for sharing his experiences on a similar project.

The authors of this report has performed all work together. However, Louise Wrange was mainly responsible for collecting and compiling information regarding TFPI1 and Emelie Holmberg had the same responsibility for TFPI2.

## REFERENCES

- [1] GJ Jr Broze, TJ Girard, *Tissue factor pathway inhibitor: structure-function*, *Frontiers in Bioscience*, issue 17, pp. 262–280, 2013-06-25.
- [2] P. Papareddy, M. Kalle, G. Kasetty, M. Mörgelin, V. Rydengård, B. Albiger, K. Lundqvist, M. Malmsten and A. Schmidtchen, *C-terminal Peptides of Tissue Factor Pathway Inhibitor Are Novel Host Defense Molecules*, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, pp. 28387–28398, 2010
- [3] P. Papareddy, M. Kalle, O. E. Sørensen, K. Lundqvist, M. Mörgelin, M. Malmsten, A. Schmidtchen, *Tissue Factor Pathway Inhibitor 2 Is Found in Skin and Its C-Terminal Region Encodes for Antibacterial Activity*, *PLoS ONE*, vol 7, issue 12, pp. e52772, 2012
- [4] P. Papareddy, M. Kalle, O. E. Sorensen, M. Malmsten, A. Schmidtchen, *The TFPI-2 Derived Peptide EDC34 Improves Outcome of Gram-Negative Sepsis*, *PLOS Pathogens*, vol.9, issue 12, pp. 1–35, 2013
- [5] N. C. Riedemann, R. Guo, P. A. Ward, *The enigma of sepsis*, *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 112, issue 4, pp. 460–467, 2003
- [6] Landstinget Kronoberg, *Med svårfångad sepsis i fokus*, 2014, <http://www5.ltkronoberg.se/Jobba-hos-oss/Reportage/Med-svarfangad-sepsis-i-fokus/>, (Collected 2015-05-18)
- [7] C. Mathe, M. France Sagot, T. Schiex and P. Rouze, *Current methods of gene prediction, their strengths and weaknesses*, *Nucleic Acids Research*, vol. 30, issue 19, pp. 4104–4117, 2002
- [8] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, (Collected 2015-05-22)
- [9] <http://www.ensembl.org/index.html>, (Collected 2015-05-22)
- [10] R. Guigo, P. Agarwal, J. F. Abril, Moises Buset, and J. W. Fickett, *An Assessment of Gene Prediction Accuracy in Large DNA Sequences*, *Genome Research*, vol. 10, issue 10, pp. 1631–1642, 2000

- [11] D. McMullan, *What Is Personalized Medicine?*, *Genome Magazine*, issue spring 2014, 2014, <http://genomemag.com/what-is-personalized-medicine/#.VV54sPntmko>

## APPENDIX



Figure 5. Flowchart for TFPI1

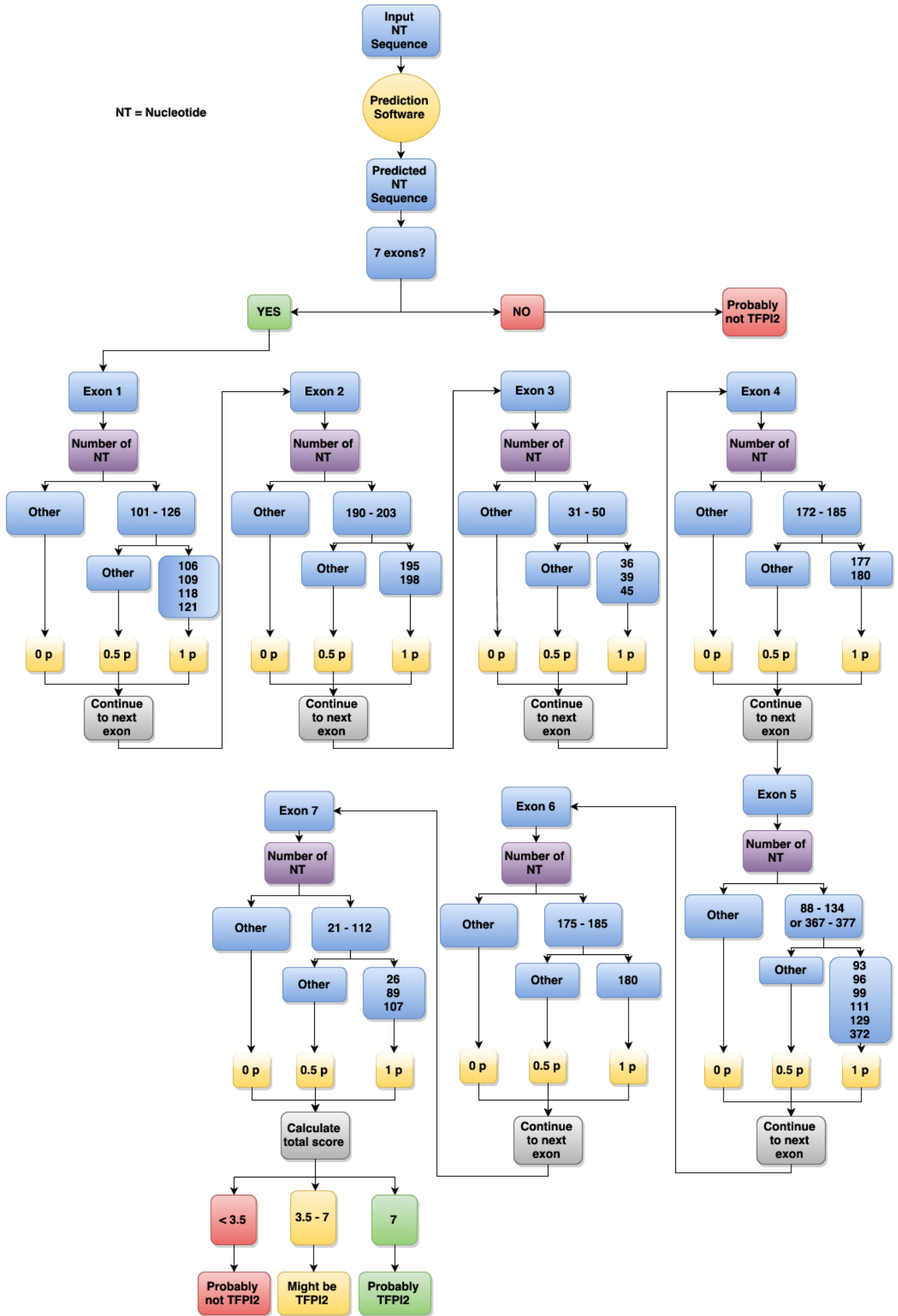
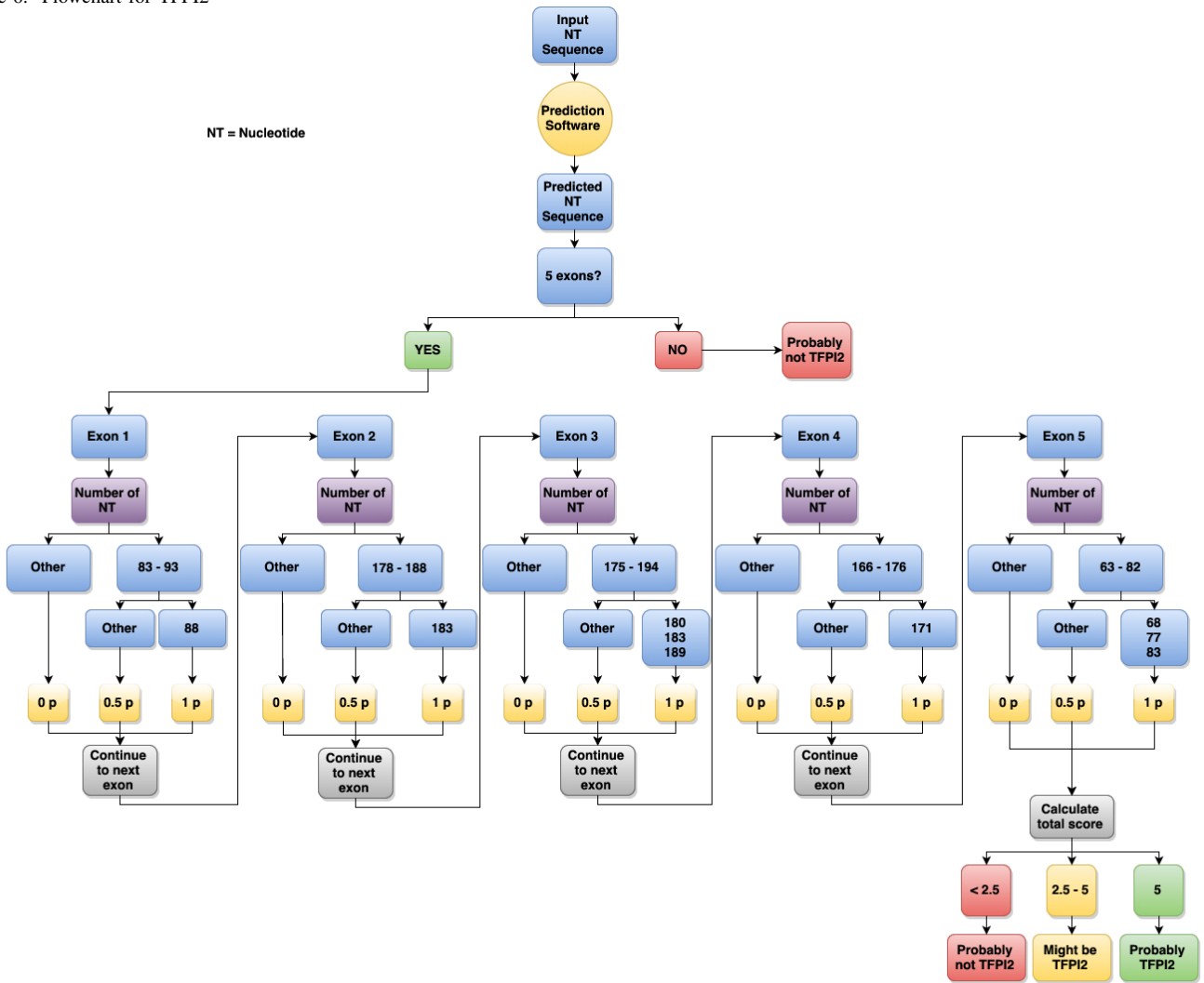


Figure 6. Flowchart for TFPI2



# Automatisk identifiering av råttors vokalisering i ultraljudsområdet

Elisabeth Vajta Engström (BME-12), Malin Magnusson (BME-12)

**Sammanfattning**—Råttor vokaliserar i stor utsträckning i ultraljudsområdet och dessa läten kan vara nyckeln till förståelsen av deras mentala hälsa. Forskning visar att det finns olika typer av vokaliseringar. Hur ofta en viss typ förekommer kan indikera på ett visst sinnestillstånd. Detta kan utnyttjas inom psykiatrisk forskning som ofta sker på råttor. Att kategorisera vokaliseringarna manuellt är ett mycket tidskrävande arbete och därför är det en fördel om det kan ske automatiskt. Det skulle medföra att kunskapen om råttors läten kan tas till vara och bland annat användas inom utveckling av antidepressiva läkemedel.

I denna rapport undersöks och utvärderas möjligheterna för automatisk detektion och klassificering av råttors vokaliseringar. Genom att lätena i en ljudfil detekteras kan bilder av enskilda vokaliseringar skapas. Med dessa bilder som grund utförs försök att med hjälp av maskininlärning kategorisera vokaliseringarna automatiskt. Klassificeringen utförs även manuellt och samtliga metoder utvärderas.

Resultatet visar att råttors vokaliseringar är mycket komplexa och det finns ingen självklar gruppering. I den här studien utvärderas klassificeringen till att vara ungefär 40 % korrekt. Med den utveckling som pågår inom digital bildanalys kommer automatisk identifiering av råttors vokalisering med bättre säkerhet vara möjlig i framtiden.

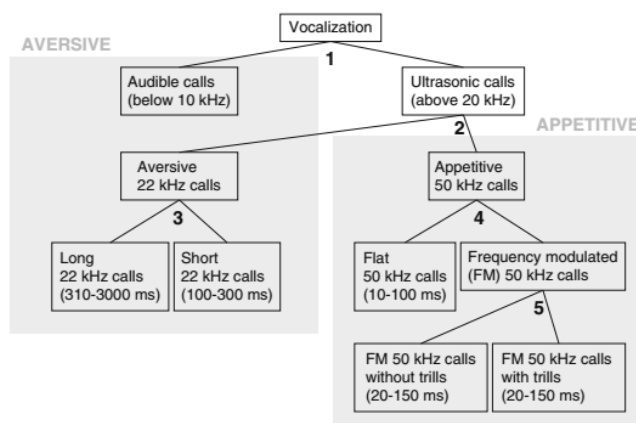
## I. INTRODUKTION

**P**SYKISK ohälsa är ett växande problem i samhället. I Sverige hade, år 2011, sju procent av männen, i åldrarna mellan 18 och 24 år, kontakt med den psykiatriska vården. Motsvarande siffra för kvinnor var tio procent [1]. Dessutom ligger de totala samhällsekonomiska kostnaderna för enbart depression på över 33 miljarder kronor [2]. Antal självmord i Sverige har länge minskat men sedan början på 2000-talet tyder statistiken på att trenden har vänt och att antalet istället ökar [3].

Det finns olika möjliga behandlingsåtgärder för personer som lider av psykisk ohälsa. De vanligast förekommande är psykoterapi och läkemedelsbehandling och ofta kombineras dessa [4]. När antidepressiva läkemedel testas och utvärderas används ofta djurförsök på råttor. För att kunna utvärdera en rattas psykiska hälsa är det viktigt att ha goda kunskaper om dess beteende vid olika tidpunkter och i olika situationer.

Förutom att kommunicera via snifflingar och kroppspråk vokaliserar råttor i ultraljudsområdet. Vokaliseringarna brukar

delas upp i två kategorier, Aversive samt Appetitive, som kan liknas vid negativa respektive positiva läten som kan ses i figur 1.



Figur 1. Kategorisering av råttors vokaliseringar enligt Brudzynski et al. [5].

I denna rapport kommer fokus ligga på vokalisering i ultraljudsområdet som är positivt betingad, det vill säga appetitive calls. För dessa läten brukar grundfrekvensen ligga kring 50 kHz och därför kallas lätena för just 50-kHz-calls eller alternativt för short calls. Dessa kan delas upp i plana och frekvensmodulerade läten, där de senare har en mer varierande frekvens. Vokaliseringarna varar normalt mellan 20 ms och 80 ms och enligt Brudzynski et al. [5] är de ett uttryck för positiv emotionell status. Burgdorf et al. [6] visar att det går att se en minskning av short calls då råttorna behandlades med mediciner som påverkar dem negativt. Det stödjer teorin att short calls sänds ut då råttor mår bra.

Short calls brukar delas upp i två underkategorier, plana läten och frekvensmodulerade läten. En plan vokalisering tros användas för att etablera och bibehålla kontakt på en mycket primitiv nivå av socialinteraktion [7]. Yuki och Okanoya [8] menar att det finns mycket som tyder på att ljud som innehåller många frekvensmodulerade delar kan vara ett index på positiva känslor.

Wright et al. [9] beskriver olika typer av subkategorier till short calls. I deras studie delas 20 000 vokaliseringar upp i 14 olika kategorier av short calls enligt figur 2.

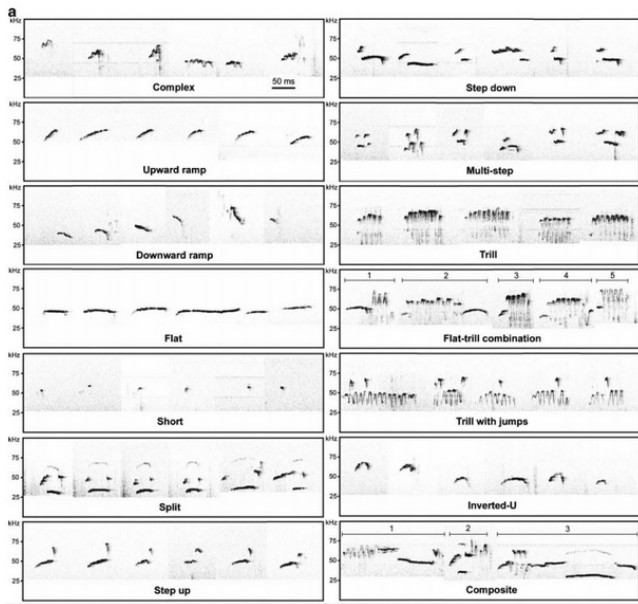
Inlämnat den 17 juni 2015

Emejladress: mte12eva@student.lu.se, mte12mm1@student.lu.se

Teknisk handledare: Professor Karl Åström, Matematikcentrum

Klinisk handledare: Professor Anders Tingström, Medicinska fakulteten

Doktorand Jonas Broms, Medicinska fakulteten



Figur 2. Short calls klassificerade i 14 olika kategorier från Wright et al. [9]

De vanligaste vokaliseringarna var trill (29 %), flat/trill combination (16 %) samt flat (14 %) vilka tillsammans utgjorde drygt 50 procent av alla vokaliseringar. Utifrån sina resultat drar de i studien även slutsatsen att de frekvensmodulerade vokaliseringarna är kopplade till det dopaminberoende belöningssystemet [9].

Grimsley et al. [10] visar att det går att automatiskt klassificera ljud som musungar ger ifrån sig då de isoleras strax efter födseln. Genom att titta på den dominerande frekvensen i nio punkter för varje vokalisering lyckades de identifiera fyra olika klasser automatiskt. De gör även en manuell klassificering där åtta olika typer av vokaliseringar identifieras.

Mycket tyder på att tolkning av råttors läten i ultraljudsområdet kan ge en helt ny parameter i utvärderingen av behandlingen av psykisk ohälsa, [9] [10]. I den här studien undersöker vi möjligheterna för att automatiskt detektera råttors olika vokaliseringarna samt att med hjälp av maskininlärning försöka identifiera och klassificera dem. Målet är att med hjälp av datorseende och andra matematiska hjälpmedel göra klassificeringen automatiskt.

Arbetet har skett i två faser. Första delen av projektet syftade till att utarbeta en funktion för att automatiskt detektera vokaliseringarna i en ljudfil samt att skapa ljudbilder av dem. Dessa bilder har sedan använts i den andra fasen, där innehållet i dem studerades samt att möjligheterna att utveckla en metod för automatisk klassificering undersöktes.

I denna rapport avhandlas de båda faserna i den löpande texten. *Metod* och *Resultat* för både detektion och klassificering presenteras och diskuteras. Avslutningsvis diskuteras olika förbättringsmöjligheter och konkreta slutsatser sammanfattas.

## II. DATA

I projektet har nio stycken ljudfiler använts. Eftersom det intressanta ljudet har en frekvens som ligger i ultraljudsområdet användes en ultraljudsmikrofon vid inspelningen. Mikrofonen var en fladdermusdetektor D1000X från Petterson AB. Vid inspelning var den placerad ca 15 cm ovanför buren. Tre av inspelningarna har en sampelfrekvens på 250 kHz och i de övriga användes en sampelfrekvens på 200 kHz. Inspelningarna har skett både på obehandlade och medicinskt behandlade råttor, med eller utan sällskap av en annan råtta i buren. Längden på inspelningarna varierar något men samtliga varar i drygt 5 minuter vardera. Mer detaljerad information om respektive ljudfil presenteras i tabell I.

Tabell I  
INFORMATION OM LJUDFILERNA.

| Ljudfil | Sampelfrekvens (Hz) | antal sampel | längd (s) |
|---------|---------------------|--------------|-----------|
| 1       | 250 000             | 82 378 608   | 329.5     |
| 2       | 250 000             | 82 444 144   | 329.8     |
| 3       | 250 000             | 79 298 416   | 317.2     |
| 4       | 200 000             | 66 977 648   | 334.9     |
| 5       | 200 000             | 68 222 832   | 341.1     |
| 6       | 200 000             | 64 946 032   | 324.7     |
| 7       | 200 000             | 64 094 064   | 320.5     |
| 8       | 200 000             | 64 159 600   | 320.8     |
| 9       | 200 000             | 66 518 896   | 332.6     |

## III. METOD

Avsnittet är uppdelat i två delar. I den matematiska bakgrunden förklaras några av nyckelbegreppen i projektet och under rubriken systemutveckling beskrivs hur metoderna nyttjats. Datorprogrammet och programspråket MatLab användes genomgående för att analysera ljuddata och lösa problemställningarna.

### A. Matematisk bakgrund

En ljudbild är uppbyggd av en matris som innehåller intensiteten för varje sampel och varje frekvens. Denna information fås efter att fouriertransform tillämpats.

*Singulärvärdesuppdelning:* Med hjälp av singulärvärdesuppdelning, en typ av matrisfaktorisering, kan varje reellvärd matris skrivas som en produkt av  $U\Sigma V^T$ .  $U$  och  $V$  är ortogonalmatriser och  $\Sigma$  en diagonalmatris som innehåller matrisens singulärvärden [11] [12]. Ur  $U$  och  $V$  kan relevanta särdrag i bilden utläsas.

*Kroneckerprodukt:* Kroneckerprodukt en matematisk operation på två godtyckligt stora matriser som leder till att de tillsammans bildar en större blockmatris. Kroneckerprodukten av en matris  $A$  och en matris  $B$  bildas genom att multiplicera varje element i  $A$  med hela matrisen  $B$  [13].

*Subpixelmetoden:* Upplösningen i en bild beror på hur stora pixlarna är. Med hjälp av subpixelmetoden, se [14], kan även särdrag inom en pixel, alltså på subpixelnivå, lokaliseras genom interpolation. Med hjälp av statistiska samband kan inte bara en speciell pixel pekats ut utan även i vilken del av pixeln som det intressanta återfinns.

*Maskininläring:* Maskininläring är en subkategori till artificiell intelligens som innebär att ett datorsystem på egen hand kan dra slutsatser utifrån en mängd data. De algoritmer som används är skapade så att de lär sig direkt från data istället för att använda sig av redan förutbestämda metoder eller modeller. Det gör att maskininläring är en stor tillgång vid till exempel behandling av Big Data där det används för att klassificera, förutse och klustra data [15].

Maskininläring [16] [17] används mycket i samband med mönsterigenkänning som nyttjas bland annat inom datorseende, det vill säga tolkningen av digitala bilder. Processen för mönsterigenkänning går ut på att inkommande data klassificeras enligt vissa särdrag. Det finns två metoder för att göra denna klassificering [18].

Den enklaste metoden är att använda supervised learning. Ett känt dataset, så kallat träningsdata som innehåller både inkommande data och given respons för denna, används för att skapa en modell. Denna modell kan sedan appliceras på ett nytt dataset som inte innehåller given respons. Det kända datasetet kan användas för att jämföra resultatet och utvärdera metoden [19]. Det finns en mängd olika typer av klassificerare. Två av de vanligaste är att antingen skapar en så kallad skog av beslutsträd [16] [20] utifrån träningsdatan, eller att jämföra avståndet hos en vektor med de vektorer som finns i träningsdatan i en metod som kallas för Nearest Neighbor [21] [22].

Den andra metoden är att använda unsupervised learning. För denna metod används bara ett dataset utan given respons. Det är istället programmet självt som ska hitta samband och inre strukturer i datan. För att sedan klassificera data är det vanligaste sättet att använda sig av klusteranalys [16] [23].

Klusteranalys [24] [25] bildar grupper, så kallade kluster, där datapunkterna inom varje kluster har en högre grad av likhet med varandra än med de i något annat kluster.

Den mest populära och använda klustringsmetoden är den iterativa K-means algoritmen. Principen bakom den är att i datan slumpmässigt placeras ut ett antal klustercentroider. För varje punkt i datasetet kommer avståndet till centroiderna att beräknas. Den centroid som ligger närmast kommer bli grunden för det klustret som en viss punkt tillhör. Därefter beräknas medelvärdet för alla datapunkter inom ett kluster och centroiden flyttas dit. Detta kommer upprepas tills dess att klustercentroiderna inte längre flyttar på sig [25].

## B. Systemutveckling

Enligt nyquiststeomet måste samplingsfrekvensen vara minst dubbla förekommande frekvensen. Eftersom relevant ljud ligger i ultraljudsområdet måste samplingsfrekvensen vara mycket

högt. Det medför att en ljudfil som är drygt fem minuter lång innehåller närmare åttio miljoner samplingsvärden. Det är för många värden för att en dator med normalt minne och normal prestanda ska kunna exekvera dem samtidigt. Flera metoder för att reducera datamängden användes under projektets gång. Matriser delades upp i kroneckerprodukter och lagrades som bandmatriser utan nollvärden för att spara utrymme. MatLabs funktion Buffer nyttjades för att dela upp ljudsignalens vektor i bitar. Filtrering, transformer och övriga beräkningar utfördes på en bit i taget innan delarna sattes ihop till en sammanhängande vektor.

Den detektionsmetod som utvecklades bygger på att intensiteten i ljudet studerades. I den råa signalen finns det mycket ljud som i det här projektet kan klassas som brus. Ett bandpassfilter designades med hjälp av MatLabs verktyg Filter Design & Analysis Tool. Gränserna för frekvenserna sattes till 30 kHz respektive 90 kHz och ett skarpt IIR butterworth filter av hög ordning designades och implementerades.

För att detektera vokaliseringarna studerades ljudets intensitet. Relativt hög intensitet vid flera samplings i följd indikerar på att en vokalisering finns här. Tidssignalen faltades med en normalfördelningskruva, med standardavvikelse på 0.0096, för att varje vokalisering skulle motsvaras av ett enda toppvärde. Varje vokaliserings läge motsvaras alltså av samplingspositionen för var och en av dessa toppar. Relevanta samplings lästes in på nytt och med hjälp av MatLabs funktion Spectrogram skapades en ljudbild, 129x255 pixlar stor, för var och en av vokaliseringarna. Samtliga bilder från de nio ljudfilerna sparades till en databas.

Med databasen som stomme inleddes klassificeringsarbetet. För samtliga klassificeringar sattes antalet kluster till 14. Första försöket skedde med hjälp av algoritmen K-means och hela bildmatriserna. Då särdragen ofta syns i mitten av bilden reducerades bildernas storlek så att de tomma kanten togs bort. På den mindre bildmatrisen utfördes först singularvärdesuppdelning och efter att  $U$ -matrisen reducerats, genom sammanslagning av element, till en tio värden lång vektor användes denna för klustringen.

Ytterligare en metod att minska mängden data och plocka ut relevanta särdrag prövades. För varje kolonn i bildmatrisen plockades positionen för den högsta intensiteten ut. Hela bilden motsvarades då av en 255 värden lång vektor. Många av dessa värden motsvarade dock brus. För att sätta dessa positionsvärden till noll användes följande metoder. Först viktades intensiteten med dess frekvens som är lägre för bruset. Hade maxintensiteten en hög frekvens förstärktes den mer än om den hade en låg frekvens. För att sortera bort bruset användes ett gränsvärde, som testades fram, för intensiteten. Nådde en intensitet inte upp till detta värde sattes den positionen till noll. Trots detta fanns några positioner som representerade brus kvar. Dessa återfanns alltid i nedre delen av bilden. För varje bild beräknades medelvärdet för de positioner som inte var noll. De värden som var under halva detta medelvärde sattes till noll.

För att inte vokaliseringens position i sidled skulle ha bety-

delse flyttades samtliga vektorers värden så att första värdet motsvarade det första värdet som inte var noll. För att vektorerna fortfarande skulle ha samma längd fylldes de ut med nollor på slutet istället. Även dessa vektorer, härefter kallade maxintensitetsvektorer, användes för klustring med K-means.

För att lätt få en överblick över vokaliseringarna i respektive klass skapades en funktion som gjorde det möjligt att få upp alla vokaliseringar ur en klass i en och samma figur. Denna funktion användes vid samtliga klassificeringsförsök.

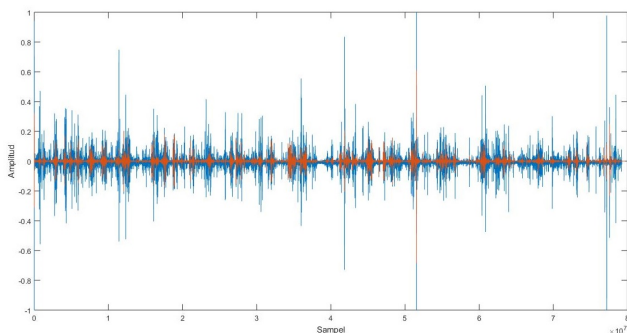
Klustring med K-means är ett exempel på klassificering med unsupervised learning. För att utvärdera hur enkelt det är att urskilja särdrag ur vektorerna utfördes även supervised learning med två olika klassificerare, TreeBagger och Fit k-nearest neighbor. För att det skulle vara möjligt behövdes ett facit. Utifrån klasserna i figur 2 tilldelades varje vokalisering en klass manuellt, vilket bildade det facit som användes.

För att utvärdera vårt facit testades människors förmåga att klassificera vokaliseringarna jämfört med datorns. Tio personer utan erfarenhet eller kunskap om råttors vokaliseringar fick klassificera tio bilder var utifrån figur 2.

Möjligheterna att studera specifika utseenden som förekommer i vokaliseringarna, till exempel inverterade U, steg och lutning diskuterades. Ett försök gjordes genom att använda handledarens färdigskrivna funktioner för ett annat arbete. Bilderna filtrerades med en normalfördelningskurva i sexton steg, för varje steg vreds normalfördelningskurvan 11.25 grader, det vill säga 180 grader totalt. Utifrån detta kunde programmet avgöra vilka riktningar som dominerade i bilden och därmed detektera vokaliseringen som markerades med röda punkter. Normalen till den dominerade riktningen i varje punkt beräknades och markerades i bilden. Genom att använda subpixelmetoden kan inte bara relevanta pixlar tas ut utan även var i de enskilda pixlarna vokaliseringen dominerar. På så sätt fås en mjuk och sammanhängande kurva. Utifrån dessa bilder gjordes dock ingen klustring utan metoden får istället ses som början på ett försök att skapa detektorer för olika utseenden i bilden.

#### IV. RESULTAT

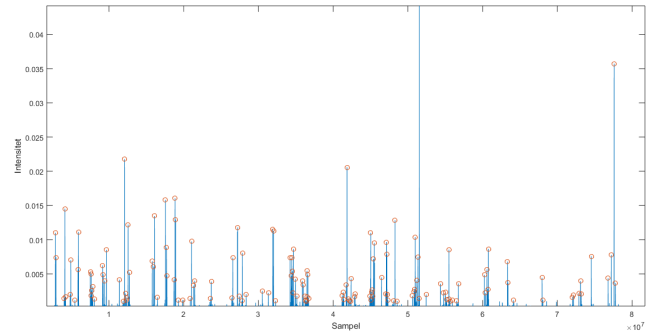
Resultatet av filtreringen visas i figur 3.



Figur 3. Filtrerad (röd) signal och den råa (blå) signalen. Figuren illustrerar att det finns mycket registrerat ljud utanför relevant frekvensområde eftersom mycket av den blå signalen syns.

Den blå signalen visar amplituden som funktion av sampelnummer för rådatan. Den röda signalen visar det motsvarande för den filtrerade signalen. Eftersom mycket av den blå signalen syns finns det mycket ljud som ligger utanför intressant frekvensområde.

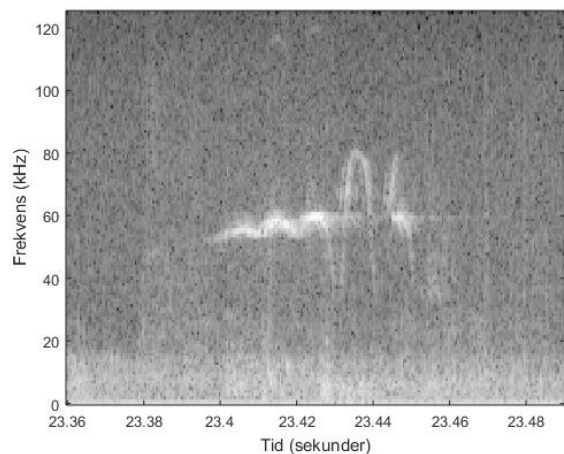
Figur 4 visar intensiteten för den filtrerade och faltade signalen för ljudfil nummer 3. De runda ringarna markerar de detekterade topparna som motsvarar en vokalisering.



Figur 4. Visar intensiteten över tid hos den filtrerade signalen för ljudfil 3. De runda ringarna markerar de toppar som detekteras vilka motsvarar en vokalisering.

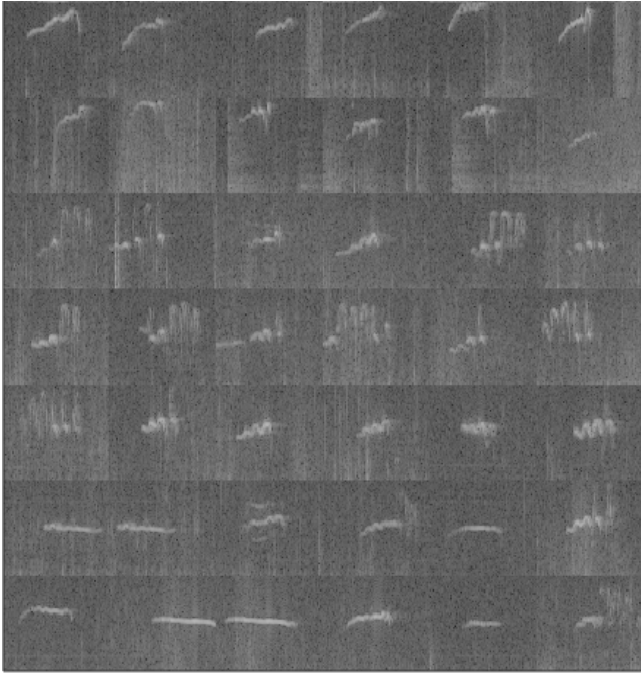
I de tre filerna som är inspelade med en sampelfrekvens på 250 kHz har råttlätarna ett högre signal-till-brus-förhållande än i de övriga sex filerna. För ljudfil nummer 3 innehåller 148 av 163 detekterade bilder vokaliseringar. Efter att detektionen utförts på samtliga ljudfiler och tomma bilder rensats bort sparades 1040 bilder på vokaliseringar ner.

I figur 5 visas ett spektrogram av en enskild vokalisering, skapad med snabb fouriertransform och ett hammingfönster. Bilden är en illustration av en matris med intensitet för olika frekvenser och motsvarande sampel. Signalen som ligger till grund för bilden är ej filtrerad, vilket gör att bruset syns i bildens nederkant.



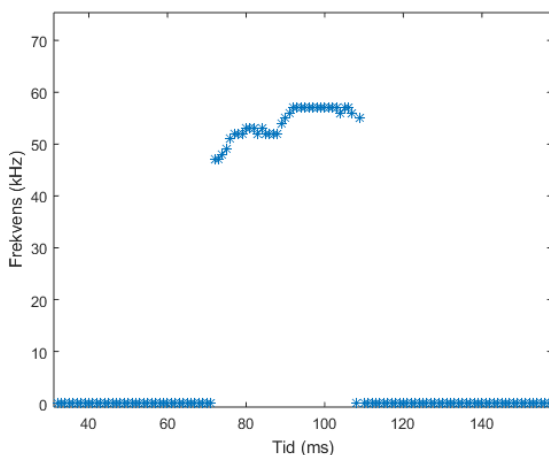
Figur 5. Ett exempel på en ljudbild av en vokalisering. Bilden skapas med hjälp av fouriertransform och ett hammingfönster och är en illustration av en matris med intensitet för olika frekvenser och motsvarande sampel.

Det är dessa 1040 ljudbilder, liknande den i figur 5, som används vid klassificeringen. I figur 6 visas några vokaliseringar som hamnar i samma klass vid klassificering med K-means på de reducerade  $U$ -matriserna. Vokaliseringarna som hamnade i samma grupp hade vissa likheter men även en hel del olikheter.



Figur 6. Några vokaliseringar som hamnar i samma klass vid klassificering med K-means och de reducerade  $U$ -matriserna.

Den andra klassificeringen skedde maxintensitetsvektorena. Ett exempel på en sådan vektor visas i figur 7.



Figur 7. Plot av vektorn med position för varje kolonns maxintensitet. Här har beskrivna metoder för att trycka ner brus använts men vokaliseringen är ej flyttad i sidled.

Även för klassificering med maxintensitetsvektorn erhöles bilder som liknade den i figur 6.

För att utvärdera hur goda de olika särdragsvektorerna var utfördes supervised learning utifrån det facit som skapades. I Tabell II redovisas resultatet av den manuella klassificeringen, både antal och andel vokaliseringar som bedömdes tillhöra vardera kategori.

Tabell II  
ANTAL OCH ANDEL AV VARJE KLAS I FACIT.

|                            | Antal | Andel (procent) |
|----------------------------|-------|-----------------|
| 1. Complex                 | 284   | 28.4            |
| 2. Upward ramp             | 121   | 11.6            |
| 3. Downward ramp           | 0     | 0.0             |
| 4. Flat                    | 140   | 13.5            |
| 5. Short                   | 23    | 2.2             |
| 6. Split                   | 42    | 4.0             |
| 7. Step up                 | 48    | 4.6             |
| 8. Step down               | 11    | 1.1             |
| 9. Multi-step              | 25    | 2.4             |
| 10. Trill                  | 55    | 5.3             |
| 11. Flat-trill combination | 144   | 13.8            |
| 12. Trill with jumps       | 11    | 1.1             |
| 13. Inverted-U             | 116   | 11.2            |
| 14. Composite              | 20    | 1.9             |

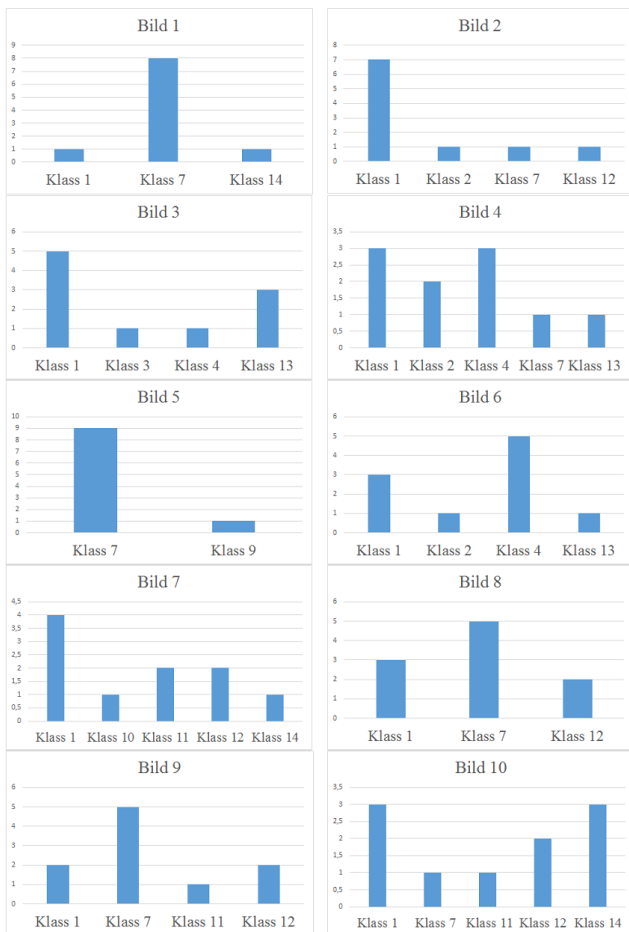
Ur tabell II kan det utläsas att de tre dominerande klasserna är Complex (28.4 %), Flat-trill combination (13.8 %) och Flat (13.5 %).

I tabell III redovisas andelen bilder i procent vars klassificering stämmer med vårt facit då supervised klassificering genomfördes. Testet utfördes, som tidigare nämnt, på två särdragsvektorer, reducerad  $U$ -matris och maxintensitetsvektor, och med två olika klassificerare, Fit k-nearest neighbor och TreeBagger.

Tabell III  
ANDEL RÄTT KLASSIFICERADE VOKALISERINGAR BEROENDE PÅ SÄRDRAGSVEKTOR OCH KLASSIFICERARE.

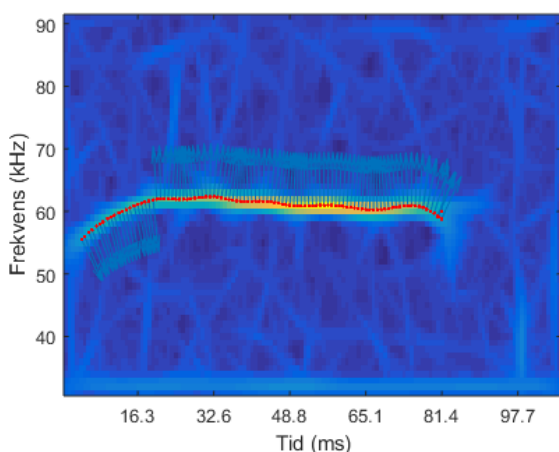
|                         | Fit k-nearest neighbor | TreeBagger |
|-------------------------|------------------------|------------|
| 1. $U$ -Matris          | 25.38 %                | 36.44 %    |
| 2. Maxintensitetsvektor | 30.00 %                | 42.31 %    |

Resultatet av de tio personernas klassificering av tio vokaliseringar redovisas i figur 8. För varje bild visas ett histogram över antalet personer som tilldelade vokaliseringen en viss klass.



Figur 8. Histogram över tio personers klasstilldelning av respektive bild. Vissa bilder har en relativt entydig klass medan andra bilder var svårare att klassificera.

Figur 9 visar resultatet av försöket att detektera punkter i ljudbilden.



Figur 9. Exempel på att detektera vokaliseringen i bilden. Varje prick normalvektor är även de markerade i bilden.

De röda prickarna följer vokaliseringens utseende och till

varje prick visas dess normalvektor, vilken bidrar till att vokaliseringens lutning i olika delar kan studeras. Med hjälp av subpixelmetoden får prickarna en jämn följd istället för att hamna mitt i varje pixel.

## V. DISKUSSION

Denna studie är, efter vår vetskap, det första försöket att klassificera råttors vokalisering automatiskt. I resultatet framgår det att det finns utrymme för förbättring i metoden. Ett sätt är att minska bruset i ljudfilerna bland annat genom att förbättra filtreringen av ljudet. Att vissa av bilderna inte innehåller någon vokalisering beror antagligen på att intensiteten i ljudsignalen vid det tillfället kommer från något annat än råttans läte. Det visar på att filtreringen av bruset inte var optimal. Bruset har från början mycket högre intensitet än råttornas vokalisering vilket innebär att rester finns kvar trots filtrering. Ett annat sätt att minska mängden brus skulle kunna vara att byta ut spånet i råttornas bur mot något annat material som inte ger upphov till lika mycket ljud. Det är dock viktigt att råttorna fortfarande trivs och känner sig hemma i miljön för de inte ska vokalisera annorlunda.

Att programmet ibland detekterar brus behöver dock inte innebära ett problem. En möjlighet är att låta brus bli en egen kategori och klassificeras därefter. På så sätt skulle de falska detektionerna av vokaliseringar sorteras bort. Däremot är det ett problem att programmet har svårt att detektera korta vokaliseringar. Deras låga intensitet över tid gör dem svåra att särskilja från bruset. Detta skulle kunna förklara varför vi fick så få av dessa då de möjligen sorterades bort som brus. Ytterligare ett problem som uppstod var att vissa vokaliseringar var så långa att de inte fick plats i bilden. Bildens storlek var fix för att det skulle vara möjligt att jämföra bilderna men i detta fall innebär det att vissa vokaliseringar inte var fullständiga.

Vid klustring med algoritmen K-means syntes det en viss skillnad på innehållet mellan de olika klasserna. Däremot förekom det i stor utsträckning vokaliseringar som tydligt inte passade in i sin kategori, vilket gällde för båda särdragsvektorerna. Jämförelsen underlättades tack vare funktionen som gjorde det möjligt att få upp samtliga bilder inom en kategori i ett fönster. Metoden går inte att utvärdera på något statistiskt sätt, bara efter åskådarens tycke. Vi tycker oss till exempel se en tendens att vokaliseringens position i bilden påverkar vilken kategori den hamnar i. Med hjälp av supervised learning gick det dock att utvärdera särdragsvektorerna. Det finns en uppsjö av olika klassificerare och de är lämpliga vid olika tillfällen och ändamål. Som syns i tabell III i resultatet var TreeBagger den klassificerare som gav bäst resultat av de som testades.

För vektorn med maxintensitetsfrekvenser, som gav bäst resultat, stämde 42.32 procent av datorns klassificeringar med vårt manuellt gjorda facit. Skulle slumpen avgöra vilken klass en vokalisering tillhör är chansen  $1/14$ , det vill säga 7.14 procent, att det blir rätt. Det innebär att resultat i den här studien är avsevärt bättre än slumpen.



Upplevelsen när facit skapades var att det vid många tillfällen var mycket svårt att veta exakt vilken klass en viss vokalisering tillhörde. Ofta fanns det två eller tre grupper som var ungefär lika passande. Att facit skapades utifrån en forskargrups indelning är både en för- och en nackdel. Deras klassificering grundas på många fler vokaliseringar men samtidigt kan lätena från deras råttor skilja sig från råtorna som användes i den här studien. Exempelvis fanns det en typ av läte som vi upplevde som ofta återkommande och säregen vilken det ingen självklar klass för. Vokaliseringen i figur 5 är ett exempel på ett sådant läte. Ingen av vokaliseringarna i denna studie kategoriserades till klassen Downward ramp.

När det gäller vilka typer av vokaliseringar som är vanligast förekommande stämmer vårt resultat relativt bra med det som Wright et al. [9] beskriver. Andelen i grupperna flat-trill combination och flat är nästan exakt lika stora här som i deras studie. Dock är trill största gruppen enligt Wright et al. medan största gruppen i denna studie är complex. Dessa kategorier är relativt lika och misstolkning mellan dessa grupper kan ha skett.

Utvärderingen av hur entydig vokaliseringarnas grupp-tillhörighet är, men hjälp av de tio referenspersonerna, visade att den inte alls är speciellt entydig. I histogrammen i figur 8 syna att bild 4, 7 och 10 tilldelades hela fem olika klasser av olika personer. Bild 5 var lättast att klassificera, här hade endast en person en avvikande uppfattning. Det visar på hur svårt det är att klassificera vokaliseringarna, även för människor, och på hur mångfacetterat råtters språk faktiskt är.

En fråga för fortsatt arbete är om vokaliseringarna ska delas upp i just 14 kategorier. Det finns några olikheter i ljudbilderna som tydligt kan ses, till exempel steg eller helt plana läten, dessa är dock färre än 14 till antalet. Det finns klustringsmetoder, så som hierarkisk klustring, som inte kräver att antalet kategorier är specificerat som kan användas. Detta skulle göra klassificeringen mer förutsättningslös och kanske skulle ett bättre resultat fås med färre kategorier.

Arbetet med att hitta mer lämpliga särdragsvektorer eller matriser kan fortsätta. Då datamängden i dessa måste begränsas är det viktigt att det är de mest relevanta särdragen som plockas ut. De allra flesta pixlarna i bilden är inte alls av betydelse utan den intressanta informationen är samlad i ett litet antal pixlar. Här presenteras endast två sätt att reducera mängden data och plocka ut särdragen i bilden men fler och kanske bättre metoder är möjliga att utveckla.

Mängden vokaliseringar som maskininlärningen sker på i detta projekt är relativt liten. Att en del av ljudfilerna kom från råttor som behandlats till depression försvårade arbetet då de inte vokaliserar lika mycket som en frisk råtta. Det gäller även för sampelfrekvensen vid inspelningen, det hade underlättat om denna var densamma för alla ljudfiler. Eftersom antalet sampel i en ljudbild genomgående är densamma i bilderna blir vokaliseringarna något ihoptryckta i sidled då sampelfrekvensen är lägre. Det bidrar till att bilderna blir svårare att jämföra. Med en större mängd enhetlig data är det

en större chans att klassificeringen lyckas.

En ytterligare nivå att ta projektet till är att skapa funktioner för detektion av specifika utseenden i vokaliseringarna, till exempel upp och nervända  $U:n$ , raka linjer eller stegkomponenter. Dessa delar skulle sedan kunna sättas ihop till en helhet som används vid klassificeringen. En början till ett försök att analysera bilden på detta sätt visas i figur 9, men försöket slutfördes ej.

Trots att klassificeringen inte fungerar fullt ut anser vi fortfarande att det finns potential inom området. Metoden skulle kunna vara ett användbart verktyg inom forskningen på antidepressiva läkemedel och för att förstå hur psykiska sjukdomar påverkar hjärnan. På lång sikt kan det också hjälpa till att minska de samhällsekonomiska kostnaderna för dessa sjukdomar och många människors lidande.

I många studier krävs det att det opereras in sensorer i råtternas hjärnor eller att deras hjärnor dissekeras för att få veta om en behandling har önskad effekt. Enligt svensk djurskyddslag ska varje djur betraktas som en individ med eget värde utöver värdet det har för människan och djuret ska inte utsättas för onödigt lidande. Ur en etiskt synpunkt är det därför en stor fördel att vår metod är icke-invasiv. Trots allt så avlyssnas råtterna och vi måste då fråga oss om vi kränker deras integritet.

Denna studie presenterar ett förslag på en ny metod för utvärdering av råtters psykologiska hälsa. Om arbetet fortskrider med lyckade resultat kan det leda till en helt ny parameter för utvärderingen av antidepressiva läkemedel. Bildanalys, den metod som används, förekommer i allt fler system och i allt fler sammanhang. Till exempel lanserade Facebook nyligen en ny ansiktsigenkänningsmetod som kan känna igen ansikten i den enorma mängd bilder som finns på sidan [26]. Utvecklingen medför att allt fler och bättre algoritmer hela tiden blir tillgängliga för användning. Bildanalys är en metod som ligger rätt i tiden helt enkelt.

## VI. SLUTSATSER

Resultatet i denna studie är inte tillräckligt bra för att metoderna ska kunna tillämpas kliniskt i dagsläget. Vid god ljudinspelning fungerar detektionsmetoden bra. Tillsammans med ett datorseende som klarar att enbart avgöra om en bild innehåller en vokalisering eller ej, kan metoden tillämpas för att avgöra antalet vokaliseringar i en ljudfil. Försöken att klassificera vokaliseringarna, både manuellt och automatiskt, påvisar komplexiteten i lätena. Det finns inga exakta rätt och fel eftersom ingen vokalisering är en kopia av en annan. Med hjälp av mer avancerade metoder och algoritmer lever förhoppningarna om att tyda råtternas språk vidare.

## VII. EFTERORD

Vi vill rikta ett stort tack till vår tekniska handledare professor Karl Åström vid matematikcentrum LTH för kontinuerliga möten och hjälp med både matematisk kunskap och kodande

i MatLab. De kliniska handledarna och uppdragsgivarna professor Anders Tingström och doktorand Jonas Broms tackar vi för bakgrundsinformation, ljudfiler och ett väldigt stort engagemang.

Under projektets fortlöpning har mycket arbetet skett gemensamt, men Malin Magnusson har arbetat mer med att lösa problemställningarna i MatLab och Elisabeth Vajta Engström har genomfört den största delen av litteraturstudien.

#### REFERENSER

- [1] Socialstyrelsen. *Psykisk ohälsa bland unga - Underlagsrapport till barn och unga hälsa, vård och omsorg*. Artikelnr 2013-5-43. <http://www.socialstyrelsen.se/Lists/Artikelkatalog/Attachments/19109/2013-5-43.pdf> Hämtad: 2015-05-12.
- [2] Asker, Anna. "Effektiv vård ska sänka kostnaderna". *Svenska Dagbladet*, 8 maj 2008, uppdaterad: 22 januari 2015. [http://www.svd.se/nyheter/dagsidan/psykologi/effektiv-vard-ska-sanka-kostnaderna\\_1222747.svd](http://www.svd.se/nyheter/dagsidan/psykologi/effektiv-vard-ska-sanka-kostnaderna_1222747.svd). Hämtad: 2015-05-12.
- [3] Jiang Guo-Xin, Hadlaczyk Gergö & Wasserman Danuta. *Själv mord i Sverige. Data:1980-2013*. Karolinska institutet och Stockholms läns landsting. ISBN: 978-91-87517-19-8, 2014. [http://ki.se/sites/default/files/sjalvmord\\_i\\_sverige\\_uppdat\\_data\\_2012.pdf](http://ki.se/sites/default/files/sjalvmord_i_sverige_uppdat_data_2012.pdf). Hämtad: 2015-04-11.
- [4] Socialstyrelsen. *Nationella riktlinjer för vård vid depression och ångestsyndrom 2010 - stöd för styrning och ledning*. Artikelnr: 2010-3-4. <http://www.socialstyrelsen.se/lists/artikelkatalog/attachments/17948/2010-3-4.pdf>. Hämtad: 2015-05-17.
- [5] Brudzynski, Stefan M. (Social Origin of Vocal Communication in Rodents) i *Bicommunication of Animals*, Guenther Witzany (red), 978-94-007-7414-8 (Online). Tyskland: Springer, 2014.
- [6] Burgdorf, Jeffrey and Knutson, Brian and Panksepp, Jaak & Shippenberg, Toni, S. "Evaluation of rat ultrasonic vocalizations as predictors of the conditioned aversive effects of drugs". *Psychopharmacology* 155 nr. 1 (2001): pp 35.
- [7] Schwedhelm, Philipp. *Realtime analysis of ultrasonic rodent vocalizations on wearable sensor nodes*. Eberhard Karls Universität Tübingen, 2010. [http://www.uni-tuebingen.de/fileadmin/Uni\\_Tuebingen/Fakultaeten/Biologie/Institut\\_f%C3%BCr\\_Neurobiologie/Kognitive\\_Neurowissenschaft/Finished\\_Projects/Theses\\_2010/Philipp\\_Schwedhelm.pdf](http://www.uni-tuebingen.de/fileadmin/Uni_Tuebingen/Fakultaeten/Biologie/Institut_f%C3%BCr_Neurobiologie/Kognitive_Neurowissenschaft/Finished_Projects/Theses_2010/Philipp_Schwedhelm.pdf) Hämtad: 2015-05-17.
- [8] Yuki, Shoko & Okanoya, Kazuo. (2014). "Behavioral correlates of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Progressive operant discrimination learning reduces frequency modulation and increases overall amplitude". *Animal Behavior and Cognition*, 1 nr. 4 (2014): pp 452-463.
- [9] Wright, Jennifer M. and Gourdon, Jim C. and Clarke, Paul B. S. Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology* 211 nr. 1 (2010): pp 1-13.
- [10] Grimsley JMS, Gadziola MA & Wenstrup JJ. Automated classification of mouse pup isolation syllables: from cluster analysis to an Excel-based "mouse pup syllable classification calculator." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6 nr. 89 (2012).
- [11] Nationalencyklopedin *singularvärdesuppdelning*. <http://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lang/singularvardesuppdelning>. Hämtad 2015-05-17.
- [12] MathWorks. *svd - Singular value decomposition*. <http://se.mathworks.com/help/matlab/ref/svd.html>. Hämtad: 2015-05-17.
- [13] MathWorks. *kron - Kronecker tensor product*. <http://se.mathworks.com/help/matlab/ref/kron.html>. Hämtad: 2015-05-17.
- [14] Åström, Kalle & Heyden, Anders. "Stochastic Analysis of Image Acquisition, Interpolation and Scale-space smoothing". *Advances in Applied Probability* 31 nr. 4 (1999): pp 855-894.
- [15] MathWorks. *Machine Learning*. <http://se.mathworks.com/machine-learning/>. Hämtad: 2015-05-18.
- [16] Sebe, N., Cohen, Ira, Garg, Ashutosh & Huang, Thomas S. *textitComputational imaging and vision: Machine Learning in Computer Vision* vol. 29. Dordrecht: Springer, 2005.
- [17] Forsyth, David A. & Ponce, Jean. *Computer Vision - a modern approach* International Edition. Upper Saddle River: Pearson Education Inc., 2003.
- [18] MathWorks. *Pattern recognition*. <http://se.mathworks.com/discovery/pattern-recognition.html>. Hämtad: 2015-05-18.
- [19] MathWorks. *Supervised Learning*. <http://se.mathworks.com/discovery/supervised-learning.html>. Hämtad: 2015-05-18.
- [20] MathWorks. *TreeBagger*. <http://se.mathworks.com/help/stats/treebagger.html>. Hämtad: 2015-05-18.
- [21] Liao, Yihua & Vemuri, V.Rao. "Use of K-Nearest Neighbor classifier for intrusion detection". *Computers & Security* 21 nr. 5 (2002), pp 439-448.
- [22] MathWorks. *fitcknn*. <http://se.mathworks.com/help/stats/fitcknn.html>. Hämtad: 2015-05-18.
- [23] MathWorks. *Unsupervised Learning*. <http://se.mathworks.com/discovery/unsupervised-learning.html>. Hämtad: 2015-05-18.
- [24] MathWorks. *Cluster Analysis*. <http://se.mathworks.com/discovery/cluster-analysis.html>. Hämtad: 2015-05-18.
- [25] Ng, Andrew *Machine Learning (Online Course) Course Materials* Stanford University, 2014.
- [26] The Economist. *How machine learning works*. <http://www.economist.com/blogs/economist-explains/2015/05/economist-explains-14>. Hämtad: 2015-05-20.

# Compartment Model Based Estimation of Myocardial Blood Flow using Dynamic N-13 Ammonia PET

Mattias Albinsson (BME-12), John Heerfordt Sjoqvist (BME-12)

**Abstract**—By using positron emission tomography the blood flow in different regions of the myocardium can be quantified. Absolute blood flow quantification requires modelling of contrast kinetics. In this article differences in behaviour between one- and two-compartment models were investigated.  $^{13}\text{N}$ -ammonia was used as tracer and measurements were done at both rest and adenosine induced stress. The one-compartment model was also subject to further investigation through different ways of solving the modelling equations. The use of interpolation and different image standard deviation based weighting techniques in the curve fitting procedure were analyzed. In accordance with earlier research on the topic, the one-compartment model performed well and is therefore preferred for simplicity. Moreover interpolation of the measured time-activity curves should be done carefully to avoid overfitting.

**Keywords:** Myocardial blood flow · positron emission tomography · compartment modelling ·  $^{13}\text{N}$ -ammonia · nonlinear curve fitting · time-activity curve · Segment

## I. INTRODUCTION

### A. Background

MYOCARDIAL blood flow (MBF) can be quantified in different regions of the myocardium using dynamic positron emission tomography (PET). The MBF is a measure of how much blood that flows through the coronary vessels in a region of the heart muscle. The quantity is often given as ml/(g tissue · minute). Following a bolus injection of a tracer, its concentration in different regions of the myocardium is related to the blood flow [1]. Hence it is useful to know how the tracer distributes.

Coronary diseases are one of the leading death causes in the world. The ability to quantify the MBF would make it possible to detect early stages of atherosclerosis and microvascular dysfunction. It would also enable identification of subclinical coronary artery diseases and balanced coronary diseases [2].

### B. Purpose

The aim of this project was to implement a plugin to the image analysis software Segment [3]. In the plugin the user should be able to obtain an estimate of the myocardial blood flow from PET images using compartment modelling.

Similar implementations did already exist in different software packages when the project started. Carimas and COMKAT are two such examples [4] [5]. The Lund Cardiac MR Group were in need of an implementation, which was not a black box. For research purposes a plugin to their own software (i.e. Segment) would be beneficial. Moreover the clinicians needed a easy to use and robust program. Therefore the purpose of this study was to implement one- and two-compartment models and analyze their behaviour. It should be possible to obtain the blood flow in particular regions of interest (ROIs) of the myocardium. The activity was supposed to be visualized as time-activity curves. Focus was put on the effects of different numerical techniques for ordinary differential equation (ODE) solving, curve fitting and interpolation.

### C. Positron Emission Tomography

Positron emission tomography is a medical imaging modality which provides much insight into cardiac ischemia. The technique's foundation is the injection of a positron-emitting tracer into the patient. The positrons indirectly cause emission of photons which are detected and used for image formation. The technique maps the distribution of the tracer, hence physiological processes are reflected. That since the tracer distributes with the blood circulation and is extracted to different organs, where the retention in the myocardium is of primary interest in perfusion imaging. Ideally the myocardial retention is proportional to the blood flow [6]. In cardiac applications PET is used to examine coronary function and ultimately, as in this paper, quantification of MBF in absolute terms [7, p. 179].

The spatial resolution of PET is limited due to factors such as detector size, positron range and photon acollinearity [7, p. 198]. Detected photons are commonly collected in list-mode which allows post-processing to form both static and dynamic images. For kinetic modelling the dynamic images, which are acquired just after the bolus injection, are of interest. Normally the clinical protocol consists of imaging both at rest and at pharmacologically induced stress. The heart can be forced into a stress state through injection of e.g. adenosine [6].

There are different techniques for reconstruction of PET images. Two common techniques is filtered back projection (FBP) and the iterative reconstruction method; ordered-subset expectation maximization (OSEM). In this article only OSEM images have been studied since the quality, especially the

Hand in: June 6, 2015

e-mail: mte12mal@student.lu.se, mte12jsj@student.lu.se

Technical supervisor: Einar Heiberg, Ass. Prof., Lund Cardiac MR Group

Clinical supervisor: Cecilia Hindorf, Medical physicist, Ass. Prof.,

Radiation Physics, Skane University Hospital Lund

signal-to-noise ratio, of those images are better than those reconstructed with FBP. Also there are no streaky artefacts with OSEM reconstruction [8]. For the interested reader comprehensive books on PET is given by [9] [10].

#### D. $^{13}\text{N}$ -ammonia

$^{13}\text{N}$ -ammonia is a radiopharmaceutical used for PET imaging of the myocardium. The half life time is 9.97 minutes and the tracer is therefore only used at hospitals with access to a cyclotron [6]. It is injected intravenously and the image acquisition is commonly started at the time of injection.

When  $^{13}\text{N}$ -ammonia reacts with glutamate it is converted to the amino acid  $^{13}\text{N}$ -glutamine and remains trapped in the tissue. The reaction is catalyzed by the enzyme glutamine synthetase which is present in the myocardium. Regions with high concentration of  $^{13}\text{N}$ , bound to either glutamine or ammonia, will appear bright on a PET image. The uptake and extraction of  $^{13}\text{N}$ -ammonia in the heart muscle is flow dependent [1]. As an example the retention fraction, the tracer taken up and retained by the tissue in an organ, shifts from approximately 0.55 to 0.9 in the myocardium if the flow decreases from 5 to 1 ml/(g·min) [11]. Hence it is necessary to model the retention when modelling the relation of blood flow to tracer activity.

#### E. Segment

The program Segment, which is developed by Medviso AB, is a software package for medical image analysis running from source code in MATLAB or as a standalone program [3]. It is mainly developed for cardiovascular MRI-imaging but is also compatible with other modalities such as CT, SPECT and PET.

## II. DATA

#### A. Patient Data

For development anonymous data from five different patients, both at rest and stress induced by adenosine, were provided by Skanes University Hospital in Lund. All patients had been examined twice, at separate time points, yielding a total of four image series for each patient.  $^{13}\text{N}$ -ammonia had been used as tracer and all images were in DICOM format which is the most common medical imaging format [9, p. 443]. The dynamic images each consisted of 47 slices and followed an acquisition scheme with twelve frames of ten seconds, two frames of thirty seconds and a final frame of 60 seconds.

For comparison the patients MBF had been evaluated in Carimas prior to the start of this project, as seen in Table I. The values represent the global MBF which is an average over the whole left ventricular myocardium.

TABLE I  
PATIENT MBF EVALUATED IN CARIMAS

| Patient Number | Rest MBF [ml/(g·min)] | Stress MBF [ml/(g·min)] |
|----------------|-----------------------|-------------------------|
| 1              | 1.15                  | 2.37                    |
| 2              | 1.01                  | 1.70                    |
| 3              | 0.82                  | 1.88                    |
| 4              | 1.24                  | 3.42                    |
| 5              | 1.06                  | 1.87                    |

## III. METHOD

#### A. Compartment Modelling

The uptake of  $^{13}\text{N}$ -ammonia in the myocardium can be described using linear differential equations. The compartment models used in this article, developed by Hutchins et al. [12], are depicted in Figure 1. The terminology of compartment models varies in the literature. A one-compartment model in this text refers to one tissue compartment (representing the myocardium) and one blood compartment (representing the blood in the left ventricle). The following set of equations was used,

$$\frac{dC_E(t)}{dt} = K_1 C_a(t) - k_2 C_E(t) - k_3 C_E(t) - \lambda C_E(t) \quad (1)$$

$$\frac{dC_G(t)}{dt} = k_3 C_E(t) - \lambda C_G(t) \quad (2)$$

where,

$$C_a(t) = \text{}^{13}\text{N}\text{-ammonia in arterial blood [Bq/ml]}$$

$$C_E(t) = \text{}^{13}\text{N}\text{-ammonia in myocardial tissue [Bq/g]}$$

$$C_G(t) = \text{}^{13}\text{N}\text{-glutamine in myocardial tissue [Bq/g]}$$

$$K_1 = \text{Ammonia uptake rate [ml/(g·min)]}$$

$$k_2 = \text{Ammonia washout rate [min}^{-1}\text{]}$$

$$k_3 = \text{}^{13}\text{N}\text{-glutamine formation rate [min}^{-1}\text{]}$$

$$\lambda = \text{}^{13}\text{N}\text{-decay constant [min}^{-1}\text{]}$$

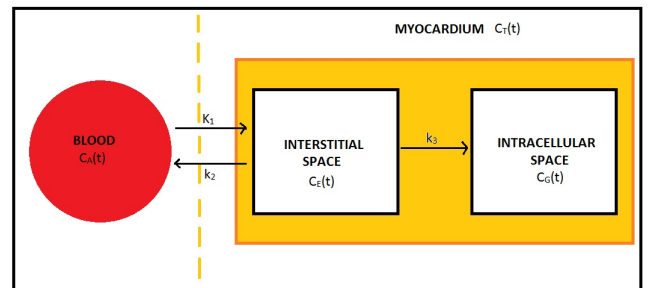


Fig. 1. Myocardial compartment model describing tracer transport

The equations above are based on a number of assumptions:

- $^{13}\text{N}$ -ammonia diffuses freely in the capillaries of the coronary circulation.
- The  $^{13}\text{N}$ -ammonia that is converted to  $^{13}\text{N}$ -glutamine remains in the myocardial tissue until natural decay.
- The  $^{13}\text{N}$ -ammonia pools within the myocardium equilibrates fast.
- The enzyme glutamine synthetase, which is present in the myocardium, remains at nearly constant levels. Hence the rate of conversion into  $^{13}\text{N}$ -glutamine remains unchanged.

The decay term is often omitted in the modelling since most PET software performs automatic correction for the decay of the radioisotope. The density of myocardial tissue is approximately 1.04 g/ml [11]. For simplicity it was approximated as 1 g/ml in this article.

The time-activity curves typically appear as in Figure 2. The different tracer activity at stress and at rest shows that the myocardial activity is slightly higher when at stress.

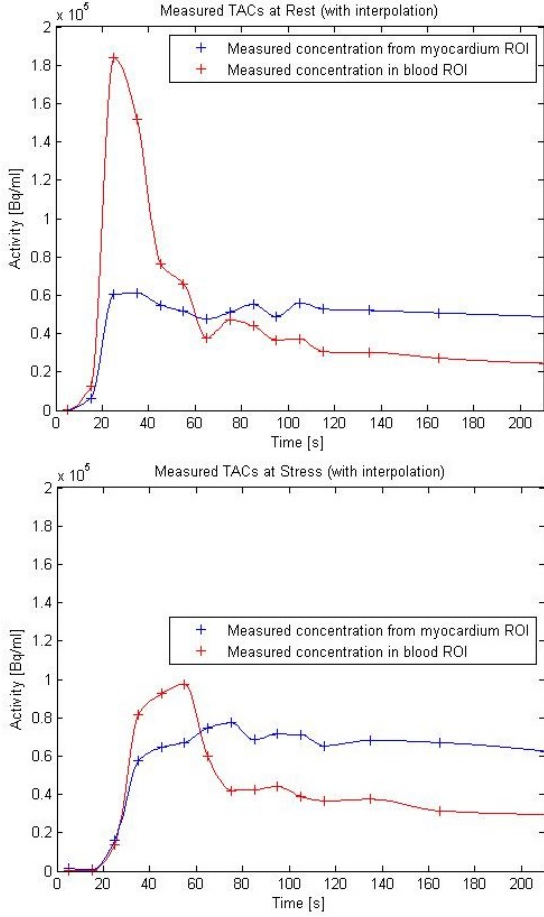


Fig. 2. Time-activity curve (TAC) from female patient at rest (top) and at stress (bottom)

The total activity in the myocardium is simply the sum of the included compartments activity,

$$C_T = C_E + C_G \quad (3)$$

If the effect of metabolically trapped tracer is neglected, i.e.  $k_3 = 0$ , a one-compartment model is obtained. The effects of such an approach was investigated by both Hutchins *et al.* and DeGrado *et al.* [12] [11]. The latter were successful using only images from the first four minutes in the one-compartment model whilst the first used ten minutes data for both models. In the two separate studies, the one-compartment model yielded slightly lower flow estimates. For the one compartment model a closed form solution for the myocardial activity (since  $C_E = C_T$ ) can be obtained using the Laplace transform,

$$\frac{dC_E(t)}{dt} = K_1 C_a(t) - k_2 C_E(t) \quad (4)$$

$$\xrightarrow{\mathcal{L}} C_E(s) - C_E(0) = \frac{K_1}{s + k_2} C_a(s) \quad (5)$$

It is assumed that  $C_E(0) = 0$ , yielding,

$$\xrightarrow{\mathcal{L}^{-1}} C_E(t) = K_1 e^{-k_2 t} * C_a(t), \quad t \geq 0 \quad (6)$$

In Equation (6)  $*$  denotes the convolution operator. The closed form solution for the two compartment model can be obtained in the same manner.

The activity represented in a modern PET image is not an instant value, but rather the integral of the activity normalized with the acquisition time. In addition, the spatial resolution of PET is limited. Therefore there is spillover, meaning that decay occurring in the myocardium can be associated with a voxel in the blood pool and vice versa. Moreover the myocardium includes blood vessels. [12] To account for these effects Hutchins *et al.* used the following expression to describe the activity measured by a PET scanner,

$$C_m(t) = \frac{1}{t_2 - t_1} \cdot [(1 - TBV)\rho_{tissue} \int_{t_1}^{t_2} C_T(t)dt + TBV \int_{t_1}^{t_2} C_a(t)dt] \quad (7)$$

$C_m$  represents the activity that is measured in a ROI placed in the myocardium. TBV is a constant term which represents the total fractional blood volume, and takes values on the interval (0,1). The term reflects the effects of both spillover and the myocardial blood volume. Even though TBV is assumed to be constant it is not known *a priori* during the MBF quantification.  $t_1$  and  $t_2$  are the start and end times of the particular image.

To account for flow-dependency in the tracer extraction the tracer specific extraction function  $E(MBF)$  was used in Equation (8). The equation and the parameter values were obtained from Klein *et al.* [6].

$$E(MBF) = 1 - a \cdot e^{-\beta/MBF} \quad (8)$$

where,

$$a = 0.096 \text{ [dimensionless]}$$

$$\beta = 1.083 \text{ [ml/(g·min)]}$$

Finally the constant  $K_1$  can be related to the MBF as,

$$MBF = \frac{K_1}{E(MBF)} \quad (9)$$

## B. Blood Flow Estimation

To estimate the blood flow a plugin to Segment was created. The plugin's function was to estimate the constants  $K_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$  and TBV from ROIs in the myocardium and the left ventricular blood pool (cf. Figure 3) and thereafter solve Equation (8) for the MBF. In order to obtain an estimate of the MBF curve fitting of the compartment model equations to the measured data was performed. The different parts of the plugin is outlined below:

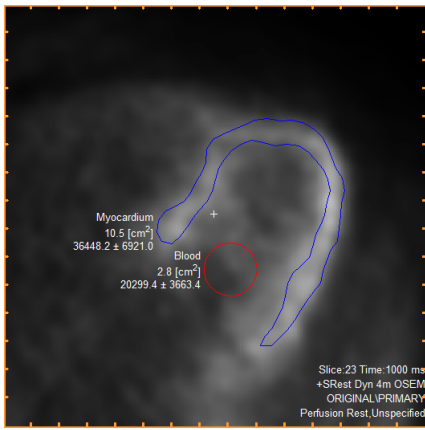


Fig. 3. Placement of one encompassing tissue ROI and one arterial input ROI in a transaxial image

1) *Preprocessing of PET Data:* The mean tracer activity in a voxel in space during the acquisition of a PET image, is represented as a numerical value [Bq/ml] in the corresponding pixel in the image. After ROIs were drawn they were associated with the mean activity in the pixels in the ROI for each time frame. The average frame activity in the different ROIs were assumed to have been measured as an instant value at the middle of the time frame. When interpolation was used, the measured activities were interpolated cubically with a one second time step using the `interp1`-function in MATLAB with the `pchip`-option. To avoid extrapolation no activity before and after half the time of the first and last images were used in the modelling.

2) *Solving ODEs:* The differential equations describing the compartment models (Equations (1) and (2)), were solved through numerical integration. The ODE solvers in MATLAB were used for the computations. The primary choice was the nonstiff `ode45` based on an explicit Runge-Kutta formula. Also the nonstiff `ode23`, the stiff `ode23s` and the moderately stiff `ode23t` were tested [13, Ch.7, p. 27]. Default settings were used.

3) *Curve Fitting Algorithm:* The integrated ODEs were fitted to the measured time-activity curves with the MATLAB function `lsqcurvefit`. The following minimization of the mean square error was performed,

$$\min S(\boldsymbol{\theta}) = \sum_{i=1}^m (C_{m_i} - \hat{C}_{m_i}(\boldsymbol{\theta}))^2 \quad (10)$$

where  $C_{m_i}$  represents the measured activity in the  $i$ :th image,  $\hat{C}_{m_i}$  is simulated from a discrete version of Equation (7) as seen in equation (11) and  $\boldsymbol{\theta}$  represents the fitted parameters. Since the tissue density is unity it can be omitted in Equation (11). The parameters  $K_1, k_2, k_3$  were constrained to non-negative values.  $TBV$  was constrained to the interval (0,1) to only accept physiologically realistic values. When constrained, `lsqcurvefit` uses the trust-region-reflective algorithm.

$$C_m(n) = TBV \cdot C_a(n) + (1 - TBV) \cdot C_T(n) \quad (11)$$

After obtaining the estimates, the MBF was calculated through solving Equation (8) with the MATLAB function `fsolve` which solves nonlinear equations. To evaluate the MBF four different methods, all with interpolated  $C_a$ , with the following differences were used:

- Unweighted curve fitting with interpolated  $C_m$ .
- Weighted curve fitting with interpolated  $C_m$ .
- Weighted curve fitting without interpolated  $C_m$ .
- Unweighted curve fitting without interpolated  $C_m$ .

The weighting was achieved through multiplication with the reciprocal of the standard deviation for each image. When  $C_m$  was interpolated and weighting was used, `lsqcurvefit` was replaced with `lsqnonlin` and the standard deviations were interpolated. Since the variance in the images are larger just after the bolus, the importance of the early images is reduced. It is also often difficult to locate the myocardium with high accuracy in those frames.

### C. Phantoms

To evaluate the implementation of the blood flow estimation a digital phantom was created. The phantom represented the myocardium and the blood pool as annular and circular regions respectively (cf. Figure 4).  $C_m$  could be generated both from the one- and the two-compartment models. Optional addition of Gaussian noise was included.

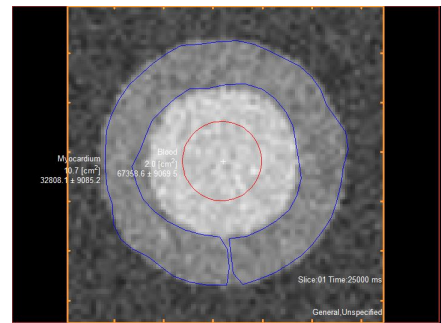


Fig. 4. Phantom with one global myocardial ROI (blue) and one ROI in the blood pool (red)

The phantom used an empirically developed function description, cf. Eq. (12), of the arterial activity from which the activity in the myocardial tissue was calculated via Equations (7) and (11). The following discrete time arterial input function was used for simulating a myocardium at rest,

$$C_a(n) = \begin{cases} 0, & n < 15 \\ 10^5 \cdot \log(0.1n) e^{-0.03(n-15)}, & n \geq 15 \end{cases} \quad (12)$$

where the sampling time is assumed to be one second and the negative values of  $C_a(n)$  were set to zero for physiological meaningfulness. The images in Section II-A indicated an approximate delay of 15 seconds from injection until tracer arrival in the myocardium explaining the initial part of the

input function. The peak amplitude was adjusted to the same order of magnitude as in patients (cf. Figure 2). A plot of the function is seen in Figure 5.

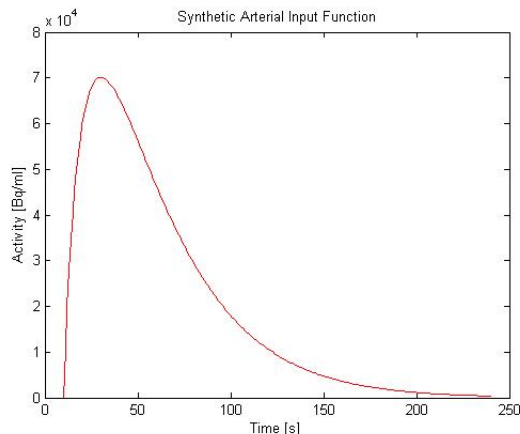


Fig. 5. Synthetic arterial input function for phantom generation

The mean activity associated with an image was calculated as the arithmetic mean of all interpolated samples of  $C_a$  and  $C_m$  during each frame time. The curve fitting was applied to pure phantom data as well as phantoms distorted with Gaussian noise.

#### D. Phantom Analysis

The phantoms were first analyzed without any addition of noise (see Table II in Section IV-A). Interpolation was used for all ROIs but without weighting in the curve fitting. Hence the parameter values used for generation of the phantoms were supposed to be returned by the plugin. After the images were generated different noise levels were applied to investigate the effects on the estimations (see Table III). Two different Gaussian noise distributions with zero-mean and standard deviations  $\sigma = 1000$  [Bq/ml] and  $\sigma = 10000$  [Bq/ml] respectively were used and the phantoms were generated and evaluated in both one- and two-compartment mode.

#### E. Patient Data Analysis

To examine the differences in the quantification of the MBF between the one- and two-compartment models the same ROIs were evaluated with both models in all patients. Two different sets of ROIs were evaluated for each patient. Also here interpolation was used but without weighting in the curve fitting. Thereafter a paired-sample t-test and the corresponding confidence intervals for both rest and stress were constructed. As input one single tissue ROI encompassing the whole myocardium and one ROI in the blood pool were placed (see Figure 3) in a central slice. Thereafter the procedure was replicated for five new ROIs, one in each patient, to compare differences among the estimated parameters. Finally all patients were analyzed with the four different approaches outlined in Section III-B3.

#### F. Merging Images for Facilitated ROI Placement

How to place the myocardial ROI is not obvious due to the limited spatial resolution and occurrence of noise. To reduce the arbitrariness of the procedure a weighted average of the late stage images, where the contrast is high between the myocardium and surrounding tissue and blood, was implemented in an additional plugin. The weights were chosen manually by the image quality. Highest weight was always given to the last image. After the averaging the image was sharpened using unsharp masking and intensity adjusted through the MATLAB functions `imsharpen` and `imadjust` respectively [14].

### IV. RESULTS

In this section the estimates of the parameter values obtained from phantoms and patients are presented. In the tables below  $K_1$  and the corresponding MBF are given in ml/(g·min) whilst  $k_2$  and  $k_3$  are true rate constants in  $\text{min}^{-1}$ . The total blood volume  $TBV$  is simply a fraction and is a dimensionless number. Using different ODE solvers did not affect the result of the parameter estimation significantly. Whilst comparing the MBF in a single ROI for the different solvers, the standard deviation was 0.003. All results outlined below were computed with `ode45`.

#### A. Results in Phantoms

When the tracer kinetic analysis was performed on pure phantom data the performance was very good as seen in Table II. Addition of Gaussian noise changed the outcome of the estimation procedure to some extent as depicted in Table III. The difference is marginal between the one- and two-compartment models.

TABLE II  
RESULTS FROM PURE PHANTOMS

| No. of Comp. | True Values |       |       |       | Estimated Values |       |       |       |
|--------------|-------------|-------|-------|-------|------------------|-------|-------|-------|
|              | $K_1$       | $k_2$ | $k_3$ | $TBV$ | $K_1$            | $k_2$ | $k_3$ | $TBV$ |
| 1            | 0.80        | 0.20  | -     | 0.40  | 0.80             | 0.20  | -     | 0.40  |
| 2            | 0.80        | 0.20  | 0.10  | 0.40  | 0.81             | 0.20  | 0.11  | 0.40  |

TABLE III  
RESULTS FROM NOISY PHANTOMS

| No. of Comp. | Est. Values ( $\sigma = 1000$ ) |       |       |       | Est. Values ( $\sigma = 10000$ ) |       |       |       |
|--------------|---------------------------------|-------|-------|-------|----------------------------------|-------|-------|-------|
|              | $K_1$                           | $k_2$ | $k_3$ | $TBV$ | $K_1$                            | $k_2$ | $k_3$ | $TBV$ |
| 1            | 0.81                            | 0.20  | -     | 0.41  | 0.76                             | 0.31  | -     | 0.33  |
| 2            | 0.81                            | 0.22  | 0.10  | 0.39  | 0.71                             | 0.18  | 0.44  | 0.42  |

#### B. Results in Patients

The time-activity curves simulated in the curve fitting process agreed relatively well to the one measured. In Figure 6 an example of a measured curve and the corresponding curve fits are depicted. Even though the fits are similar the paired sample t-test concluded that there are differences in the results from the one- and two-compartment models. The data used in the comparison is found in Table IV. The two-compartment model gave higher values of the parameter  $K_1$ , and thus higher MBF, both during rest and stress. The null hypothesis stating that there were no difference in MBF could be rejected on a

significance level of 99 % for patients at rest and 99.9 % for patients at stress. The confidence intervals gave the following results;  $[-0.067, -0.0046]$  at rest and  $[-0.32, -0.092]$  at stress. The higher flow estimates using a two-compartment model agreed with earlier studies, even though they used different image acquisition schemes [11] [12].

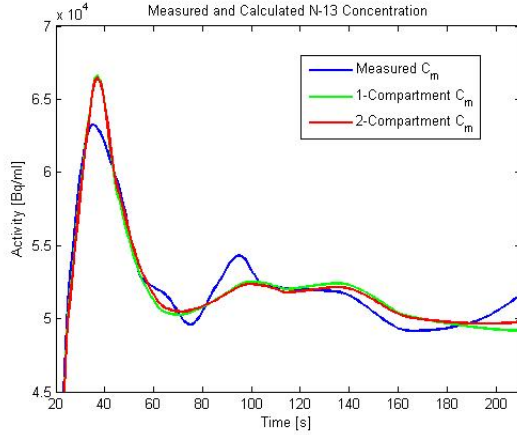


Fig. 6. Measured and curve fitted activity with both compartment models from a myocardial ROI (N.B. the scaling of the axes)

TABLE IV  
RESULTS USED FOR PAIRED T-TEST

| No. of Comp. | Rest MBF [ml/(g·min)] | Stress MBF [ml/(g·min)] |
|--------------|-----------------------|-------------------------|
| 1            | 0.87                  | 2.04                    |
| 2            | 0.90                  | 2.25                    |
| 1            | 1.11                  | 2.55                    |
| 2            | 1.17                  | 2.74                    |
| 1            | 0.88                  | 1.90                    |
| 2            | 0.89                  | 2.04                    |
| 1            | 0.87                  | 1.95                    |
| 2            | 0.96                  | 2.25                    |
| 1            | 0.70                  | 1.94                    |
| 2            | 0.72                  | 2.18                    |
| 1            | 0.51                  | 2.11                    |
| 2            | 0.51                  | 2.40                    |
| 1            | 0.78                  | 3.37                    |
| 2            | 0.80                  | 3.55                    |
| 1            | 0.76                  | 2.21                    |
| 2            | 0.77                  | 2.25                    |
| 1            | 1.13                  | 2.12                    |
| 2            | 1.20                  | 2.37                    |
| 1            | 1.10                  | 2.19                    |
| 2            | 1.15                  | 2.38                    |

The five succeeding estimations of the coefficients  $K_1$ ,  $k_2$  and  $k_3$  plus the parameter  $TBV$  are shown in Table V. The MBF estimates using the four different approaches and the values from Carimas (cf. Section II-A) are seen in Tables VI and VII. A comparison shows that the differences are more prominent at stress than at rest. That is seen in Figure 7 where the unweighted method with interpolation was compared to Carimas.

Correlation Scatter and Bland-Altman Plots  
- Comparison to Carimas

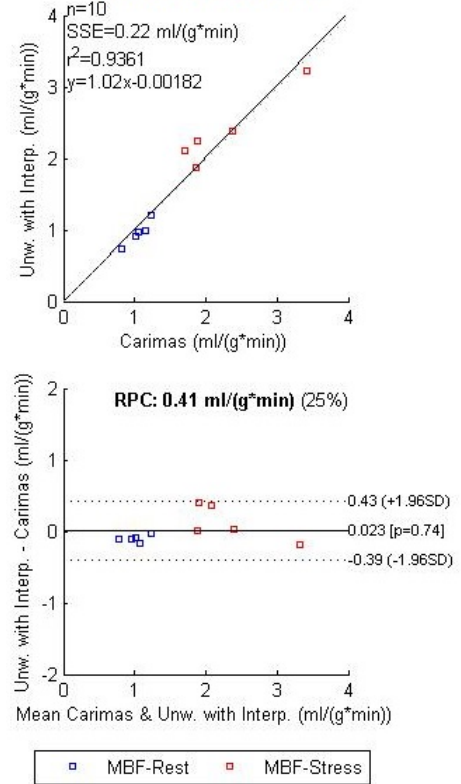


Fig. 7. Unweighted method with interpolation compared to Carimas

TABLE V  
RESULTS FROM COMPARTMENT COMPARISON

| Patient | Comp. | $K_1$ | $k_2$ | $k_3$ | $TBV$ |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1       | 1     | 0.94  | 0.40  | -     | 0.25  |
|         | 2     | 0.98  | 0.48  | 0.08  | 0.24  |
| 2       | 1     | 0.86  | 0.30  | -     | 0.31  |
|         | 2     | 0.87  | 0.31  | 0.02  | 0.31  |
| 3       | 1     | 0.69  | 0.32  | -     | 0.23  |
|         | 2     | 0.68  | 0.35  | 0.05  | 0.22  |
| 4       | 1     | 1.09  | 0.50  | -     | 0.28  |
|         | 2     | 1.15  | 0.63  | 0.09  | 0.26  |
| 5       | 1     | 0.87  | 0.30  | -     | 0.25  |
|         | 2     | 0.84  | 0.28  | 0.01  | 0.25  |

### C. Results of Image Merging

In summary the averaging method behaved well when several late stage images clearly showed the myocardial left ventricle wall. In cases where only the last image was of good quality, which is more often the case in patients at rest, ROI placement was easier in the original image. The procedure appeared to increase the noise in the images if the sequence of late images was of poor quality. An example of the final image in a sequence at rest and the weighted time-averaged counterpart is seen in Figure 8.

## V. DISCUSSION

### A. Plugin implementation

There are different ways to approach compartment modelling in PET perfusion analysis. In this article the choice



TABLE VI  
PATIENT MBF AT REST

| Patient No. | Unweighted + Interpolation [ml/(g·min)] | Weighted + Interpolation [ml/(g·min)] | Weighted + No Interpolation [ml/(g·min)] | Unweighted + No Interpolation [ml/(g·min)] | Carimas [ml/(g·min)] |
|-------------|---|---------------------------------------|--|--|----------------------|
| 1           | 1.00                                    | 0.98                                  | 0.98                                     | 1.00                                       | 1.15                 |
| 2           | 0.91                                    | 0.90                                  | 0.91                                     | 0.91                                       | 1.01                 |
| 3           | 0.73                                    | 0.76                                  | 0.81                                     | 0.73                                       | 0.82                 |
| 4           | 1.22                                    | 1.23                                  | 1.15                                     | 1.24                                       | 1.24                 |
| 5           | 0.98                                    | 1.00                                  | 0.98                                     | 1.00                                       | 1.06                 |

TABLE VII  
PATIENT MBF AT STRESS

| Patient No. | Unweighted + Interpolation [ml/(g·min)] | Weighted + Interpolation [ml/(g·min)] | Weighted + No Interpolation [ml/(g·min)] | Unweighted + No Interpolation [ml/(g·min)] | Carimas [ml/(g·min)] |
|-------------|---|---------------------------------------|--|--|----------------------|
| 1           | 2.40                                    | 2.37                                  | 2.36                                     | 2.43                                       | 2.37                 |
| 2           | 2.12                                    | 2.26                                  | 2.43                                     | 2.11                                       | 1.70                 |
| 3           | 2.26                                    | 2.34                                  | 2.49                                     | 2.25                                       | 1.88                 |
| 4           | 3.24                                    | 3.58                                  | 3.68                                     | 3.53                                       | 3.42                 |
| 5           | 1.89                                    | 2.29                                  | 2.22                                     | 1.80                                       | 1.87                 |

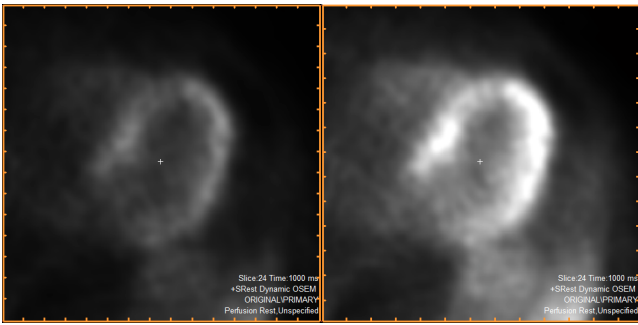


Fig. 8. Last image in sequence at rest (left) and processed merged version (right)

to use numerical integration to solve the differential equation was made. Another approach would have been to solve the equations in integrated form. The main difficulty with that approach is nonlinear fitting with the convolution integral in Equation (6).

In the implemented method the mean value of the activity at a number of time instants was associated with a particular frame. The results appeared to agree with the numerical integration techniques found in literature.

### B. Phantoms

As stated in Section IV-A the outcome of both compartment models were good when applied to pure data. That was the expected result since in a correct implementation the output values from the phantom analysis should be equal to the input values used to generate the image. In the noisy phantoms the estimates were not as good as a consequence of the loss of information in the images. As could be seen in Table III a standard deviation of 1000 Bq/ml had low impact whilst the standard deviation of 10000 Bq/ml gave estimation errors of clinical significance.

The arterial input function was not supposed to affect the parameters estimated from a generated phantom. That since the function values only appear as scale factors in Equations

(1), (2) and (11). Therefore the amplitude, width and setting the negative values to zero should not be major concerns.

In this study the phantoms were only distorted with Gaussian noise which did not dramatically change the algorithm's performance. That is not surprising since averaging is a main part of the algorithm, and averaging dramatically reduces the effect of Gaussian noise.

### C. Patients

A major concern was the possibility to verify our results. The gold standard using injected microspheres could not be employed within the framework of this project [6]. The comparisons with Carimas gave a possibility to check the accuracy to some extent. The correlation plot in Figure 7 showed positive correlation whilst the Bland-Altman plot illustrated bias in the rest estimates. At stress more variation was shown. Although the results are highly dependent on the ROIs used and it is therefore difficult to decide which implementation is superior.

Of the four different approaches used (see section III-B3), it seems most reasonable to use weighting and no interpolation of  $C_m$ . Weighting with the image standard deviation is used to suppress the dependence on the highly insecure images at the beginning of the acquisition and interpolation of the tissue ROI is abstained to avoid overfitting. However no method could be determined superior from the few tests done. It can be seen in Tables VI and VII that the weighting seems to affect the results more than the interpolation. If the estimates are changed to the better is more difficult to confirm.

The paired sample t-test indicated higher MBF estimates from the two-compartment model in agreement with earlier research. Anyhow the five other evaluations seen in Table V do not appear to follow that pattern. Thus, to draw a general conclusion further investigation is needed. Compared to the results from Hutchins *et al.* [12] the coefficients spanned across reasonable bounds. What strengthens the reliability of the implemented plugin in Segment is that values in all methods are in the same order of magnitude as in Carimas,

even though better accuracy might be needed for clinical integration.

#### D. Limitations

This paper contains several limitations whereof the most significant are listed below:

- When phantoms were generated they were only distorted with Gaussian zero-mean noise. It would have been of interest to study the effect of Poisson and Gamma distributed noise and composite distributions as well.
- When noise was applied to the phantoms only the generated image sequence was distorted by noise. It would have been of interest to examine the effect of noise addition to the measured arterial and myocardial activity, used for phantom generation, as well.
- In the patient evaluations only data from five different patients (two acquisitions for all patients at different time points, each during both rest and stress) were used. In order to develop a clinically useful implementation more patient data is needed. In addition verification against a gold standard method would be of high value.
- The Carimas values are from global ROIs whilst the results from Segment are from ROIs in a central slice, possibly giving differences in the MBF. Anyway the patient-to-patient variation seemed to be linked.

#### E. Sustainable Development

From a sustainability point of view the proposed implementation is of good value. Since some kind of PET perfusion analysis is often performed whilst evaluating coronary artery disease, the extra resources needed for the method is minimal. The algorithm runs fast and give flow estimates of high clinical value where the only real costs are a few minutes of work for the clinician and a small power consumption by the computer used for processing. The low radiation dosage that the patient is exposed to is low in relation to the diagnostic value.

From an economic perspective it is important that the source code from projects like this is made available for free. In that way research resources do not have to be spent on developing already existing implementations, thus making the usage of research grants more efficient.

#### F. On the Image Merging

An improved visual impression is no guarantee for higher information content in the image. There is even a risk of introducing false information when applying image enhancement techniques. In noisy image sequences there was no obvious benefit of averaging several frames. On the contrary additional noise appeared in the averaged image, which is not surprising since the signal to noise ratio is best in the last image. It was found hard to define an averaging pattern that worked well for both noisy and good images. Therefore, if a method of this type is to be used, it would be helpful to implement an interface where the number of images to be averaged and their respective weights are selected.

## VI. CONCLUSION

Using compartment models to evaluate PET images could be a good way to facilitate the diagnosis of coronary heart diseases. Our results shows that the method yields physiologically reasonable values. To bring the implementation to the clinic requires more statistical analysis and comparisons with a gold standard method. Through this study no advantage using a two compartment model could be proven, making the one compartment model the first choice for the sake of simplicity.

## VII. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank our technical supervisor Einar Heiberg, Associate professor, Clinical Physiology, Lund Cardiac MR Group for all support regarding mathematical modelling, Segment and coding in MATLAB and our clinical supervisor Cecilia Hindorf, Medical physicist, Associate professor, Radiation Physics at Skane University Hospital Lund for her expertise in PET imaging. Finally we would also like to thank the Lund Cardiac MR Group for letting us in to their helpful atmosphere.

## REFERENCES

- [1] H. R. Schelbert, M. R. Phelps, S. C. Huang et al., *N-13 ammonia as an indicator of myocardial blood flow*, *Circulation* 1981; 63:1259-72
- [2] T. H. Schindler, H. R. Schelbert, A. Quercioli, and V. Dilsizian, *Cardiac PET Imaging for the Detection and Monitoring of Coronary Artery Disease and Microvascular Health*. *JACC.Img.* 2010; 3:623-40.
- [3] E. Heiberg, J. Sjogren, M. Ugander, M. Carlsson, H. Engblom, and H. Arheden, *Design and Validation of Segment - a Freely Available Software for Cardiovascular Image Analysis*, *BMC Medical Imaging*, 10:1, 2010.
- [4] S. V. Nesterov, *Myocardial perfusion quantitation with 15O-labelled water PET: high reproducibility of the new cardiac analysis software (Carimas)*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009; 36:1594-602.
- [5] R. F. Muzic, and S. Cornelius, *COMKAT: Compartment Model Kinetic Analysis Tool*. *J.Nucl.Med.* 2001; 42:636-645.
- [6] R. Klein, R. S. B. Beanlands, and R. A. deKemp, *Quantification of myocardial blood flow and flow reserve: Technical aspects*, *J. Nucl. Cardiol.* 2010; 17:555-70.
- [7] M. M. Khalil, *Basic Sciences of Nuclear Medicine*. Berlin: Springer, 2011 ISBN: 978-3-54-085961-1
- [8] H. M. Sondergaard, M. M. Madsen, K. Boisen, M. Bottcher, O. Schmitz, T. T. Nielsen, H. E. Botker, S. B. Hansen, *Evaluation of iterative reconstruction (OSEM) versus filtered back-projection for the assessment of myocardial glucose uptake and myocardial perfusion using dynamic PET*. *Eur.J.Nucl.Med.Mol.Imaging* 2007 34:320-329.
- [9] D. L. Bailey et al., *Positron Emission Tomography*. Springer, 2005, ISBN: 85233-798-2
- [10] D.L. Bailey, J.L. Humm, A. T. Todd-Pokropek, and A. van Aswegen, *Nuclear Medicine Physics, A Handbook for Teachers and Students*. Vienna: IAEA, 2014 ISBN: 978-92-0-143810-2
- [11] T. R. DeGrado et al., *Estimation of myocardial blood flow for longitudinal studies with <sup>13</sup>N-labeled ammonia and positron emission tomography*, *Conferece contribution. Nuclear Medicine*. June 12-15, MinneaPolis, Minn.
- [12] G. D. Hutchins et al., *Noninvasive Quantification of Regional Blood Flow in the Human Heart Using N-13 Ammonia and Dynamic Positron Emission Tomographic Imaging* *JACC* Vol. 15. No. 5 April 1990:1032-42
- [13] C. B. Moler, *Numerical Computing with Matlab*. SIAM, 2004 ISBN: 978-0-89-871560-6
- [14] *MATLAB and Image Processing Toolbox Release 2015a* The Math-Works, Inc., Natick, Massachusetts, United States.

# Dieselpartiklars påverkan på baroreflexen studerad med sekvensmetoden

Ebba Knutsson (BME12), Elin Magnusson (BME12)

**Sammanfattning**—Flertalet studier har gjorts som visar att det finns ett direkt samband mellan exponering av luftburna partiklar och förhöjd risk för hjärt- och kärlsjukdomar. Dock är det inte klarlagt vilken typ av partiklar som är farligast eller genom vilka mekanismer de påverkar oss. I denna studie undersöks därför om det finns ett samband mellan tillfälligt hög exponering av dieselpartiklar och en försämring av barosensitiviteten. Baroreflexen är den mekanism som genom nervsystemet reglerar blodtrycket i kroppen genom att öka eller minska hjärtfrekvensen. För att uppskatta barosensitiviteten finns ett flertal metoder. I denna studie används sekvensmetoden med så kallad "Global Approach" som innebär analys av sekvenser av korrelerade förändringar av systoliskt blodtryck och hjärtfrekvens. Utifrån sekvenserna skattas en linje med hjälp av linjär regression vars lutning motsvarar barosensitiviteten. För att undersöka om dieselpartiklar påverkar baroreflexen genomförs en jämförelse mellan det uppskattade värdet på barosensitiviteten före exponering och efter tre timmars exponering. En jämförelse genomförs också i oexponerad miljö för att bekräfta att försöksuppställningen inte har någon påverkan på resultatet. Den EKG- och blodtrycksdata som använts kommer från 18 försökspersoner som under tre timmar vistats i en kontrollerad tryckkammare under exponering av höga halter av dieselpartiklar. Studiens resultat pekar på att dieselpartiklar inte har någon signifikant påverkan på baroreflexen.

## I. INTRODUKTION

### A. Bakgrund

**B**AROREFLEXEN är den mekanism som reglerar akuta förändringar av blodtrycket genom att reglera hjärtfrekvensen, motståndet i kärlen och kärlkontraktionen. Detta uppnås genom det autonoma nervsystemet, bestående av det sympatiska och det parasympatiska nervsystemet. I aortabågen och i halspulsådern finns tryckkänsliga baroreceptorer. Dessa reagerar på snabba förändringar av blodtryck genom att uppfatta de skillnader i sträckningen av kärlväggen som uppstår när blodtrycket ökar eller minskar. För att motverka den blodtrycksförändring som uppstått ökas eller minskas hjärtfrekvensen, kärlmotståndet och kärlkontraktionen. Om förändringen är bestående kommer receptorerna att ha anpassat sig till det nya värdet efter ungefär ett dygn [1].

För att kunna utvärdera baroreflexen har begreppet baroreflexsensitivitet (BRS) införts. BRS är ett mått på baroreflexens förmåga att öka eller minska hjärtfrekvensen som ett svar på en hastig förändring av blodtrycket. Ett lågt BRS ( $< 3 \text{ ms/mmHg}$ ) har visat sig signifikant öka risken att dö i akuta hjärtsjukdomar för patienter som tidigare har drabbats

av en hjärtinfarkt [2]. Förutom kardiovaskulära sjukdomar har fysiologiska faktorer såsom ålder och kön en påverkan på BRS. Även fysisk kapacitet har visat sig påverka och det finns bevis som föreslår ett samband mellan hormonell status och BRS, exempelvis menstruationscykeln [3].

I vår omgivning finns överallt små partiklar. Dessa har alltid funnits naturligt som rester från vulkaner, sandstormar, hav och liknande men kan även skapas av människan som restprodukter vid exempelvis förbränning av fossila bränslen. Luftburna partiklar kallas aerosoler och de partiklar som genererats av mänsklig aktivitet har oftast en storlek på under 100 nm. Dagligen andas en människa in i genomsnitt 100 miljoner partiklar. Studier har visat att en del av dessa partiklar kan ta sig in i känsliga delar av kroppen och orsaka sjukdomar. Dock är det inte klarlagt vilka partiklar som är farligast eller genom vilka mekanismer de påverkar oss [4]. Det mesta av luftföroreningar i storstäderna kommer från diesel- och bensindrivna fordon. En svensk studie har visat att det finns ett samband mellan yrkesmässig exponering av motoravgaser från diesel- och bensindrivna fordon under lång tid och en ökad risk att drabbas av hjärtinfarkt [5].

Det finns flera studier [7] [6] som har visat att det finns direkta samband mellan exponering av luftburna partiklar och akuta kardiovaskulära sjukdomar så som hjärtinfarkt och hjärtsvikt. WHO uppskattar att 3 miljoner människor dör varje år till följd av exponering av luftföroreningar. Värst utsatta är u-länder, men även om luftkvaliteten i västvärlden har förbättrats de senaste 50 åren finns fortfarande tydliga samband mellan föroreningar och dödsfall även här. Trots att bevisen för att sambanden finns är tydliga saknas forskning och förklaring på hur exponering av luftburna partiklar leder till kardiovaskulära sjukdomar [6].

Det finns en mängd metoder för att mäta BRS. Den första metoden som utvecklades var farmakologisk och går ut på att ett blodtryckshöjande vasoaktivt läkemedel utan påverkan på hjärtfrekvensen injiceras. Därefter studeras hur denna artificiella blodtryckshöjning påverkar hjärtfrekvensen. Denna metod har begränsade användningsområden då den kräver intravenösa injektioner av läkemedel. Flera andra metoder har utvecklats utifrån denna farmakologiska metod som alla bygger på samma metodik. Valsalvamanövern är en metod där baroreceptorerna i aortabågen påverkas naturligt genom att autonoma reflexer uppstår när man blåser ut luft mot ett tryck. En metod liknande valsalvamanövern är metoden med nackkammare i vilken ett yttre tryck appliceras på baroreceptorerna i halspulsådern som då svarar genom att signalera för en sänkt hjärtfrekvens som kan mätas [2].

Alla de tidigare nämnda metoderna bygger på manipulation

Inlämnat den 11 juni 2015

E-mailadress: {har10em3@student.lu.se, mte12ekn@student.lu.se}

Teknisk handledare: Leif Sörnmo, Biomedicinsk Teknik

Teknisk handledare: Frida Sandberg, Biomedicinsk Teknik

av blodtrycket. För att kunna få ett mått på BRS utan att påverka blodtrycket har flera metoder utvecklats där spontana och samtidiga variationer av blodtryck och hjärtfrekvens analyseras. Dessa metoder bygger på att det finns bevis för att baroreceptorerna inte bara aktiveras av akuta ändringar i blodtrycket utan även av de små variationer som uppstår hela tiden. Till skillnad från de manipulativa metoderna är detta sätt enkelt, billigt och icke-invasivt och kan användas för att utvärdera hur baroreflexen påverkar andra kardiovaskulära parametrar [2].

Det finns två huvudsätt att göra icke-invasiva BRS-skattningar — i tidsdomän eller i frekvensdomän. I tidsdomän används främst den av De Rienzo et al. [8] beskrivna sekvensmetoden som går ut på att hitta korrelerade sekvenser av samtidig förändring av systoliskt blodtryck (SBP) och hjärtfrekvens (som beskrivs av de så kallade RR-intervallens längd). På dessa sekvenser utförs sedan linjär regression och linjens lutning motsvarar ett mått på BRS. Den linjära regressionen kan genomföras på två olika sätt, antingen kan "Global Approach" (GA) eller "Local Approach" (LA) användas. Om GA-metoden används görs regression en gång på samtliga ingående punkter i alla sekvenser samtidigt. LA-metoden innebär att regression görs för varje sekvens och resultatet från alla regressioner medelvärdesbildas. I frekvensdomän används spektralmetoden, först beskriven av Pagani et al. [9], som bygger på att varje spontan oscillation i blodtrycket leder till en oscillation i samma frekvens i RR-intervall och att detta samband beror på en aktivering av baroreflexen [2].

### B. Tes

Flertalet studier har gjorts där man tittat på samband mellan partikelexponering under lång tid och olika typer av sjukdomar. Dock finns väldigt lite forskning på en specifik typ av partiklar och deras direkta påverkan på kroppsliga funktioner. För att öka vår förståelse för hur luftföroreningarna i vår omgivning påverkar oss undersöker vi med hjälp av sekvensmetoden om det finns något samband mellan en tillfälligt hög exponering av dieselpartiklar och en minskning av baroreflexens sensitivitet. Vi utgår ifrån hypotesen att exponering av dieselpartiklar försämrar baroreflexens förmåga att påverka hjärtfrekvensen och därmed reglera blodtrycket.

### C. Agenda

Denna rapport beskriver analysen av EKG- och blodtrycksdata från ett antal försökspersoner med hjälp av sekvensmetoden. Rapporten visar hur den data som använts har samlats in och hur den har analyserats för att få fram ett BRS-värde. En statistisk analys har genomförts och resultatet från denna presenteras. Vidare diskuteras resultatets rimlighet, datainsamlingens påverkan på resultatet och vilken utvecklingspotential som finns för studien.

## II. DATA

I studien har kontinuerlig EKG- och blodtrycksdata från 18 st försökspersoner använts. Försökspersonerna bestod av nio män och nio kvinnor mellan 40 och 66 år, alla icke-rökare och slumpmässigt utvalda. Försökspersonerna har vid

två olika tillfällen spenderat 3 timmar i en välkontrollerad exponeringskammare. Kammaren är  $21,6 m^3$  och alla ytor är gjorda i rostfritt stål förutom ett fönster på  $0,8 m^2$ . Ingen luft kan lämna kammaren förutom genom det välkontrollerade ventilationssystemet. Rummet nås via en luftsluss med lufttäta dörrar för att avgränsa kammaren från det omgivande laboratoriet.

Vid det ena försökstillfället exponerades försökspersonerna för höga halter av dieselpartiklar. Dessa genererades genom att leda in en kontrollerad del avgaser från en dieseldriven bil som stod utanför labbet. Partiklarna spädades ut till önskad koncentration,  $276 \mu g/m^3$ , och leverades sedan till kammaren via inluften. Vid det andra försökstillfället tillsattes inga partiklar till luften i kammaren. EKG- och blodtrycksdata samlades simultant in under fem tiominutersintervall vid båda tillfällena. Den första mätningen gjordes före exponeringen och mätningar gjordes sedan efter en timme, två timmar och tre timmar inne i kammaren. Den sista mätningen gjordes direkt efter exponering. Försökspersonerna var inte medvetna om vid vilket av de två försökstillfällena exponering av dieselpartiklar skedde.

Blodtrycket mättes på fingret genom att använda CNAP-metoden (continuous non-invasive arterial pressure). Detta är en optisk mätmetod av kontinuerligt blodtryck som använder sig av en tryckmanschett och beräknar blodtrycket i fingret genom att optiskt mäta blodvolymen.

## III. METOD

För att skatta värdet på försökspersonernas barosensitivitet användes sekvensmetoden med Global Approach som beskrivs nedan.

### A. Analys av EKG-signal

I utförandet av sekvensmetoden används tiden mellan varje hjärtslag, det så kallade "RR-intervallet". Detta intervall plockades fram ur EKG-signalen genom att identifiera R-topparna för varje hjärtslag enligt figur 1. Tidsintervallet mellan dessa toppar mättes. Längden på varje RR-intervall samt tidpunkten för motsvarande hjärtslag sparades för vidare analys.

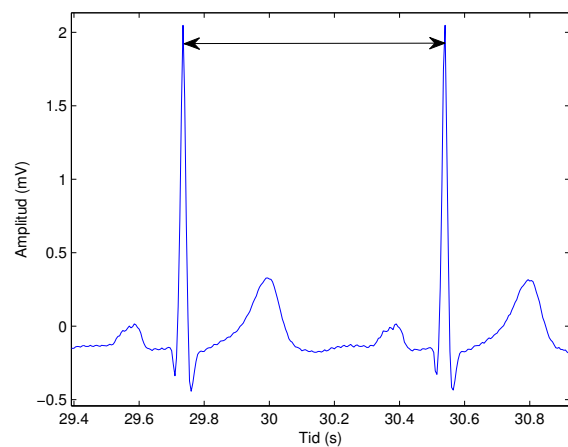


Figure 1. RR-intervall

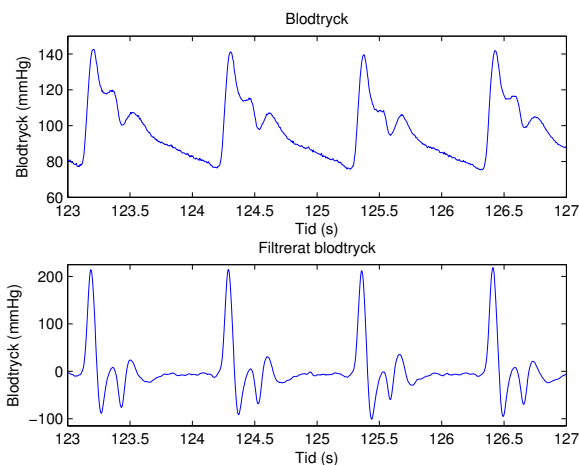
## B. Filtrering

Den arteriella blodtryckssignalen filterades för att lättare kunna analyseras. Filtreringen skedde genom en lågpasdifferentiator i syfte att förstärka snabba förändringar kring maxima och minima för att göra dem lättare att detektera i nästa steg samt för att få en mer symmetrisk signal. Filtret som användes är först definierat av Laguna et al. [10] och sedan modifierat av Gouveia [11] för bättre anpassning till arteriell blodtrycksmätning. Filtret  $G$  implementerades som produkten av två delfilter,  $G_1$  och  $G_2$  enligt nedanstående ekvationer.

$$G_1 = 1 - z^{-6} \quad (1)$$

$$G_2 = \frac{1 - z^{-8}}{1 - z^{-1}} \quad (2)$$

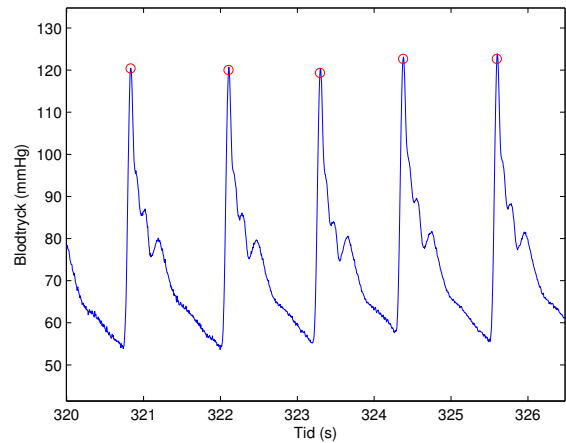
$G_1$  är en differentiator som förstärker signalens toppar och symmetri och  $G_2$  är ett lågpasfilter som dämpar det högfrekventa brus som förstärks av differentiatorn. En jämförelse mellan det filterade och den icke-filterade blodtrycket kan ses i figur 2 nedan.



Figur 2. Jämförelse mellan filterat och icke-filterat blodtryck. I den filterade kurvan framträder distinkta toppar men samtidigt ges ett felaktigt värde på blodtrycket.

## C. Identifiering av systoliskt blodtryck

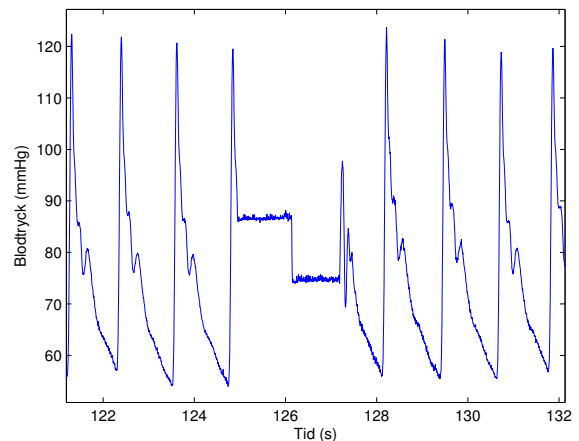
Blodtryckssignalen som analyserades kom från en kontinuerlig mätning av det artäriella blodtrycket och innehöll därför både systoliska och diastoliska värden. Sekvensmetoden bygger på analys av systoliskt blodtryck, det vill säga det högsta trycket i varje hjärtcykel, och därför sorterades det systoliska blodtrycket ut från vektorn innehållande blodtrycksvärdena. Detta gjordes genom att detektera topparna i den filterade kontinuerliga blodtrycksdatan och spara tidpunkterna för dessa. Genom att utgå från dessa tidpunkter kunde topparna med korrekt blodtrycksvärde i den ofiltrerade blodtryckskurvan markeras, se figur 3.



Figur 3. Exempel på identifierade systoliska toppar

En blodtryckskurva innehåller förutom de systoliska topparna även karakteristiska dikrotiska toppar, d.v.s. ytterligare ett toppvärde mellan två systoliska toppar. För att dessa inte skulle identifieras som systoliska toppar användes vid detekteringen av topparna ett gränsvärde för tillåten tid mellan två identifierade toppar. För varje hjärtslag undersöktes signalen inom ett tidsspänn på  $\pm 500$  ms. Den högsta toppen i signalen inom detta område identifierades som den systoliska toppen.

I blodtrycksdatan fanns även flertalet kalibreringspunkter med toppvärden långt under de verkliga systoliska topparna, se figur 4.



Figur 4. Exempel på en kalibreringspunkt

Dessa kalibreringspunkter innehåller ingen information och var således tvungna att identifieras och raderas innan fortsatt analys. Detta gjordes genom att ställa in ett gränsvärde som topparna i den filterade blodtryckssignalen måste överstiga. Gränsvärdet  $\eta$  valdes till:

$$\eta = \overline{bp}_{filtrerad} + 2\sigma \quad (3)$$

där  $\overline{bp}_{filtrerad}$  är medelvärdet av den filterade blodtryckssignalen och  $\sigma$  är dess standardavvikelse. Om den lokali-

serade toppen i den filtrerade blodtryckssignalen understeg gränsvärdet ersattes motsvarande element i vektorn med det systoliska blodtrycket med "Not a Number".

#### D. Identifiering av baroreflex-sekvenser

Baroreflexen har en tidsfördröjning på någon sekund vilket innebär att en förändring i blodtryck inte ger upphov till en direkt förändring av hjärtfrekvensen. Förändringen av hjärtfrekvensen syns därmed inte förrän efter nästa hjärtslag. För att ta hänsyn till detta gjordes en förskjutning av det systoliska blodtrycket med ett sampel vilket innebär att  $SBP(n-1)$  jämfördes med  $RR(n)$ .

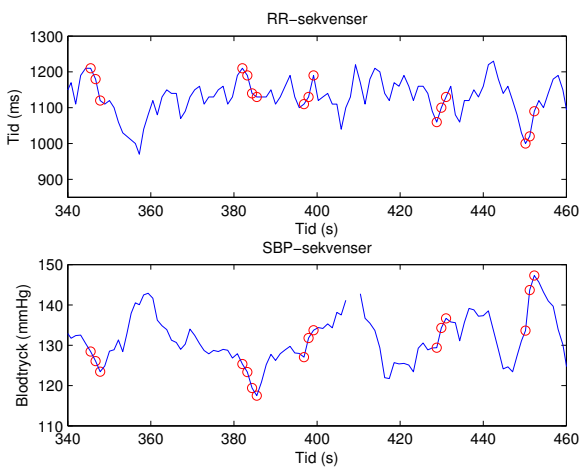
För att en punkt ska ingå i en baroreflex-sekvens måste den enligt sekvensmetoden vara omgiven av minst ett bestämt antal på varandra följande punkter där samtliga värden antingen ökar eller minskar. I denna studie bestämdes den minsta sekvenslängden till tre på varandra följande slag. Alla giltiga sekvenser på minst tre slag identifierades i SBP respektive RR-vektorn. Därefter matchades dessa mot varandra för att hitta sekvenser av minst tre hjärtslag av samtidig förändring.

För att de identifierade sekvenserna ska vara giltiga krävs att de uppfyller vissa krav. De gränsvärden som används varierar i olika studier och det finns ingen studie som presenterar ett fast värde på dessa. De områden som det ställs krav på är sekvensens längd, minsta tryckskillnad i systoliskt blodtryck och minsta tidsskillnad i RR-intervall. De gränsvärden som användes ses i tabell I nedan och är först definierade av Gouveia [11].

Tabell I  
GRÄNSVÄRDEN

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Minsta sekvenslängd   | 3 slag |
| Minsta skillnad i SBP | 1 mmHg |
| Minsta skillnad i RR  | 5 ms   |

De värden som inte uppfyllde kraven togs bort och därefter plockades även de sekvenser bort som inte längre bestod av minst tre på varandra följande värden. De slutgiltiga sekvenserna sparades i en vektor och plottades, se figur 5.



Figur 5. Exempel på utmarkerade baroreflexsekvenser.

#### E. Skattning av BRS genom GA-metoden

För att få en korrekt skattning av BRS med GA-metoden plockades de lokala medelvärdena för varje sekvens bort. Detta för att få bort den lokala driften i datan och istället bara undersöka de absoluta skillnaderna. Medelvärdet  $\overline{SBP}_k$  och  $\overline{RR}_k$  för varje sekvens  $k$  beräknades enligt

$$\overline{SBP}_k = \frac{1}{N_k} \sum_{i=1}^{N_k} SBP_k(i) \quad (4)$$

$$\overline{RR}_k = \frac{1}{N_k} \sum_{i=1}^{N_k} RR_k(i) \quad (5)$$

där  $N_k$  motsvarar antalet punkter i sekvensen. Därefter avtrennades sekvenserna till  $x_k^{SBP}$  och  $x_k^{RR}$  genom att för varje punkt  $N$  i sekvensen subtrahera det lokala medelvärdet för sekvensen enligt nedanstående ekvationer.

$$x_k^{SBP} = SBP_k^N - \overline{SBP}_k \quad (6)$$

$$x_k^{RR} = RR_k^N - \overline{RR}_k \quad (7)$$

För att få en pålitlig skattning av BRS är så många mätpunkter som möjligt att föredra. Därför infördes kravet att en mätning endast räknades som giltig om den innehöll minst fem stycken baroreflex-sekvenser. De mätningar som resulterade i färre än fem sekvenser plockades bort och dessa försökspersoner användes inte i den fortsatta analysen.

Då alla punkter i de giltiga sekvenserna var identifierade gjordes en linjär regression enligt minsta kvadratmetoden över dessa punkter. Den anpassade linjens lutning representerar värdet på BRS. För att ytterligare öka pålitligheten i resultatet gjordes med hjälp av MatLab-funktionen *Bisquare* istället en robust linjär regression för att minska påverkan från outliers. Denna metod innebär att de olika punkternas inverkan på regressionen viktas beroende på hur nära den anpassade linjen de ligger. Detta ger ett stabilare resultat med mindre känslighet för "outliers".

#### F. Statistisk analys

I syfte att undersöka huruvida försökspersonernas vistelse i kammaren hade någon påverkan på baroreflexen undersöktes om det fanns någon signifikant skillnad mellan barosensitiviteten från mätningarna som gjordes innan personerna gick in i kammaren och efter tre timmar i kammaren i oexponerad luft. Jämförelsen gjordes genom ett t-test med stickprov i par där BRS-värdena jämfördes person för person. Testet utfördes på en signifikansnivå på 95%.

För att få svar på frågeställningen om exponering av dieselpartiklar har någon påverkan på barosensitiviteten gjordes ett likadant test mellan mätningarna som gjordes före och efter tre timmar i exponerad luft i kammaren.

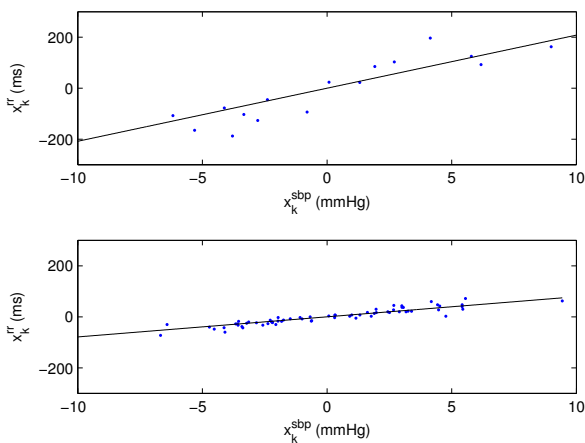
## IV. RESULTAT

I tabell II presenteras det totala antalet identifierade baroreflexsekvenser och deras längd hos de 18 försökspersonerna under de två kammarförsöken.

Tabell II  
ANTAL BAROREFLEXSEKVENSER OCH DERAS LÄNGD

|                 | Totalt | 3   | 4   | 5   | >5 |
|-----------------|--------|-----|-----|-----|----|
| Antal sekvenser | 1702   | 819 | 761 | 104 | 18 |

Exempel på resultat från den linjeanpassning som utifrån baroreflexsekvenserna gjordes med linjär regression efter viktade outliers visas i figur 6.



Figur 6. Exempel på linjeanpassningar för två olika mätningar.

Den beräknade barosensitiviteten mätt i  $ms/mmHg$  från mätningar vid det oexponerade (dag 1) respektive det exponerade försöket (dag 2) som uppfyllde giltighetskraven och användes för jämförelser återfinns i tabell III och IV. I dessa tabeller återfinns även regressionens förklaringsgrad  $r^2$  som är ett mått på hur väl det skattade BRS-värdet stämmer överrens med den data som använts. Mätning 1, som utgör baseline, gjordes precis innan kammarförsöket påbörjades och mätning 2 gjordes efter tre timmar i kammaren.

Tabell III  
BRS SAMT FÖRKLARINGSGRAD VID MÄTNINGAR DAG 1

|           | Mätning 1 | $r_1^2$ | Mätning 2 | $r_2^2$ |
|-----------|-----------|---------|-----------|---------|
| Person 4  | 20.80     | 0.83    | 24.30     | 0.77    |
| Person 5  | 11.30     | 0.66    | 7.20      | 0.71    |
| Person 7  | 6.80      | 0.83    | 7.41      | 0.81    |
| Person 8  | 9.96      | 0.64    | 6.13      | 0.65    |
| Person 9  | 9.82      | 0.82    | 10.79     | 0.68    |
| Person 13 | 5.49      | 0.81    | 4.33      | 0.86    |
| Person 14 | 8.39      | 0.89    | 7.08      | 0.79    |
| Person 15 | 8.42      | 0.81    | 8.96      | 0.76    |
| Person 16 | 7.21      | 0.72    | 7.73      | 0.75    |
| Person 17 | 11.76     | 0.73    | 11.65     | 0.79    |
| Person 20 | 10.26     | 0.77    | 7.07      | 0.72    |

Tabell IV  
BRS SAMT FÖRKLARINGSGRAD VID MÄTNINGAR DAG 2

|           | Mätning 1 | $r_1^2$ | Mätning 2 | $r_2^2$ |
|-----------|-----------|---------|-----------|---------|
| Person 4  | 16.58     | 0.71    | 16.05     | 0.83    |
| Person 8  | 11.70     | 0.74    | 8.36      | 0.83    |
| Person 9  | 8.59      | 0.69    | 13.96     | 0.78    |
| Person 10 | 6.83      | 0.70    | 5.84      | 0.80    |
| Person 11 | 7.30      | 0.65    | 5.52      | 0.84    |
| Person 14 | 5.84      | 0.75    | 8.73      | 0.88    |
| Person 15 | 7.81      | 0.77    | 8.62      | 0.68    |
| Person 16 | 10.55     | 0.71    | 7.08      | 0.75    |
| Person 20 | 10.34     | 0.80    | 11.42     | 0.84    |
| Person 21 | 19.65     | 0.64    | 15.06     | 0.85    |

Resultatet från det statistiska t-test som gjordes visade att ingen signifikant skillnad kunde visas varken mellan baseline och efter tre timmar i kammaren dag 1 eller mellan baseline och efter tre timmars exponering dag 2. Tabell V visar utfallet från testet med hypotesen att mätning 1 och mätning 2 är lika.  $n$  är antalet försökspersoner som jämförts i testet,  $H = 0$  innebär att ingen skillnad kan visas med 95% signifikans,  $p$  representerar p-värdet och  $\sigma$  är standardavvikelsen för skillnaden i BRS mellan mätning 1 och mätning 2.

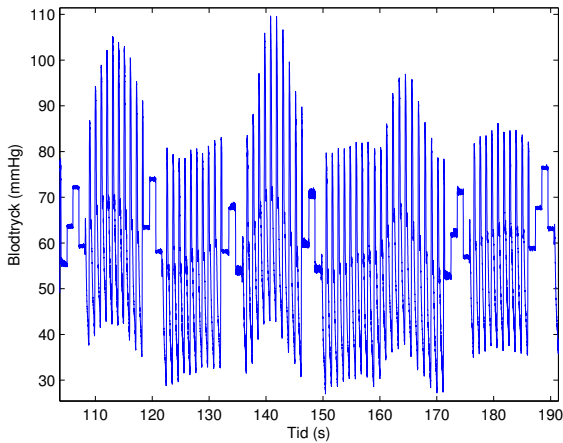
Tabell V  
T-TEST

|          | Dag 1 | Dag 2 |
|----------|-------|-------|
| n        | 11    | 10    |
| H        | 0     | 0     |
| p        | 0.26  | 0.69  |
| $\sigma$ | 2.16  | 3.03  |

## V. DISKUSSION

Resultatet från studien pekar på att tillfällig hög exponering av dieselpartiklar inte ger en direkt påverkan på baroreflexen. Tidigare studier som visat på att dieselpartiklar signifikant ökar risken för hjärtinfarkt och andra sjukdomar bygger på hög exponering under lång tid (flera år) [5] [6]. Då baroreflexen reagerar på snabba förändringar av blodtryck och sedan anpassar sig till nya normalvärden borde inte resultaten från dessa studier ha något samband med baroreflexens sensitivitet. Inga tidigare studier har gjorts där man har studerat dieselpartiklars direkta påverkan på baroreflexen varför det är svårt att uttala sig om rimligheten i det resultat vi kommit fram till.

Data som användes i studien är inte insamlad i syfte att utvärdera baroreflexen, något som kan vara anledningen till den dåliga datakvaliteten i vissa blodtrycksmätningar, se exempel i figur 7. Detta innebar bland annat att data från flertalet försökspersoner inte var användbar då den på grund av många avvikelser inte gav upphov till tillräckligt många giltiga baroreflexsekvenser. En bekräftelse av resultatet kräver en större studie med studiens syfte i åtanke vid datainsamlingen. Detta skulle förbättra datakvaliteten och innebära att färre mätningar behöver bortses ifrån vilket skulle ge ett mer pålitligt resultat.



Figur 7. Blodtrycksdata med upprepande kalibreringar inom korta tidsintervall och kraftigt varierande värden på trycket däremellan.

Då topparna från kalibreringsområdena filterades bort användes istället för en fast gräns ett dynamiskt gränsvärde. Detta för att ta hänsyn till variationen i blodtrycksdata mellan personer. Gränsvärdet valdes därför genom att kombinera medelvärde och standardavvikelsen på ett sätt där de flesta kalibreringspunkter togs bort. Samtidigt innebär detta gränsvärde att några verkliga toppar även försvann. Ett bättre anpassat gränsvärde, som istället utgår från topparnas utseende i förhållande till omgivningen, skulle innebära att färre punkter felaktigt tas bort vilket bidrar till en noggrannare metod och en bättre skattning av BRS-värdet.

Den blodtrycksdata som användes i studien mättes kontinuerligt på fingret med hjälp av den optiska CNAP-metoden. Detta innebär att studien är baserad på blodtrycket i fingret som ligger något lägre än normalt artäriellt blodtryck som mäts i överarmen. Då sekvensmetoden endast är baserad på hur blodtrycket förändras och inte några absoluta värden spelar det dock för den fortsatta analysen ingen roll var på kroppen blodtrycket är uppmätt.

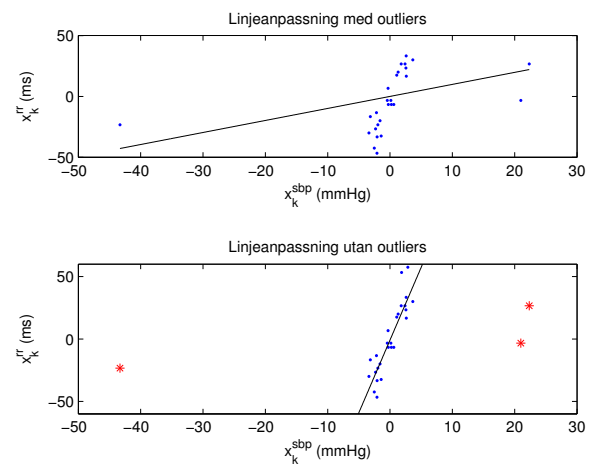
Anledningen till att sekvensmetoden valdes för att undersöka barosensitiviteten var att den är icke-invasiv och undersöker baroreflexen utan att påverka den. Analysen genomfördes i tidsdomän och inte i frekvensdomän då sekvensmetoden är enklare att implementera samtidigt som den ger tillräckligt goda resultat för att kunna utföra jämförelser vilket var syftet med studien. För att utifrån försökspersonernas baroreflexsekvenser skatta BRS användes GA-metoden. Denna valdes framför LA-metoden då studier har visat att GA ger ett resultat med mindre felmarginall till referensvärden samt en mer robust skattning än LA [12].

För att öka pålitligheten i resultaten gjordes endast jämförelser mellan BRS som uppmätts samma dag. Detta minskar risken för att få ett felaktigt resultat som kan bero på naturlig variation av hjärtfrekvens mellan dagarna. BRS-värdet varierar även mycket mellan försökspersonerna och antar värden mellan 5 och 25  $ms/mmHg$ . Detta visar att BRS-värdet är individuellt och kan påverkas av faktorer så som ålder och kön.

För att motverka effekten från outliers vid den linjära regres-

sionen användes en robust metod som viktade datapunkternas påverkan på den slutgiltiga linjen. Denna metod fungerade bra och gav en bättre anpassning för de mätningar som hade några få avvikande värden. Samtidigt fanns några mätningar där tydligt avvikande värden saknades. Att metoden användes även på dessa mätningar resulterade i något sämre skattningar där förklaringsgraden minskade något. Dock var metoden värd att behålla då skattningarna överlag fick en högre och mer utjämnad förklaringsgrad. I genomsnitt var förklaringsgraden mellan 70 och 80% vilket vi anser är tillräckligt bra för att använda i analysen.

Metoden med robust linjär regression fungerade bra för alla mätningar utom en där det fanns outliers med så pass avvikande värden att denna metod inte hjälpte, se figur 8 nedan. Då vi redan ansåg oss ha så pass få mätningar att utgå ifrån i den fortsatta analysen tyckte vi det var viktigt att ändå kunna använda oss av denna mätning. För att detta skulle gå raderades de avvikande datapunkterna manuellt.



Figur 8. Jämförelse av regressionen med och utan manuellt bortplockade outliers.

Den statistiska jämförelsen gjordes som ett t-test med stickprov i par. Antalet försökspersoner i varje jämförelse var 11 respektive 10 stycken. För att få en pålitligare statistisk analys skulle ett större antal försökspersoner i varje jämförelse behövs, något som en förbättrad datainsamling hade kunnat förändra.

En ganska stor variation mellan BRS-mätningarna kan ses hos vissa av försökspersonerna och värdet både ökar och minskar i mätning 2. Variationen hos mätningarna beskrivs genom standardavvikelsen,  $\sigma$ . Att standardavvikelsen är så pass stor, i samma storleksordning som BRS-värdena, kan innebära att det finns en osäkerhet i datainsamlingen. Det kan också tyda på att det finns en spontan variation hos BRS. För att bekräfta orsaken till den stora standardavvikelsen behövs fler studier med fler försökspersoner.

För den statistiska jämförelsen av BRS som gjordes i försöket är absolutvärdet inte intressant då det endast är skillnaderna mellan samma person som analyseras. Dock ligger de uppskattade BRS-värdena i studien i samma storleksordning som tidigare studier har visat [3]. Detta ger resultatet



trovärdighet och innebär att metoden med största sannolikhet har implementerats på rätt sätt.

Ur ett hållbarhetsperspektiv är det viktigt att vi ökar vår förståelse för hur vår påverkan på vår omgivning, genom ständiga utsläpp i trafik och industri, inte bara påverkar miljön utan även vår hälsa. I dagsläget är vi medvetna om att vårt levnadssätt, med förbränning av fossila bränslen, inte är hållbart för vår miljö. Trots detta görs inte tillräckligt stora satsningar på förnyelsebara bränslen. Om vi ökar vår kunskap om hur luftburna partiklar från förbränning av fossila bränslen påverkar vår hälsa får vi fler verktyg och incitament för förändring. Den metod vi har implementerat kan användas för att undersöka flera andra typer av luftburna partiklars påverkan på baroreflexen och kan därmed fungera som ett verktyg i andra utvecklingsprocesser. Att studier som denna görs är därför viktigt för att driva den tekniska utvecklingen i en riktning som är hållbar både för miljö och människor.

## VI. SLUTSATSER

Genom implementering av sekvensmetoden kunde ett mått på försökspersonernas BRS uppskattas. Vid statistisk analys av jämförelse mellan BRS före exponering (baseline) och efter tre timmars exponering kunde det i denna studie inte visas att dieselpartiklar har en signifikant påverkan på baroreflexen. Ingen signifikant skillnad kunde heller visas mellan BRS före kammarförsöket och efter tre timmar i oexponerad luft. Detta innebär att försökssupställningen inte hade någon påverkan på resultatet.

## VII. EFTERORD

Studien har genomförts som ett samarbete mellan institutionen för Biomedicinsk teknik och institutionen för Ergonomi och Aersosolteknologi på Lunds Tekniska Högskola. Ett stort tack riktas till vår tekniska handledare Leif Sörnmo, Biomedicinsk teknik vid LTH, för stöttning och givande diskussioner längs vägen. Tack till Frida Sandberg, Biomedicinsk teknik vid LTH, för hjälp med föranalys och bearbetning av data samt tips och råd i MatLab. Tack till Christina Isaxon, Anders Gudmundsson och Mats Boghard, Ergonomi och Aersosolteknologi vid LTH, för datainsamling och att ni tagit er tid att svara på våra frågor.

Arbetet med detta projekt har genomförts genom lika delat ansvar mellan de båda författarinnorna Ebba Knutsson och Elin Magnusson.

## REFERENSER

- [1] C.A. Swenne. "Baroreflex sensitivity: mechanisms and measurement." *Netherlands Heart J.*, vol. 21, pp. 58–60, 2013.
- [2] M.T. La Rovere, G.D. Pinna, G. Raczak, "Baroreflex sensitivity: measurements and clinical implications." *Ann Noninvasive Electrocardiol.*, vol. 13, pp. 191–207, 1998.
- [3] T. Laitinen, J. Hartikainen, E. Vanninen, L. Niskanen, G. Geelen, E. Länsimies, "Age and gender dependency of baroreflex sensitivity in healthy subjects" *Journal of Applied Physiology*, vol. 84, p. 576–583, 1998.
- [4] C. Isaxon, "Aerosol characterization in real life and a methodology for human exposure studies in controlled chamber settings". Doctoral thesis. ISBN 978-91-7473-856-8. 2014.
- [5] A. Ilar, M. Lewné, N. Plato, J. Hallqvist, M. Alderling, C. Bigert, C. Hogstedt, P. Gustavsson, "Myocardial infarction and occupational exposure to motor exhaust: a population-based case-control study in Sweden." *European Journal of Epidemiology*, vol. 29, pp. 517–525, 2014.
- [6] N.L. Mills, K. Donaldson, P. W. Hadoke, N. A. Boon, W. MacNee, F. R. Cassee, T. Sandström, A. Blomberg, D. E. Newby, "Adverse cardiovascular effects of air pollution" *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, vol. 6, pp. 36–44, 2009.
- [7] R.D. Brook, S. Rajagopalan, C.A. Pope 3rd, J.R. Brook, A. Bhatnagar, A.V. Diez-Roux, F. Holguin, Y. Hong, R.V. Luekper, M.A. Mittleman, A. Peters, D. Siscivick, S.C. Smith Jr., L. Whitsel, J.D. Kaufman, "Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association" *Circulation*, vol. 1;121, pp. 2331–2378, 2010.
- [8] M.D. Rienzo, G. Bertinieri, G. Mancina, A. Pedotti "A new method for evaluating the baroreflex role by a joint pattern analysis of pulse interval and systolic blood pressure series" *Med Biol Eng Comput*, vol. 23, pp. 313–314, 1985.
- [9] M. Pagani, V. Somers, R. Furlan, S. Dell'Orto, J. Conway, G. Baselli, S. Cerutti, P. Sleight, A. Malliani "Changes in autonomic regulation induced by physical training in mild hypertension" *Hypertension*, vol. 12, pp. 600–610, 1988.
- [10] P. Laguna, N.V. Thakor, P. Caminal, R. Jané, H.R. Yoon, A. Bayés de Luna, V. Martí, J. Guindo "New algorithm for QT interval analysis in 24-hour holter ECG: performance and applications" *Med Biol Eng Comput*, vol. 28, pp. 67–73, 1990.
- [11] S. Gouveia, Contributions to the analysis of short-term cardiovascular coupling. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2009.
- [12] S.Gouveia, A.P. Rocha, P. van de Borne, P. Lago "Assessing Baroreflex Sensitivity in the Sequence Technique: Local versus Global Approach" *Computers in Cardiology*, vol. 32, pp.279–282, 2005.

# En studie i klinisk användning av hjärnstamsaudiometri i Region Skåne

Sofia Felding (BME-11), Emma Lundell (BME-11)

**Sammanfattning**—I rapporten utreds hur hjärnstamsaudiometri bör utföras för att optimera mätningens kvalitet och tillförlitlighet. Hjärnstamsaudiometri, även kallat ABR, utförs regelbundet inom Region Skåne för att objektivt testa patienters hörsel. Undersökningen utförs genom att icke-invasiva elektroder fästs på patienten och hörselsinnet stimuleras av en signal med frekvensinnehåll valt för att nå hjärnstammen samtidigt. Resultatet från undersökningen är en vågform med fem toppar, utifrån vilka en van audionom eller läkare kan tolka patientens hörselförmåga.

För att utvärdera ABR-mätningars tillförlitlighet utförs i denna rapport experiment där mätningar genomförs samtidigt som misstänkta störningskällor tillåts ha inverkan. Den utrustning som används för insamlandet av data är Interacoustics Eclipse EP25. Resultatet analyseras sedan för att avgöra om och i så fall hur störningar påverkar mätresultatet. Eftersom det inte bara är utrustningen utan även den mänskliga faktorn som kan påverka mätningens tillförlitlighet genomförs även intervjuer och diskussioner med personalen som utför ABR på Skånes Universitetssjukhus i Lund.

Resultatet från experiment och intervjuer indikerar att den viktigaste aspekten för en lyckad mätning är att patienten är avslappnad under mätningen. Muskelspänningar är den av de testade störningskällorna som höjer antalet förkastade mätvärden och sänker kvalitetsmåttet 'rejected', 'wave reproducibility', 'residual noise' och Fmp mest. De parametrar som personalen bör tränas i att förstå är framför allt det statistiska måttet Fmp samt medelvärde av bakgrundsbruset, 'residual noise'. Om dessa värden granskas kan användaren få värdefull information om kvaliteten på mätningen vilket kan ge både snabbare och mer tillförlitliga undersökningar. Hur denna information ska nå ut till användarna behöver ses över i verksamheten.

## I. INTRODUKTION

### A. Bakgrund

**H**JÄRNSTAMASUDIOMETRI, eller Auditory Brainstem Response (ABR), är en mätning som kan ge information om innerörats och hjärnans förmåga att uppta ljud. Vid en ABR-mätning stimuleras ett öra i taget av ett akustiskt stimulus. Utrustningen samlar sedan in det elektrofysiologiska svar som avläses via elektroder fästa på patienten. Patienten deltar inte aktivt i undersökningen, vilket gör mätningen objektiv. [1]

Något som däremot är subjektivt är tolkningen av resultatet. Vid analys av resultatet betraktas svarens amplitud och latenstid. Amplituden är proportionerlig mot antalet neuroner som aktiveras hos patienten, och latensten beskriver hastigheten på signalöverföringen. Topparna i signalen representerar till

största del aktiviteten från hörselsäckan (cochlea) eftersom störningar påverkar resultaten från längre in i örat. [1]

Resultatet av inspelningen vid en ABR-undersökning är en serie vågformer benämnda I-V, som normalt registreras under de 10 första millisekunderna efter att stimuli har getts. Våg I-III ges av kraniala nerven VIII samt den nedre hjärnstammen. Våg IV och V ges av den över hjärnstammen. Svar fås normalt inom 5-6 ms efter stimulering. För stimuli med högre intensitet minskar latenstiden samtidigt som svarets amplitud ökar. [1]

Forskning på signalerna som genereras vid ABR-mätningar har publicerats sedan mitten av 60-talet. 1967 publicerade Sohmer och Feinmesser ABR-resultat registrerat med icke-invasiva elektroder. Jewett och Willistonen beskrev år 1971 noggrant människors ABR och identifierade att de senare vågorna kom från hjärnstammen. 1977 visade Selters och Brackman korrelation mellan en förlängd inter-peak och tumörer större än 1 centimeter. Metoden användes således tidigare för detektion av tumörer men detta har på senare tid till stor del ersatts av MRI. 1975 påvisade Starr och Achor korrelation mellan ABR och sjukdomar i CNS kopplade till hjärnstammen. [2]

Eftersom mätningen är objektiv lämpar den sig för att få information om hörseln hos patienter som inte själva kan delta och ge pålitliga svar i ett vanligt hörseltest. ABR kan därför användas för att detektera hörselskador hos spädbarn eller barn och vuxna med nedsatt funktionsförmåga. Ett avvikande resultat från ABR-testet kan bekräfta om en hörselskada beror på skador på hörselnerven eller i hjärnstammen. Det kan indikera exempelvis tinnitus på ett öra, latenser mellan höger och vänster öra, nedsatt hörsel eller distortion av ljud. [1]

ABR ger elektrofysiologiska svar som är i storleksordningen mikrovolt. Således är det inte svårt att förstå att mätningarna är känsliga för yttre störningar. Signalen måste förstärkas minst 100 000 gånger innan det är möjligt att analysera resultatet. Dessutom måste signalen medelvärdesbehandlas så att elektrisk aktivitet som inte härstammar från auditiva stimuli minimeras. [1]

Elektrisk aktivitet som kan påverka resultat från elektrofysiologiska undersökningar klassificeras som patient- och utrustningsberoende samt inverkan från yttre störningskällor. Exempel på störningskällor som är patientberoende är dålig kontakt mellan hud och elektrod, muskelspänningar hos patienten samt kognitiv belastning. Vid kognitiv belastning aktiveras områden i kortex vilket detekteras av elektroderna fästa på patienten. Störningar som kan genereras från utrustningen är exempelvis att förstärkaren placeras för nära hårdvaran som samlar in data från patienten. Yttre störningar kan komma från exempelvis mobiltelefoner och datorer som finns i nära

Inlämnat den 21 maj 2015

E-mejladress: {sofia.felding@gmail.com, emma.lundell@gmail.com}

Teknisk handledare: Leif Sörnmo, Biomedicinsk teknik, LTH

Klinisk handledare: Jonas Brännström, Medicinska fakulteten, LU

anslutning till utrustningen. De källor som påverkar mest är de som genererar störningar i området 20-2500 Hz, vilket är det vanligaste mätområdet för ABR. [3]

Det finns olika metoder för att öka signalens styrka samtidigt som brusets inverkan minimeras. 'Bayesian weighting', en form av viktad medelvärdesbildning, är en sådan metod. Metoden går ut på att för varje mätomgång, så kallade svep, kvantifieras bakgrundsbruset. Svep med lite brus ges större betydelse, medan svep med mer brus inte bidrar lika mycket till slutresultatet. En så kallad 'rejection level' appliceras, vilket utgör en tröskel och förkastar alla svep med bakgrundsbrus över denna nivå. Det innebär att resultat från dessa svep inte tas med. Fördelen med 'Bayesian weighting' är att 'rejection level' kan sättas högre, för att få med fler svep. Om svepen innehåller mycket brus ges de mindre betydelse. Denna metod underlättar mätningar i miljöer som inte är optimala när det gäller yttre störningar. Tiden det tar tills tillräckligt bra resultat erhålls under en mätning kan då minskas. [4]

För att få information om mätningens kvalitet under tiden som undersökningen pågår kan man titta på de någon av parametrarna 'rejected', 'wave reproducibility', 'residual noise' eller Fmp (Statistical analysis of multiple points) som presenteras i mjukvaran under mätningens gång. Fmp är en matematisk beräkning som baseras på 21 mätpunkter från den inspelade vågen och indikerar kvaliteten på vågen [6]. 'Wave reproducibility' är ett mått mellan 0 och 100 procent som visar hur stor sannolikheten är att ett svep från mätningen stämmer överens med den vågform som presenteras. 'Rejected' anger hur stor andel av svepen som blev förkastade under mätningen.

'Residual noise' är ett medelvärde av bakgrundsbruset. Det beräknas vanligtvis inom ett tidsfönster på 10 ms, och det baseras på stabiliteten hos vågformen. När 'residual noise' går ner under en viss nivå, t.ex. 40 nV för vuxna och 20 nV för barn, kan mätningen avslutas och ge ett pålitligt resultat, oavsett hur många svep som har gjorts. [7]

Fmp är en statistisk analys av ABR-mätningen. Det bygger på att svarsamplituden jämförs med bakgrundsbruset, även här i ett tidsfönster på 10 ms. Lägre brus och högre svarsamplitud ger högre Fmp. När nivån stigit över 3,1 erhålls med 99 procent sannolikhet ett svar som härstammar från en äkta signal och inte från brus. Fördelen med ovanstående två parametrar är att de kan användas för att bestämma när mätningen kan avslutas, detta för att minska testtiden och öka sannolikheten för att pålitligt mätresultat. Således används statistik istället för användarens subjektiva bedömning av svaret. [7]

Traditionellt sett har ABR-mätningar utförts med stimuli i form av ett klick, vilket innebär att ett brett spektrum av frekvenser stimulerar örats basilmembran. Eftersom höga frekvenser detekteras och görs om till aktionspotentialer tidigare i snäckan än låga frekvenser, när de höga frekvenserna hjärnstammen fortare [10]. Resultatet av en ABR-undersökning gjord med klick-stimuli blir således ett resultat som är förskjutet i tiden, och därmed inte helt synkront. Chirp-stimuli skiljer sig från klick-stimuli genom att örat stimuleras av en signal där låga frekvenser skickas in före höga frekvenser, vilket innebär att alla frekvenser når basilmembranet samtidigt och således även hjärnstammen [9]. Eftersom svaret inte längre är förskjutet i tiden blir svarsamplituden för varje

chirpstimuli dubbelt så stor som för traditionell klickstimuli, vilket underlättar för tolkning av mätresultatet [8]. Dessutom har chirp-stimuli ett smalare frekvensband, vilket innebär att man får ett mer frekvensspecifikt svar. Chirp-stimuli ger alltså tydligare information om patientens hörsel inom ett mer avgränsat frekvensområde. [10]

## B. Tes och agenda

ABR och andra elektrofysiologiska mätningar av hörseln används regelbundet på audiologiska avdelningar i Region Skåne. Fördelen är att mätningarna ger objektiva svar. Nackdelen är att det finns moment i undersökningen som gör att svaren kan bli otillförlitliga. Tesen i denna rapport är att yttre störningar är en faktor som skulle kunna äventyra mätningens tillförlitlighet. En annan faktor som skulle kunna påverka är att de tekniska kunskaperna hos audionomer är begränsade, vilket påverkar valet av metod för att avgöra kvaliteten på en mätning. Forskning kring analys av de elektrofysiologiska svaren, störningar, medelvärdesbildning, brus, filter och nya typer av stimuli har förbättrat förutsättningarna för att utföra bra ABR-mätningar, men audionomerna måste också ha en förståelse för dessa parametrar för att mätningarna ska ge ett tillförlitligt resultat.

Denna studie ska utreda hur en ABR-mätning ska utföras för bäst resultat. Detta ska uppnås dels genom en kartläggning av Region Skånes audionomers kunskaper kring utrustningens inställningar och tillvägagångssättet för mätningen. Dessutom ska en uppsättning test med olika förutsättningar utreda mätningens känslighet för yttre störningar.

## II. DATA

För att få en djupare inblick i de problem som de audionomer som arbetar med ABR-mätningar på Skånes Universitetssjukhus (SUS) kommer i kontakt med skickades ett formulär med frågor ut. Formuläret besvarades av tre personer. Den information som samlades in bestod både av tekniska specifikationer och subjektiva åsikter om hur audionomen upplever att utföra specialmätningar.

För att testa vilken inverkan vanliga störningskällor har på ABR-mätningar gjordes kliniska tester på en 23-årig kvinna med normal hörsel. Datan som samlades in jämfördes och utvärderades. För att generera reproducerbara resultat användes ett och samma testprotokoll under samtliga mätningar. Datan samlades in med utrustning tillverkad av Interaustics med modellnamn Eclipse.

## III. METOD

### A. Litteraturstudier

För grundläggande information om vad hjärnstamsaudiometri är, vad det används till, hur mätningar som utförs och vilken forskning som är aktuell inom området gjordes en litteraturstudie. Böcker lånades av Audiologiska avdelningen i Lund och artiklar söktes via LUB-Search. Sökorden innehöll bland annat 'Auditory Brainstem Response', 'Measurement', 'Noise' och 'Filter'. Dessutom söktes artiklar specifikt från vissa författare,

t.ex. Wayne Wilson, som har varit tongivande i mycket av forskningen kring ABR.

Litteraturstudien innefattade också artiklar, manualer och undervisningsvideos från tillverkaren Interacoustics. Underlaget från Interacoustics gav information om den hård- och mjukvara som används på SUS i dagsläget, samt vilka metoder som ligger bakom utvecklingen av dessa. Bland annat söktes information om 'Bayesian weighting', 'residual noise', Fmp och Chirp-stimuli.

### B. Intervjuer

Intervjuer gjordes med tre audionomer från Audiologiska avdelningen på SUS i Lund. De tre anställda på avdelningen utför så kallade specialmätningar, vilket innefattar bland annat ABR. Syftet med intervjun var dels att få en överblick av vilken inställning audionomerna som regelbundet arbetar med specialmätningar har till metoderna som används, dels att identifiera eventuella svårigheter och problem relaterat till mätningen. Frågorna berörde bland annat vilka ABR-utrustningar som används av audionomen, hur säkert hon känner sig på att använda dessa och hur hon går till väga för att få hjälp med mätningen om problem uppstår. Det ställdes också mer tekniskt specifika frågor kring vilka testprotokoll som används och hur insatt audionomen är i hur dessa är inställda. Slutligen undersöktes hur audionomen allmänt känner för att arbeta med utrustningen, vad som upplevs som svårt beträffande utförande av ABR-mätningar samt förslag till förbättring. Två av intervjuerna följdes upp med diskussioner med anledning av att förtydliga de angivna svaren.

### C. Experimentell undersökning av störningar

Syftet med experimentet var att undersöka huruvida yttre störningar påverkar utrustningen som används vid ABR, och om så är fallet, hur störningarna kan minimeras. Utrustningen lånades från Audiologiska avdelningen i Lund, och är en av utrustningarna som vanligtvis används vid en ABR-undersökning på patienter. Tillverkare av utrustningen är Interacoustics och modellen heter Eclipse. Mjukvaran som tillhör heter EP25. Till experimentet användes olika typer av elektronisk utrustning som vanligtvis återfinns på sjukhus och eventuellt kan verka som störningskällor, t.ex. mobiltelefoner.

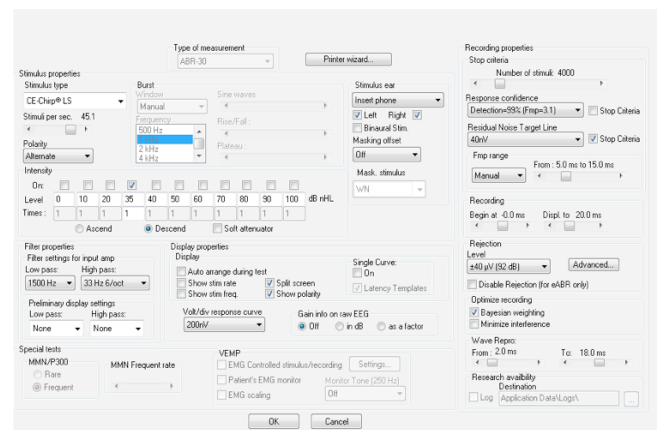
De kliniska testerna i ABR inleddes med att testpersonens översta hudlager tvättades bort med kiselpasta för att ge bättre kontaktyta där elektroderna skulle fästa. Huden desinficerades med sprit och tre elektroder fästes enligt klinisk standard med en på varje mastoid och en i hårfästet på testpersonen, se figur 1. En fjärde jordelektrod fästes på vänster kind. Impedansen kontrollerades att vara mindre än 2 kOhm för samtliga elektroder, vilket är tillräckligt lågt för att kontakten ska anses vara god och kunna resultera i ett tillförlitligt resultat [5]. En tongenererande instickshörlur fördes slutligen in i varje öra på testpersonen.

Inför mätningen ombads testpersonen att slappna av och sätta sig bekvämt i stolen. En ton med angiven frekvens och dB-nivå spelades upp i testpersonens högra öra, samtidigt som ett maskeringsbrus spelades upp i det vänstra örat. Undersökningen fortsatte tills maximalt 4000 svep hade utförts.



Figur 1. Klinisk standard för applicering av elektroder inför en ABR-mätning. En elektrod placeras på varje mastoid, en i hårfästet och en på vänster kind.

Om parametern 'residual noise' understigit en nivå på 40 nV stoppades dock mätningen automatiskt enligt inställningar i testprotokollet i figur 2. För att generera reproducerbara resultat användes ett och samma testprotokoll, benämnt CE-Chirp LS, som grund. Testprotokollet med samtliga inställningar visas i figur 2.



Figur 2. Inställningar för protokollet CE-Chirp LS.

Genom att införa och förflytta olika potentiella störningskällorna undersöktes eventuell inverkan på ABR-utrustningen. För att identifiera påverkan från de olika källorna försökte varje källa i största möjliga mån testas oberoende från de andra. För att uppnå ett så korrekt som möjligt förflyttades källor som inte aktivt testades bort från ABR-utrustningen.

ABR-undersökningarna utfördes enligt följande schema:

- A Mätningar utfördes under normala förutsättningar på 60, 50, 40, 35 och 20 dB nivå.
- B Testpersonen tuggade tuggummi för att simulera muskelstörningar i ansiktet. Mätningen utfördes på nivåerna 50 dB och 35 dB.
- C Testpersonen läste en text för att simulera mental ansträngning. Mätningen utfördes på 50 och 35 dB.
- D Förförstärkaren placerades ovanpå hårdvara för att generera störningar. Mätningen utfördes på nivåerna 50 dB och 35 dB.
- E Två mobiltelefoner placerades på varsin sida utrustningen och ett samtal inleddes. Mätningen utfördes på nivån 50 dB.

F Fyra mätningar utfördes med ändringar gjorda i testprotokollet. Frekvensen ändrades inledningsvis till 33,1 Hz. Vid nästa undersökning kryssades rutan 'minimize interference' i. Vid tredje mätningen ändrades lågpasfilter till 5000 Hz och därefter högpasfilter till 0,5 Hz 6/oct. Samtliga ovanstående mätningarna utfördes på 50 dB.

Under samtliga mätomgångar, förutom inför mätomgång E, stängdes samtliga mobiltelefoner i rummet av. Datorer och annan elektronisk utrustning placerades minst två meter från utrustningen. För mätomgång C, D och E utfördes referensmätningar utan störningskälla på samma decibelnivåer som mätningarna gjorda med inducerad störningskälla, detta för att behändigt kunna jämföra resultaten.

Hur undersökningen påverkades dokumenterades digitalt i både text- och bildformat. Parametrarna 'rejected', 'wave reproducibility', 'residual noise' och Fmp som alla kan ge information om mätningens kvalitet antecknades under samtliga mätningar.

Slutligen, för att uppskatta kvaliteten på de utförda mätningarna, analyserades parametrarna statistiskt. Det gjordes tio referensmätningar på nivåerna 50 respektive 35 dB. För dessa mätningar beräknades sedan medelvärde och standardavvikelse i programmet Excel. Detta utfördes med anledning av att bestämma ungefär hur stora avvikelser som är normalt för de ovan nämnda parametrar 'rejected', 'wave reproducibility', 'residual noise' och Fmp vid mätningar under liknande förutsättningar.

#### IV. RESULTAT

##### A. Information från intervjuer

1) *Audionom A:* Audionom A känner sig säker på att använda samtliga utrustningar som finns tillgängliga på Audiologen i Lund. Hon upplever tolkning av svar som den svåraste delen av undersökningen. Hon berättar att sedan införandet av testprotokoll har det blivit omständigt att ändra inställningar tillfälligt. Hon upplever att hon kunde göra en bättre mätning tidigare då hon kunde ändra filtreringen efter mätningen själv.

Vid problem med undersökningen kontrollerar hon sladdar, elektroder och angivna parametrar, startar om utrustningen och kontrollerar ljudgivaren. Om problem kvarstår provar hon sig fram, läser manualen eller frågar en kollega. Hon önskar tid för regelbunden uppdatering och tid för ut- och fortbildning för att förbättra och förenkla ABR-mätningar.

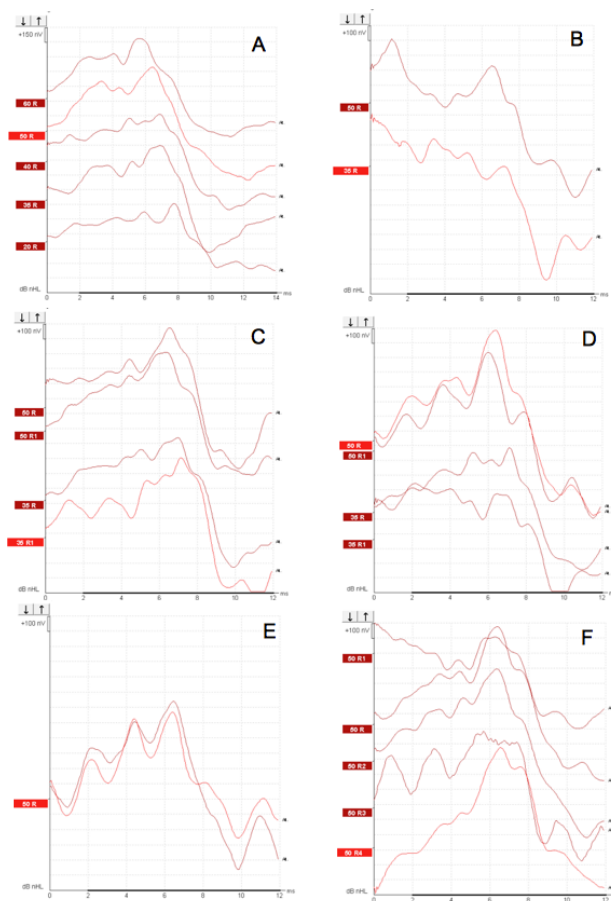
2) *Audionom B:* Audionom B använder endast ABR-utrustning av märket Audera och har ännu inte haft tid att lära sig Eclipse, som köptes in till avdelningen senare. Även hon upplever tolkning av svar/kurvor som den svåraste delen av undersökningen. Störningar upplevs inte som särskilt problematiskt, men skulle mätsvaren bli otydliga kontrollerar hon impedansen samt att patienten ligger bra eller att barnet inte är vaket. Patientens egen aktivitet och muskelspänningar verkar enligt audionom 2 störa mer än mobiltelefoner och andra yttre störningar.

Om problem uppstår frågar hon kollegor eller tittar i hjälpprogrammet. Hon önskar kunna justera protokollen som används själv. I nuläget föredrar hon att använda det

förinställda protokoll som gjorts i Malmö framför det i Lund. Hon önskar att alla testprotokoll ska standardiseras och namnges entydligt för att eliminera risken för misstolkning.

Audionom B upplever att inställningen 33,1 stimuli per sekund ger bättre resultat 27,1 som är inställt i standardprotokollet. Filter som hon använder är ett högpasfilter med brytfrekvens vid 50Hz och lågpasfilter med brytfrekvens vid antingen 1,5 kHz eller 1,5 kHz. Tidsfönstret ställs till 10 ms på vuxna och 15 ms på barn.

3) *Audionom C:* Audionom C känner sig mest bekväm med att använda Eclipse men använder regelbundet samtliga utrustningar, alltså även Audera. Hon upplever att det svåraste med en ABR-undersökning är när störningar uppstår trots att patienten är lugn och elektroder sitter bra med god kontakt. Tolkningen av resultaten är också tidskrävande. Ytterligare ett problem är att hon inte känner sig insatt i hur testprotokollen är inställda. Om problem uppstår under mätningen felsöker hon själv genom att kontrollera elektroder och sladdar. Om fel kvarstår tillkallas en annan audionom på avdelningen eller en ingenjör.



Figur 3. Vågformerna från mätomgång A-F. Siffrorna vid y-axeln visar på vilken dB-nivå mätningen gjordes. I bild C, D och E är kurvorna R referenskurvor och R1 är kurvorna för mätning med störningar. I bild F är R = normal, R1 = sampelhastighet 33,1 Hz istället för 45,1 Hz, R2 = minimize interference ikryssad, R3 = lågpasfilter ändrat till 5000 Hz, R4 = högpasfilter ändrat till 0,5 Hz 6/oct.

## B. Mätresultat från experiment med störningar

Vågformerna som mätningarna i omgång A-F resulterade i visas i figur 3 (A-F).

På kurvorna i figur 3 kan en van audionom eller läkare markera ut topparna I-V på vågformen som genererats. Den tydligaste toppen, V, hamnar i samtliga mätningar någonstans mellan 6 och 8 ms, strax innan kurvan går skarpt nedåt. Noterbart är att våg V förskjuts något framåt i tiden för mätning på en lägre dB-nivå. I bild 2C-E har kurvor från mätningar vid normala förutsättningar lagts ovanpå kurvorna från mätningar gjorda under påverkan av inducerade störningskällor, detta för att direkt kunna jämföra vågformerna.

Under tiden som samtliga mätningar i omgång A-F genomfördes registrerades resultatet av 'residual noise' och Fmp enligt figur 4.

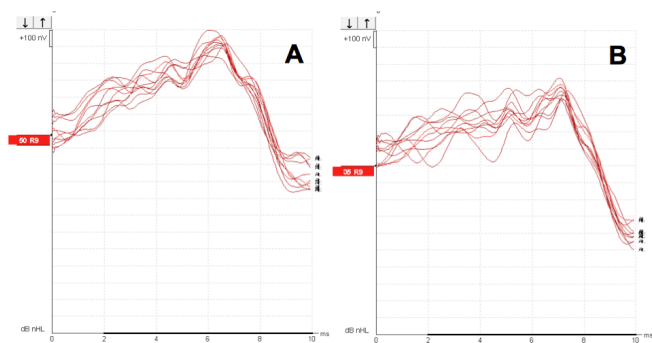


Figur 4. Exempel på en graf för Fmp (röd) och 'residual noise' (svart) under en ABR-mätning.

De gröna bockarna till vänster respektive höger i figur 4 visar att Fmp respektive 'residual noise' i denna mätning hamnat på en enligt inställningarna tillfredställande nivå. Resultaten för 'rejected', 'wave reproducibility', Fmp och 'residual noise' för samtliga vågformer i samtliga mätningomgångar A-F kan ses i tabell I.

I tabell I kan utläsas att parametern 'rejected' oftast hamnar på noll, med undantag för mätomgång B. 'Wave repro.' hamnar för samtliga mätningar på över 80 procent, åter igen med undantag för mätomgång B. 'Residual noise' varierar mellan 40 och 121 nV, även här noterades det högsta, alltså ur störningssynpunkt sämsta värdet i mätomgång B. Fmp, som ska vara minst 3,1 för en pålitlig mätning, varierade mellan 4 och 97. Det största värdet återfanns under de normala förutsättningarna, medan det lägsta värdet noterades då testpersonen tuggade tuggummi i mätomgång B.

Slutligen redovisas i figur 5 de 10 kontrollmätningar som utfördes på 50 dB respektive 35 dB. Kurvorna har lagts ovanpå varandra för att variationen mellan kurvorna tydligare ska kunna urskiljas, se figur 5.



Figur 5. A. 10 kurvor från mätning på 50 dB. B. 10 kurvor från mätning på 35 dB.

Tabell I  
DATA FRÅN MÄTOMGÅNG A-F

|                          | Rejected (%) | Wave repro. (%) | Residual noise (nV) | Fmp   |
|--------------------------|--------------|-----------------|---------------------|-------|
| <b>A. Normal</b>         |              |                 |                     |       |
| 60 dB                    | 0            | 96              | 45                  | 57,28 |
| 50 dB                    | 0            | 95              | 40                  | 97,41 |
| 40 dB                    | 0            | 93              | 40                  | 84,09 |
| 35 dB                    | 0            | 94              | 51                  | 50,21 |
| 20 dB                    | 0            | 91              | 40                  | 36,85 |
| <b>B. Muskelanstr.</b>   |              |                 |                     |       |
| 50 dB                    | 50           | 57              | 96                  | 8,12  |
| 35 dB                    | 45           | 52              | 121                 | 4,16  |
| <b>C. Läsa</b>           |              |                 |                     |       |
| normal 50 dB             | 1            | 93              | 55                  | 31,63 |
| läsa 50 dB               | 2            | 96              | 39                  | 67,73 |
| normal 35 dB             | 0            | 94              | 47                  | 38,11 |
| läsa 35 dB               | 0            | 93              | 41                  | 67,96 |
| <b>D. Förförstärkare</b> |              |                 |                     |       |
| normal 50 dB             | 0            | 97              | 51                  | 65,43 |
| nära 50 dB               | 0            | 96              | 49                  | 55,79 |
| normal 35 dB             | 0            | 91              | 45                  | 38,53 |
| nära 35 dB               | 0            | 83              | 51                  | 20,51 |
| <b>E. Mobiltelefoner</b> |              |                 |                     |       |
| normal 50 dB             | 0            | 88              | 55                  | 19,07 |
| ringer 50 dB             | 0            | 88              | 58                  | 32,62 |
| <b>F. Inställningar</b>  |              |                 |                     |       |
| normal 50 dB             | 0            | 97              | 42                  | 67,03 |
| 33,1 Hz                  | 0            | 95              | 43                  | 22,46 |
| min. interf.             | 0            | 95              | 59                  | 39,09 |
| lågpass 5000             | 0            | 96              | 43                  | 61,23 |
| högpass 0,5              | 0            | 97              | 44                  | 73,71 |

I tabell II redovisas medelvärde och standardavvikelser för kontrollmätningarna med avseende på samma parametrar som återfinns i tabell I.

Tabell II  
MEDELVÄRDE OCH STANDARDAVVIKELSER

|                | Medelvärde | Standardavvikelse |
|----------------|------------|-------------------|
| <b>50 dB</b>   |            |                   |
| Rejected       | 0,3        | 0,64              |
| Wave repro.    | 91,9       | 5,58              |
| Residual noise | 44,1       | 7,79              |
| Fmp            | 52,8       | 14,81             |
| <b>35 dB</b>   |            |                   |
| Rejected       | 0,3        | 0,9               |
| Wave repro.    | 93,8       | 3,46              |
| Residual noise | 39,8       | 0,4               |
| Fmp            | 57,9       | 9,80              |

Precis som för majoriteten av mätningarna i omgång A-F visar referensmätningarna, både på 50 dB och 35 dB, låga värden för 'rejected' och höga värden för 'wave repro'.

'Residual noise' gick ner till 40 nV för de flesta av de tio referensmätningarna, vilket gjorde standardavvikelsen för denna parameter låg. Störst standardavvikelse noterades för Fmp.

## V. DISKUSSION

Gemensamt för audionomerna som arbetar med ABR-mätningar på SUS är att de känner en generell osäkerhet kring utrustningen. Det finns flera olika modeller av utrustningen som används kliniskt på avdelningen. Endast en av audionomerna som har besvarat frågan känner sig bekväm med att använda samtliga modeller. Två av tre lyfte fram en önskan om att själva kunna modifiera parametrar under en undersökning istället för att använda sig av färdigfyllda protokoll, vilket idag är standard på SUS. Detta indikerar att audionomerna själva har ett tekniskt intresse och en önskan om att mer individanpassa undersökningen efter patienten. Samtidigt kan standardiserade protokoll vara att föredra eftersom samma inställningar för samma typ av mätningar underlättar för tolkning av resultaten. Problemet idag är att audionomerna inte litar på de förinställda protokollen och samtidigt besitter de inte tillräckligt med förkunskaper för att själva modifiera inställningarna.

Ett generellt tillvägagångssätt när något inte fungerar är att söka hjälp från kollegor. Det är inte ovanligt att mätresultaten misstros eftersom svaren från två mätningar gjorda på en patient, med identiska förutsättningar, kan se olika ut. Denna osäkerhet ligger dock i elektrofysiologiska mätningars natur eftersom sådana svar alltid varierar. Detta syns också i bild 4. De tio kurvorna är inte identiska, trots att mätningarna gjorts under exakt samma förutsättningar. Standardavvikelserna i tabell 2 visar också variationen för de olika parametrarna mellan olika mätningar. Avvikelserna är inte särskilt stora beträffande "wave repro." eller "rejected". Avvikelsen är något större för Fmp, dock är medelvärdet över 50 för referensmätningarna på både 50 dB och 35 dB. Detta värde är med god marginal över 3,1 vilket är det värde som enligt testprotokollet, se bild (se figur 2, rekommenderas som minimum för att mätningens kvalitet ska anses godkänd. Således är alla mätningar gjorda under försöket godkända med god marginal. För 'residual noise' var medelvärdet runt 40 nV, och standardavvikelsen var mycket liten. Detta beror på att det i inställningarna (se figur 2) valts att 40 nV ska användas som stopp-kriterium för mätningen. Detta innebär att mätningen automatiskt stoppas och inga fler svep görs när 'residual noise' nått ner till denna nivå. Eftersom nästan alla referensmätningar lyckades med detta avlästes detta värde oftast till 39-40 nV, vilket alltså medför en mycket liten standardavvikelse.

Om resultaten i tabell I jämförs, dels inbördes och dels med referensmätningarna i tabell II, syns att vågens reproducerbarhet samt andelen förkastade svep hamnar på låga nivåer för alla mätningar med undantag för mätningen påverkad av muskelansträngning. Här är också nivån för 'residual noise' avsevärt högre än för samtliga övriga mätningar och resultatet når inte upp till en godkänd nivå. Fmp är också betydligt sämre här, dock fortfarande på en enligt inställningarna godkänd nivå. Det som audionomerna upplever som största anledning till att

mätningen håller låg kvalitet stämmer alltså överens med de resultat som uppmättes. Att patienten är avslappnad ser ut att kunna påverka mätningen avsevärt. Gemensamt för resultaten i tabell I är att 'residual noise' varit något högre än gränsvärdet 40 nV i de flesta mätningarna. Detta beror sannolikt på att testpersonen inte varit tillräckligt avslappnad. Vid en klinisk mätning ska åtgärder vidtas för att öka avkopplingsnivån hos patienten, t.ex. genom att ha en bekväm stol och släcka lampan i rummet. Inga av dessa åtgärder vidtogs inför ovanstående försök.

Vid övriga mätningar med tillförda störningar i form av mental aktivitet, fel placering av förförstärkare samt mobiltelefoner i närheten kan inga större skillnader utläsas. Fmp varierar mycket, men håller sig alltid över gränsvärdet på 3,1. Under vissa försök avlästes Fmp till ett högre värde, det vill säga mätningen anses mer pålitlig, då störningar infördes än vid samma mätning i normalläget. Det finns således inget i dessa parametrar som indikerar att de inducerade störningarna påverkade mätningen negativt. Det går inte heller att dra några slutsatser om att olika inställningar för filter eller stimulerings-hastighet påverkar mätningen signifikant.

Ingen av audionomerna nämner att de studerar Fmp eller 'residual noise' för att avgöra om mätningen är pålitlig eller ej. Enligt tillverkaren av Eclipse (Interacoustics) finns en tradition av att istället avläsa vågens reproducerbarhet för att avgöra mätningens kvalitet. Detta är enligt Interacoustics dock ett förlegat mått, eftersom det inte är särskilt exakt. Dessutom beror detta mått på inom vilken tidsram man i protokollet väljer att beräkna reproducerbarheten. I aktuellt protokoll (se figur 2) används tidsfönstret 2-18 ms. Samtidigt ligger vågtoppar av intresse av normalt vid ungefär 0-10 ms. Ett mer modernt och pålitligt sätt är enligt Interacoustics att avläsa Fmp och 'residual noise'. Fördelen med att först betrakta Fmp är att ett snabbt svar ges huvudvidata mätresultaten är troligt att härstamma från ett äkta svar istället för brus. Om Fmp är över nivån 3,1 kan det med 99% sannolikhet bestämmas att signalen härstammar från ett äkta svar. Därefter kan 'residual noise' användas som ett mått på när patienten är tillräckligt avslappnad, vilket i sin tur innebär ett mätresultat håller hög kvalitet. Då gränsvärdet 40 nV uppnåtts kan mätningen stoppas, vilket ger möjlighet att tjäna dyrbar tid, till exempel innan ett barn som undersöks vaknar. Information om detta verkar dock inte ha nått ut till användarna, som inte har för vana att titta på dessa parametrar under mätningens gång.

I rapporten har klinisk användning av ABR i Region Skåne studerats ur ett tekniskt perspektiv med fokus på störningskällor som eventuellt kan påverka undersökningen. En faktor som kan ha signifikant inverkan på resultaten är att testpersonen i de experimentella undersökningarna har normal hörsel. ABR utförs vanligtvis på patienter med hörselnedsättningar. För att validera resultaten ytterligare behövs en större serie mätningar utföras på ett större antal testpersoner med ett varierande spann av hörselförmåga.

För att vidare bedöma och utreda kvaliteten på den utbildning som personalen inom Region Skåne får vid införandet av en ny hård- och mjukvara för ABR skulle en jämförande studie exempelvis kunna göras i Växjö där samma typer av mätningar med samma typ av utrustning utförs.

## VI. HÅLLBAR UTVECKLING

Hållbar utveckling innebär att såväl ekonomiska som materiella resurser används effektivt. När det gäller ABR-mätningar i Region Skåne finns mer att önska när det gäller dessa delar. Idag finns det utrustning inom Region Skåne som köpts in för tiotusentals kronor som inte används av hela personalstyrkan eftersom användarna inte känner sig trygga med hur tekniken fungerar. Dessutom är all tid inom sjukvården dyrbar, och användarnas osäkerhet kring utrustningen gör att den tid som avsätts för en ABR-undersökning inte används effektivt. För en mer hållbar utveckling kring ABR-mätningar krävs tydliga instruktioner om hur man går till väga, såväl tekniskt som kliniskt. I denna rapport är det framför allt den tekniska delen som har analyserats, och slutsatserna följer nedan.

## VII. SLUTSATSER

Med rätt inställda testprotokoll som används konsekvent för samma typ av mätningar finns egentligen ingen större anledning att misstro resultatet av en ABR-mätning. Yttre störningar påverkar sällan, fokus ska istället placeras på patientens sinnestillstånd så att denne är så avslappnad som möjligt. En avslappnad patient genererar en mer tillförlitlig mätning som dessutom kan genomföras snabbare.

Finns osäkerhet kring mätningens kvalitet ska parametrarna 'residual noise' och Fmp betraktas. Generellt gäller det för personalen som arbetar med ABR att parametrars betydelse samt tolkning av kurvor är svårt. För att underlätta för de anställda behövs vidareutbildning av personalen. Informationen kring båda problemen finns tillgänglig i manualer och artiklar, men hur den bäst förmedlas till användaren i vardagen bör ses över i verksamheten. Mer lättförstådd information samt regelbunden fortbildning skulle bidra till snabbare undersökningar med högre kvalitet samt att resultaten som producerats anses vara tillförlitliga enligt audionomer såväl som läkare.

Vidare forskning behövs för att validera resultaten från denna kliniska studie eftersom underlaget har varit begränsat med avseende på antalet deltagande testpersoner i de experimentella undersökningarna samt antalet deltagande anställda inom Region Skåne.

## VIII. EFTERORD

Vi vill tacka:

- Jonas Brännström för klinisk handledning.
- Anders Nilsson för assisterande klinisk handledning och praktisk information om utrustningen.
- Leif Sörnmo för handledning från LTH.
- Audionomerna Linda Ivarsson, Gunilla Eklund och Aida Halimic för intervjuer och diskussioner.
- Stefan Pettersson på Interacoustics för hjälp och information kring utrustningen Eclipse.

Fördelningen av arbetet i denna rapport har gjorts enligt följande. Emma har skött större delen av kontakterna med audionomerna och Interacoustics. Hon har också ansvarat för att få tillgång till mätutrustningen på Audiologen i Lund. När det gäller rapporten har Emma skrivit det mesta under rubriken resultat. Sofia har haft ansvar för att anteckna och sammanfatta information som fås från intervjuer och diskussioner med

audionomer. Dessutom har hon skött den mesta av kontakten med handledare. I rapporten har hon skrivit större delen av texten som beskriver metoden. Övrigt arbete, såväl praktiskt som rapportskrivande, har fördelats jämnt.

## REFERENSER

- [1] J. Hall. "New handbook of auditory evoked responses", Allyn & Bacon (Pearson Education), 2006.
- [2] E. Moore. "Bases of auditory brain stem evoked responses", Grune & Stratton, New York, 1983.
- [3] A. Marcoux, I. Kurtz. "Noise Reduction to Achieve Quality ABR Measurement", Canadian Hearing Report, vol 8(3): pp. 19—23, 2012
- [4] Interacoustics. *Quick Guide - Bayesian Weighting*, Item No. 8106681
- [5] Interacoustics. "Bruksanvisning till Eclipse", Item No. 81066572 - 03/2015 pp. 42
- [6] T. Sauter, D. Beck, D. Speidel. "ABR and ASSR: Challenges and Solutions", Hearingreview.com, June, 2012
- [7] Interacoustics. *Quick Guide - Fmp and Residual Noise*, Item No. 8106681
- [8] M. A. Petoe, A. P. Bradley, W. J. Wilson "On chirp stimuli and neural synchrony in the suprathreshold auditory brainstem response". Acoustical Society Of America, vol 128(1):pp. 235—246, 2010.
- [9] Interacoustic Academy, *video explaining the CE-Chirp stimulus*, [Online]. <http://www.interacoustics.com/e-learning>. Accessed May 18, 2015.
- [10] Interacoustic Academy, *video comparing the CE-Chirp to the click stimulus*, [Online]. <http://www.interacoustics.com/e-learning>. Accessed May 18, 2015.



# Kombinerat mfERG och mfVEP för snabbare och säkrare undersökning av oklar synnedsättning

Victor Lundqvist (BME12), Mikael Maga (BME12)

**Sammanfattning**—Många personer lider av oklar synnedsättning där det är svårt att avgöra var problemet är lokaliserat. Två metoder som används kliniskt är multifokalt elektroretinogram (mfERG) och ”multifocal visual evoked potentials” (mfVEP) vilka undersöker retinas respektive synbanornas funktion. Dessa genomförs separat men om de skulle kunna utföras simultant skulle det leda till bättre möjligheter att diagnosticera dessa personer. För att undersöka huruvida detta är möjligt genomfördes en studie på ögonklinken vid Skånes universitetssjukhus i Lund. I studien deltog 7 individer som alla fick genomgå en mfERG-undersökning samt en simultan undersökning där ett svar från såväl retina som synbark registrerades. Baserat på resultatet från mfERG klassificerades individerna som normaleende respektive synnedsatta. Försöksupställningen för den simultana undersökningen medförde ett normalt svar från synbarken, fokus låg därför på att analysera det retinala svaret. Den initiala analysen indikerade att det erhållna svaret närmast liknade ett ”pattern elektroretinogram” (PERG), vilket är en annan typ av retinalt svar. För de normaleende syns en tydlig topp vid 50 ms och en mer diffus topp vid 100 ms. Dessa toppar återfanns inte hos de synnedsatta. Två olika SNR-värden beräknades utifrån det retinala svaret från den simultana undersökningen varav det ena visade en tydlig skillnad mellan normaleende och synnedsatta. Studien påvisar att det finns goda möjligheter att kunna utföra en simultan undersökning av retina och synbanorna med kliniskt värde. Det finns därför starka incitament för fortsatta studier på området.

## I. INTRODUKTION

**ÖGONSJUKDOMAR** av olika slag drabbar såväl unga som gamla vilket kan leda till stort lidande för den drabbade. Att tidigt kunna ställa en korrekt diagnos är av stor vikt för den enskilda. Det finns många patienter som lider av svårdiagnostiserade ögonsjukdomar. Hos många av de patienter som lider av oklara synnedsättningar är det ofta ett problem att avgöra om problemet är lokaliserat till retina (näthinna) alternativt synbanorna.

### A. Ögat

De yttre delarna av ögat har till uppgift att samla och fokusera ljuset på retina där energin från fotoner omvandlas till elektriska nervsignaler [1]. Uppbyggnaden av retina är komplex och utgörs av 5 distinkta celltyper. Fotonabsorptionen äger rum i fotoreceptorerna vilka är belägna i det yttersta lagret av retina, längst bort från glaskroppen. Detta medför att ljuset

måste passera genom de övriga retinala neuronerna för att nå fotoreceptorerna. Detta har dock inte så stor påverkan på ljusgenomsläppet på grund av att cellagren är tunna och transparenta. Fotoreceptorerna är uppdelade i två typer, färgkänsliga tappar som har hög koncentration i macula lutea (gula fläcken) samt ljuskänsliga stavar som finns utanför den mest centrala delen av macula, kallad fovea centralis.

Det innersta cellagret utgörs av gangliecellerna vars axoner samlas i nervus opticus (synnerven) och lämnar ögat i papilla (blinda fläcken) [1] [2]. De bipolära cellerna fungerar som en brygga mellan fotoreceptorer och ganglieceller. De övriga två celltyperna är interneuroner med främst horisontell utbredning. Horisontalcellerna bildar synapser med fotoreceptorer och bipolära celler och hjälper till att reglera signalöverföringen. Ett liknande cellager bestående av de amakrina cellerna finns mellan de bipolära cellerna och gangliecellerna.

Nervus opticus från respektive öga möts i chiasma opticum [2] [3]. Här sker en överkorsning mellan de axoner som bär på information från det temporala synfältet från respektive öga. På så sätt samlas synintrycket från höger respektive vänster synfält. Därefter leds signalerna vidare till syncentrum i hjärnan vilket är beläget i bakhuvudet. Skador på olika delar av ledningsbanorna ger upphov till olika synbortfall.

### B. mfERG

Elektroretinogram (ERG) är en välbeprövad klinisk metod som används för att utvärdera retinas funktion [4]. ERG mäter retinas elektrofysiologiska aktivitet som helhet.

En vidareutveckling av denna teknik är multifokalt elektroretinogram (mfERG) som gör det möjligt att få ut information om funktionen i avgränsade delar av retina [5]. Med denna metod går det att upptäcka lokala aktivitetsförändringar i retina som tidigare var svåra att påvisa.

Vid en mfERG-undersökning appliceras en lins på patientens cornea (hornhinna) innehållande komponenter som gör det möjligt att mäta den elektriska aktiviteten från retina som uppstår vid stimulering [6]. Vid undersökningen är det viktigt att patienten sitter avslappnat och har stöd som minskar muskelaktivitet. Det är även viktigt att patienten klarar av att fokusera på samma punkt under hela undersökningen. För att underlätta detta är undersökningen uppdelad i flera intervall, ofta 15–30 sekunder långa, där patienten ges möjlighet att blinka i pauserna för att minimera de störningar som detta medför. Uppdelningen i intervall gör det även möjligt att förkasta en mätserie där till exempel en blinkning har stört utan att förlora en stor mängd data.

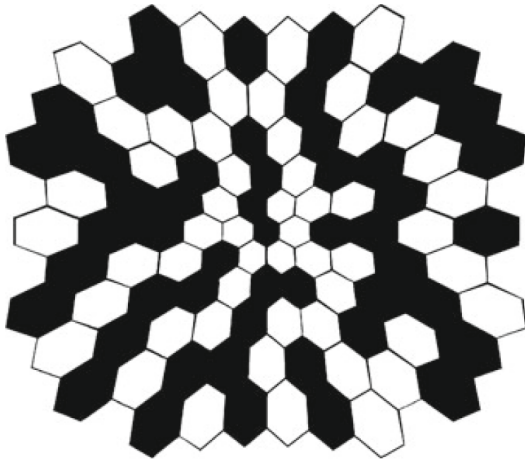
Retina stimuleras med hjälp av ett hexagonalt mönster som normalt innehåller 61 eller 103 hexagoner, se figur 1.

Inlämnat den 10 juni 2015

E-post: victor.lundqvist.204@student.lu.se  
mikael.maga.882@student.lu.se

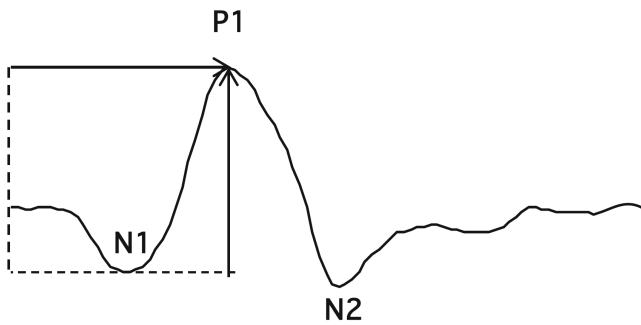
Teknisk handledare: Leif Sörnmo, Institutionen för Biomedicinsk teknik, Lunds Tekniska Högskola

Klinisk handledare: Sten Andréasson, Medicinska fakulteten, Avdelningen för Oftalmologi, Lunds Universitet



Figur 1. Hexagonalt stimuleringsmönster med 103 sektorer som används vid mfERG [6].

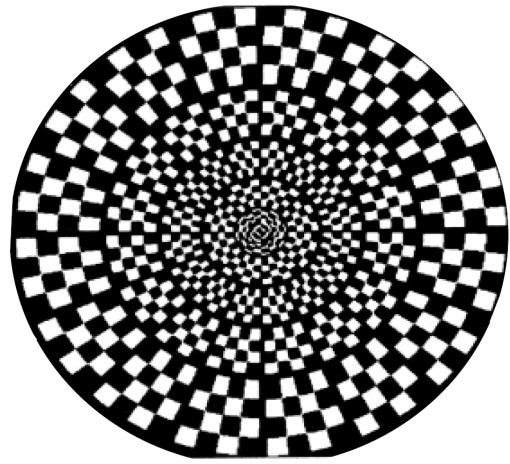
Hexagonernas storlek ökar inifrån och ut för att varje hexagon ska stimulera lika många fotoreceptorer på retina. Detta medför att de elektriska signalernas amplitud är jämförbara mellan olika områden. Vid stimulering skiftar hexagonerna färg från svart till vit eller tvärtom. Då alla fält inte byter färg samtidigt upplevs färgskiftningarna slumpmässiga men följer egentligen en och samma pseudo-randomiserade m-sekvens. Denna är förutbestämd men startpunkten i sekvensen för de olika hexagonerna är åtskilda. I detta fall utgörs m-sekvensen av en binär sekvens bestående av två olika tillstånd, 1 och  $-1$ , där 1 motsvarar vitt och  $-1$  motsvarar svart [7]. Längden på sekvensen bestäms av m-sekvensexponenten  $n$  enligt  $2^n - 1$  där  $n$  är ett heltal.



Figur 2. Exempel på standardsignal erhållen vid mfERG med de tre topparna utmärkta [6]. Den vertikala pilen visar amplitud och den horisontella "implicit time" för P1.

Med tekniken mäts flera lokala ERG-svar, typiskt 61 eller 103 beroende på valt stimuleringsmönster. Det som mäts är inte direkt de lokala svaren utan de beräknas med hjälp av algoritmer; för en utförlig förklaring av matematiken bakom hänvisas det till referens [8]. Förståelse för den matematiska teorin är dock ej nödvändigt för att kunna tillämpa undersökningsmetoden.

Responset på stimulus åskådliggörs med en vågform bestående av tre karakteristiska toppar [6]. En negativ topp inledningsvis efterföljs av en positiv topp och vanligtvis återfinns



Figur 3. Stimuleringsmönster med 60 sektorer för mfVEP [9].

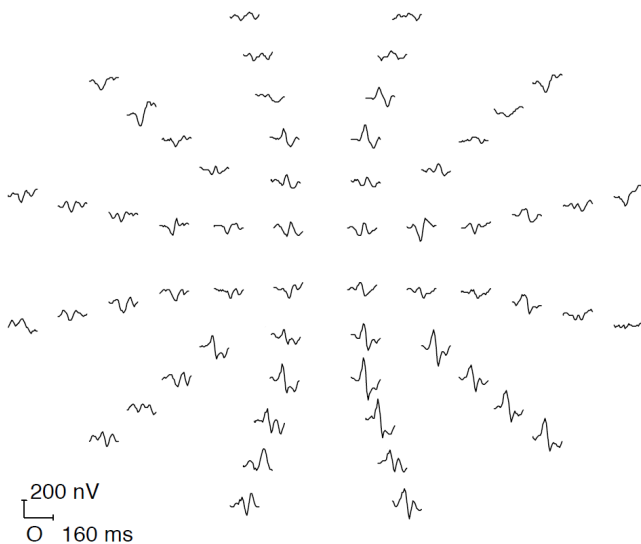
ytterligare en negativ topp i slutet. Dessa kallas N1, P1 och N2 med avseende på deras polaritet och placering i tiden, se figur 2. Amplituderna mäts vanligtvis mellan extrempunkterna ("topp-till-topp amplitud"). Således mäts amplituden i P1 från botten av N1 till toppen av P1. Tiden från stimulering till respektive extrempunkt benämns "implicit time".

### C. mfVEP

"Multifocal visual evoked potential" (mfVEP) är en teknik som visar den elektriska aktiviteten i syncentrum i hjärnan efter visuell stimulering av ögat [9]. Denna undersökningsmetod används för att studera de retino-kortikala ledningsvägarna. Precis som fallet var för mfERG är mfVEP en vidareutveckling av en metod, i detta fall "visual evoked potential" (VEP), som ger ett mer allmänt svar. Den multifokala tillämpningen gör det möjligt att få en spatial upplösning av svaret och genom detta kunna upptäcka förändringar som ej gick att se förut. Detta eftersom synsvaret som erhålls vid VEP har svårigheter att visa defekter i underrepresenterade delar av ledningsbanorna då dessa drunknar i helhetssvaret [10].

Stimuleringsmönstret som används kan liknas vid en dart-tavla indelad i 60 eller 120 sektioner som vardera innehåller ett rutmönster bestående av 8 vita och 8 svarta rutor, se figur 3. Sektionernas storlek ökar inifrån och ut för att ha så lika inverkan på det kortikala svaret som möjligt [11]. Stimuleringen följer ett pseudo-randomiserat mönster likt det som beskrevs för mfERG. Den stora skillnaden är att här inverteras kontrasten för en hel sektor med  $4 \times 4$  rutor samtidigt, det vill säga de svarta rutorna i varje sektor blir vita och tvärtom.

För registrering av signal används normalt elektroder som fästs vid inion, en elektrod 4 cm superior och en direkt på. Ytterligare fyra elektroder sätts 4 cm lateralt på vardera sidan om elektroderna vid inion. En jordelektrod fästs vanligen i pannan. Signalen som erhålls innehåller en topp vid 75 ms (N75) samt en vid 100 ms (P100). Ett typiskt resultat för en 60 sektors mfVEP återfinns i figur 4.



Figur 4. Typiskt utseende för svaret erhållet från ett 60 sektors mfVEP [9].

#### D. PERG

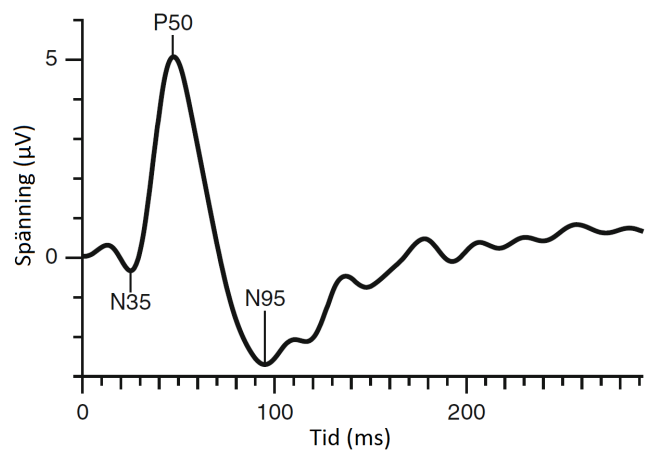
”Pattern electroretinogram” (PERG) är en metod för att främst utvärdera de retinala gangliocellernas funktion [12]. Stimuleringsmönstret som används vid denna undersökning är ett svart-vitt schackmönster där alla fält skiftar färg samtidigt och därigenom behåller en konstant medelluminans. Rekommenderad ”reversal rate” är  $4 \pm 0,8$  ”reversals per second”.

Standardundersökningen ger ett transient respons, det vill säga ett komplett respons samlas in innan nästa ”pattern reversal”. Vågformen vid ett normalt respons karakteriseras initialt av en mindre negativ komponent runt 35 ms (N35) följt av en mycket större positiv komponent efter 45–60 ms (P50). Den avslutas med en större negativ komponent efter 90–100 ms (N95), se figur 5.

Vad gäller undersökningen är det precis som vid mfERG av yttersta vikt att patienten är avslappnad och huvudpositionen stabil för att minska artefakter. Vidare är valet av elektrodtyp och dess placering viktigt eftersom signalerna som samlas in är väldigt svaga, i storleksordningen 2–8  $\mu V$ . Alla typer av linselektroder anses olämpliga.

#### E. Problemställning

Den kliniska utvecklingen går ständigt framåt. Nya undersökningsmetoder tas fram och redan existerande förfinas ytterligare. Att simultant kunna genomföra mfERG och mfVEP skulle leda till en rad förbättringar. Dels skulle det vara möjligt att förkorta undersökningstiden vilket är extra fördelaktigt då en nedsövd patient ska undersökas. Att söva patienter under undersökningen tillämpas främst på små barn som inte kan instrueras att fokusera. Narkos medför alltid en viss risk, därmed är förkortad undersökningstid fördelaktigt. Dessutom skulle en simultan undersökning kunna leda till att det blir lättare att diagnostisera patienter som måste genomgå båda undersökningarna. En anledning till detta är att ett mer adekvat svar erhålls då båda undersökningarna är baserade på samma stimulering. Detta gör det möjligt att följa samma stimulus från



Figur 5. PERG signal med de tre karakteristiska topparna markerade [12].

retina till synbark. Såväl trötthet som patologi kan vara bidragande orsaker till att de separata undersökningarna inte blir jämförbara. En simultan undersökning skulle alltså medföra en styrka i bedömningen.

Denna studie har som syfte att undersöka möjligheterna att utföra en simultan undersökning av mfERG och mfVEP, vilket vi tror är möjligt. För att försöka få svar på detta gör vi i studien simultana undersökningar på 7 stycken individer, både normaleesende och synnedsatta. Data som erhålls studeras med hjälp av utrustningen som finns tillgänglig på sjukhuset samt med hjälp av andra matematiska program. Resultaten presenteras med hjälp av grafer och tabeller och vi ger våra tolkningar av dessa.

## II. DATAINSAMLING

Selektion av deltagare sköttes av personalen på ögonkliniken, samtliga var besökande patienter på avdelningen. Detta innebär att olika typer och varierande grad av synnedsättning finns representerad i datamängden. Den totala urvalsgruppen bestod av 7 individer i varierande ålder. Såväl kvinnor som män är representerade i data. Av dessa individer klassificerades 2 stycken som normaleesende på det aktuella ögat. Övriga 5 individer hade en påvisad synnedsättning. I data från den simultana undersökningen finns 5 vänster- och 2 högerögon representerade.

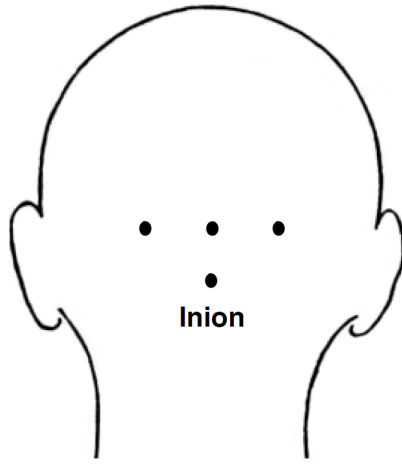
## III. METOD

### A. Undersökningar

Eftersom undersökningarna krävde medicinsk utbildning utfördes de av personal från ögonkliniken vid Skånes universitetssjukhus i Lund.

Vid undersökningarna användes VERIS Science 6.4.3 (EDI, San Mateo, CA, USA) med tillhörande utrustning bestående av silverpläterade elektroder, kamera/skärmenhet (FMS IV TPI stimulator, EDI), förstärkare (Grass 15LT, Grass Technologies, Warwick, RI, USA) samt linselektrod (B-A bipolar lenselectrode, Hansen labs, Coralville, IA, USA).

På varje individ utfördes två undersökningar. Vid undersökning 1 genomfördes ett mfERG på ett av ögonen



Figur 6. Placering av elektroder på bakhuvudet för undersökning 2 [9].

vilket kortfattat gick till enligt följande. Det aktuella ögat lokalbedövades med oxibuprokain 0,4 % (4 mg/ml) varefter linselektroden applicerades. Individens placerades i en stol med ett nackstöd och ombads justera detta för att sitta så bekvämt som möjligt. Skärmen tillhörande datorn vändes bort från individen för att minska påverkan på mätningen. Individens ombads sedan att titta in i kameran och fokusera på en punkt i mitten av stimuleringsmönstret, fokuspunkten. Datainsamling skedde sedan i 32 sessioner på vardera 13,65 sekunder.

När undersökning 1 var avslutad påbörjades undersökning 2 på det motsatta ögat, med ett stimuleringsmönster som används för mfVEP. Här utfördes samtliga steg som i undersökning 1 gällande applicering av lins och placering av individ. Utöver detta placerades även 4 elektroder i nacken enligt standard för mfVEP beskrivit ovan, bortsett från de två elektroderna lateralt från inion som ej användes, se figur 6. Målsättningen för elektrodresistanserna var att ligga under 5 k $\Omega$  vilket är rekommenderat [13]. Jordelektroden fästes i pannan. Datainsamlingen skedde sessionsvis på samma sätt som i undersökning 1. För specifika parametrar för respektive undersökning se tabell I.

Tabell I  
PARAMETRAR FÖR UNDERSÖKNING 1 & 2

|                           | Undersökning 1           | Undersökning 2           |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Stimuleringsmönster       | Hexagon 103              | Dartboard 120            |
| Luminans vit hexagon/ruta | 201,98 cd/m <sup>2</sup> | 159,73 cd/m <sup>2</sup> |
| Skärmfrekvens             | 75,0 Hz                  | 75,0 Hz                  |
| M-sekvensexponent         | 15                       | 14                       |
| Extern förstärkning       | 50 000                   | 100 000                  |
| Extern bandpassfilter     | 10–300 Hz                | 3–100 Hz                 |
| Avstånd skärm             | 40 cm                    | 40 cm                    |
| Synfält                   | 20°                      | 20°                      |
| Total inspelningstid      | 7 min 17 sec             | 7 min 17 sec             |

### B. Filter

För att underlätta datainsamlingen skapades ett nytt testprotokoll i VERIS (EDI). I undersökning 1 användes

ögonklinikens standardfiltrering. För undersökning 2 användes ”artifact removal” med 1 iteration med följande 3 filter, ”kernel 1” (0–120 ms), ”1st slice of kernel 2” (0–120 ms) och ”2nd slice of kernel 2” (0–120 ms) med funktionen ”filter by segment” vald. Utöver detta användes ett ”power line filter” på 50 Hz. ”Retinal view” användes i båda undersökningarna.

### C. Dataanalys

Data från testprotokollet exporterades till Matlab R2013b (MathWorks, Natick, MA, USA) där samtliga analyser av data utfördes. Ett flertal olika egenskrivna funktioner skapades för att göra data överskådlig.

### D. Bestämning av brus och SNR

För att få en uppskattning av bakgrundsstörringen angreps problemet på två olika vis. Först gjordes en undersökning med linselektroden placerad i en koksaltlösning och en signal uppmättes. Denna signal användes sedan till att göra en grov uppskattning av SNR enligt formel (1) där  $x(n)$  är signalen och  $v(n)$  är bruset; för vidare information hänvisas till referens [14], [15] och [16]. Tidsfönstret 0–120 ms användes då respektive signal, från undersökning 2, skulle jämföras med bruset.

$$gSNR = \frac{RMS_{signal}}{RMS_{brus}} = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} x^2(n)}}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1} v^2(n)}} \quad (1)$$

Utöver detta gjordes ett försök att göra en beräkning av SNR enbart utifrån signalen från respektive individ. Tidsintervallet 0–120 ms valdes som signal och tidsintervallet 300–420 ms fick representera bruset. Utifrån detta beräknades ett SNR-värde för varje sektor  $i$  på individ  $j$  enligt formel (2).

$$SNR_{ij} = \frac{RMS_{ij}(0 - 120ms)}{\frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} RMS_{ij}(300 - 420ms)} - 1 \quad (2)$$

För varje individ bestämdes därefter ett medelvärde för hela retina enligt formel (3).

$$mSNR_j = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^{N-1} SNR_{ij} \quad (3)$$

## IV. RESULTAT

### A. Undersökning 1

Denna undersökning användes för att avgöra vilka individer som klassificerades som normalseende och vilka som ansågs ha en synnedättning. De två normalseende uppvisade fullt normala mfERG-svar. Hos individerna med synnedättning hade de flesta främst en påverkan på makula förutom en som hade dålig funktion över hela retina.

## B. Undersökning 2

Resultatet från mfVEP-delen av undersökningen gav ett normalt svar för de normaleseende individerna. Detta har därför inte studerats djupare då det är svaret från retina som är avgörande för att kunna kartlägga om den simultana undersökningen fungerar eller ej. För att undersöka detta har främst det totala svaret som fås av retina analyserats. Anledningen till detta är att det har varit lättare att analysera helhetssvaret än att titta på lokala retinala svar.

Då undersökning 1 gav så pass dåliga resultat för individerna med synnedsättning misstänktes att undersökning 2 skulle ge svårtolkade resultat. Därför fokuserades det inledningsvis på resultaten från de två undersökningarna som gjorts på normaleseende individer, vilket presenteras i figur 7. Här ses en tydlig trend för kurvformen, framförallt i intervallet 40–120 ms. Vid 50 ms syns en tydlig negativ topp i båda kurvorna. Dessutom kan ytterligare en negativ topp vid cirka 100 ms anas.

Detta kan jämföras med svaret som erhålls från individerna med synnedsättning, se figur 8 och 9. Signalerna är betydligt svagare och rör sig i ett smalare amplitudintervall. Dessutom ses ingen tydlig trend i dessa kurvor varken sinsemellan eller jämfört med de normaleseende. Värt att notera är att det inte går att urskilja någon tydlig topp varken vid 50 eller 100 ms på någon av dessa individer.

Data från en av individerna med synnedsättning har utelämnats i dessa figurer då dess amplitud avvek så pass kraftigt att den inte ansågs ge ett tillförlitligt resultat.

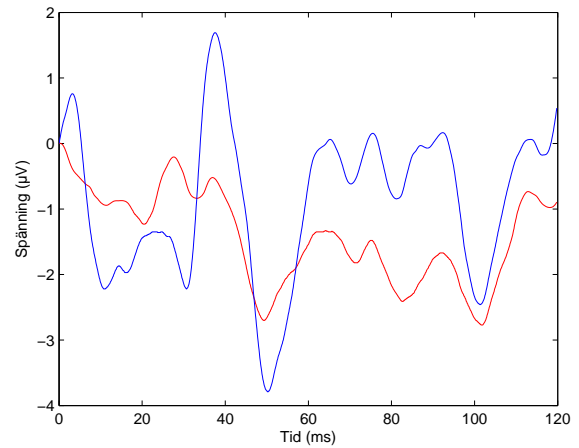
## C. SNR

Vid gSNR-beräkningen med den uppmätta brussignalen erhöles data enligt tabell II. De två normaleseende individerna gav ett gSNR på runt 10 (medelvärde 10,21). Generellt sett ligger motsvarande värde hos individerna med nedsatt syn betydligt lägre (medelvärde 3,35). Även här förkastas data från samma individ som tidigare (individ 7). Att gSNR hos denna individ är högt skall inte tolkas som att det fås en eftersökt signal, utan istället beror det på att signalen innehöll orimligt höga amplituder.

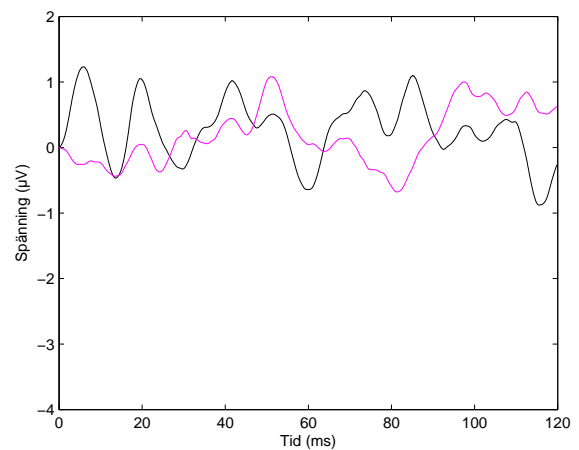
Beräkningen för mSNR, se tabell II, ger värden något över noll. Det går inte att se någon uppenbar skillnad i resultaten från de normaleseende jämfört med de synnedsatta.

Tabell II  
KLASSIFICERING AV INDIVIDER SAMT RESULTAT FÖR SNR

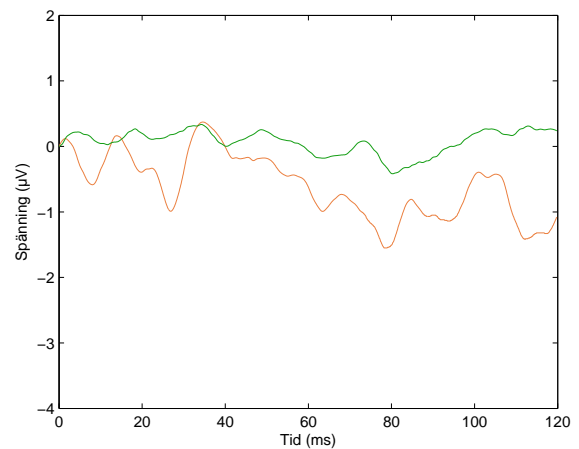
|                              | Klassificering | gSNR  | mSNR |
|------------------------------|----------------|-------|------|
| Individ 1                    | Nedsatt syn    | 3,71  | 0,25 |
| Individ 2                    | Normal         | 10,68 | 0,03 |
| Individ 3                    | Nedsatt syn    | 3,16  | 0,20 |
| Individ 4                    | Nedsatt syn    | 5,22  | 0,14 |
| Individ 5                    | Nedsatt syn    | 1,31  | 0,11 |
| Individ 6                    | Normal         | 9,74  | 0,21 |
| Individ 7                    | Nedsatt syn    | 27,17 | 0,04 |
| Medelvärden normal           | -              | 10,21 | 0,12 |
| Medelvärden nedsatt          | -              | 8,11  | 0,15 |
| Medel nedsatt utan individ 7 | -              | 3,35  | 0,17 |



Figur 7. Det samlade retinala svaret för de normaleseende individerna, individ 2 (röd) samt individ 6 (blå).



Figur 8. Det samlade retinala svaret för två av de synnedsatta individerna, individ 1 (svart) samt individ 3 (magenta).



Figur 9. Det samlade retinala svaret för två av de synnedsatta individerna, individ 4 (orange) samt individ 5 (grön).

## V. DISKUSSION

Då stimuleringsmönstret som användes för den simultana undersökningen är exakt samma som normalt används vid mfVEP fanns det ingen större osäkerhet i att denna del av undersökningen skulle fungera. Det är möjligt att det finns en viss påverkan på signalen för mfVEP från linselektroden som användes vid undersökningen. Detta har dock inte undersökts specifikt eftersom svaret som erhöles ansågs fullgott. Därmed har fokus mest legat på att analysera det retinala svaret.

Studien hade som mål att undersöka om det gick att kombinera mfERG med mfVEP. Relativt snabbt då data började analyseras konstaterades det att det snarare skulle vara ett PERG svar som erhöles. Detta stämde mer överrens med såväl kurvformen för signalen som den teoretiska bakgrunden rörande hur stimuleringsmönster används vid dessa olika undersökningar. Något som noterades vid denna tidpunkt var att linselektroder ej är rekommenderade vid PERG. Då insamling av data var påbörjad gjordes ett aktivt val att fortsätta utföra den simultana undersökningen med linselektroden. Vidare undersökningar rörande stimuleringsmönstret, dess frekvens samt hur olika elektrodotyper påverkar resultatet hade varit intressanta att utföra men ryms ej inom tidsramen för detta projekt.

Den punkt i signalen som det har fokuserats mycket på är toppen vid 50 ms som tydligt framträdde hos de båda normaleende individerna. Utöver detta liknar signalerna varandra även gällande övrig kurvform i tidsfönstret 40–120 ms samt gSNR. Ett flertal filterinställningar utöver de som nämnts specifikt i artikeln har testats och gemensamt för dessa är att denna topp alltid syns tydligt.

Vilka celler i retina det är som ger upphov till dessa signaler har diskuterats men något definitivt svar kan inte ges. Mycket pekar dock på att det skulle vara gangliecellerna. En av anledningarna till detta är signalens tidsmässiga utbredning. Den tydligaste toppen ligger vid 50 ms, vilket är en tidpunkt då det även syns en topp i PERG. Dessutom är stimuleringsmönstret som används mycket likt det som används för PERG, vilket gör det troligt att svaret skulle komma från samma celltyp. Detta är en stark indikation för att det skulle vara gangliecellerna som är den starkast bidragande enheten till den uppmätta signalen.

De två olika SNR-mätningarna tar hänsyn till två olika sorters brus. Med gSNR-metoden jämförs det inte med bruset som återfinns i respektive signal utan den ger endast en grov uppskattning på hur signalen förhåller sig till bakgrundsbruset från mätutrustningen. Det höga gSNR-värdet påvisar att detta brus har liten påverkan på det erhållna resultatet vilket är centralt om metoden ska kunna tillämpas kliniskt.

Beräkningen ger oss ett snitt på hur mycket medelamplituden avviker från brusnivån. Som tidigare nämnts indikerar resultatet att normaleende har ett högre gSNR än de med nedsatt syn. De olika grader av synnedsättning som finns bland dessa individer kan ses som en förklaring till variationen i gSNR i denna grupp. För individ 7 kan dock inte de väldigt höga gSNR-värdet förklaras av en väl fungerande retina. Istället beror det på en helt annan typ av brus som mSNR-metoden syftar att ta i beaktande.

De mSNR-värden som beräknades var ett försök att ta hänsyn till det brus som olika fysiologiska parametrar bidrar

med, exempelvis muskelaktivitet. Resultatet verkar dock inte ge någon tillförlitlig information. Tittar man på de uppmätta signalerna i ett större tidsspänn ses att signalerna inte planar ut, utan fortsätter oscillera. En möjlig förklaring till detta är att det inte är störningar i sig utan istället visar att retina blir fortsatt stimulerad. Vid ett normalt mfERG är algoritmerna utformade så att den del av signalen som inte är intressant släcks ut. En teori är att algoritmerna som används i detta fall är utformade för mfVEP och på grund av detta bidrar till mindre utsläckning. Då algoritmerna inte är tillgängliga är detta inget som har kunnat undersökas. Allt detta skulle kunna innebära att mSNR-värdet i vårt fall är irrelevant som mått på signalstyrkan relativt brusnivån. Det vill säga att i så fall jämförs signalen inte enbart med brus utan även med en eftersläpande signal med retinalt ursprung.

Något som har varit ett problem under projektets gång är antalet individer som undersökts. Förhoppningen var att främst studera ett flertal normaleende individer men det blev endast två. I gengäld har det istället erhållits mycket data från individer med nedsatt syn. Då data analyserades visade sig detta dock ge ett mervärde. Det framgår tydligt av resultatet att en defekt i makula har stor påverkan på den retinala signalen som registreras. Ett utfall av detta slag är av största vikt för det kliniska värdet för undersökningen. Dock hade det behövts fler individer i respektive grupp för att kunna dra mer tillförlitliga slutsatser. Trots detta pekar resultaten mot att det finns en stor potential för att kunna utföra en simultan undersökning på detta vis och därmed finns det starka incitament för fortsatta studier.

Det finns ett flertal fördelar med den föreslagna simultana undersökningen både för patienten, sjukvården samt ur ett hållbarhetsperspektiv. Bland annat skulle det underlätta mycket för de patienter som på grund av sjukdom eller trötthet endast klarar av att göra en undersökning. Dessa patienter skulle därmed inte behöva göra två sjukhusbesök. För sjukvården finns det många vinster där den kanske största är tidsbesparing. Det är inte enbart så att två undersökningar istället blir en utan ofta måste en eller båda undersökningarna göras om då svaren inte är jämförbara. Dessutom medför metoden en stor diagnostisk fördel då det är samma stimulus som följs från retina till synbark vilket kan vara av särskild vikt då patienter med oklar synnedsättning undersöks.

## VI. SLUTSATSER

Ett stort genomgående problem för samtliga resultat, och resonemang som baseras på dessa, är att det finns för lite data för att dra några tillförlitliga slutsatser. Tendenserna som finns kan ändå påvisa att det finns en mycket god sannolikhet för att kunna utföra en simultan undersökning av kliniskt värde. Innan detta är möjligt krävs dock fler studier på området.

## VII. EFTERORD

Vi vill rikta ett stort tack till vår kliniska handledare Sten Andréasson för hans stora engagemang i vårt projekt, alla givande diskussioner samt hans inspirerande sätt att leda oss framåt i arbetet. Vidare vill vi även tacka all delaktig personal på ögonkliniken vid Skånes universitetssjukhus i Lund och

rikta ett speciellt tack till Boel Nilsson för hennes stora engagemang och hjälp i det kliniska arbetet, såväl praktiskt som teoretiskt. Slutligen vill vi även tacka vår tekniska handledare Leif Sörnmo för hans vägledning i rapportskrivandet och hans förmåga att driva oss framåt.

Författarna till artikeln har under hela projektets gång arbetat tillsammans och utfört samtliga moment gemensamt.

#### REFERENSER

- [1] W. F. Boron, E. L. Boulpaep, *Medical Physiology Second Edition*, pp. 378–389, Philadelphia: Saunders, 2009.
- [2] L. S. Costanzo, *Physiology Third Edition*, pp. 78–86, Philadelphia: Saunders, 2006.
- [3] D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A.-S. LaMantia, J. O. McNamara, L. E. White, *Neuroscience Fourth Edition*, ch. 11–12, Sunderland: Sinauer, 2008.
- [4] M. F. Marmor, A. B. Fulton, G. E. Holder, Y. Miyake, M. Brigell, M. Bach, ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2008 update), *Documenta Ophthalmologica*, vol. 118, pp. 69–77, 2009.
- [5] E. E. Sutter, D. Tran, The Field Topography of ERG Components in Man—I. The Photopic Luminance, *Vision Res.*, vol. 32, No. 3, pp. 433–466, 1992.
- [6] D. C. Hood, M. Bach, M. Brigell, D. Keating, M. Kondo, J. S. Lyons, M. F. Marmor, D. L. McCulloch, A. M. Palmowski-Wolfe, ISCEV standard for clinical multifocal electroretinography (mfERG) (2011 edition), *Documenta Ophthalmologica*, vol. 124, pp. 1–13, 2012.
- [7] R. Portnoy, E. E. Sutter, VERIS Science 5.1 Reference Guide, Electro-Diagnostic Imaging (EDI), 2005.
- [8] E. E. Sutter, Imaging visual function with the multifocal m-sequence technique, *Vision Research*, vol. 41, pp. 1241–1255, 2001.
- [9] L. Grånse, Evaluation of the visual pathway with ERG, mfERG and mfVEP in inherited eye disorders, Dissertation, Department of Ophthalmology, Lund University, 2006.
- [10] M. Bengtsson, S. Andréasson, G. Andersson, Multifocal visual evoked potentials—a method study of responses from small sectors of the visual field, *Clinical Neurophysiology*, vol. 116, pp. 1975–1983, 2005.
- [11] D. C. Hood, The Multifocal Visual Evoked Potential (VEP): Applications and Limitations in Neurop-Ophthalmology, 2003-02-13, [http://novel.utah.edu/collection/NAM/program/20030213\\_nanos\\_retina\\_sympos/year/2003/](http://novel.utah.edu/collection/NAM/program/20030213_nanos_retina_sympos/year/2003/).
- [12] M. Bach, M. G. Brigell, M. Hawlina, G. E. Holder, M. A. Johnson, D. L. McCulloch, T. Meigen, S. Viswanathan, ISCEV standard for clinical pattern electroretinography (PERG): 2012 update, *Documenta Ophthalmologica*, vol. 126, pp. 1–7, 2013.
- [13] J. V. Odom, M. Bach, M. Brigell, G. E. Holder, D. L. McCulloch, A. P. Tormene, Vaegan, ISCEV standard for clinical visual evoked potentials (2009 update), *Documenta Ophthalmologica*, vol. 120, pp. 111–119, 2010.
- [14] X. Zhang, D. C. Hood, C. S. Chen, J. E. Hong, A signal-to-noise analysis of multifocal VEP responses: an objective definition for poor records, *Documenta Ophthalmologica*, vol. 104, pp. 287–302, 2002.
- [15] M. B. Hoffman, J.-J. Flechner, Slow pattern-reversal stimulation facilitates the assessment of retinal function with multifocal recordings, *Clinical Neurophysiology*, vol. 119, pp. 409–417, 2008.
- [16] Y. Han, M. A. Bearse Jr., M. E. Schneck, S. Barez, C. Jacobsen, A. J. Adams, Towards optimal filtering of standard multifocal electroretinogram (mfERG) recordings: findings in normal and diabetic subjects, *British Journal of Ophthalmology*, vol. 88, pp. 543–550, 2004.

# Korrelationsanalys för att studera möjlig synaptisk koppling hos nervcellspar i sensorimotoriska cortex

Erik Gillsbro (BME-12), Simon Leppänen (BME-12)

**Sammanfattning**—För att undersöka kopplingen mellan två närliggande nervceller i sensorimotoriska cortex hos råttor, samlas data in över nervcellernas aktivitet. Efter detta utförs statistisk analys på denna data med två olika metoder för att undersöka korrelationen mellan nervcellerna. Intervall i cell 1 grupperas utgående från om cell 2 är aktiv under intervallet eller inte. Den första metoden går ut på att histogram för dessa två grupper ritas upp och jämförs. Eftersom faktumet att långa intervall har större sannolikhet att innehålla spikar förvränger resultaten, skapas en simulerad lognormalfördelning av aktiviteten hos spikarna i cell 2 utgående från deras väntevärde och varians. Istället för att utgå från spikar i cell 2, används denna simulerade fördelning som grund för grupperingen. I den andra metoden analyseras skillnaden i medelvärde för de två grupperna och jämförs med medelvärdeskillnaden för simulerade intervall som antas vara helt oberoende. Resultatet är att man med dessa metoder kan påvisa korrelerade effekter hos aktiviteten för två nervceller.

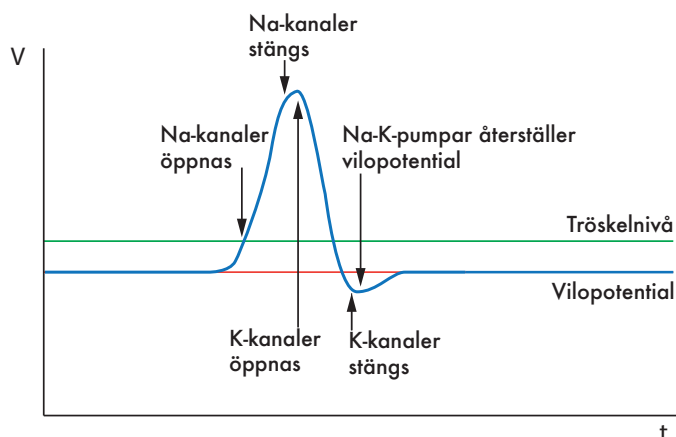
## I. INTRODUKTION

### A. Nervcellens funktion

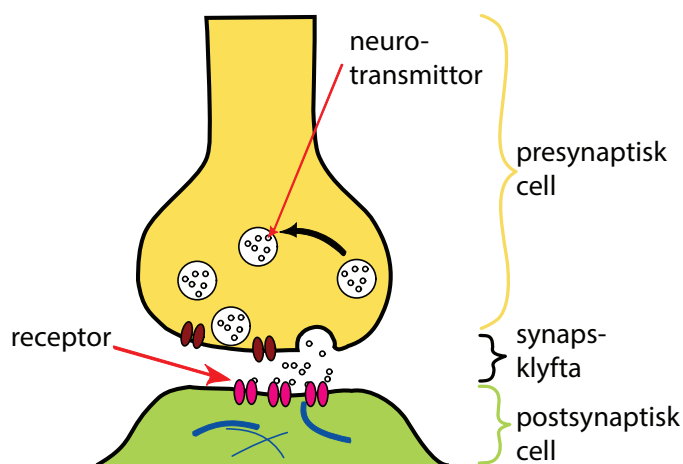
EN nervcell sänder information till närliggande nervceller med hjälp av elektriska impulser, så kallade aktionspotentialer eller spikar. De propagerar via spänningsstyrda jonkanaler längs nervcellen och åstadkommer en potentialändring över nervcellens membran. En aktionspotential initieras genom att cellen av närliggande cellers aktivitet depolariseras tills den uppnår en specifik potentialskillnad, så kallat tröskelvärde. Tröskelvärdet ligger vanligtvis mellan  $-40$  mV och  $-55$  mV. När tröskelvärdet nås depolariseras hela cellen genom att cellens natriumjonkanaler öppnas och natrium strömmar ut ur cellen. Därefter stängs natriumjonkanalerna och kaliumjonkanalerna öppnas. Kalium strömmar då in i nervcellen och membranpotentialen sjunker. Till sist återställs membranpotentialen och de ursprungliga jonkoncentrationerna av Na-K-pumparna (se figur 1). Aktionspotentialen är ett allt-eller-ingenetfenomen vilket innebär att om tröskelvärdet uppnås, oavsett storlek på de sammanlagda inkommande signalerna, skickas en ny aktionspotential från den postsynaptiska nervcellen. En aktionspotential kan endast röra sig i en riktning längs nervcellen och varar i varje punkt på nervcellen normalt i ett fåtal millisekunder [1].

Den presynaptiska cellens axon är ihopkopplad med den postsynaptiska cellens dendriter genom synapser och signalöverföringen mellan cellerna sker över synapsklyftan med kemiska signalsubstanser, så kallade neurotransmittorer (se

Utkast inlämnat den 11 juni 2015  
 Emailadress: mte12egi@student.lu.se, mte12sle@student.lu.se  
 Teknisk handledare: Johan Lindström, matematisk statistik  
 Klinisk handledare: Henrik Jörntell, institutionen för experimentell medicinsk vetenskap



Figur 1. Aktionspotentialens olika skeden

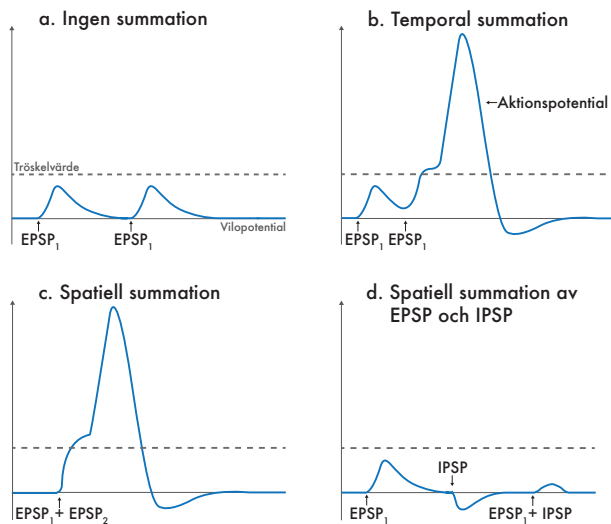


Figur 2. Illustration över en synaps. [2]

figur 2). Neurotransmittorererna frisätts via exocytos till synapsklyftan när aktionspotentialen når den terminala delen av axonet. De binder in till receptorspecifika jonkanaler på den postsynaptiska sidan vilket gör att jonkanalerna öppnas och signalen kan fortsätta längs den postsynaptiska cellens dendriter genom att en ny aktionspotential initieras. Signalsubstansen kan, beroende på typ, ge upphov till en excitatorisk postsynaptisk potential (EPSP) eller inhibitorisk postsynaptisk potential (IPSP) hos den postsynaptiska cellen. EPSP och IPSP är graderade potentialer och ska inte förväxlas med aktionspotentialen, även om deras funktion är att initiera eller



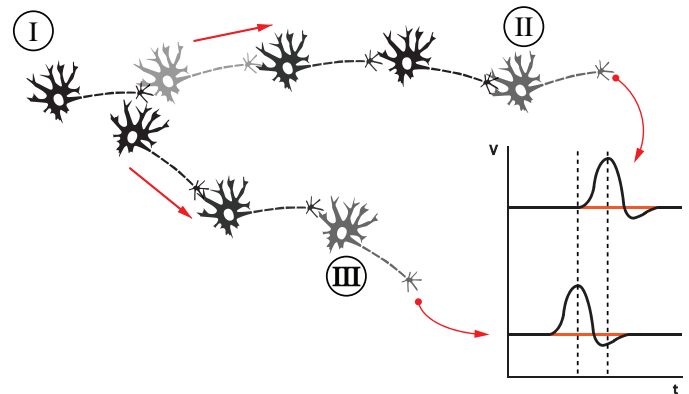
inhibera dessa. Postsynaptiska potentialer (PSP) är additiva och kan summeras både temporalt och spatialt (se figur 3). En nervcell kan ha tusentals synaptiska kopplingar och genom påverkan från många synaptiska kopplingar samtidigt kan sannolikheten för att den postsynaptiska cellen ska depolariseras till tröskelvärde och starta en ny aktionspotential variera [3]. Hur stor påverkan varje enskild presynaptisk nervcell har på den postsynaptiska nervcellen beror på ett antal faktorer. En huvudfaktor är frekvensen som den presynaptiska nervcellen fyrrar med. En hög frekvens ger kraftigare signal eftersom summation av aktionspotentialerna kan ske temporalt. En annan faktor är storleken på den postsynaptiska cellkroppen, där en större cellkropp betyder att kraftigare signal krävs för att ge samma effekt som en lägre signal ger på en mindre cellkropp. Även jonkanalernas fördelning över den postsynaptiska cellen i förhållande till synapsens position spelar roll; med många jonkanaler nära synapsen ger signalerna från den presynaptiska cellen en större påverkan på den postsynaptiska nervcellens membranpotential [1]. Ytterligare en parameter är den stokasticitet som är inbyggd i den presynaptiska terminalens exocytos av neurotransmittorer. Det finns en sannolikhet, om än liten, att frisättning av neurotransmittorer sker utan att någon signal nått den presynaptiska terminalen. Denna frisättningen ger, beroende på signalsubstans, upphov till mEPSP (mikroEPSP) eller mIPSP (mikroIPSP) [4] vilket är ett bra exempel på den slumpmässighet som hela tiden är närvarande i nervsystemet.



Figur 3. **a.** Ingen summation av EPSPs eftersom deras nivå ligger under tröskelvärde. **b.** Temporal summation innebär att samma EPSP avfyrs inom ett tidsintervall som tillåter att de summeras. **c.** Spatiell summation innebär att flera EPSPs från olika områden summeras. **d.** EPSPs och IPSPs kan interagera och summeras. Här kan man se ett exempel på hur PSPs kan delvis eller helt släcka ut varandra.

En nervcell kan ha synaptiska inputs från tusentals andra nervceller. Detta gör det omöjligt att isolera två nervcellers koppling in vivo. Flera nervceller i samma område kan dessutom vara kopplade till en och samma nervcell som ligger längre bort i systemet så att två intilliggande nervceller tar emot signal från samma nervcell oberoende av varandra (se figur 4). I detta fall kan det se ut som om nervcellerna

är korrelerade. Det här gör det svårt att säga om det finns en direkt koppling mellan nervcellerna endast genom att undersöka om de spikar samtidigt. Detta innebär att man måste ta till statistiska metoder och verktyg för att analysera om ett nervcellspar har en koppling.



Figur 4. Exempel på varför signalerna från två celler kan se falskt korrelerade ut. Signalen börjar i nervcell I i figuren. Signalerna mäts sedan i nervcellerna II och III. Signalen från nervcell II är något fördröjd mot signalen från nervcell III och dessa kan då se ut att vara synaptiskt kopplade.

## B. Demenssjukdomar

Antalet personer som lider av demenssjukdomar i Sverige framgick år 2012 till ungefär 158 000. Denna siffra var år 2005 och år 2000 142 200 respektive 133 000. I dessa siffror kan vi tydligt se en ökande trend. Olika undersökningar [5] pekar dock på att antalet insjuknade per år egentligen minskar, och att den ökning som man kan se i statistiken huvudsakligen beror på att insjuknade lever allt längre med sin sjukdom vilket leder till att det totala antalet personer som lever med demenssjukdomar ökar. Demenssjukdomar är de sjukdomar som är mest kostsamma för samhället idag. Den årliga kostnaden för varje person drabbad av demenssjukdomar estimeras<sup>1</sup> till 398 000 kr. Det här ger en total årlig kostnad på cirka 62,9 miljarder kronor. I dessa kostnader inkluderas direkta kostnader för bland annat sjukvård, boende och uppskattade indirekta kostnader för patientens anhöriga [5]. Denna kostnad kan jämföras med de uppskattade årliga samhällsliga kostnaderna för hjärt- och kärlsjukdomar som uppgår till ungefär 61,5 miljarder kronor [6].

Alzheimers sjukdom utgör ungefär 60 procent av alla fall av demenssjukdomar. Orsakerna bakom Alzheimers sjukdom är fortfarande inte väl förstådda. Det som händer i hjärnan är att amyloid beta ( $A\beta$ )-plack ackumuleras mellan nervceller. Om detta är en delorsak till sjukdomen eller en effekt av sjukdomen är något som forskare ännu inte har kommit fram till. Inuti cellerna finns det ett protein,  $\tau$ -protein som hjälper till med transport av olika ämnen längs mikrotubulinätverken i nervcellerna. Vid alzheimers sjukdom genomgår  $\tau$ -protein vissa kemiska förändringar som leder till att det börjar klumpa ihop sig vilket försvårar transport av ämnen i celler. Dessa två

<sup>1</sup>Antaget att antalet drabbade är 158 000 stycken

abnormaliteter antas leda till att synapser mellan nervceller slutar fungera och degenereras. Detta leder till slut till att hela nervceller börjar dö [7]. Med mera information om hur kommunikationen mellan nervceller fungerar på ett detaljerat plan och hur olika typer av nätverk av nervceller kommunicerar med varandra, skulle man kunna bygga upp bättre modeller för hur sjukdomar som Alzheimers fungerar och påverkar hjärnan.

Det detta arbete försöker uppnå är att genom att analysera spiktider som är insamlade i sensorimotoriska cortex på råttor komma fram till hur kommunikationen mellan två nervceller ser ut. Genom att med olika statistiska verktyg analysera förskjutningar mellan spiktider för nervcellerna försöker vi hitta statistisk korrelation mellan dem och på så sätt visa om de är synaptiskt kopplade samt, om så är fallet, försöka ge ett kvantitativt mått på hur stark kopplingen är för olika nervcellspar.

## II. DATA

Den data som använts som underlag för denna undersökning samlas in genom att en tunn glaselektrod i sensorimotoriska cortex registrerar aktiviteten i hjärnan med hjälp av metoden voltage clamp. Elektroden måste befinna sig tillräckligt nära två separata nervceller som reagerar kraftigt nog på stimuli för att deras aktivitet inte ska kunna misstas för brus. Att hitta signaler från två nervceller samtidigt är essentiellt eftersom det är kopplingen mellan dessa nervceller som ska studeras.

Efter datainsamlingen analyseras all data automatiskt genom att en mall definieras över spikens utseende och alla spikar med samma utseende grupperas. Hittas två distinkta spikformer kategoriseras dessa eftersom de då kan antas komma från olika nervceller. Tiderna för när respektive nervcell spikar sparas i två listor. Det är dessa tider som används för att genomföra den statistiska analysen.

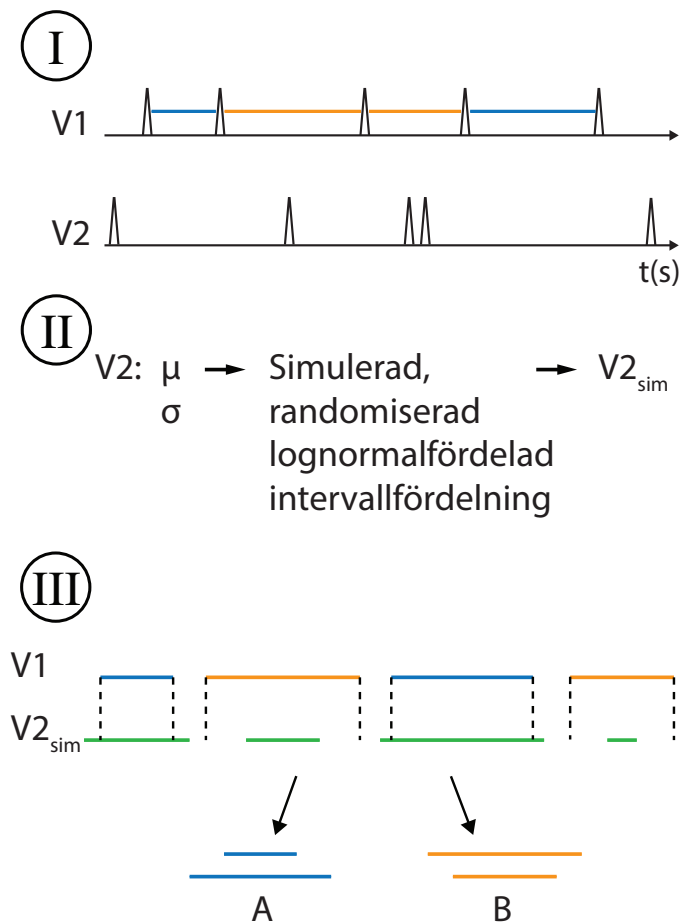
Under insamling av data finns det pågående stimuleringar i bakgrunden som ger upphov till aktivitet i nervcellerna. De spikar som är av intresse för denna undersökning är de som uppstår spontant, alltså inte de som forcerats av stimuli. Om spikar som uppstår på grund av stimuli hade tagits i beaktande blir nätverkseffekterna<sup>2</sup> i hjärnan mera framträdande eftersom stimuleringarna påverkar hela områden i hjärnan. Eftersom det är kopplingen mellan två specifika nervceller som är intressant i denna undersökning bortses alltså från forcerad aktivitet. Ligger det till exempel en nervcell längre bort i nätverket som reagerar på stimuli, kan det få följden att man i datan ser två spikar som kan verka korrelerade, men som i själva verket triggas av en gemensam källa längre bort i nervcellskedjan (se figur 4).

## III. METOD

För att på ett smidigt sätt kunna behandla de stora datamängder som produceras vid försöken utvecklades ett Graphics User Interface (GUI) i MatLab. Programmet ger användaren möjlighet att radera all data som är direkt beroende av stimuleringarna. Efter att all irrelevant data sållats bort, beräknas intervallen mellan alla spikar för den ena nervcellen

<sup>2</sup>Nätverkseffekter är effekter som simultant påverkar en större del av hjärnan

(V1) samt för den andra nervcellen (V2). Eftersom sannolikheten för förekomst av spikar blir större med ökande intervalllängd, simuleras en randomiserad intervalltidsfördelning  $V2_{sim}$  utgående från väntevärde och varians som beräknas från V2. För varje intervall i V1 dras ett randomiserat intervallvärde ur  $V2_{sim}$  och deras storlek jämförs. Intervallen i V1 grupperas sedan i två grupper beroende på om intervallerna i  $V2_{sim}$  är större (grupp A) eller mindre (grupp B) än intervallerna i V1 (se figur 5). Detta simulerar avsaknad respektive närvaro av spik i V2, för varje intervall i V1. För att kunna avgöra om nervcell 1 påverkar nervcell 2 eller vice versa, används metoden även åt andra hållet så intervall i V2 jämförs med intervall i  $V1_{sim}$ .

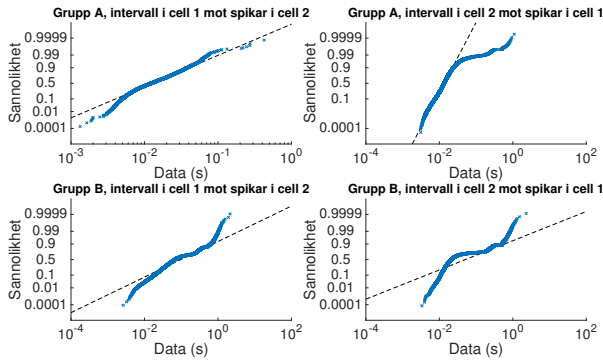


Figur 5. **I:** Nervcellernas spiktider. **II:** Lognormalfördelad spikintervallfördelning  $V2_{sim}$  simuleras med väntevärde och varians erhållit från V2. **III:** Intervall i V1 kategoriseras i grupp A och B utgående från jämförelse mot randomiserade intervalltider från  $V2_{sim}$ .

Från denna metod förväntas, vid en eventuell synaptisk koppling, erhållas två i förhållande till varandra något i x-led förskjutna histogram. Om cell 2 exempelvis har en inhiberande effekt på cell 1, kan histogrammet för grupp B förväntas vara förskjutet positivt i x-led. Om en situation som denna framkommer i dessa undersökningar kan man anta att man genom att behandla och analysera spiktidsdata på det sätt som beskrivs i denna rapport potentiellt kan identifiera synaptiska kopplingar mellan nervceller. Om koppling finns

bör man i histogrammen kunna se skillnad i medelvärde för intervalllängderna i A och B, vilket ger anledning att analysera datan med statistiska verktyg. Under projektet analyserades sju nervcellspar. För att skilja dessa åt namngavs de enligt grekiska alfabetet.

I modellen som använts för datan antogs intervallen i A och B vara lognormalfördelade (se figur 6) [8] vilket gjorde att vi valde två stycken olika test för att avgöra om grupp A och B tillhör samma fördelning. Nollhypotesen var således att A och B tillhör samma fördelning. De test som användes var ett tvåsamples Kolmogorov-Smirnovtest (KS-test) samt tvåsamples t-test. KS-testet jämför de kumulativa sannolikhetstäthetsfunktionerna för de båda fördelningarna och analyserar skillnaden mellan dessa. Begreppet "KS-stat" är ett mått på hur mycket dessa fördelningar maximalt skiljer sig åt från varandra i y-led. För t-test logaritmerades intervallerna först då t-test endast fungerar på normalfördelade populationer. Fördelen med KS-test är att vi inte behöver ta någon hänsyn till fördelningen av intervallen samt att den har svårare för att förkasta nollhypotesen än vad andra test har.



Figur 6. Data från cellpar Alfa uttritat i förhållande till sannolikheten att data är lognormalfördelat. I a och b är grupp A uttritat och i c och d är grupp B uttritat.

För att vidare undersöka om de två cellerna är oberoende tillämpades även en andra metod där medelvärdena för intervallen i grupp A och B studeras. I denna metod skapas först simulerade spiktidsfördelningar,  $V1_{sim}$  och  $V2_{sim}$ , genom att med återläggning dra värden från listorna med verkliga spiktidsintervall,  $V1$  och  $V2$ . Dessa sorteras sedan i grupp  $A_{sim}$  och grupp  $B_{sim}$  enligt figur 5. Denna simulering görs för att få fördelningar som kan antas vara helt oberoende och randomiserade. Detta görs för båda cellernas intervall varefter skillnaden i medelvärde för intervallen beräknas:

$$\Delta_{sim} = \bar{B}_{sim} - \bar{A}_{sim} \quad (1)$$

För att få tillförlitliga fördelningar repeteras processen 1 000-10 000 gånger. Alla dessa medelvärden ritas i ett histogram. Medelvärdesskillnaden för de verkliga spiktidsintervallen:

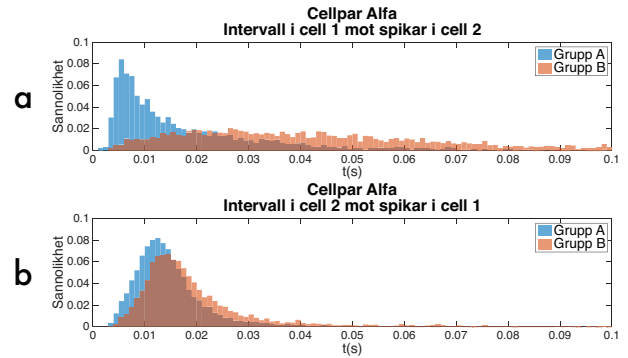
$$\Delta = \bar{B} - \bar{A} \quad (2)$$

samt 2,5 %- och 97,5 %-kvantilerna för de simulerade fördelningarna märks ut. I detta skede jämförs alltså  $\Delta$  mot fördelningen av alla  $\Delta_{sim}$ -värden. Nollhypotesen var således

att  $\Delta$  tillhör fördelningen  $\Delta_{sim}$ . Om nervcellerna är oberoende borde man inte statistiskt kunna skilja  $\Delta$  från  $\Delta_{sim}$ .

#### IV. RESULTAT

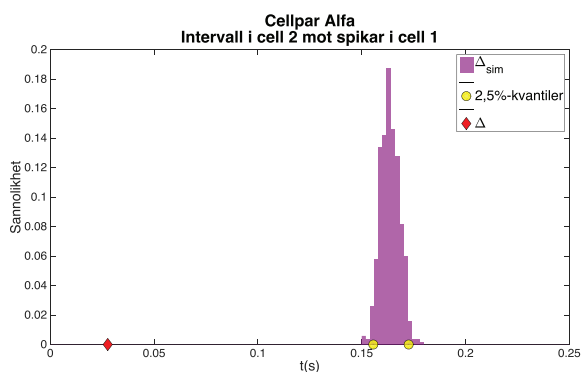
I figur 7 har grupp A och grupp B för cellpar Alfa plottats i samma histogram. Datat är simulerat från cellpar Alfa där det från cell 1 har registrerats 8 593 stimuliberoende spikar och från cell 2 registrerats 25 843 stimuliberoende spikar. Vad vi kan se är en tydlig förskjutning av B i förhållande till A, där A är utan spik i intervallet.



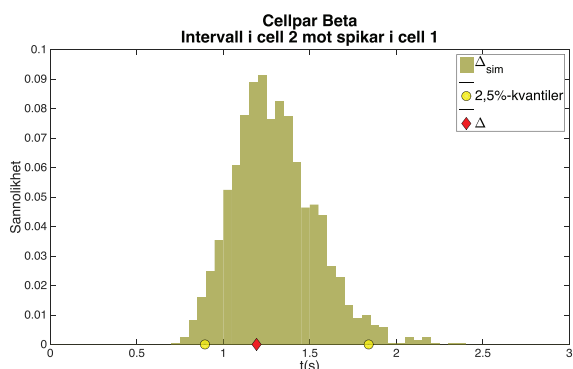
Figur 7. a. Intervallen i grupp B är mer jämt fördelade över hela tidsskalan. Intervallen i grupp A är tydligt kortare vilket ses av den tydliga blå toppen. Grupp A innehåller 2 689 intervall, grupp B innehåller 5 903 intervall b. Det är två tydliga toppar där grupp B är något mera förskjuten framåt i tidsled jämfört med grupp A. Det betyder att en spik i cell 1 förlänger intervallet mellan spikar i cell 2. Låg sannolikhet för längre intervall. Grupp A innehåller 19 006 intervall, grupp B innehåller 6 836 intervall.

I figur 8 är resultaten från de simulerade spiktidsintervallens medelvärden för cellpar Alfa uppritade. De simulerade spiktidsintervallen är skapade så att de kommer från oberoende fördelningar. Detta innebär att vid ett scenario där  $\Delta$  ligger inom kvantilerna för  $\Delta_{sim}$ -fördelningen, kan således A och B antas vara oberoende. I figur 8 är det tydligt att  $\Delta$  ligger långt utanför kvantilerna vilket tyder på att A och B inte är oberoende. I de fall där  $\Delta$  ligger inom kvantilerna kan nollhypotesen inte förkastas och således är A och B oberoende (se figur 9). För cellpar Beta är en större andel av intervalllängderna betydligt längre (se figur 10) än vad de är för cellpar Alfa (se figur 7). Dessa längre intervall ger upphov till en större variation av  $\Delta_{sim}$  för cellpar Beta (se figur 9) än för cellpar Alfa (se figur 8) vilket syns tydligt i avståndet mellan kvantilerna i respektive figur.

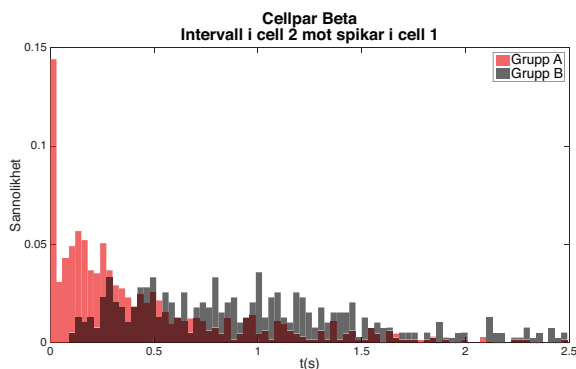
I figur 11 syns en förhöjd sannolikhet att ett visst intervall återkommer då en spik har inträffat. Samma fenomen är inte lika påtagligt om en spik inte inträffat. De intervallen är ca 200 - 400 ms långa och varierar för olika nervcellspar. Den förhöjda sannolikheten för dessa intervall gör att "svansarna" inte följer de teoretiska värdena för en lognormalfördelning (se figur 6).



Figur 8. Fördelningen för  $\Delta_{sim}$  är plottade i histogrammet med 2,5%-kvantilerna utritade samt  $\Delta$ .  $\Delta$  ligger tydligt utanför kvantilerna och nollhypotesen kan förkastas. Avståndet mellan kvantilerna är ca 0,015 sekunder.



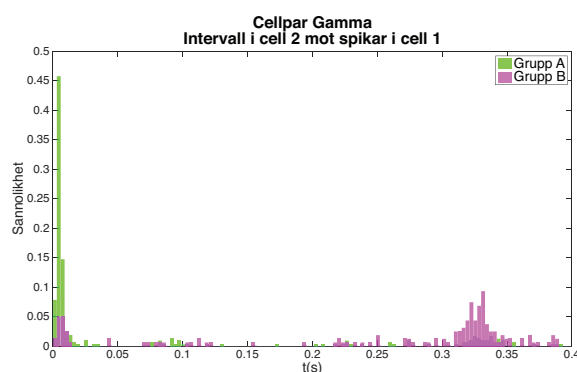
Figur 9.  $\Delta$  ligger inom kvantilerna; nollhypotesen kan ej förkastas och nervcellerna kan anses vara oberoende. Avståndet mellan kvantilerna är nästan 1 sekund.



Figur 10. Stor sannolikhet för långa intervall och långsam avklingning av de långa intervallen.

## V. DISKUSSION

Att data antas vara lognormalfördelad stämmer inte överens med den fördelning som data verkligen har. En stor anledning till det är att långa intervall förekommer i större utsträckning hos vissa cellpar än vad som skulle ingå i en förväntad lognormalfördelning av datan. Mer troligt är att antagandet om lognormalfördelning verkar stämma för spiktidsintervall



Figur 11. Fördelningen av intervall för cellpar Gamma har en förhöjd sannolikhet för intervall med längd i närheten av 330 ms. Detta ger upphov till skevhet i antagandet om lognormalfördelad data.

som är mindre än 50 ms men det varierar kraftigt för olika nervcellspår och viss data kan anses lognormalfördelat ända upp till ca 100 ms (se bilaga för sammanställning av data i tidsfönstret 100 ms). Eftersom det är kopplingen mellan nervcellsparet som studeras har en stor mängd data på tusentals spiktider i varje dataset varit viktigt för att få tillräckligt noggrann information om hur korrelerade de två nervcellerna är. Datamängden har varierat kraftigt mellan de olika försöken. Vid för få spikar i ett dataset har ingen signifikant bedömning av korrelationen mellan cellerna kunnat göras då de intressanta spikarna har varit för få. Ett datasets spikintervall inom det område som anses relevant vid undersökning av korrelation är ungefär mellan 0 och 50 ms. Slumpmässigt fördelade intervalltider i grupp B inom denna tidsperiod kan tolkas som att nervcellerna inte har någon korrelerad koppling. Detta på grund av att man i detta fall inte kan se någon tydlig effekt av spikar i den ena cellen på intervalltider i den andra cellen. Situationen kan vara så att cellerna i detta fall till exempel ligger på olika sidor om elektroden och således inte har någon direkt korrelerad koppling till varandra. I detta fall skulle cellernas individuella spiktidsfördelning (V1 och V2) se ut som de vore kopplade men inte visa sig vara sinsemellan korrelerade (jämför figur 4). Detta kan anses rimligt med tanke på att varje enskild nervcell tar emot synaptiska impulser från tusentals andra nervceller vars gemensamma input avgör om en spik ska avfyra eller inte.

Resultatet från det dataset som varit mest intressant visar en tydlig förskjutning framåt i tidsled för de intervall i cell 2 som påverkas av att cell 1 spikar (se figur 7b). Detta kan tolkas som att cell 1 har en inhibitorisk effekt på cell 2. Om man istället ser på hur intervalllängderna i cell 1 påverkas av spikar i cell 2 blir resultatet markant annorlunda. Som man kan se i figur 7a är de värdena i grupp B relativt jämnt fördelade över en längre tidsperiod. Vi kan dock med hjälp av de metoder som använts inte konstatera ett oberoende förhållande mellan cellerna. Av detta kan således tolkas att det i detta fall förefaller vara cell 1 som är presynaptisk till cell 2.

Att  $\Delta$  i figur 8 ligger till vänster om  $\Delta_{sim}$  innebär att den verkliga datan har mindre skillnad i medelvärde för intervalltiderna än vad den simulerade datan har. Även om

$\Delta$  är mindre än  $\Delta_{sim}$  kan man inte utgående från detta dra några slutsatser om styrkan hos kopplingen. Eftersom  $\Delta > 0$  indikerar detta fortfarande att nervcell 1 inhiberar nervcell 2 eftersom  $\bar{B}$  är större än  $\bar{A}$ . Metoden som används för att skapa figur 8 kan således endast användas för att avgöra om nervcellsparet är oberoende eller ej, och kan alltså inte ge något mått på styrkan i kopplingen. Anledningen till att den här metoden används är för att det kan vara svårt att med blotta ögat avgöra från histogram som i figur 10 om nervcellerna är oberoende.

De stora skillnaderna i datamängd och fördelning av intervalltider kan bero på hur mycket den ena nervcellen påverkar den andra. Som beskrivet i avsnittet bakgrund är det många parametrar som spelar in. En tolkning kan vara att om grupp A respektive B är lognormalfördelade med en viss förskjutning så ger storleken på förskjutningen ett mått på hur stark korrelationen är. En stor påverkan ger förstås en starkare korrelation eftersom signalen då med större sannolikhet överförs till den postsynaptiska cellen. En liten påverkan från den första cellen kan också vara anledningen till att lite data erhålls då en spik i den ena cellen inte ger särskilt stor effekt i den andra och att det är andra närliggande celler som påverkar mer om en spik ska initieras eller inte.

Slutligen så har vi inte kunnat påvisa någon exciterande effekt hos ett nervcellspär i något dataset. Det skulle kunna vara så att de sju nervcellspär vi har analyserat varit inhiberande alternativt inte kopplade. För att hitta exciteriska kopplingar hade vi således behövt data från fler nervcellspär samt fler och ännu mer utförliga metoder för undersökning av dessa.

## VI. SLUTSATSER

Genom att simulera oberoende spiktidsintervall tusentals gånger och jämföra dessa mot intervall från verklig data har en signifikant skillnad mellan nervcellernas intervallfördelning kunnat påvisas. Detta indikerar att det kan finnas en synaptisk koppling mellan nervcellerna i de nervcellspär som vi kan förkasta nollhypotesen för. Hur stark denna koppling är för varje nervcellspär har inte kunnat påvisas i någon större utsträckning då förskjutningen mellan intervallen inte är ett tillräckligt exakt mått.

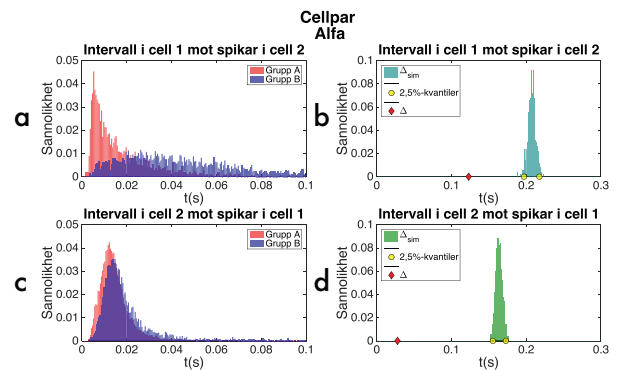
## VII. EFTERORD

Ett stort tack till våra handledare Henrik Jörntell och Johan Lindström som hjälp oss med utvecklingen av metoderna. Ett stort tack till Anton Spanne, doktorand på institutionen för experimentell medicin, för all den kombinerade kunskap inom neurofysiologi och statistik som du bidragit med till denna artikel. Ett stort tack även till Jonas Enander, doktorand på institutionen för experimentell medicin, för all data vi fått ta del av. Vi vill också tacka personalen på Stamstället för det goda kaffet, samt Sveriges klimatförhållanden för det dåliga vädret under hela maj månad. Även dessa faktorer har hjälpt oss slutföra detta arbete!

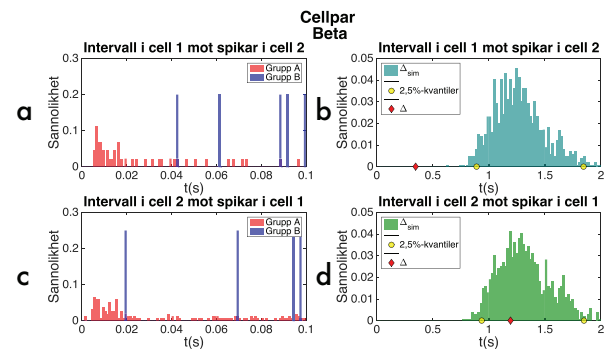
## BILAGA

Här är samtlig data samlad från de nervcellspär som har registrerats. Alla intervall längre än 100 millisekunder i figur

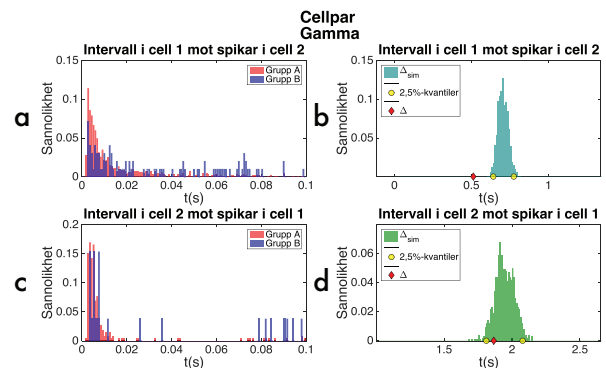
a. och figur c. för samtliga cellpar är borttagna. Detta för att lättare kunna åskådliggöra hur intervallfördelningen för varje cellpar ser ut i förhållande till de andra cellparen. För figur b. respektive figur d. har 1 000 simuleringar av  $\Delta_{sim}$  utförts.  $\Delta$  samt 2,5 %- och 97,5 %-kvantilerna har märkts ut i figurerna.



Figur 12. a. Grupp A innehåller 2 689 intervall, grupp B innehåller 5 903 intervall. c. Grupp A innehåller 19 006 intervall, grupp B innehåller 6 836 intervall.



Figur 13. a. Grupp A innehåller 44 intervall, grupp B innehåller 5 intervall. c. Grupp A innehåller 153 intervall, grupp B innehåller 4 intervall.



Figur 14. a. Grupp A innehåller 870 intervall, grupp B innehåller 111 intervall. c. Grupp A innehåller 246 intervall, grupp B innehåller 39 intervall.

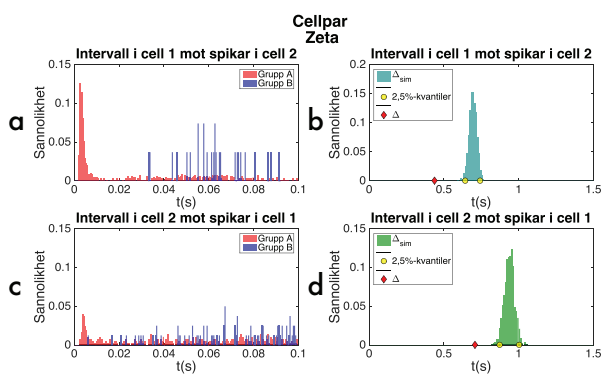


Figure 15. a. Grupp A innehåller 684 intervall, grupp B innehåller 26 intervall. c. Grupp A innehåller 378 intervall, grupp B innehåller 80 intervall.

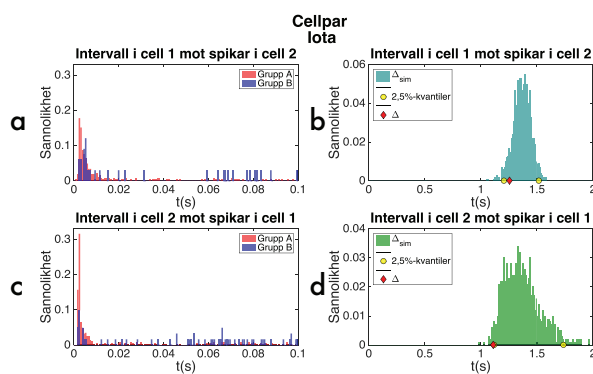


Figure 18. a. Grupp A innehåller 255 intervall, grupp B innehåller 42 intervall. c. Grupp A innehåller 476 intervall, grupp B innehåller 44 intervall.

## REFERENSER

- [1] E. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum, and A. J. Hudspeth, *Principles of neural science*, 5th ed. McGraw-Hill Professional, 2012.
- [2] Wikipedia user: Nrets, "Synapse illustration unlabeled," [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Synapse\\_Illustration\\_unlabeled.svg#/media/File:Synapse\\_Illustration\\_unlabeled.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Synapse_Illustration_unlabeled.svg#/media/File:Synapse_Illustration_unlabeled.svg), December 2009 (accessed 2015 maj 13).
- [3] H. C. Lai and L. Y. Jan, "The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels," *Nature Reviews Neuroscience*, vol. 7, pp. 548–562, Juli 2006.
- [4] B. Katz and R. Miledi, "Estimates of quantal content during 'chemical potentiation' of transmitter release," *The Royal Society Publishing*, vol. 205, no. 1160, Augusti 1979.
- [5] www.socialstyrelsen.se, "Demenssjukdomarnas samhällskostnader i sverige 2012," <http://www.socialstyrelsen.se/Lists/Artikelkatalog/Attachments/19444/2014-6-3.pdf>, juni 2014 (accessed mars 27).
- [6] K. S. Carlsson and U. Persson, "Sammanfattning av ihe-rapporten "kostnader för hjärt-kärlsjukdom år 2010"," [https://www.hjart-lungfonden.se/Documents/Rapporter/Sammanfattning\\_kostnader\\_hjart-karlsjukdom\\_2010.pdf](https://www.hjart-lungfonden.se/Documents/Rapporter/Sammanfattning_kostnader_hjart-karlsjukdom_2010.pdf), Februari 2012 (accessed 21 April 2015).
- [7] National Institute on Aging, "Alzheimer's disease, fact sheet," [http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/alzheimers\\_disease\\_fact\\_sheet\\_1.pdf](http://www.nia.nih.gov/sites/default/files/alzheimers_disease_fact_sheet_1.pdf), Juli 2011 (accessed 2015 mars 28).
- [8] A. Spanne, P. Geborek, F. Bengtsson, and H. Jörntell, "Spike generation estimated from stationary spike trains in a variety of neurons in vivo," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 8, no. 199, Juli 2014.

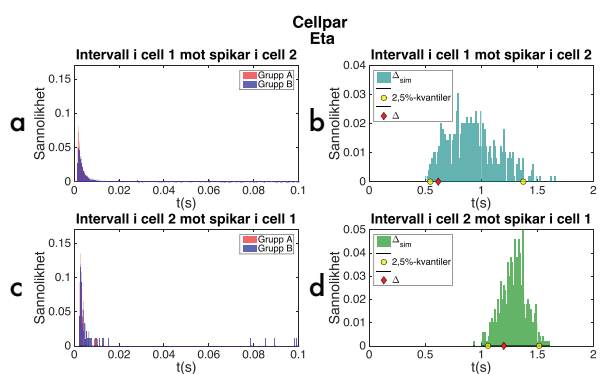


Figure 16. a. Grupp A innehåller 29 392 intervall, grupp B innehåller 1 626 intervall. c. Grupp A innehåller 98 intervall, grupp B innehåller 90 intervall.

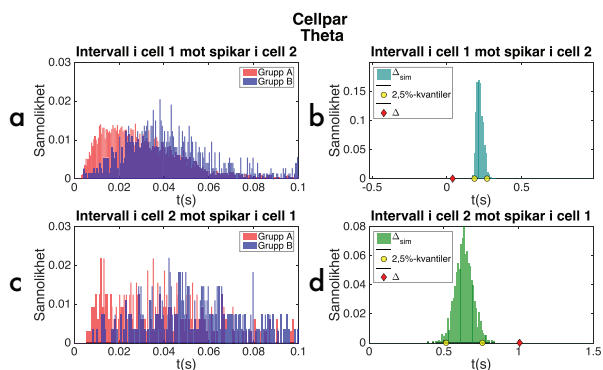


Figure 17. a. Grupp A innehåller 5 716 intervall, grupp B innehåller 778 intervall. c. Grupp A innehåller 326 intervall, grupp B innehåller 268 intervall.

# Microindentation on healing fractures: A comparison between healthy and osteoporotic bone

Johanna Bergman (BME12), Johan Åkesson (BME12)

**Abstract**—Osteoporotic fracture healing is a relatively unexplored field, but nevertheless fractures caused by osteoporosis is a growing problem with an aging population. When investigating the quality of newly formed bone during healing, bone geometry and density measurements together with three point bending is typically featured. Hardness of the newly formed bone is suggested as an additional perspective to evaluate the quality of the healing fractures and can be measured on a structural level using microindentation. There is however no standard for measuring hardness on bone using microindentation. The aim of this study was to establish a local protocol for microindentation on bone using the Knoop indenter. A possible difference in hardness between healthy and osteoporotic bone was investigated as well as if there is a difference in hardness between the newly formed callus bone and cortical bone. An open fracture model on rat femur was used on healthy and osteoporotic rats. The model of osteoporosis was an ovariectomized (OVX) rat model. The samples was embedded in plastic and cut in half by a diamond blade saw. Methods for improving the bone surface was investigated. The optimal load for the microindentation was examined and chosen as 25g. Hardness measurements was performed on the cortical bone and the callus on both the healthy and osteoporotic bone. Within the project, a protocol for successful measurements was established. The results indicate that the callus is softer than the cortical bone but no significant difference in hardness between the healthy and osteoporotic bone could be seen.

## I. INTRODUCTION

**O**STEOPOROSIS is a systemic skeletal disorder where decreased bone density and deteriorating microstructure of the bone increases the risk for fractures. However, low bone density alone does not correspond to high fracture risk. Bone quality factors such as mineralization of bone matrix, mineral content and crystallinity are some additional important factors when it comes to the fragility of bone. An aging population will also increase the prevalence of osteoporosis and thus lead to more fractures [1].

Fracture healing can be simplified into four general steps or stages (even if some overlap between these exists). Stage one is the inflammation phase which is caused by the soft tissue breaking, leading to activation of non-specific healing pathways and an immune response. Growth factors stimulates the migration of stem cells from the bone marrow into the fracture hematoma. Next step is the soft callus formation. This stabilizes the fracture site before the formation of hard callus, which is the third step. The stem cells differentiate, in

several steps, into osteoblasts. These replace the soft callus with the hard one. Finally, the last step is the remodeling phase. The callus volume shrinks and the bone fibers are optimally oriented. Other than being a little thicker, there will be no evidence that the bone sustained a fracture [2] [3]. Even if most fractures heal as described above, there are exceptions which do not heal without treatment, so-called nonunions. The gold standard is to treat these nonunion fractures with autograft bone from the iliac crest [4]. This implies two surgeries and therefore more suffering for the patient. Other treatments are under development [2]. To evaluate different treatments and determine their clinical feasibility, assessment of the bone quality and mechanical properties of the healed fractures are required.

Studies have shown that osteoporosis may also affect the fracture healing, but this field is still not sufficiently explored. A problem with studies that examine fracture healing in osteoporotic patients is that there can be no control group. Animal models for osteoporosis is therefore needed to further investigate osteoporotic fracture healing. If there is an altered healing process in osteoporotic bone, treatments may as well have different effect in healthy and osteoporotic patients. There is a need for further studies examining possible differences between healthy and osteoporotic fracture healing [5].

Fracture healing studies typically feature microCT and three point bending as standard techniques in determining the bone properties of healing fractures [6]. MicroCT provides information of the amount, density and microarchitecture and three point bending describes mechanical properties dependent on both geometry and structure of the bone. However, the quality of the newly formed bone in terms of its molecular composition and structure is also important for the total strength of the bone. Bone has a hierarchical structure in both micro and nano scale. The basic functional unit of compact bone is the osteon. Osteons consists of cylindrical lamellae and osteocytes oriented around the Haversian canal [3]. The lamellae is a calcified bone matrix mainly consisting of collagen fibrils and calcium phosphate hydroxyapatite [7]. Therefore, a method for measuring mechanical properties on a structural level locally on the bone is desirable as it contributes to an additional perspective on bone quality.

Hardness is a mechanical property that describes the materials resistance to plastic deformation. It is possible to measure hardness locally, the methods are easy and relatively inexpensive to implement. The bone can be kept intact and the only deformation will be small indents or scratches on the surface. One method for measuring hardness is microindentation. A small indenter is forced, by a given load during a specific time,

Submitted June 11, 2015

Mail: {mte12jbe@student.lu.se, mte12jak@student.lu.se}

Technical supervisors: Hanna Isaksson, Neashan Mathavan, Biomedical Engineering

Clinical supervisor: Magnus Tägil, Faculty of Medicine

into the surface of the material. There are primarily two types of indenters, the Vickers and Knoop [8]. The Vickers gives a symmetrical, diamond shaped, indentation while the indentation from the Knoop has one diagonal longer than the other. By measuring the longer diameter of the Knoop indentation or the mean diameter of the Vicker's, a hardness value can be calculated [8]. Microindentation has been performed on bone in some previous studies [9] [10] [11].

With microindentation, the micro hardness of the bone will be measured. There is a strong relationship between micro hardness and the mineralization of the bone. There is also a correlation between the organic matrix and the micro hardness [9].

There is no standard for measuring hardness on bone using microindentation. However, attempts have been made to assess the variations in hardness due to different parameters such as tissue condition, load and dwell time [10] [11]. Since there is no standard for those measurements it is difficult to compare hardness values from different studies. In addition the samples are prepared in different ways. Both Knoop and Vickers indenter has been used on bone in previous studies [7] [9] [10] [12] [13]. There is some indications that the Vickers indenter would be more suitable since bone is an anisotropic material [12].

In this study microindentation will be used to compare the hardness of newly formed bone with that of mature bone in healthy and osteoporotic rats. This will contribute to the relatively unexplored field of osteoporotic fracture healing. The aim is to develop a local protocol for sample preparation and micro hardness measurements on bone. Furthermore the aim is to investigate if there is a difference in hardness between healthy and osteoporotic bone and if there is a difference between the callus and the cortical bone.

## II. SAMPLES

Two groups of samples were used in this study (Table I). The control group consisted of femurs from 7 healthy rats and the OVX group consisted of 6 femurs from rats with induced osteoporosis.

TABLE I  
NUMBER OF SAMPLES USED.

| Group   |   |
|---------|---|
| Control | 7 |
| OVX     | 6 |

## III. METHOD

### *Experimental model*

The model of osteoporosis in this study is an ovariectomized (OVX) rat model. Sprague–Dawley rats were ovariectomized at 12 weeks of age or kept as controls. After additional 12 weeks an open fracture model, previously described by Tägil et al., was performed on the right femur of each rat [15]. With this model 50 % of untreated fractures in healthy rats heal after 6 weeks. The rats were sacrificed at the age of 30 weeks. The samples were a part of a larger study and previously

embedded in plastic and cut in half by a diamond blade saw (300, EXAKT) (Fig. 1).

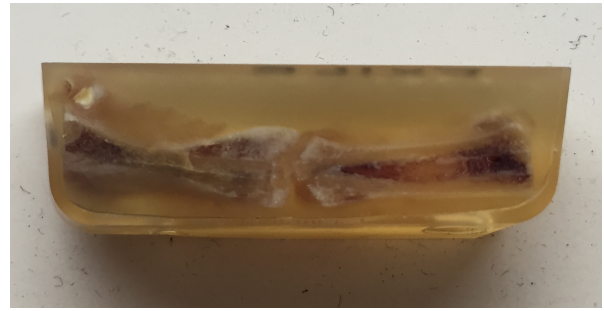


Fig. 1. Rat femur embedded in plastic

### *Preparation of samples*

A milling machine was used, on the plastic side, to make the samples parallel. The bone surface was polished with a lubricant (DP-Lubricant Red, Struers) using a polishing machine (LaboPol-5, Struers) and then placed in an ultra sound bath (1200, Branson) for 7 minutes.

### *Microindentation*

A microscope (DMRME, Leica) with an attached camera (DFC320, Leica) and microindenter (Leitz) (Fig. 2 and 3). Foremost due to practical reasons the Knoop indenter was used.

The diagonal of the indentations was measured manually using an image analyzing software (Leica QWin Standard v 3.1.0). The Knoop hardness number (HK) was calculated by the formula  $HK = 14.229P/l^2$ , where  $P$  is the applied load (kg) and  $l$  is the length of the longer diameter (mm). [8] The minimal distance between indentations was set to 3 times the diagonal of the indentation and the minimal distance to the border 2.5 diameters to avoid overlapping deformations and boundary effects [10].

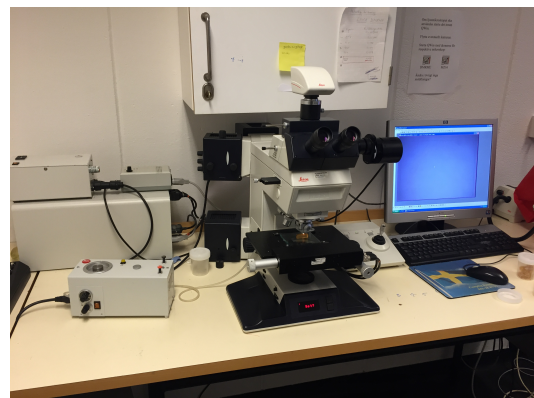


Fig. 2. The experimental setup. Microscope with attached camera and microindentation equipment.



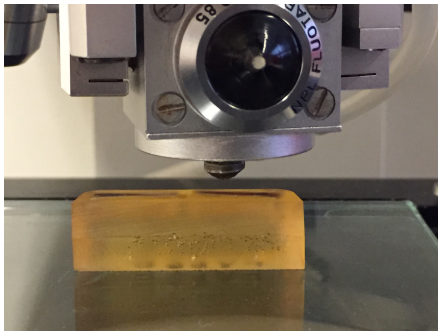


Fig. 3. Microindenter with sample

#### Initial measurements

Sandpapers of varying grit size (800, 1200 and 4000) were used in an attempt to improve the surface of the samples before the polishing. A visual check was then performed with a microscope (DMRME, Leica). Different methods, milling, sawing and grinding, for making the samples parallel were evaluated.

The initial measurements were performed on cortex far from the fracture site on one of the samples from the control group. The preparation on this sample was just polishing. A Knoop indenter was used with 15s dwell time. Different loads (10g, 25g, 50g) were tested to determine the most suitable load for further measurements. 10 indentations with each load was performed with a minimal distance between indentations of 3 times the longer diagonal. The longer diagonal was here parallel to the bone fibers. Different loads (10g, 25g) were then tested with the longer diagonal perpendicular to the bone fibers, the minimal distance was then 3 times the shorter diagonal. All 10 indentations was performed before measuring the diagonals.

#### Assessment of hardness

A Knoop indenter was used with 25g load and 15s dwell time. The total amount of measurements was 20 on each sample. Ten indentations was performed on the cortical bone and ten on the callus, five along the fiber direction and five perpendicular. The directions of the indentations was the same on both regions even though the fibers are disoriented in the callus. All measurements was performed directly after each indentation. A representative indentation can be seen in Fig. 4 and an example of indentation placement on callus is shown in Fig. 5.



Fig. 4. Representative indentation on cortical bone.

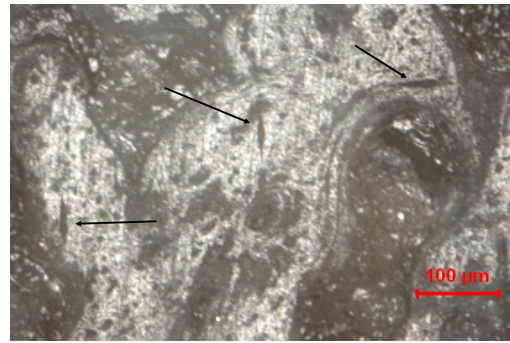


Fig. 5. Overview of callus with 3 indentations marked with arrows.

#### Statistical analysis

Since the number of samples in each group was low the non parametric Mann-Whitney U-test was used to compare the two groups (Control and OVX) and the Wilcoxon signed rank test was used to compare the hardness within the same group.

## IV. RESULTS

#### Initial measurements

TABLE II  
HARDNESS VALUES ( $kg/mm^2$ ) FROM THE INITIAL MEASUREMENTS  
PRESENTED AS MEAN  $\pm$  SD.

| Load and direction | Number of indentations | Hardness ( $kg/mm^2$ ) | CV(%) |
|--------------------|------------------------|------------------------|-------|
| 50g parallel       | 6                      | 71.2 $\pm$ 8.3         | 12.5  |
| 25g parallel       | 10                     | 76.8 $\pm$ 6.5         | 8.5   |
| 25g perpendicular  | 7                      | 97.8 $\pm$ 12.9        | 13.2  |
| 10g parallel       | 10                     | 70.0 $\pm$ 12.7        | 18.1  |
| 10g perpendicular  | 9                      | 81.5 $\pm$ 10.2        | 12.5  |

Although attempts were made to improve the surface roughness there was no improvement regardless of grit size. The most suitable method for making the samples parallel was using a milling machine.

Since all indentations with the same load (in the same direction) were performed before the measuring, there was no possibility to redo indentations that for some reason were difficult to measure. This explains why there is not always 10 measurements with each load in table II.

For the 50g load only 6 indentations were made since they became so big that the distance between the indentations were too long. There were, for the same reason, no indentations made in the perpendicular direction with this load. In addition, the bone looked crushed. Therefore, the 50g load was not used for further measurements.

The indentations from the 10g load was considered too small to perform accurate measurements.

Since the indentations from the 25g load were big enough to measure reliably but still could be fitted within a relatively small area, this load was chosen for further measurements.

TABLE III  
HARDNESS VALUES ( $kg/mm^2$ ) FROM THE CONTROL GROUP PRESENTED AS MEAN  $\pm$  SD

| Sample | Callus (parallel) | Cortical (parallel) | Callus (perpendicular) | Cortical (perpendicular) |
|--------|-------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| 1      | 68.1 $\pm$ 17.1   | 88.1 $\pm$ 7.5      | -                      | 122.3 $\pm$ 33.7         |
| 2      | 46.3 $\pm$ 9.2    | 74.2 $\pm$ 15.9     | 44.1 $\pm$ 5.0         | 108.9 $\pm$ 18.6         |
| 3      | 81.4 $\pm$ 4.4    | 85.1 $\pm$ 14.6     | -                      | 111.6 $\pm$ 13.3         |
| 4      | 59.4 $\pm$ 18.3   | 52.9 $\pm$ 7.6      | -                      | 83.6 $\pm$ 17.5          |
| 5      | 68.8 $\pm$ 23.3   | 90.1 $\pm$ 13.8     | 56.6 $\pm$ 16.6        | 94.6 $\pm$ 14.1          |
| 6      | 63.3 $\pm$ 8.2    | 63.3 $\pm$ 11.1     | 65.6 $\pm$ 26.3        | 76.7 $\pm$ 9.3           |

TABLE IV  
HARDNESS VALUES ( $kg/mm^2$ ) FROM THE OVX GROUP PRESENTED AS MEAN  $\pm$  SD

| Sample | Callus (parallel) | Cortical (parallel) | Callus (perpendicular) | Cortical (perpendicular) |
|--------|-------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|
| 7      | 58.9 $\pm$ 12.5   | 102.0 $\pm$ 9.0     | 39.8 $\pm$ 7.8         | 47.9 $\pm$ 5.6           |
| 8      | 76.9 $\pm$ 10.7   | 64.0 $\pm$ 16.5     | 37.4 $\pm$ 8.8         | 71.0 $\pm$ 22.6          |
| 9      | 46.4 $\pm$ 12.3   | 72.6 $\pm$ 15.7     | 60.8 $\pm$ 8.7         | 78.8 $\pm$ 14.4          |
| 10     | 61.7 $\pm$ 26.4   | 73.0 $\pm$ 8.7      | 54.9 $\pm$ 14.0        | 98.5 $\pm$ 16.5          |
| 11     | 57.1 $\pm$ 29.2   | 89.1 $\pm$ 14.0     | -                      | 87.0 $\pm$ 5.3           |
| 12     | 68.8 $\pm$ 28.6   | 80.3 $\pm$ 4.3      | 64.9 $\pm$ 40.5        | 75.3 $\pm$ 19.6          |

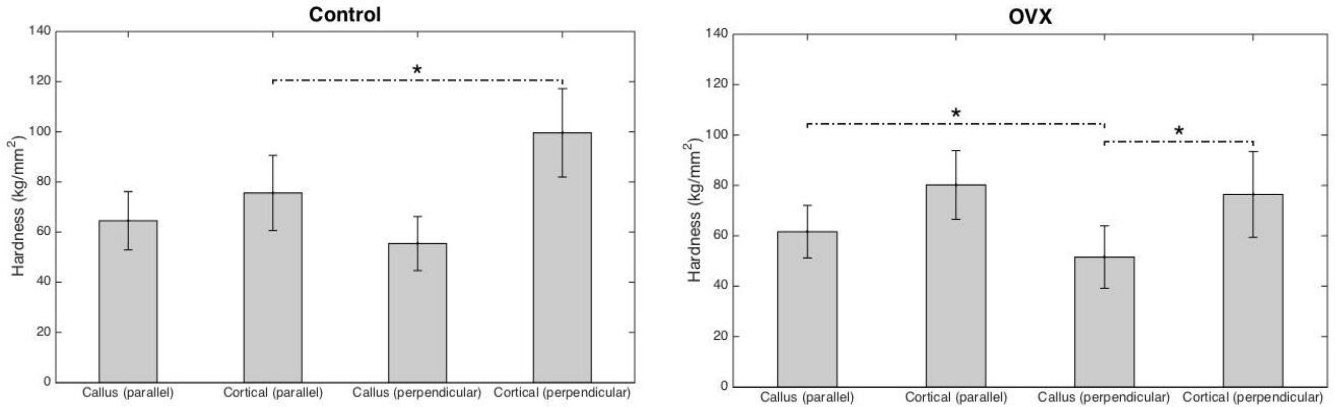


Fig. 6. Plot of mean hardness ( $\pm$  SD) in control (left) and OVX group (right). Significant difference in hardness ( $P < 0.05$ ) is marked with  $*$ . Note that callus perpendicular has fewer measurements in both control and OVX.

### Assessment of hardness

In table III and IV the mean hardness for each sample is presented. On three samples in the control group and one in the OVX group it was impossible to fit five indentations in the perpendicular direction on the callus.

No statistical significant ( $p < 0.05$ ) difference in hardness can be seen between the osteoporotic and healthy rats when comparing the callus hardness or the hardness of the cortical bone. The calluses in perpendicular direction were not compared since there were not enough values.

A significant difference in the hardness of the cortical bone in perpendicular and parallel direction can be seen in the control group but not in the OVX.

No significant difference can be shown when comparing the hardness of the callus and the cortical bone in the parallel direction in either of the groups.

A significant difference can be seen between the callus and cortex in perpendicular direction in the OVX group. Note that there was only 5 values from the callus (compared to 6) from the cortical bone.

In the control group there was not enough values to compare

the callus and cortex in perpendicular direction.

The results from the Wilcoxon signed rank test is summarised in Fig. 6.

### V. DISCUSSION

When measuring hardness with microindentation the sample preparation is critical. The surface needs to be smooth and the samples needs to be completely parallel (there can be no slope in any direction). If the samples are not parallel, there will be asymmetrical indentations. There was no improvement on the surface by using sandpaper of the chosen sizes. Instead, the already smooth diamond sawed surface got scratched. Maybe an even finer sandpaper or diamond paste would make the surface smoother, however the surface was considered smooth enough. A disadvantage by grinding the surface is that it was much harder to identify the different bone regions and even distinguish the bone from plastic. Bone is an inhomogeneous material and finding focus was sometimes difficult, especially on the callus. Since the measuring is performed manually in the software, finding focus is essential. It is possible that a smoother surface would simplify the focusing, but as

mentioned above there was some disadvantages, at least with the grinding method used in this study.

The biggest issue was to make the samples completely parallel. The samples were previously used in a larger study and therefore embedded in plastic, cut in half and of varying size. Since the bone surface was exposed on one side, there was just the plastic side to work with to make the samples parallel. Due to the different sizes of the samples it would be difficult to make a stance and grind them, the samples were also too small to fit properly in the saw that was available. The best option was then to use a milling machine. However, when using this method in future studies this issue could be partly avoided by sawing the samples two times. First to cut the bone in half and then, with the same settings without moving the sample, cut the plastic underneath the bone. This will automatically make half of the samples parallel.

When all indentations were performed before the measuring their size it was sometimes impossible to measure all indentations, for example due to imperfections on the surface. Therefore measuring should be performed directly after each indentation and thereby making it possible to redo indentations and ensure the required number of measurements.

A general rule for microindentation is that the larger indentation, the greater accuracy [7]. Therefore the 25g load was considered more suitable than the 10g load and the 50g load was rejected since the distance recommended (3 diagonals) between indentations became too long to keep all indentations within the same area. After all, the rat bone is small. The choice of 25g is also in line with the literature [9] [10].

There is a large standard deviation within each region. One explanation can be the inhomogeneous nature of the bone. Since the bone has a hierarchical structure with structures in both nano and micro scale it is possible that the hardness varies depending on which structure is indented [7]. Another contribution to the large standard deviation can be limitations in the method, in some measurements difficulties of finding focus may have influenced the result.

No significant difference can be seen between the hardness of the osteoporotic and healthy bones. Conversely, Boivin et. al did show a significant difference in hardness of human iliac bone from healthy and osteoporotic patients [9]. Since Boivin et. al used iliac bone from humans the contradictory results may indicate that the findings from the rat model can not be applied on humans. On the other hand, just as in human postmenopausal osteoporosis, the trabecular bone is more affected in comparison to the cortical in the rat model [16]. This can explain that there was no significant difference in hardness between the healthy and OVX group.

A significant difference in hardness can be seen between the cortical bone and the callus in perpendicular direction in the OVX group. It seems that the callus in this direction is softer than the cortical bone. Even though no significant difference can be seen in the other comparisons, the callus seems to be softer than the cortical bone.

This study is, as mentioned, a part of a larger study where different mechanical and structural analyses have been performed on the samples. Those results, that are soon to be published, shows no difference in composition between the

OVX and healthy bone. A significant difference has however been seen in composition between the callus and the cortex in both groups. Higher mineral plate density and greater heterogeneity has also been seen in the cortex compared to the callus. This is in line with the results from the microindentation

In addition the results indicate that there is a possible difference in hardness depending on the direction of the indenter. The bone seems to be harder in the perpendicular direction. Similar results can be found in a study by P. E Riches et. al. [17]. One explanation can be that the bone cracks in the fiber direction and thus leading to longer indentations. This is a finding that can not be detected with the Vickers indenter [17]. The possible direction dependence can be eliminated by cutting the bone in the transversal plane instead of longitudinal [13].

It is difficult to compare hardness values from different studies. Foremost dependent on the condition of the sample and the sample preparation. In addition there are only a few studies, to our knowledge, using the Knoop indenter. The results seems reasonable when comparing the hardness values in this study with the ones from P. E. Riches et. al. [17].

It was hard to fit in enough indentations on the callus, partly due to the size of the callus but also depending on the rougher surface. The Vickers indenter allows shorter distance between indentations and would thereby enable more measurements. Since it is not verified whether the Knoop or Vickers indenter is the most suitable for bone this is suggested for further investigations.

There are some other methods that can be used to measure hardness on bone. Nanoindentation is one method that has been used [18]. The method is similar to microindentation but in nanoscale. This method have some advantages since it is more accurate and it is possible to measure more mechanical properties than hardness, for example elastic and plastic properties [19]. However it is more expensive and time consuming than the microindentation. Another method that recently have begun to be used on bone is reference point indentation, this can be done without sample preparation and even in vivo. Since this method is relatively new the correlation to common mechanical properties are not fully evaluated [20].

### *Ethical aspects*

In this study using humans was no option, partly because of difficulties to get a homogeneous group and partly because no control group can be used. This implies a need for using animals.

The number of animals used in a study should always be as few as possible. Microindentation can be performed on samples that already are subjected to other tests. From an ethical point of view it is good to reuse samples since this does not require sacrifice of additional animals.

One option to avoid animal testing is to make computer simulations. However, to make simulations data is needed. Measuring of different parameters, such as hardness, can contribute to possible future simulations.

## VI. CONCLUSION

The aim of this study was to establish a local protocol for microindentation on bone and investigate if there is a difference in hardness between healthy and osteoporotic bone as well as if there is a difference in hardness between the callus and cortical bone.

It was found that sample preparation is critical when measuring hardness with microindentation. The surface needs to be smooth and the samples need to be completely parallel. In terms of load, 25g was found to be the most suitable for the current samples.

No significant difference in hardness could be seen between the healthy and osteoporotic bone, but the results indicate that the callus is softer than the cortical bone. This is in line with other findings in literature.

## VII. ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank our supervisors Hanna Isaksson and Neashan Mathavan for their guidance and encouragement through the project. We would also like to thank Mea Pelkonen and Zivorad Zivkovic for their help with the sample preparation. A great thanks to Srinivasan Iyengar and the division of Materials Engineering for letting us use the microindentation equipment and a special thanks to Hussein Sina and Kumar Babu Surreddi who helped us solve all practical problems with the micro indenter.

Both authors contributed equally to the project and report.

## REFERENCES

- [1] R. Bartl and B. Frisch, *Osteoporosis. Diagnosis, Prevention, Therapy. Second edition*. Heidelberg: Springer, 2004, 2009.
- [2] P. Bosemark, *Enhancing bone healing through concurrent anabolic- and anti- catabolic pharmacological treatment*. Lund: Media-Tryck, Lund University, 2014.
- [3] F. Martini and E. Bartholomew, *Essentials of Anatomy & Physiology*. Essex: Pearson Education, 2014
- [4] MK Sen, T. Miclau. Autologous iliac crest bone graft: Should it still be the gold standard for treating nonunions?, *Injury*, vol. 38, pp. 75–80, 2007.
- [5] P. Giannoudis, C. Tzioupis, T. Almalki, R. Buckley. Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different? A basic science perspective., *Injury*, vol. 38 pp 590–599, 2007.
- [6] N. Mathavan, P. Bosemark, H. Isaksson, M. Tägil. Investigating the synergistic efficacy of BMP-7 and zoledronate on bone allografts using an open rat osteotomy model, *Bone*, vol. 56, pp. 440 – 448, 2013
- [7] Y. H. An and R. A. Draughn, *Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface*. Florida: CRC Press, 2000.
- [8] W. Callister, Jr and D. Rethwisch, *Fundamentals of Materials Science and Engineering. An Integrated Approach*. John Wiley & Sons, 2008
- [9] G. Boivin, Y. Bala, A. Doublier, D. Farlay, L.G. Ste-Marie, P.J. Meunier, P.D. Delmas. The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients, *Bone*, vol. 38, pp. 532–538, 2008.
- [10] E. Dall'Ara, C. Öhman, M. Baleani, M. Viceconti. The effect of tissue condition and applied load on Vickers hardness of human trabecular bone, *Journal of Biomechanics*, vol. 40, pp. 3267–3270, 2007.
- [11] W. Johnson, A. Rapoff. Microindentations in bone: Hardness variation with five independent variables, *J Mater Sci: Mater Med*, vol. 18, pp. 591–597, 2007.
- [12] A. Vieira, R. Hancock, M. Dumitriu, M. Schwartz, H. Limeback, M. Grynpas. How Does Fluoride Affect Dentin Microhardness and Mineralization?, *Journal of Dental Research*, vol.10, pp. 951-957, 2005.
- [13] A. Rapoff, R. Rinaldi, J. Hotzman, D. Daegling. Elastic Modulus Variation in Mandibular Bone: A Microindentation Study of Macaca fascicularis, *American Journal of Physical Anthropology*, vol. 135, pp. 100-109, 2008.
- [14] N. Mathavan, M. J. Turunen, M. Tägil, H. Isaksson. Characterising Bone Material Composition and Structure in the Ovariectomized (OVX) Rat Model of Osteoporosis, *Calcified Tissue International*, April 2015.
- [15] M. Tägil, M. McDonald, A. Morse, L. Peacock, K. Mikulec, N. Amanat, C. Godfrey, D. Little. Intermittent PTH<sub>(1–34)</sub> does not increase union rates in open rat femoral fractures and exhibits attenuated anabolic effects compared to closed fractures, *Bone*, vol. 46, pp. 852-859, 2010.
- [16] D. N. Kalu. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss, *Bone and Mineral*, vol. 15, pp. 175-192, 1991.
- [17] P. E. Riches, N. M. Everitt, A. R. Heggie, D. S McNally. Microhardness Anisotropy of Lamellar Bone, *Journal of Biomechanics*, vol. 30, pp. 1059-1061, 1997.
- [18] H. Isaksson, S. Nagao, M. MaLkiewicz, P. Julkunen, R. Nowak, J. S. Jurvelin. Precision of nanoindentation protocols for measurement of viscoelasticity in cortical and trabecular bone, *Journal of Biomechanics*, vol. 43, pp. 2410-2417, 2010.
- [19] B. Bhushan, *Handbook of Nanotechnology*. Columbus: Springer 2007.
- [20] M. A. Gallant, D. M. Brown, J. M. Organ, M. R. Allen, D. B. Burr. Reference-point indentation correlates with bone toughness assessed using whole-bone traditional mechanical testing, *Bone*, vol. 53, pp. 301-305, 2013.

# Optogenetik inom epilepsi: Prototyputveckling av trådlös mikro-LED-stimulator

Sigrid Björnsdotter (BME12), Ebba Palenius (BME11)

**Sammanfattning**—Dagens behandlingsmetoder för epilepsi är ofullständiga och i behov av ett komplement. En metod som skulle kunna hjälpa många epilepsipatienter i framtiden är behandling med optogenetik. Optogenetik innebär stimulering av celler med hjälp av ljus och det är ett område där forskningen idag går snabbt framåt. I ett samarbete mellan Avdelningen för neurologi vid Biomedicinskt centrum i Lund och Politecnico di Milano tillverkades en trådlös mikro-LED-stimulator att användas i optogenetikförsök på möss. Tidigare har många framgångsrika försök gjorts på möss inom optogenetik på avdelningen i Lund men endast med fast utrustning. Visionen är att kunna använda en trådlös teknik som fungerar minst lika bra som fast utrustning. En trådlös teknik kan göra försök möjliga på vakna, fritt rörliga möss och ta forskningen närmare en metod som i framtiden kan användas på människor.

Syftet med arbetet var att testa mikro-LED-stimatoren *in vivo* och att hitta förbättringsmöjligheter hos stimulatoren. Känt sedan tidigare försök var att ljusöverföringen in till neuronerna i hjärnan inte var tillräckligt bra, detta framkom även i försök i detta arbete. Olika metoder testades för att förbättra ljusöverföringen och slutligen uppnåddes en förbättring på 250 % från de första försöken i detta arbete vilket är en avsevärd förbättring. Det finns dock fortfarande förbättringar att göra inom området.

## I. INTRODUKTION

**F**LER än 70 miljoner människor världen över lider idag av epilepsi. Epilepsi är en neurologisk sjukdom som innebär överaktivitet hos nervbanor i hjärnan. Nervcellerna reagerar mer än normalt på stimuli och cellernas excitabilitet ökar efter upprepade epileptiska anfall. Detta gör att epilepsipatienter ofta upplever en försämring över tid och att anfällen på sikt kan leda till svåra hjärnskador. Personer med epilepsi är en heterogen grupp med patienter med olika symptom och som kräver olika behandlingsmetoder [1]. Det finns idag två vanliga tillvägagångssätt för behandlingsmetoder inom epilepsi. Antingen ändras excitabiliteten på nervcellerna för att förhindra att de epileptiska anfällen bryter ut eller så används ett slutet system (closed-loop) som avbryter epileptiska anfall millisekunder efter att de brutit ut.

Många behandlas idag med anti-epileptiska läkemedel men svåra bieffekter och läkemedelsresistens är vanligt förekommande. En annan vanlig behandlingsmetod idag är kirurgi, vilket upp till 90 % av de behandlade patienterna blir hjälpta av. Alla former av epilepsi kan dock inte opereras bort vilket kan bero på att det epileptiska fokuset sitter svåråtkomligt,

att det är utspritt i flera olika områden i hjärnan eller att operationen skulle riskera att skada kognitiva förmågor [2].

Deep Brain Stimulation (DBS) och Vagus Nerve Stimulation (VNS) är idag alternativa behandlingsmetoder. DBS innebär att elektroder skickar ut elektriska impulser till epileptiskt påverkade delar av hjärnan. Elektroder opereras in i specifika områden av hjärnan och en implanterad pulsgenerator genererar kontinuerliga högfrekventa elektriska signaler [3]. VNS är en behandling som förhindrar epileptiska anfall genom elektrisk stimulering av vagusnerven i halsen. Nackdelen med DBS och VNS är att de inte är celltypspecifika [4].

En metod som skulle kunna hjälpa patienter som idag saknar behandling är optogenetik. Optogenetik innebär användning av optiska system för stimulering av celler som genetiskt har modifierats för att uttrycka ljuskänsliga jonkanaler, så kallade opsiner. Opsin kan föras in i neuronerna, med hjälp av till exempel virala vektorer, som sedan permanent uttrycker genen för jonkanalen. Cellerna blir känsliga för ljus med en specifik våglängd, men är annars opåverkade och fungerar normalt. Framgångsrik optogenetikforskning bedrivs om flera sjukdomar, till exempel Parkinsons sjukdom [2] och stimulering av hjärtmuskeln vid hjärtrymsrubbingar [5]. Intresset för optogenetik inom epilepsi har därför väckts. Forskningen är i ett tidigt skede men goda resultat från inledande djurstudier visar att det finns stora möjligheter inom området. En stor fördel med optogenetik som epilepsibehandling jämfört med många andra metoder är att den är celltypspecifik och därmed endast påverkar celler som har stor betydelse vid epileptiska anfall. Den kognitiva förmågan riskeras inte att permanent påverkas då ingen vävnad tas bort eller skadas under behandlingen, den enda risken är att hjärnvävnad kan skadas vid den inledande operationen.

Temporallobsepilepsi är den vanligaste formen av sjukdomen och mycket optogenetikforskning bedrivs inom området [1]. Forskningen har gått ut på att tysta hyperaktiva neuron och resulterat i att epileptiska anfall har kunnat avbrytas med hjälp av ljus. Till exempel har försök gjorts på möss som uttryckt opsinet Channelrhodopsin-2 (ChR2) i interneuron, en nervcellstyp som minskar andra neuroners aktivitet. ChR2 är en katjonkanal som öppnas av blått ljus inom millisekunder vilket ger upphov till att neuronet depolariseras och därmed kan avge aktionspotentialer. När interneuron således aktiveras optogenetiskt kan de avbryta pågående anfall genom att hämma närliggande hyperaktiva neuron i det epileptiska fokuset [2]. På detta sätt har framgångsrika slutna system tagits fram för användning på möss. Systemen har detekterat epileptiska anfall i realtid med elektroencefalografi (EEG) och då skickat ut ljus som aktiverat opsinet i neuronerna [6].

Inlämnat den 24 juni 2015

E-mejladress: mte12sbj@student.lu.se, mte11epa@student.lu.se

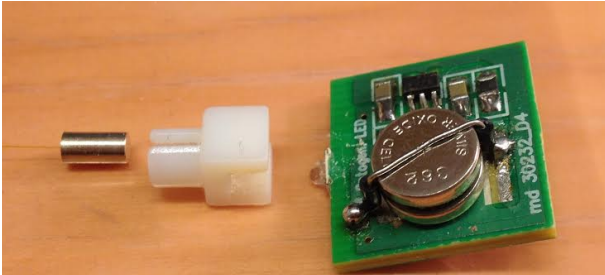
Handledare: Merab Kokaia, Professor

Avdelningen för neurologi, Lunds universitet.

Handledare: Fredrik Berglind, doktorand

Avdelningen för neurologi, Lunds universitet

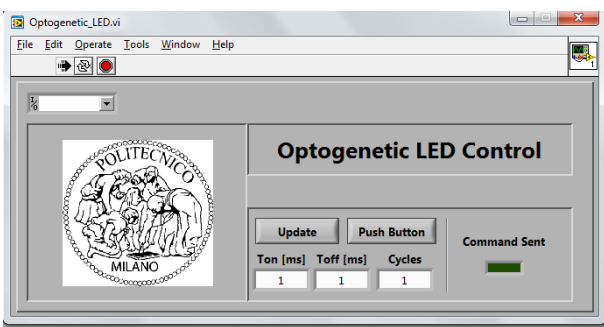
Målet inom området idag är att ta fram en fungerande trådlös teknik som avbryter epileptiska anfall med minst lika goda resultat som i tidigare försök med fast utrustning. Fördelar med en trådlös stimulator är djurens rörelsefrihet och att de inte behöver påverkas precis innan försöken, vilket ger mer tillförlitliga resultat [7]. För detta ändamål har forskare vid Politecnico di Milano i ett examensarbete tagit fram en trådlös mikro-LED-stimulator [8], se Figur 1. Stimulatorn gjordes i samarbete med Lunds Universitet och skickades till Avdelningen för neurologi i Lund efter examensarbetets avslutande.



Figur 1. Trådlös mikro-LED-stimulator (till höger i bild) med adapter (i mitten) och optisk fiber med tillhörande metallhylsa (till vänster).

Den trådlösa mikro-LED-stimulatorn är en liten enhet tänkt att fästas på en muskalle. Syftet med enheten är att skicka ut pulser av blått ljus för att påverka opsinet i nervcellerna.

Mikro-LED-stimulatorn består av en lysdiod som drivs av två seriekopplade silveroxidknappceller. Lysdiodens specifikationer finns i Tabell I. Stimulatorn har en mottagare för infraröd strålning. Mottagaren gör att enheten kan triggas med en extern fjärrkontroll att sända ut ljuspulser. Fjärrkontrollen kan användas manuellt med en knapp eller via ett specialanpassat datorprogram (Optogenetic\_LED). I programmet kan tre parametrar för ljuspulserna regleras. Parametrarna är tid då ljuset är påslaget ( $T_{on}$ ), tid då ljuset är avstängt ( $T_{off}$ ) och antal cykler (Cycles), se Figur 2. Ljuset leds från lysdioden till målcellerna via en optisk fiber. Den optiska fibern har en metallhylsa som är fäst i lysdioden på mikro-LED-stimulatorn med hjälp av en avtagbar adapter i plast som syns i Figur 1.



Figur 2. Gränssnitt för datorprogrammet Optogenetic\_LED.

Tidigare försök med mikro-LED-stimulatorn har resulterat i en ljusöverföring från lysdiod till optisk fiber på endast 1,97 %. Den optiska fibern var i dessa försök 100  $\mu\text{m}$  i diameter

[8]. Det visar på stora förluster i kontakten mellan lysdioden och fibern.

Detta arbete har två syften. Det ena syftet är att för första gången testa den trådlösa mikro-LED-stimulatorn *in vivo* och jämföra resultaten mellan den och fast utrustning. Målet med *in vivo*-testet är att se om ett epileptiskt anfall kan simuleras hos en sövd mus vid användning av den trådlösa stimulatorn för ökade kunskaper om hjärnans reaktion. Det andra syftet är prototyputveckling av mikro-LED-stimulatorn genom att förbättra ljusöverföringen mellan LED och optisk fiber.

I denna rapport redovisas försök som syftar till att ta reda på förbättringsmöjligheter av den trådlösa mikro-LED-stimulatorn och utifrån resultaten vidareutveckla den. Sist i rapporten diskuteras resultaten från *in vivo*-testet och vilka förbättringar som gjorts med ljusöverföringen.

Optogenetik kan vara lösningen för de epilepsipatienter som idag saknar behandling. Det som diskuteras i denna rapport är ett steg i den teknikutveckling som behövs för att leda epilepsiforskningen inom optogenetik framåt.

Tabell I  
SPECIFIKATION FÖR LED

|                   |                           |
|-------------------|---------------------------|
| Tillverkare       | OSRAM Opto Semiconductors |
| Modell            | LB-N91E                   |
| Typ               | SMD                       |
| Dimensioner       | 3,2 mm x 1,6 mm x 1,85 mm |
| Våglängd          | 470 nm                    |
| LED-färg          | Blå                       |
| Ström             | 20 mA                     |
| Framsänning       | 3,4 V                     |
| Utsändningsvinkel | 20°                       |

## II. METOD

### Förstudie

För att påbörja arbetet med förbättring av den trådlösa mikro-LED-stimulatorn krävdes litteraturstudier. Artiklarna som lästes behandlade epilepsi samt optogenetik. En del av artiklarna hittades via sökmotorn LUB Search medan andra erhöles från handledare Fredrik Berglind.

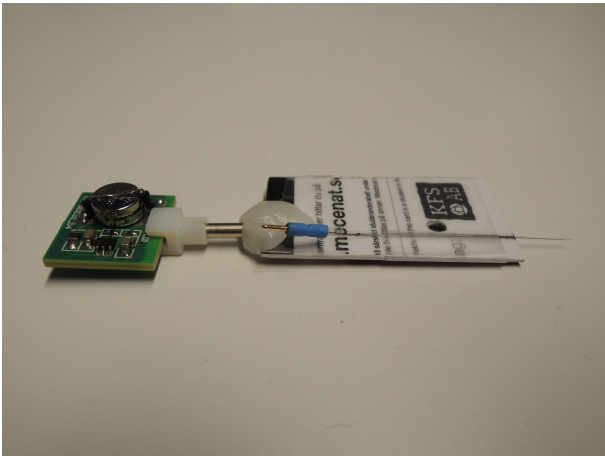
En intervju med Stefan Andersson-Engels (Professor, Institutionen för fysik, Lunds tekniska högskola) gjordes för att få mer kunskap om brister hos den trådlösa mikro-LED-stimulatorn samt genomförbara förbättringar.

### *In vivo*-test

Två delförsök gjordes, ett med den fasta utrustningen och ett med den trådlösa mikro-LED-stimulatorn. Försöket med den fasta utrustningen gjordes för att uppmäta referenser inför försöket med mikro-LED-stimulatorn.

Inför *in vivo*-testet krävdes en del förberedelser då det inte tidigare gjorts några försök på djur med den trådlösa mikro-LED-stimulatorn. Optroder, var och en bestående av en optisk fiber med metallhylsa (200  $\mu\text{m}$ , Doric Lenses) och en metallektrod i volfram (TM21A10, World Precision Instruments), tillverkades och klistrades på ett plastkort. Kort

och metallhylsa sattes ihop med plastmassan Coolmorph (Bl-tronics) för stabilitet, se Figur 3. Två stycken tillverkades utifall fel skulle uppstå, dessa kallades optrod A och optrod B. Elektroden fästes vid den optiska fibern, så att dess spets nådde 0,7 mm längre ner än fiberns, för att vid försöken registrera signaler från neuronerna.



Figur 3. En av optroderna hopsatt med adaptorn och den trådlösa mikro-LED-stimulatorn.

Optroderna fästes på en plexiglashållare för att passa försöksuppställningen. En skåra i plexiglashållaren frästes ut för att hålla fibern och elektroden på plats. Förutom fibern med metallhylsa används i delförsöket med den fasta utrustningen en optisk fiber (200  $\mu\text{m}$ , FT200EMT, Thorlabs) med FC/PC kontakter för koppling från trådad LED. Detta *in vivo*-test gjordes på sövd mus och därför användes plastkort och plexiglashållare i försöksuppställningen. I senare försök på vakna möss kommer uppställningen att se annorlunda ut då försök endast gjordes på sövd mus i detta arbete.

En transgen mus som uttrycker ChR2 främst i primära neuron sövdes. Skallen fixerades med justerbara skruvar. En tryckmätare placerades under musen för att kontinuerligt mäta andningsfrekvensen och därmed hur djupt sövd musen var. Musens reflexer testades och när ingen reaktion skedde ansågs dosen sömnmedel vara på en bra nivå. Lokalbedövning injicerades under huden ovanför skallen. Huden skars upp längs skallen med en skalpell och drogs åt sidorna. Väteperoxid användes för att lösa upp de hinnor som ligger ovanför skallbenet. Referenspunkter togs på skallbenet för att säkerställa att huvudet var fixerat rakt och platt inför försöken. Ett hål borrades i skallbenet rakt ovanför den del av hjärnan där mätningarna skulle genomföras.

Försök gjordes med den fasta LED-utrustningen (463 nm, maxeffekt 25 mW, Prizmatix). Ljuseffekten vid försöket var 2,3 mW. En av optroderna sattes ihop med lysdioden från den fasta utrustningen och fördes systematiskt ner i hjärnan till ett djup på 2,2 mm där tydlig hjärnaktivitet syntes. Ljuspulser (250 ms pulslängd) och pulståg (10 Hz, 5 ms pulslängd, 15 s) sändes genom den optiska fibern och elektroden uppmätte neuronens svar. Svaret skickades som en signal genom en förstärkare (DP-311, Harvard Apparatus) där den förstärktes 10 gånger och bandpassfilterades 0,1 Hz – 3 kHz. Signalen

digitaliserades av en PowerLab 4/35 (ADInstruments) vid 10 000 samplningar/sekund och visades på en datorskärm i programmet LabChart (ADInstruments). En Faraday bur stod runt uppställningen under försöket för att blockera elektromagnetisk strålning från omgivningen.

Den fasta utrustningen byttes mot den trådlösa mikro-LED-stimulatorn, se uppställning i Figur 3. Samma optrod användes, endast ljuskällan byttes ut. Bytet ledde till små förflyttningar av optroden och vid studie av neuronens aktivitet konstaterades att skador uppkommit. Optroden flyttades därför till en oskadad punkt i hjärnan. Försök genomfördes i den nya punkten på samma sätt som med den fasta utrustningen.

På datorskärmen visades, vid de båda delförsöken, tre kurvor. En visade musens andningsfrekvens och de två resterande visade signalen från elektroden. Den ena signalen hölls ofiltrerad och den andra högpasfilterades vid 250 Hz. Framförallt studerades den ofiltrerade signalen som avspeglade den lokala fältpotentialen, det vill säga sammanlagd aktivitet hos större populationer av neuron. Den filtrerade signalen representerar multi-unit aktivitet (MUA) vilket innebär aktionspotentialer från mindre grupper av neuron.

### Förbättring av ljusöverföring

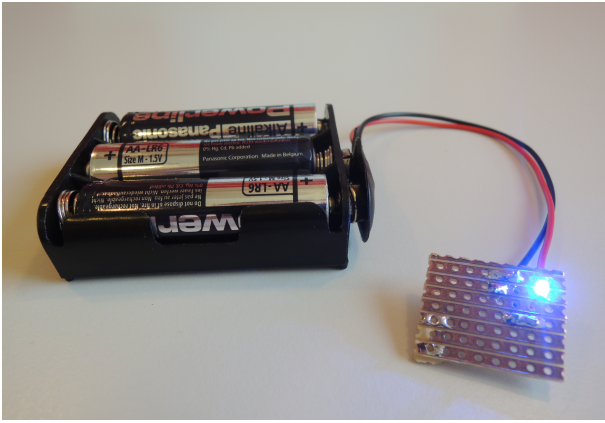
1) *Effektmätning nummer ett:* Effektmätningar gjordes med en handhållen effektmätare (Newport Corporation, 1916-C, Irvine, CA, USA). Lysdiodens uteffekt uppmättes som ett referensvärde och för att jämföra med tidigare resultat [8]. Dioden kopplades med adapter till optisk fiber på optrod A och optrod B och mätningar gjordes. Även en obearbetad optisk fiber testades för att avgöra om skador uppkommit på optroderna. Liknande mätningar gjordes sedan utan adaptorn för att studera dess påverkan på ljusöverföringen mellan lysdioden och den optiska fibern. Vid dessa mätningar hölls lysdioden i direktkontakt med de optiska fibrerna och ljuspulser sändes ut. Lysdioden flyttades systematiskt för att kontrollera den maximala effekten som kunde uppmätas.

2) *Förbättringsarbete:* Ett antal lysdioder, likadana som den på den trådlösa mikro-LED-stimulatorn, köptes in för att genomföra försök på. Den trådlösa mikro-LED-stimulatorn finns endast i ett exemplar och därför gjordes inte förändringar på den. Utifrån intervjun med Stefan Andersson-Engels och vetenskapen om mycket dålig ljusöverföring påbörjades arbetet med en anordning för närmre kontakt mellan lysdiod och optisk fiber. Detta gjordes genom att borra ett hål för fibern i lysdiodens kåpa.

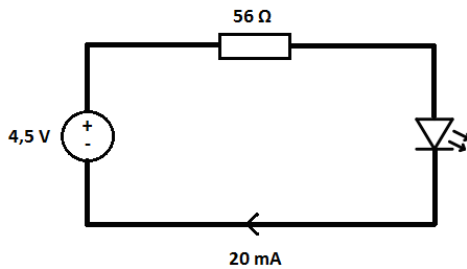
Elektrotekniska föreningen vid Lunds tekniska högskola (ETF) kontaktades för hjälp med strömförsörjning till de nyinköpta lysdioderna. ETF bidrog med kunskaper om elektronik samt tillhandahållande av elektriska komponenter. En referensrets bestående av en lysdiod, en resistor och en batterihållare för tre AA-batterier byggdes, se Figur 4. Kretsschema återfinns i Figur 5

En effektmätning av referensretsen gjordes för att jämföras med effekten hos mikro-LED-stimulatorn. Effektmätningen gjordes för att ha en referens till mätningarna då den optiska fibern var närmare ljuskällan.

Två lysdioder borrades med ett djup av 0,5 mm respektive 1,1 mm. Två ytterligare dioder borrades med 1,2 mm men des-



Figur 4. Bild på referenskretsen.



Figur 5. Kretsschema över referenskretsen.

sa fanns sedan defekta. Hålen gjordes med en borrar (Performance Micro Tool, TR-2-0120-BN) i en tredimensionell Computer Numerical Control-maskin (CNC-maskin) (Solectro, ICP4030, Eichenzell, Germany). Alla hål hade en diameter på  $200\ \mu\text{m}$ . Borrningen gjordes av Axel Tojo (forskningsingenjör, Institutionen för Biomedicinsk teknik, Lunds tekniska högskola).

3) *Effektmätning nummer två*: Effektmätningar gjordes på lysdioderna med borrarade hål. En lång optisk fiber ( $200\ \mu\text{m}$ , Thorlabs) kapades till flera stycken med passande längd. För att få fina snittytor användes en diamantpenna (Thorlabs). I de borrarade hålen fördes optisk fiber in och flertalet mätningar gjordes. Vid mätning med  $1,1\ \text{mm}$  djupt hål klistrades den optiska fibern fast i hålet på grund av svårigheter att hålla fibern på plats (Precision Super Glue, Loctite). Mätningar gjordes med olika fibrer för att uppmäta så tillförlitliga resultat som möjligt. Försöksuppställningen var inte optimal men tillräckligt bra för att uppmäta skillnader och se förbättringar.

### III. RESULTAT

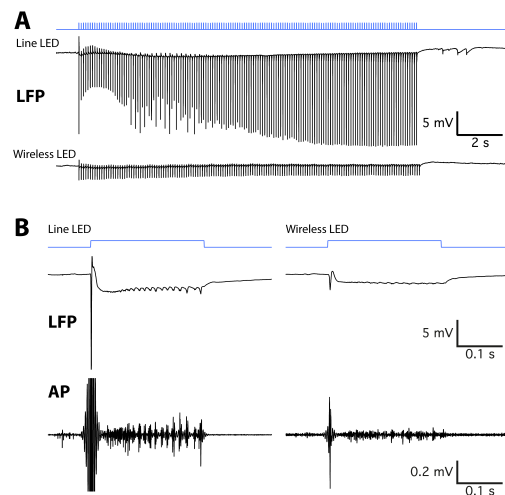
#### Förstudie

Intervjun med Stefan Andersson-Engels resulterade i förslag angående förbättring av ljusöverföring mellan den trådlösa mikro-LED-stimulatorn och den optiska fibern. Första förslaget var att använda en konvex lins eller gradientlins för att samla ljuset. Det andra förslaget, som gick ut på att klistra fast den optiska fibern i ett borrarat hål, var det som genomfördes.

#### *In vivo*-test

Se kurvor från *in vivo*-testet i Figur 6. När neuronerna stimulerades med en lång puls exciterades alla celler vilket genererade spiken med hög amplitud (Figur 6B). Steady state uppnåddes på grund av aktivitetsberoende deaktivering av ChR2-kanalen. Dessutom syns att nervcellerna synkroniserades i ett cykliskt mönster. Detta skedde både vid användning av den fasta utrustningen och vid användning av den trådlösa, fast med betydligt lägre spikamplitud och steady state-nivå i det senare fallet.

Vid stimulering av cellerna med ett pulståg med den fasta utrustningen kan den första spiken ses ha högre amplitud än de efterföljande (Figur 6A) vilket beror på samma mekanism som ger steady state-depolarisering vid lång puls. Spikarna minskade i amplitud och en bølge uppstod sedan då inhiberingen i vävnaden inte klarade av att kompensera för den påtvingade aktiveringen och fler primära neuron rekruterades till aktiviteten. Efter pulståget syns ytterligare en spontan urladdning (afterdischarge) då många celler genom den igångsatta nätverksaktiviteten återigen exciterades utan att någon ljuspuls sändes in. Därefter gick vävnaden in i en refraktärperiod och ingen aktivitet kunde studeras. Även vid pulstågsstimulering med den trådlösa mikro-LED-stimulatorn hade den första pulsen högre amplitud än de efterföljande. Därefter minskade amplituden efterhand och visade inte det bølgeformade mönster som vid försöket med den fasta utrustningen. Efter detta pulståg uppstod en refraktärperiod men däremot ingen ytterligare excitering av celler utan de återgick direkt tillbaka till spontan aktivitet. För värden från *in vivo*-testet, se Tabell II.



Figur 6. Resultat från försök på mus. **A** visar resultat från försök med pulståg och **B** visar resultat från försök med en puls. Kurvor markerade med Line LED visar resultat med den fasta utrustningen och kurvor markerade med Wireless LED visar resultat med mikro-LED-stimulatorn. Kurvor markerade med LFP är den ofiltrerade signalen och kurvor markerade med AP är den högpassfilterade. Blå kurvor visar det stimuli som gavs genom fibern.



Tabell II  
RESULTAT FRÅN FÖRSÖK PÅ MUS

|                             | Amplitud för fast utrustning [mV] | Amplitud för trådlös mikro-LED-stimulator [mV] |
|-----------------------------|-----------------------------------|--|
| <b>Försök med en puls</b>   |                                   |  |
| Maxvärde                    | 14,8                              | 2,9  |
| Medelvärde plåtå efter puls | 3                                 | 1,3  |
| <b>Försök med pulståg</b>   |                                   |  |
| Puls 1                      | 18                                | 3  |
| Medelvärde puls 2-50        | 11                                | 2,5  |
| Medelvärde puls 51-100      | 16                                | 2,3  |
| Medelvärde puls 101-150     | 19                                | 2,3  |

### Förbättring av ljusöverföring

1) *Effektmätning nummer ett:* Uteffekten från mikro-LED-stimulatorns lysdiod uppmättes till 5,3 mW. Övriga resultat från effektmätningen visas i Tabell III. Vid användning av adaptorn uppkom ljusöverföringen endast till 1 %. I tabellen kan det utläsas att ljusöverföringen blev högst med den oarbetade optiska fibern. I försöken där adaptorn användes blev resultaten betydligt sämre än de försök där lysdioden hölls direkt mot fiberns metallhylsa. Under mätningen framkom att positionen för lysdioden i förhållande till den optiska fibern har en stor betydelse. En liten förflyttning i sidled ledde till stor minskning av effekten som överfördes till optiska fibern.

Tabell III  
RESULTAT FRÅN EFFEKTMÄTNING NUMMER ETT

|                 | Uppmätt effekt med adapter [ $\mu$ W] (Procentuell transmission) | Uppmätt effekt utan adapter [ $\mu$ W] (Procentuell transmission) |
|-----------------|--|---|
| Ny optisk fiber | 55 (1.0)   | 80 (1.5)  |
| Optrod A        | 51 (1.0)   | 69 (1.3)  |
| Optrod B        | 39 (0.7)   | 50 (0.9)  |

2) *Förbättringsarbete:* Effektmätningen av referenskretsen som byggdes i samarbete med ETF uppgick till 9,0 mW vilket är en betydligt högre effekt än vad som uppnåddes med den trådlösa mikro-LED-stimulatorn. Resultaten efter inborring kunde därför endast användas för att studera den procentuella förbättringen av ljusöverföringen.

3) *Effektmätning nummer två:* Värderna från mätningen med optisk fiber i borrarade lysdioder kan ses i Tabell IV. Resultaten visar att ljusöverföringen från LED till optisk fiber maximalt uppnår 316  $\mu$ W vilket är cirka 3,5 % av referenskretsens totala effekt.

## IV. DISKUSSION

### *In vivo*-test

*In vivo*-testet gjordes innan förbättring av ljusöverföringen mellan lysdiod och optisk fiber hade genomförts och effekten

Tabell IV  
RESULTAT FRÅN EFFEKTMÄTNING NUMMER TVÅ

|                                 | Uppmätt effekt [ $\mu$ W] (Procentuell transmission) |
|---------------------------------|--|
| Endast LED                      | 9000   |
| Optisk fiber i 0,5 mm djupt hål | 213 (2.4)  |
| Optisk fiber i 1,1 mm djupt hål | 316 (3.5)  |

ut från den optiska fibern var endast cirka 55  $\mu$ W (1 % av uteffekten från lysdioden). Genom att studera signalerna i Figur 6 kan det konstateras att svaret från cellerna då de stimulerades med den trådlösa mikro-LED-stimulatorn var betydligt lägre än när de stimulerades med den fasta utrustningen, men högre än förväntat med tanke på skillnaden i effekt. En anledning kan vara att maxintensiteten för att inte skada levande vävnad användes i delförsöket med den fasta utrustningen. Det var troligen ett överflöd av ljus och aktiverad vävnad i förhållande till räckvidden på den inspelade fältpotentialen. Utanför elektrodens detektionsområde skedde ingen mätning och eventuell reaktion på stimulering i detta område uppmättes därmed ej.

Att mikro-LED-stimulatorn gav värden över förväntan visar på att den har stor potential men eftersom stimuleringen av cellerna inte gav tillräckligt hög amplitud för att kunna efterlikna den fasta utrustningen eller uppvisa en bågformad struktur under pulståget finns det fortfarande ett behov av bättre ljusöverföring. Anledningen till utebliven bågform i Figur 6A är att inhiberingen i vävnaden klarade av att kompensera för den ökade aktiveringen.

Vid användning av den fasta utrustningen syntes en period av excitationer (afterdischarges) en tid efter att ljuspulserna hade upphört, vilket inte syntes vid användningen av mikro-LED-stimulatorn. Excitationerna skedde troligen eftersom cellerna "programmerats" att rytmiskt avfyra aktionspotentialer och deras excitabilitet hade ökat. Dessa excitationer visar en modell av ett epileptiskt anfall och är därför önskvärda i försöken. De ger en större kunskap om hur cellerna reagerar vid anfall vilket kan vara till hjälp vid framtagandet av nya behandlingsmetoder. Den trådlösa mikro-LED-stimulatorn trigger inte cellerna tillräckligt för att skapa afterdischarges vid dessa få pulståg men upprepade stimuleringar hade eventuellt lett till detta. Det bör påpekas att *in vivo*-testet utfördes på nedsövt djur, och anestesi har negativ inverkan på nervcellers excitabilitet. I vakna djur är det möjligt att man inte måste öka ljusstyrkan så mycket mer för att ändå uppnå tillräcklig respons.

Musen i *in vivo*-testet hade ChR2 uttryckt i stor andel av neuronerna och därmed även i interneuronerna. Detta gör att även motreaktionen till neuronens excitation ökar vid stimulering med ljus. Hade inte detta varit fallet hade troligen en större reaktion kunnat uppnås.

*Felkällor:* Innan *in vivo*-testet skadades elektroden i optroden genom att spetsen böjdes. Elektroden var väldigt känslig och skadan gav sannolikt sämre resultat i mätningarna. Goda inspelningar samlades in men det går inte att utesluta att bättre resultat hade kunnat uppnås med en oskadad elektrod.

Vid användning av den trådlösa mikro-LED-stimulatorn var avståndet mellan den optiska fiberns och elektrodens spets (0,7 mm) beräknat utifrån försök med den fasta utrustningen. När den trådlösa mikro-LED-stimulatorn användes var effekten lägre och därmed blev avståndet ljuset färdades i vävnaden kortare. Detta kan ha gjort att alla signaler från de påverkade neuronerna inte nådde fram till elektroden och att svaren som detekterades blev lägre.

På grund av att vissa neuron skadades vid bytet mellan den fasta och den trådlösa utrustningen gjordes de två delförsöken i *in vivo*-testet i olika punkter i hjärnan. Inga exakta jämförelser kan göras utifrån resultaten med de olika utrustningarna men skillnader kan diskuteras.

Med största sannolikhet hade ljusöverföringen varit för dålig även om felkällorna undvikits. För att erhålla bättre resultat krävs att ljusöverföringen mellan lysdiod och optisk fiber förbättras.

### Förbättring av ljusöverföring

I tidigare försök i Milano uppmättes ljusöverföringen till 1,97 % från mikro-LED-stimulatorn till en optisk fiber. Fibern var då 100  $\mu\text{m}$  i diameter [8]. I detta arbete gjordes mätningar med en fiber med diametern 200  $\mu\text{m}$  vilket borde genererat resultat med högre ljusöverföring. Detta var inte fallet utan mätningar med liknande uppställning, i detta arbete, gav snarare lägre överföring, cirka 1 %, vilket var en motivation till att utföra prototyputveckling i form av förbättring av ljusöverföringen. De mest framgångsrika resultaten uppmättes vid inbörning av den optiska fibern i lysdiodens kåpa på den referensrets som togs fram. Ljusöverföringen uppgick då i 3,5 % av diodens emitterade effekt. De förbättringar som gjorts visar att ljusöverföringen kan bli ungefär 250 % bättre om denna metod används på den trådlösa mikro-LED-stimulatorn. Detta visar att den trådlösa mikro-LED-stimulatorn potentiellt skulle kunna ge en effekt på knappt 190  $\mu\text{W}$  om en optisk fiber förs in genom kåpan och klistras fast. En stor fördel med att föra in den optiska fibern i kåpan är att den optiska fibern vid varje försök hamnar rakt framför ljuskällan. Vid *Effektmätning nummer två* konstaterades det att djupare hål gav bättre ljusöverföring vilket är rimligt eftersom fibern kom närmare ljuskällan och mindre ljus hann spridas.

Det hade varit intressant att se resultatet av *in vivo*-testet om det gjorts efter prototyputvecklingen eftersom det antagligen genererat bättre resultat. Ljusöverföringen hade antagligen fortfarande inte varit tillräcklig för att få goda resultat. Enligt handledare Fredrik Berglind hade det varit önskvärt att få en ljusöverföring på minst 20 % vilket visar att vidare arbete behöver göras och att utformningen av mikro-LED-stimulatorn behöver ändras. Det finns flera tillvägagångssätt och ett förslag är att använda en annan typ av lysdiod än den som användes i dessa försök då det är svårt att optimera ljusöverföringen med den befintliga. Ett annat förslag är att skärma av ljuset bättre för att på så sätt rikta mer ljus in i fibern.

När börningen i lysdiodernas kåpor gjordes visade det sig att de som hade borrhål med ett djup på 1,2 mm inte längre fungerade. Eftersom två stycken gjordes med det djupet med samma resultat drogs slutsatsen att borrhålet kom för nära

elektroniken och därmed förstörde den. Lysdioden med ett håldjup på 1,1 mm fungerade och användes därför i försöken.

Vid intervjun med Stefan Andersson-Engels gavs förslag på att använda konvex lins och att använda gradientlins. Förslaget med konvex lins har ett problem då avstånden i musens hjärna är väldigt små och lins med tillräckligt kort brännvidd finns inte. Om mer tid funnits hade det varit mycket intressant att försöka förbättra ljusöverföringen med hjälp av en gradientlins och sedan jämföra dessa resultat med de resultat som erhöles i *Effektmätning nummer två*, se Tabell IV.

*Felkällor:* En anledning till att ljusöverföringen i *Effektmätning nummer ett* blev lägre än vid liknande försök på Politecnico di Milano kan bero på att adaptorn blev större och lösare ju mer den användes på grund av att plasten var för mjuk. Det var svårt att veta om ljuset riktades rakt igenom adaptorn mot fibern. Utifrån effektmätningarna har det framkommit att positionen av LED i förhållande till optisk fiber är väldigt viktig. På grund av detta är den lösa adaptorn som används på den trådlösa mikro-LED-stimulatorn inte optimal. Vid mätningarna hamnade adaptorn ofta ur position vilket påverkade ljusöverföringen. Dessutom försämrade adaptorn direktkontakten mellan lysdiod och fiber vilket ledde till sämre resultat. Mätningen utan adapter i *Effektmätning nummer ett*, där lysdioden hölls direkt mot fibermynningen, visade att bättre ljusöverföring och därmed högre effekt ur optiska fibern hade varit möjlig med en bättre adapter.

Effektmätningarna hade behövt göras mer systematiskt då positionen av LED och optisk fiber spelade stor roll. I mätningarna flyttades fiber i förhållande till lysdiod för hand och därmed var det svårt att få exakta mätningar av maximal ljusöverföring. Resultaten i rapporten ger dock en antydning om vilka resultat som kan uppnås med denna metod.

### Hållbar Utveckling

Optogenetik är en metod som är värd att satsa på och som kommer att växa i framtiden. En anledning till det är att det är bra ur ett hållbart perspektiv. Patienter kan potentiellt övergå från läkemedelsbehandling till en behandling med optogenetik vilket bidrar till en minskad konsumtion av läkemedel som i sin tur leder till att mindre mängd miljöfarligt avfall kommer ut i naturen. Batterierna som används i den trådlösa mikro-LED-stimulatorn innehåller 0 % kvicksilver. Mikro-LED-stimulatorn kommer vara en del i ett slutet system som endast reagerar på epileptiska anfall när de bryter ut. Dioden kommer alltså endast vara igång en kort tid vid ett anfall vilket leder till en mycket effektiv användning av batterierna.

### Etik

Syftet med *in vivo*-testet i denna rapport var att se vilken reaktion som kunde fås med den trådlösa mikro-LED-stimulatorn och jämföra den med de resultat som kunde uppnås med den fasta utrustningen. Testet är inte etiskt försvarbart ur alla perspektiv då det innan testet fanns vetskap om att ljusöverföringen var dålig och en misstanke om att tillräckligt bra resultat inte skulle uppnås. Ur ett etiskt perspektiv hade det varit bra att vänta med *in vivo*-testet till dess att ljusöverföringen hade förbättrats.

## V. SLUTSATSER

*In vivo*-testet gjordes på en mus och resultaten var lovande. Signalerna från delförsöket med den trådlösa mikro-LED-stimulatoren blev som väntat lägre än med den fasta utrustningen men försöket visade att stimulatoren har stor potential. I detta arbete har tester gjorts som visar på vad som behöver förbättras med den trådlösa mikro-LED-stimulatoren. Ljusöverföringen mellan LED och optisk fiber var från början inte optimal och för att förbättra detta integrerades optisk fiber och lysdiod till en enhet. Detta gjordes för att säkerställa att de vid framtida försök sitter i linje med varandra och att så mycket som möjligt av ljuset leds in i fibern. Ljusöverföringen kunde förbättras avsevärt med denna metod. Önskvärt är dock att ljusöverföringen in i den optiska fibern uppgår till 20 % av vad som emitteras från lysdioden vilket innebär att det fortfarande finns ett behov av förbättringar.

Det återstår en hel del arbete innan metoden kan användas kliniskt men sett till resultaten och de förbättringar som redan gjorts finns det stora möjligheter inom området i framtiden.

## VI. EFTERORD

Vi vill tacka professor Stefan Andersson-Engels för hans deltagande i vår intervju. Vidare vill tacka Elektrotekniska föreningen vid Lunds tekniska högskola för att de hjälpte oss att tillverka en elektrisk krets. Vi vill även tacka forskningsingenjör Axel Tojo för att han hjälpte oss att borra hål i lysdioder. Slutligen vill vi rikta ett stort tack till vår handledare Fredrik Berglind för hans stöd genom hela arbetets gång. Författarna till rapporten har genomfört allt arbete tillsammans.

## REFERENSER

- [1] P. Landazuri. "Mesial Temporal Lobe Epilepsy: A Distinct Electroclinical Subtype of Temporal Lobe Epilepsy" *ASET*, vol. 54, pp. 274–288, 2014.
- [2] J. N. Bentley, C. Chestek, W. C. Stacey, P. G. Patil. "Optogenetics in epilepsy" *Neurosurg Focus*, vol. 34, issue 6, juni 2013.
- [3] M. Altinay, E. Estemalik, D. A. Malone Jr. "A Comprehensive Review of the Use of Deep Brain Stimulation (DBS) in Treatment of Psychiatric and Headache Disorders" *American Headache Society*, Headache, pp. 345–350, februari 2015.
- [4] S. C. Schachter, J. I. Sirven, Epilepsy Foundation, 2013 *Vagus Nerve Stimulation (VNS)*, [Online], Tillgänglig: <http://www.epilepsy.com/learn/treating-seizures-and-epilepsy/devices/vagus-nerve-stimulation-vns> [Hämtad 24 april 2015]
- [5] P. M. Boylea, T. V. Karathanosa, N. A. Trayanova. "Beauty is a light in the heart": The transformative potential of optogenetics for clinical applications in cardiovascular medicine" *Trends in Cardiovascular Medicine*, vol. 25, issue 2, pp. 82–83, februari 2015.
- [6] C. Armstrong, E. Krook-Magnuson, M. Oijala, I. Soltesz. "Closed-loop optogenetic intervention in mice" *Nature Protocols*, vol. 8, issue 8, pp. 1475–1493, augusti 2013.
- [7] C. T. Wentz, J. G. Bernstein, P. Monahan, A. Guerra, A. Rodriguez, E. S. Boyden. "A wirelessly powered and controlled device for optical neural control of freely-behaving animals" *Journal of Neural Engineering*, vol. 8, issue 4, 2011.
- [8] G. Boso, G. Ferrari, M. Sampietro. "Wireless LED-based Stimulation System for Optogenetic Experiments on Freely Moving Animals", *Description and User Manual*, Politecnico di Milano, Scuola di Ingegneria dell'Informazione Dipartimento di Elettronica e Informazione.

# Screening av maligna melanom med hjälp av infraröd avsökning över hudområden

Anders Persson (BME-11)

**Sammanfattning**—Syftet med det här projektet var att undersöka möjligheterna för att utveckla nya screening-metoder på hudkliniker. Cancer är en sjukdom som drabbar en stor del av befolkningen, och av all cancer har hudcancer högst prevalens.

Genom att utveckla nya screening-metoder för dessa kan förhoppningsvis sjukhusen spara in pengar, samtidigt som patienter slipper gå och oroa sig för biopsi-svar som kan ta flera veckor.

Alla typer av hudcancer inkluderades i studien.

Första målet med studien var att titta på maligna melanom i första hand, eftersom det är den hudcancer-typ som lättast metastaserar och sprider sig i kroppen. Slutligen inkorporerades alla typer av hudcancer. Även om maligna melanom är den typ som enklast metastaserar så är det bra att upptäcka alla potentiellt maligna hudförändringar och ta bort dessa via operation eller skrapning.

Resultaten pekar på att det kan finnas ett mönster hos maligna hudförändringar, men problem under mätning och analys gör det svårt att dra konkreta slutsatser. Därför bör ytterligare studier genomföras på en större population, för att undersöka signifikansen i mönstret.

## I. INTRODUKTION

**C**ANCER drabbar en stor del av världens befolkning. År 2012 rapporterades 14 miljoner nya fall samt 8.2 miljoner avlidna i någon form av cancer i världen. Det är dock en typ av sjukdom som inte kan placeras under den enkla kategorin "cancer" då det finns ett flertal olika typer. Hade cancer räknats som *en* sjukdom så hade det varit den största orsaken till dödsfall i världen. Den vanligaste cancer-typen med flest nya fall per år är hudcancer, i.e. maligna melanom, basalcellscancer, skivepitelcancer. [1]

2–3 miljoner icke-melanoma hudcancerfall upptäcks globalt varje år, varav majoriteten är basalcellscancer, basaliom. Fördelen med basaliom är att den sällan sprider sig till andra delar av kroppen. Därför förs ingen statistik på den i Sverige och vissa andra länder. Den uppkommer vanligen som en hudfärgad knuta, fläckrodnad eller ett sår som inte läker. Se Figur 1.

Skivepitelcancer ingår i de 2–3 miljoner icke-melanoma hudcancerfallen nämnda ovan men står för en markant lägre andel. Cancertypen uppstår i princip endast på exponerade hudytor, exempelvis kal hjässa, handrygg eller



Figur 1. Från vänster ses två basaliom och en skivepitelcancer.

nacke. Skivepitelcancer har två stadier med olika utseende, det första drabbar endast det översta hudlagret, skivepitelen, och liknar där en rodnad eller ett sår. Steg två uppstår när canceren har tagit sig ned ytterligare ett lager i huden, till dermis, och kallas då för *invasiv* skivepitelcancer.

Maligna melanom är mer ovanliga. Det är också den farligaste typen av hudcancer, detta då det är den mest troliga att metastasera sig i kroppen, alltså sprida cancer-celler till andra delar av kroppen där de fäster och bildar dottertumörer. Malignt melanom uppstår genom att huden utsätts för UV-strålning, detta leder till DNA-skador som i vissa fall inte repareras inom celler, när detta får ske kan en okontrollerad cell-delning uppstå – en cancer. Maligna melanom ses oftast som en oregelbunden leverfläck med varierande andra definierande drag, exempelvis utstickande, kliande, färgskiftande eller näst intill svart. För samtliga hudcancertyper rekommenderas ett läkarbesök om en patient har upptäckt nya hudförändringar, sår som inte läker samt nya oregelbundna leverfläckar.

När en patient har ett misstänkt malignt melanom så blir de undersökta av en läkare med ett dermatoskop, det vill säga en handhållen enhet med förstoringsglas och lampa inbyggt. Tycker läkaren att det ser malignt ut så opereras både hudförändringen och en del omkringliggande vävnad bort. Vid misstanke för malignt melanom görs även ofta en lymfnodsundersökning för att se om canceren har metastaserat, skulle denna undersökning visa på metastaser i lymfkörtlarna undersöks andra delar av kroppen. [2]

I dagsläget finns det ingen konkret forskning som stödjer användandet av termografiska metoder för att detektera cancer i något stadie. Dock finns det företag och hemsidor som påstår sig kunna göra detta utan vetenskaplig grund, främst inom bröstcancerundersökningar, något som FDA har varnat för i USA. [3] Däremot används *near-infrared*, det vill säga ljus precis utanför det infraröda området, inom ett flertal medicinska områden såsom pulsoxymetri, hjärntumörsvisualisering samt som behandlingsmetod mot olika former av cancer i samband med fotokänsliga nano-

Inlämnat den 25 juni 2015

Emailadress: mte11ape@student.lu.se

Handledare: Stefan Andersson-Engels, LU Medical Laser Centre

Handledare Axis: Thomas Winzell, AXIS Communications AB [10]

Handledare SUS: Överläkare Niels Bendsøe, Hudkliniken SUS

partiklar eller antikroppar. [4] [5] [6]

Det finns idag ingen termografisk screeningmetod för cancer. Vad som finns är studier och forskning baserade på cancercellers metabolism. Cancerceller växer näst intill okontrollerat och har därför en högre metabolism, något som är väl känt inom cancerforskningen och redan används terapeutiskt i behandlingar genom att utnyttja cancercellens "vilja" att absorbera näringsämnen för att växa ytterligare. [7] Vad som orsakar den ökade metabolismen och hur man bör behandla patienter undersöks fortfarande. [8]

I denna studien undersöks om man kan använda denna metaboliska skillnad i cellerna för att detektera hudcancer i ett tidigare stadiet. Teorin som undersöks är om man kan upptäcka en svag termisk energiskillnad mellan friska celler, alltså naevus eller leverfläck som det oftare kallas, och de cancerogena celler som uppstår i exempelvis ett malignt melanom. Metoden är non-invasiv och tar under 30 sekunder för att genomföra på en misstänkt fläck. I slutändan skulle denna förstudie kunna leda till en självscreeningsmekanik där alla har möjligheten att undersöka en fläck de är oroliga över.

För varje patient som kan diagnosteras med denna metod sparar sjukhusen in pengar. När sedan proverna skickas iväg kan svar ta upp till sju veckor, något som är väldigt prövande för patienterna, således är en snabb och effektiv - och framförallt säker, metod önskvärd.

I den här rapporten presenteras data som samlats in under två dagars kliniska undersökningar på patienter som besökt hudkliniken för konsultation eller operation. Dessa patienter har haft olika typer av carcinom och en del av dessa har varit bekräftade eller obekräftade.

## II. DATA

Alla bilder, analyser och slutsatser är baserade på de patienter som anges i Tabell I. Frågor som ofta ställs till cancerpatienter, gällande saker såsom rökning och hur mycket tid de spenderar i solen har inte använts under undersökningen då det relevanta för studien var redan existerande hudförändringar och inte förebyggande metoder.

Tabell I  
INSAMLAD STATISTIK

|            | Antal |
|------------|-------|
| MM         | 1     |
| BCC        | 8     |
| SEC        | 1     |
| Bekräftade | 6     |

Tabell I. MM är maligna melanom, BCC är basalcancer, SEC är skivepitelscancer och bekräftade är antalet av dessa ovanstående som blivit bekräftade som maligna.

## III. METOD

### A. Intervjuer, samtal & litteratur

I det inledande stadiet av studien intervjuades såväl slutanvändare som teknikutvecklare för att bygga en marknadsbild. Vidare utfördes även en litteraturstudie berörande den nuvarande användningen av termografiska metoder inom medicin.

### B. Etisk prövning

Eftersom studien involverade känslig patientdata behövdes en etisk prövning. En tidigare godkänd studie med liknande förutsättningar fanns, och kunde användas inom detta projekt.

### C. Förberedelser

Syftet med undersökningen var att ta reda på huruvida maligna melanom kunde detekteras via non-invasiv fotografering med termografisk utrustning. För att genomföra detta lånades utrustning av Axis Communications AB och patienter med misstänka hudförändringar tillhandahölls av hudspecialistavdelningen på Lunds Universitetssjukhus.

Inför påbörjade undersökningar behövdes en mall för hur det hela skulle gå till finnas för att enkelt protokollföra alla händelser och lätt kunna referera bilder till patienter, samtidigt som det inte skulle vara enkelt att härleda undersökningarna eller bilderna till en viss patient. Detta förbereddes i två steg; i det första steget skrevs en helt anonym protokollmall där endast "patientnummer", kön för statistikförande, klockslag fotografierna togs samt antalet bilder som togs under undersökningen antecknades, se Figur 2. Nästa steg var att hålla två olika journaler för varje patientundersökning. Där ena journalen endast innehöll lokalisering av den misstänkta hudförändringen, patientnummer och kön. Den andra journalen, ansedd att användas av den kliniske handledaren innehöll all information som behövdes för att härleda informationen i protokollmallen till en eventuell diagnos genom flera steg. Detta för att skydda samtliga patienters integritet.

|                         |              |
|-------------------------|--------------|
| <b>Patient:</b>         | [nr]         |
| <b>Typ:</b>             | [BCC/SEC/MM] |
| <b>Multiples:</b>       | [J/N]        |
| <b>Sex:</b>             | [M/FM]       |
| <b>Confirmed:</b>       | [Y/N]        |
| <b>Time:</b>            | [dd/hh/mm]   |
| <b>Nr. Of pictures:</b> | [nr]         |

Figur 2. Protokollmallen vid experimentellt utförande vars syfte var att hjälpa till med statistikförande av patienter samt lägga ytterligare ett steg mellan fotografi och patient-igenkännande.

#### D. Experimentellt utförande

Den experimentella uppställningen bestod av en laptop, en strömenhet och omkopplare för kameran, samt en värmekamera. Fotografierna togs på samma avstånd från patienten under alla försök, se Figur 3. Utöver detta fanns även en live-feed från kameran uppvisad på laptopen, till viss del för att visa patienterna vad som hände under undersökningen, men även i fokuseringssyfte när en hudförändring skulle lokaliseras. Kameran använde sig av en sensor av bolometertyp, denna typ av sensor räknar inte fotoner som vanliga ljus-sensorer gör. Istället består varje pixel på sensorn av en termisk, till stor del isolerad, MEMS-brygga. När inkommande strålning träffar sensorn ändras pixelstrukturen och resulterande resistansförändring detekteras. Kameran var absolutkalibrerad för användning inom medicinskt bruk med en felmarginal på ungefär 0.2 grader Celsius inom fokuserat område och en känslighet på cirka 100mC.

När undersökningarna utfördes på hudkliniken, SUS, så fanns all utrustning i ett mottagningsrum som patienterna fick komma in i innan de gick vidare till operation, eller precis efter att de genomgått konsultation. När hudförändringen på patienten lokaliserats så togs ett referensfoto med vanlig kamera, och sedan fokuserades värmekameran mot hudförändringen alltmedan patienten satt bekvämt och så stilla som möjligt. Den efterföljande bildtagningen bestod i en ögonblicksbild från kamerans live-feed samt 50 st rådata-filer. För att få ut temperatur-kartornas rådata så användes ett, av teknisk handledare, skrivet c++-skript som automatiskt tog 50 rawformat-bilder för att kunna göra en medelvärdesbildning och därmed undvika brustoppar. När rådatan var insamlad gjordes processen om på en frisk hudsektion på patientens kropp i närheten av den misstänkta hudförändringen, detta för att minska temperatur-skillnader baserade på annorlunda vaskulär struktur under huden. Således samlades minst 100 rådata-filer in från varje patient, där hälften var på en frisk del och hälften på en misstänkt malign hudförändring.

När insamling av data var genomförd på en patient medelvärdesbildades datan och kategoriserades för senare analys.

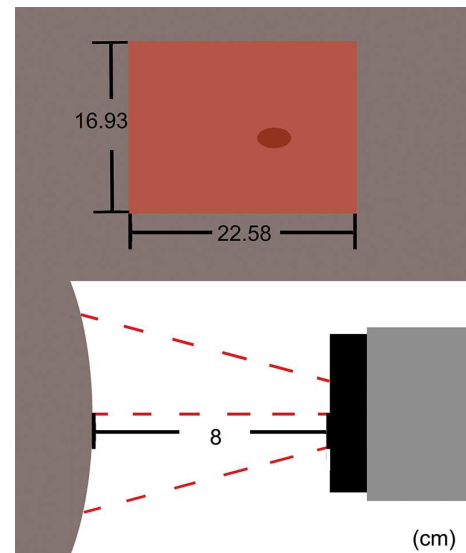
#### E. Analys

Analys av undersökningen gjordes i tre delar. Tillsammans gav dessa tre metoder en rimlig uppskattning av skillnader inom det givna undersökningsmaterialet.

##### 1) Jämförelse av rådata

För att kunna jämföra temperaturkartorna, från den friska leverfläcken, hos en patient, med den misstänkta hudförändringen, så behövde först en medelvärdesbildning av samtliga 50 kartor tas. Dessa genererades med ett skript anpassat för just den här typen av filer med den exakta namnföljden "Temp\_Map\_raw0000xx.pgm" där xx gick från 00-49 och .pgm är rawformatet.

När sedan medelvärdes-kartorna skapats i två resultatfiler så kördes dessa genom ett matlab-skript



Figur 3. Fotografiuppställning. Ovan i bild syns mätområdet, nedan visas avståndet mellan kameran och patienten.

som jämförde de högsta temperaturerna närvarande i båda bilderna mot varandra samt tog ut deras index så att punkterna med de registrerade högsta temperaturerna kunde finnas i referensmaterialet.

##### 2) Jämförelse av referensmaterial

De ögonblicksbilder som togs som referensmaterial gav grå-skale bilder, varje pixel i dessa har ett värde mellan 0-255, och då kamerans mätintervall är givet kan man referera varje sådant värde till ett visst värde i Celsius, även detta gjordes med hjälp av matlab genom att ladda in bilderna, bryta ned dessa pixel för pixel och jämföra mot högst- respektive lägst genererade temperaturer. För att ytterligare försöka undvika toppar och dalar som uppstått endast som artefakter eller brus så medelvärdesbildades ett område kring max- respektive min-värdena i bilderna.

##### 3) Optisk analys

Den sista delen var en enkel optisk jämförelse mellan de olika bilderna. Genom att behandla referensmaterialet i ett bildbehandlingsprogram kunde utstickande delar identifieras.

## IV. RESULTAT

Mätningar genomfördes på totalt 10 patienter, samtliga över 50 år gamla, 6 av dessa kvinnor. Av de 10 undersökna patienterna hade 10 någon form av misstänkt malign hudförändring, specifikt 8 med basalcellscarcinom, 1 malignt melanom samt 1 patient med misstänkt skivepitelcancer, 6 av dessa patienter hade en bekräftad diagnos vid mätningstillfället enligt Tabell I.

Resultaten indikerar att hudförändringar kan detekteras med hjälp av termografiska medel genom att observera det mönster som uppstår kring maligna hudförändringar, men

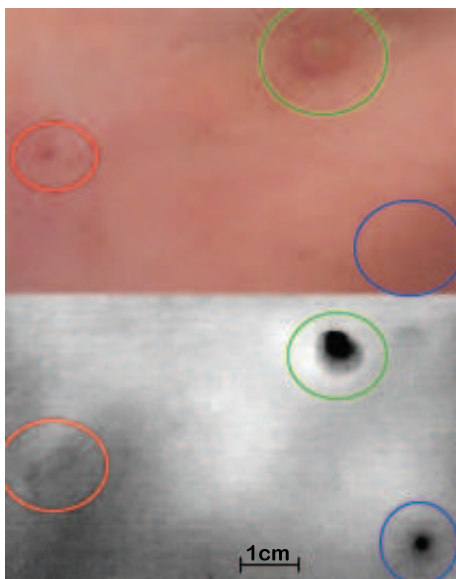
förändringarnas stadie är inte uppenbart enbart genom enkel observation eller analys av behandlade bilder.



Figur 4. Basalcellscarcinom, temperaturmätningen indikerar en högre temperatur under och i ytterkanten av förändringen.

#### A. Optisk- & bildbehandlingsanalys av referensmaterial

I Figur 4 ser vi ett basalcellscarcinom, den del av vävnaden som sticker ut från huden utmärks av ett mörkare parti, alltså lägre temperatur, omgivet av ett ljusare parti. Vid jämförelse med en helt frisk sektion av hud i närliggande område så uppvisade carcinomet med omgivning en  $4.76^{\circ}\text{C}$  skillnad mot ett helt friskt område.



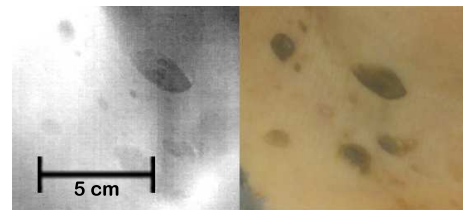
Figur 5. Ett flertal hudförändringar hos en patient. Den röda cirkeln är ett tidigare basalcellscarcinom som skurits bort. Grön cirkel innehåller ett hudhorn Cornu Cutaneum) vilka kan indikera tidig SEC. [9] Blå cirkel indikerar ett tidigare hudhorn som nu blivit borttaget.

Figur 5 uppvisar ett flertal hudförändringar hos en enskild patient. Den röda cirkeln visar äret efter ett basalcellscarcinom som blivit borttaget, patologen rekommenderade biopsi då de misstänkte att samtliga cancerogena celler inte var borta. Här skulle man kunna notera en svag

temperaturskillnad, noterad i bild som ett mörkare område. Det går däremot inte att säga någonting om huruvida det skulle vara på grund av cancerogena celler eller enbart en lokal artefakt i patientens hud som uppkommit vid ärrbildning.

Grön cirkel uppvisar ett så kallat "hudhorn", dessa bildas främst genom kraftig fjällning efter långvarig UV-exponering och kan indikera tidiga stadier av SEC. I Figur 5 kan vi notera liknande temperatur-mönster som uppstod i Figur 4 vid carcinomet. Det vill säga ett mörkt utstickande parti omgivet av en cirkel av högre temperatur. Denna hudförändring uppvisade en total temperaturskillnad på  $0.24^{\circ}\text{C}$ .

Blå cirkel visar lokaliseringen av ett tidigare hudhorn som frusits och skrapats bort. Den lokala effekten av ärrbildningen efter detta visar på en lägre temperatur på  $-1.04^{\circ}\text{C}$  jämfört med omgivande hud.



Figur 6. En patient med multipla benigna naevus, de som sticker ut mycket från huden har en markant lägre temperatur än de som ligger närmre intill.

I Figur 6 syns ett flertal benigna födelsemärken, dessa har samma mörka färg mot resterande hud, men saknar den omringande ljusa ringen som de maligna hudförändringarna har uppvisat. Ett födelsemärke som sticker ut på detta vis uppvisar en genomsnittlig temperaturskillnad på  $-0.46^{\circ}\text{C}$  i jämförelse mot hudpartier utan födelsemärken.

#### B. Analys av rådata

Jämförelse av temperaturkartor inga resultat då det skript vars syfte det var att sammanställa rådatan till resultatfilen gav ett felmeddelande under körning som inte uppkommit under testkörningar. Källkoden var otillgänglig och således var problemet inte lösligt under analysstiden.

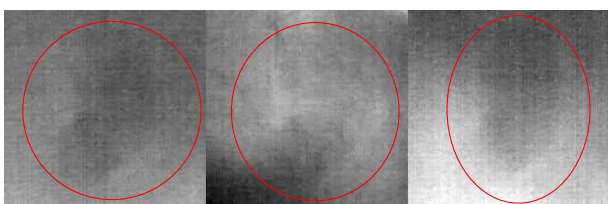
## V. DISKUSSION

Resultatet pekar på att maligna hudförändringar följer ett visst mönster vad gäller deras temperatur-mappning. Då friska naevus, om de är utstickande, verkar uppvisa en lägre temperatur än omgivande hud så är de endast en mörkare fläck på temperatur-kartan, se Figur 6. De misstänkta maligna hudförändringarna följer i stort mönstret där de har en mörk mitt-sektion med ljusare omgivning precis intill jämfört med omkringliggande hud. Detta skulle kunna tyda på ett mönster som uppkommer för alla maligna hudförändringar. En patient som därmed uppvisar detta mönster på en hudförändring som anses benign eller ofarlig kan därför vara värt att undersöka ytterligare, resultaten är dock baserade på en för låg

population för att dra konkreta slutsatser huruvida detta är befogat eller ej.

Något som kan ha påverkat resultatet är vind i rummet som påverkar hudtemperaturen hos patienten mellan bilderna. Rummet hölls stängt då en patient var inne, men konvektion spelar alltid roll vid termiska mätningar och då luftkonditioneringen i rummet inte var kontrollerbar kan detta ha påverkat temperaturer vid de mätningar då patientens olika mätningar låg 1-2 minuter isär.

Vid optisk analys av referensmaterialet för patientbilderna upptäcktes en artefakt i värmekamerans bildtagning kring de sista tre patienterna, se Figur 7. Detta mörkare fält uppkom tydligt på tre bilder, och om det föreligger sig att det funnits även i tidigare bilder, utan att ha varit lika tydliga, kan detta ha påverkat resultatet, främst vad gäller omgivande hudpartier som påverkar resultatet mer om de är mörkare, alltså kallare, än vad de bör vara.



Figur 7. Artefakt från värmekamerans bildtagning

Problem som kunde uppstå vid bildtagning var ”överexponering”, där en yta som inte var väldigt mycket varmare än resterande hud runt omkring visades som detta i bildtagningen. Problemet är visualiserat i Figur 8. På ett fåtal patienter uppkom detta fenomen, troligen beroende på vinkel på huden och hur kameran uppfattar den strålning som kommer från patienten. Oftast kunde detta problem överkommas med vinkling av apparaturen, men då hudförändringen var lokaliserad precis där en krökning existerar kunde fenomenet inte överkommas. För att kringgå detta skulle ett annat objektiv behövts som möjliggjort närmare fotografering så att apparaturen inte mottar en stor yta på samma gång. Med en stadig uppställning skulle en svepande apparatur kunna involveras där en mängd bilder tas över tid på samma område, vilka sedan sätts ihop med hjälp av någon bildbehandlingsmjukvara. Totalt fick två patienter räknas bort från resultaten på grund av detta fenomen.

Vad gäller samtliga framtagna resultat är dessa baserade på bildbehandlings-analys och inte på de faktiska

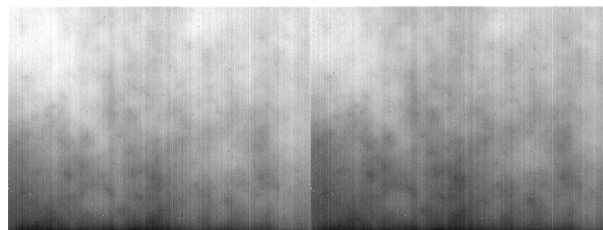


Figur 8. ”Överexponerad” hud vid fotografering gör att man inte kan detektera några skillnader i det drabbade området.

temperatur-kartorna som genererades utav värmekameran. Kamerans känslighet för bildtagning är såpass hög att den kan detektera skillnader på  $100\text{m}^\circ\text{C}$ . Då standardavvikelsen inom fokusområdet är  $\pm 0.2^\circ\text{C}$  kan alla resultat i området  $>0.2$  samt  $<-0.2^\circ\text{C}$  klassas som relevanta inom någon mån. Kameran har dock inte ett fokusfönster utan är specifikt fokuserat 8 cm från linsen. Om en hudförändring är tillräckligt utstickande för att hamna utanför fokusområden kan temperatur-bilden bli påverkad av detta.

Syftet med tre individuella analysmetoder var att få en bredare bild av varje patients hudförändring, upptäcka eventuella mönster och se om dessa var strikt visuella eller ej. Vad det skulle innebära att upptäcka ett analytiskt mönster, som ej syns visuellt, eller tvärtom är svårt att säga. Det mönster som uppkommit kring de maligna hudförändringarna som tidigare diskuterats kan alltid vara en tillfällighet.

Det finns en del patienter där endast rådata samlats in, det saknas alltså en del strikt visuella medel, i.e. ögonblicksbilder från kameran, att jämföra med för en del av patienterna, något som självklart påverkar en optisk analys om det finns ett lågt antal bilder att visuellt analysera och bildbehandla. I Figur 9 kan man se att det är svårt att jämföra två olika individuella bitar rådata. En viss skillnad kan synas, främst i de mörkare partierna längst ned i bild, även på en helhets-ljusstyrka som är lite högre till vänster i bild. Detta kan dock bero på skillnader i kamerans temperatur vid bildtagningen, temperaturen i rummet, patientens konvektion vid huden eller ett dussin andra parametrar som inte kan påverkas. Genom att analysera materialet på rätt sätt hade det gått att jämföra de absoluta temperaturerna hos patienterna, och därmed upptäcka skillnader på så vis.



Figur 9. Grafisk representation av de rådata-filer som värmekameran genererar från två patienter

Att inte kunna analysera temperatur-kartorna via medelvärdesbildning är ytterst ofördelaktigt, detta då en rådata bild potentiellt kan innehålla en stor del brus, och därmed inte ge en sanningsenlig bild av vad som faktiskt finns avbildat. De rådata filer som tagits av kameran är flerdimensionella matriser, och innehåller väldigt mycket information som skulle ha bidragit en stor del till projektet.

Tid är ytterligare en aspekt som spelat in. Då det tog lång tid för författaren att kommunicera med alla inblandade i projektet tog det längre tid än beräknat att starta upp mätningarna, och därmed minskade populationen nämnvärt.



## VI. HÅLLBAR UTVECKLING & ETIK

Målet med projektet är en screenings-metodik som helt kan ersätta biopsi-tagningar från patienter så är det en klar förbättring av dagens metodik som använder otaliga mängder engångs-artiklar producerade av medicintekniska företag. Skulle en specialistmottagning köpa in en sån här apparatur för 100 000kr så har den återbetalts inom 5 veckor, något som en stor andel av sjukhusledning troligen skulle vara positivt inställda till. Den kamera som använts i detta projekt var i prisklassen 20 000 – 30 000kr, sammanlänkat med en dator som kan utföra analys i realtid, eller på kort tid, gör att 100 000kr per enhet inte skulle vara ett otänkbart pris.

I dagsläget kan det ta upp till sju veckor att få tillbaka resultatet av en biopsi, något som är en kraftig påfrestning på en patient som skall få reda på huruvida en hudförändring är malign. Metoder för att sänka denna tid beprövas kontinuerligt inom sjukvården, men det är svårt att sänka väntetider hos en labbenhet om man inte har råd att utöka lokaler och anställa mer personal. Har man då, som SUS hade under undersökningstiden, ett nytt system under utveckling på en av de inblandade enheterna så kan väntetiderna bli än längre. Något som är, i min mening, oacceptabelt. En undersökning av sådan vikt att det kan leda till totala livskvalitets- och livsstilsförändringar bör ge resultat inom *max* en vecka. Helst en timme.

Får man en sådan här screening-metod att fungera säkert, kvalitativt och snabbt så besparar man en stor del patienter bördan av ”tänk om”. I Sverige får cirka 30 000 patienter diagnosen basaliom, och cirka 2 800 får diagnosen malignt melanom. Utöver dessa finns ett högt antal patienter som undersöks men aldrig får diagnosen hudcancer. Bara av den anledningen bör tid och resurser läggas på att utveckla nya och fungerande screening-metoder som involverar så lite tid och smärta, fysisk som psykisk, hos patienterna som möjligt.

Som screening-metod bör man även vara medveten om att den är unik i sitt slag, då ingen annan screening-metod för hudcancer existerar i dagsläget, som ger ett säkert resultat, och som inte är invasiv.

## VII. SLUTSATSER

Den här studien ger en viss indikation på att man skulle kunna detektera hudförändringar av malign typ genom att söka över hudområden med termografiska medel. Genom att fotografera områden med kända hudförändringar kan ett visst mönster detekteras hos givna patienter, men om det stämmer hos den generella befolkningen återstår att se.

Slutsatsen som dras från projektet är att det inte går att fastställa bevis för metodens effektivitet, men att fler studier bör genomföras med utökad population, mer välplanerad experimentell uppställning samt välprövad analysmetod. Vidare är det en värd investering för sjukvården att investera i utveckling av screening-metoder för hudcancer då de långsiktiga vinsterna kommer utväga kostnaden för projektet.

## VIII. EFTERORD

Jag vill tacka

- Thomas Winzell och Mats Bylander från Axis Communications AB för teknisk handledning och utlåning av värmekamera.
- Niels Bendsøe för klinisk handledning genom projektet och bidragen tid till arbetet.
- Stefan Andersson-Engels för handledning i uppstarten av projektet och hjälp med etiskt godkännande.
- Thomas Jansson och Hanna Isaksson för hjälp med att överkomma bekymmer innan och under projektets gång.
- Personalen på hudkliniken, SUS för deras hjälp och samarbetsvillighet.
- Vänner och bekanta som hjälpt till att läsa igenom materialet under projektets gång samt hjälpt till med kod-förståelse.

All kontakt med handledare, företag och övrigt inblandade i projektet har skötts av Anders Persson, även ”författaren”. Samtligt skriptande och analys-arbete som inte direkt involverat värmekamerans grundläggande funktioner, kalibrering samt dess medelvärdesbildning av resulterande rådata har gjorts av författaren. Samtliga delar av rapporten är skriven av författaren.

## REFERENSER

- [1] R. Lucas, T. McMichael, W. Smith, and B. Armstrong, ”Solar Ultraviolet Radiation – Global burden of disease from solar ultraviolet radiation”, *Environmental Burden of Disease Series*, No. 13
- [2] <https://www.cancerfonden.se/om-cancer/malignt-melanom-dup-93>, 2015-05-20
- [3] <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/ucm257259.htm>, 2015-05-20
- [4] P.V. Butte, A. Mamelak, J. Parrish-Novak, D. Drazin, F. Shweikeh, P.R. Gangalum, A. Chesnokova, J.Y. Ljubimova, and K. Black. ”Near-infrared imaging of brain tumors using the Tumor Paint BLZ-100 to achieve near-complete resection of brain tumors,” *Neurosurgical Focus*, vol. 36, No. 2, p. E1, 2014, DOI: 10.3171/2013.11.FOCUS13497.
- [5] K. Sato, T. Nagaya, P.L. Choyke, and H. Kobayashi ”Near Infrared Photoimmunotherapy in the Treatment of Pleural Disseminated NSCLC: Preclinical Experience,” *Theranostics Online*, vol. 5, pp. 698–709, 2015, DOI: 10.7150/thno.11559
- [6] M. Nitzan, S. Noach, E. Tobal, Y. Adar, Y. Miller, E. Shalom, and S. Engelberg, ”Calibration-Free Pulse Oximetry Based on Two Wavelengths in the Infrared – A Preliminary Study,” *sensors Online*, vol. 14, pp. 7420–7434, 2014, DOI: 10.3390/s140407420
- [7] C. Muñoz-Pinedo, N. El Mjiyad, and J-E. Ricci, ”Cancer metabolism: current perspectives and future directions,” *Cell Death & Disease*, vol. 3, 2012
- [8] T.N. Seyfried, R.E. Flores, A.M. Poff, and D.P. D’Agostino ”Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics,” *Oxford Journals Online: Carcinogenesis*, vol. 35, 2014
- [9] W.F. Lever, G. Schaumburg-Lever, ”Histopathology of the Skin, 6th edition”, 1983
- [10] <http://www.axis.com/se/sv>

# SectioPlan - ett elektroniskt bokningsprogram för planerade kejsarsnitt i Region Skåne

Isabelle Johansson (BME12), Nadia Wåhlin (BME12)

**Sammanfattning**—Brister i IT-systemen inom Region Skåne orsakar att planeringsprocessen för planerade kejsarsnitt huvudsakligen sker via telefon samt pappersanteckningar. Läkaren som vill boka en tid för ett planerat kejsarsnitt måste, i de fall då det saknas operationstider på den egna kliniken, ringa runt till de olika kvinnoklinikerna i Skåne för att hitta en ledig tid. En bokad tid antecknas därefter i en pärm på den aktuella operationsavdelningen. Det problematiska arbetsflödet leder till ökade kostnader och risk för informationsförluster på klinikerna. Detta projekt, som huvudsakligen har genomförts på Lunds Tekniska Högskola och Skånes Universitetssjukhus, har undersökt problemen som uppstår kring bokning av planerade kejsarsnitt och processens förbättringspotential. Det gjordes främst genom intervjuer med personal på kvinnoklinikerna i Lund och Malmö. Utifrån slutsatserna från undersökningen utvecklades ett användargränssnitt för ett elektroniskt bokningsprogram som gör det möjligt för läkarna att se och boka operationstider till sina patienter. Programmet har bemötts med positiva reaktioner från personalen och skulle kunna bidra till ett förbättrat arbetsflöde för planerade kejsarsnitt på kvinnoklinikerna i Malmö och Lund.

## I. INTRODUKTION

**I**DAG lägger läkare i många fall en tredjedel av sin arbetstid på administrativt arbete. Detta är en av anledningarna till att patienter och läkare ofta upplever tidsbrist vid patientbesök. Mycket av administrationen är dock nödvändigt patientarbete som inte kan utelämnas eller utföras av någon annan än läkaren själv. Trots att införandet av IT-system i sjukvården har inneburit nya möjligheter för det administrativa arbetet, har det inte haft den effektiviserande effekt som förväntats. Dels upplevs inte IT-systemen som användarvänliga och dels saknas kompatibilitet mellan dem. Orsaker till detta är brister i både utvecklingen och implementeringen av nya och befintliga IT-system. Vid utveckling involveras inte vårdpersonal i tillräckligt stor utsträckning, vilket kan bero på det kunskapsglapp som finns mellan systemutvecklare och användare. Användarna har svårt att formulera krav och behov till utvecklarna eftersom de har liten insikt i de tekniska lösningar och förbättringar som är möjliga att genomföra. Det uppstår också en konflikt mellan åsikten om att IT-systemen måste anpassas efter användarnas behov respektive att det är användarnas rutiner och arbetssätt som ska anpassas efter IT-systemet. I införandefasen saknas ofta systematiska arbetssätt och det avsätts inte tillräckligt med resurser för vårdpersonalens utbildning i nya funktioner och IT-system [1].

En ytterligare bidragande orsak till svårigheterna vid införandet av IT-system är den komplicerade organisationen

kring sjukvården. Sjukhusets verksamhet och dess komplexitet beskrivs i ”Det komplexa sjukhuset - att leda djupgående förändringar i en multiprofessionell verksamhet”, genom fyra världar som var och en styrs av sin egen logik. De fyra världarna är *Cure*, läkarkåren som arbetar på sjukhuset - men inte alltid för det, *Care*, sjuksköterskorna som samordnar komplexa arbetsflöden runt patienter och anhöriga även om de inte alltid har det formella ansvaret, *Control*, cheferna som har svårt att påverka läkare och sjuksköterskor, och *Community*, representanter för samhället, influerade av politiken. På grund av världarnas olika perspektiv kan målen, och sättet att uppnå dessa, skilja sig åt. Professionella grupper som läkare har en stark yrkesidentitet och deras intresse fokuseras ofta på den egna professionen, vilket kan bidra till att arbetsinsatser från andra yrkesgrupper inom sjukvården som läkaren är beroende av undervärderas. [2].

Sjukvårdens verksamhet ökar i komplexitet då sjukhus slås ihop, som skett i Malmö och Lund, då många aktörer är inblandade i de olika processerna på sjukhusen. På större sjukhus finns en hög komplexitet och det kan vara svårt för personalen på olika avdelningar att känna samhörighet och samarbeta med varandra.

Då sjukvårdssystemets organisation blir mer komplicerad, ställs allt högre krav på att kommunikation och information sker på ett fungerande och effektivt sätt. Fungerar inte detta kan det uppstå informationsförluster, som i sin tur kan leda till ökad arbetsbelastning, förseningar, ökad risk för patientsäkerheten och inställda besök eller operationer. Risken för sådana förluster är stor då informationsöverföring sker genom fysisk användning av eller överlämning av dokument eller verbal kommunikation [3]. Denna typ av manuell hantering används när digitaliseringen är förhindrad på grund av att det saknas funktioner i IT-systemen [1]. För att minska risken för detta används, utöver elektroniska journalsystem, också andra elektroniska dokumentationssystem. I Region Skåne består dessa exempelvis av graviditets- och förlossningsjournalen *Obstetrix* och operationsplaneringssystemet *Orbit* [4], [5]. I *Orbit* sker planering och uppföljning i operationsprocessen. Flödet är uppdelat i sju faser, där första fasen är *operationsanmälan* och sista *postoperation* [5].

Många olika typer av operationer registreras i *Orbit*, däribland planerade kejsarsnitt. Kejsarsnitt görs när kvinnan av någon anledning inte kan föda barn vaginalt och kan delas upp i akuta och planerade kejsarsnitt. Ett akut kejsarsnitt görs om något oväntat händer under en vanlig förlossning som gör att den inte framskrider på önskat sätt. Planerade kejsarsnitt sker på medicinsk indikation som kan vara att barnet ligger i sätesläge, svår sjukdom hos modern eller barnet, förlossningsrädsla eller att modern varit med om minst två

Inlämnat den 10 juni 2015

Email-adress: {mte12ijo@student.lu.se, mte12nwa@student.lu.se}

Teknisk handledare: Martin Stridh, Institutionen för Biomedicinsk Teknik

Klinisk handledare: Monica Lilja, Överläkare på Kvinnokliniken Lund

tidigare kejsarsnitt [6].

När den medicinska indikationen väl är identifierad behöver operation planeras. Inplaneringen sker tidigast i vecka 32 i graviditeten men rutinerna varierar mellan olika sjukhus [7]. Fastställning av operationsdag krävs eftersom graviditeten har en naturligt bestämd tidslängd och därför måste operationen planeras in inom en viss tidsram så att förlossningen inte hinner sätta igång på naturlig väg. Det planerade kejsarsnittet planeras därför in att utföras sju till nio dagar innan beräknat förlossningsdatum [6].

Läkaren behöver, vid planeringen, veta vilka tider som finns tillgängliga för bokning av operation, men i Orbit inkluderar fasen *Operationsanmälan* ingen funktion där lediga tider kan bokas. Det innebär att Orbit i realiteten endast fungerar som ett registreringsverktyg vid planeringen av planerade kejsarsnitt.

Istället hanteras denna planeringsprocess helt manuellt. Personal vid kvinnokliniken i Lund beskriver hur de måste ringa runt mellan de olika klinikerna i Region Skåne för att hitta lediga tider åt sina patienter, när tider saknas på den egna kliniken. Vid bokning fyller personal, vid kliniken där tiden bokats in, i patientinformationen i en pärm. Därefter registreras operationen i Orbit.

Eftersom ett planerat kejsarsnitt inte är en akut operation utan elektiv<sup>1</sup>, finns en risk att den ombokas. Den största delen inställda operationer i Region Skåne sker av organisatoriska skäl, såsom tidsbrist, felplanering och brist på personal [8]. Eftersom ombokning av kejsarsnitten görs manuellt i bokningspärmen finns det en klar risk att personalen missar när en ledig tid blir tillgänglig och att denna tid aldrig bokas om. Detta kan resultera i att operationssalen står tomma istället för att utnyttjas.

Det faktum att denna manuella hantering medför en stor risk för informationsförluster och kostar pengar för Region Skåne, visar på att processen skulle kunna effektiviseras genom att den digitaliseras. Operationsplaneringsverktyg fyller en viktig funktion genom att delge alla inblandade i operationsprocessen information [9], men samtidigt saknas funktioner i befintliga IT-system för att detta ska kunna ske fullt ut och de anses inte heller vara användarvänliga. Det har visats att planeringsverktyg som anpassas med hänsyn till operationens art kan ge ytterligare förbättringar i planeringen och genomförandet av operationerna [10]. Detta tyder på att behovet ligger i ett enkelt elektroniskt program där användarna involveras redan i utvecklingsfasen.

### Produktidé

Detta kandidatarbete innefattar därför en produktidé i form av ett elektroniskt bokningsprogram för planerade kejsarsnitt. Programmet kommer på ett överskådligt sätt att ge en tydlig och aktuell bild av lediga och bokade operationstider på alla anslutna förlossningskliniker. Behörig personal kan se information om de inbokade operationerna och boka en tid direkt i programmet. De lediga tiderna registreras i programmet av den personal som tilldelas administrationsbehörighet.

Bokningsprogrammet har utvecklats med hänsyn till sjukvårdens komplexa struktur och de tidigare beskrivna

svårigheter som införandet av ett nytt IT-system kan innebära. Programmet syftar till att förenkla arbetsflödet och på så sätt minimera den manuella hanteringen. Genom användning av ett elektroniskt bokningsprogram skulle kostnaderna i vården kunna reduceras eftersom risken för inställda operationer minskar.

Denna rapport inleds med att beskriva hur information om operationsplaneringsprocessen och IT-system inhämtats och hur detta använts för att utveckla programmet. Därefter presenteras resultat i form av de viktigaste slutsatser som kunnat dras utifrån informationen och en beskrivning av programmets funktioner ges. Både projektiden och dess användning diskuteras sedan ur ett större perspektiv och slutligen beskrivs de slutsatser som projektet lett fram till.

## II. METOD

Arbetsprocessen i detta projekt kan beskrivas som en flödesprocess. Nedan redogörs metod och tillvägagångssätt för de olika delmomenten i processen.

### Idé

Via personal på kvinnokliniken i Lund erhöles indikationer på att det fanns ett behov av ett förbättrat arbetsflöde vid planering av kejsarsnitt. En idé om hur behovet skulle kunna tillgodoses uppkom och ett möte hölls med en områdeschef på Skånes Universitetssjukhus. Detta gjordes för att få bekräftelse på att rätt uppfattning om situationen hade erhållits samt för att få godkännande för genomförande av projektet.

### Informationsökning

En litteraturstudie genomfördes för att söka information kring sjukvårdens administrativa uppbyggnad samt för att få en överblick över vad som har gjorts inom området operationsplanering. Befintliga bokningsprogram och tidigare arbeten kring att utveckla sådana undersöktes också för att få en bild av hur dessa typer av verktyg kan byggas upp.

Sökningar på databaserna Google Scholar och PubMed gjordes där olika sökord, såsom *operationsplanering*, *operationsresurs*, *Region Skåne*, *kejsarsnitt*, *bokningsprogram*, *IT-system*, *sjukvård* och *administration*, kombinerades. En likadan sökning gjordes även med sökorden på engelska för att undersöka om liknande frågeställningar funnits utomlands.

Det material som ansågs vara mest relevant för arbetet valdes ut och sammanfattades genom att intressanta stycken i litteraturen antecknades.

Utöver materialet från litteratursökningen användes även två källor som rekommenderades vid intervjuer. Dels publikationen "Ur led är tiden - fyra utvecklingsområden för en mer effektiv användning av läkares tid och kompetens", som gjorts av Vårdanalys [1], och dels boken "Det komplexa sjukhuset - att leda djupgående förändringar i en multiprofessionell verksamhet" skriven av Lars Erik Norbäck och Axel Targama [2]. Detta material analyserades för att få en tydligare bild av sjukvårdens miljö och olika arbetssätt och gav en bredare kunskap i hur sjukvården fungerar, vilka problem som kan uppstå och hur dessa kan lösas.

En intern funktionsbeskrivning av Orbit 5, vilket är den senaste generationen av Orbit, delgavs av utvecklaren EVERY

<sup>1</sup>Planerad operation. [14]

för att möjliggöra närmare studie av dess utformning och funktioner [5].

### *Målgrupp och intervjuer*

För att få en bild av hur arbetsflödet kring planerade kejsarsnitt ser ut på Skånes Universitetssjukhus, utfördes nio intervjuer. Målgruppen för intervjuerna, som fastställdes efter informationssökningen, var personal och chefer på kvinnokliniker i Lund och Malmö. Bland dessa ingick sjuksköterskor, barnmorskor, specialistläkare, operationsplanerare, områdeschefer och enhetschefer. En doktor i optimeringslära, som arbetar inom Region Skåne med schemaläggning och logistik, intervjuades även tack vare hennes kunskaper och erfarenheter inom planerings- och bemanningsfrågor.

Intervjuerna genomfördes med en semistrukturerad intervjumall och inleddes med att syfte och produktidé presenterades. Intervjufrågorna behandlade därefter personens roll i processen, vilka problem som kan uppstå och vad som skulle kunna förbättras i arbetet kring planerade kejsarsnitt. Respondenten fick även möjlighet att komma med synpunkter och idéer om själva bokningsprogrammets utformning och funktioner. Frågorna bestämdes i förväg men justerades ibland beroende på vem som intervjuades, då exempelvis chefer och sjuksköterskor utför olika arbetsuppgifter och har olika roller i bokningsprocessen. Under intervjuerna fördes anteckningar som sammanställdes efter varje intervju.

I denna fas kontaktades även kvinnokliniker i Region Östergötland och Akademiska Sjukhuset i Uppsala via mejl. Detta för att få en uppfattning om hur organisationen kring planerade kejsarsnitt ser ut på andra sjukhus jämfört med inom Region Skåne.

### *Analys och konceptframställning*

Från informationssökningen och intervjuerna kunde arbetsprocessen vid bokning av planerade kejsarsnitt i Lund och Malmö identifieras. Viktiga slutsatser om denna drogs och utifrån dessa utvecklades ett användargränssnitt för ett bokningsprogram.

Utifrån litteraturstudien och intervjuerna gjordes en analys för att få en förståelse för problemet och kunskap inom det område som identifierats som centralt i arbetet. Resultaten från datan vägdes samman genom en kvalitativ analys för att svara mot arbetets övergripande syfte. De viktigaste slutsatserna identifierades och utifrån dem utformades ett koncept för ett bokningsprogram. För att fritt kunna tänka kring hur programmet skulle kunna se ut och vad som skulle ingå, utfördes till en början ett antal brainstorming-sessioner. Bland annat användes det formulär som i dagsläget fylls i vid bokning av de planerade kejsarsnitten och som utgör innehållet i pärmen på kliniken i Lund. Detta för att veta vilken information bokningsprogrammet måste innehålla. Olika scenarion skapades, gällande problem som skulle kunna uppstå under planeringsprocessen. Detta för att få ytterligare förståelse för vilka funktioner som skulle inkluderas i programmet. Funktionerna sammanställdes i en kravspecifikation.

### *Prototyputveckling*

För att designa en prototyp, bestående av ett användargränssnitt, gjordes först en handritad skiss som sedan användes som hjälpmedel vid utvecklandet. Med undantag för schemafältet, som togs fram i Microsoft Office Excel, användes därefter prototypverktyget ForeUI [11] för att designa den grafiska utformningen på bokningsprogrammet och implementera funktionerna från kravspecifikationen. För varje funktion utvecklades ett steg-för-steg-flöde som användaren tas igenom. På så sätt kunde en simulering av programmet göras genom ett vanligt bildspel.

Ett namn, som skulle vara tydligt och förklarande för bokningsprogrammets funktion, valdes. Ett antal förslag med olika kombinationer av ord som är kopplade till programmet användningsområde listades. Namnet behövde vara kort och inte bestå av för många stavelser, då sjukvårdspersonal använder programnamn i vardagligt tal på arbetsplatsen.

### *Uppföljning och utvärdering*

När prototypen ansågs färdig gjordes uppföljningsbesök på kvinnokliniken i Lund för att få återkoppling från två operationsplanerare och en läkare som intervjuats i det tidigare skedet. Prototypen demonstrerades och personerna fick dela med sig av sina åsikter och ge förslag på förbättringsmöjligheter. Efter vidare reflektion över förslagen utfördes de justeringar som ansågs lämpliga. Till sist sammanställdes en utvärdering av den slutgiltiga prototypen tillsammans med förslag på framtida förbättringar.

## III. RESULTAT

Från informationssökningen och intervjuerna erhöles en mängd data i form av identifiering av arbetsprocessen vid bokning av planerade kejsarsnitt i Lund och Malmö och viktiga slutsatser om denna. Utifrån dessa utvecklades ett användargränssnitt för ett bokningsprogram.

### *Arbetsprocessen och slutsatser från intervjuer*

Arbetsprocessen inleds med att en obstetriker<sup>2</sup> beslutar att patientens förlossning ska ske med planerat kejsarsnitt. Det varierar från patient till patient hur lång tid innan beräknat förlossningsdatum detta bestäms, men beslutet tas tidigast åtta veckor innan dess. För några år sedan planerades kejsarsnitt in att utföras i graviditetsvecka 37-38, men på grund av resursbrist görs de nu i vecka 39.

På kvinnokliniker i Lund och Malmö finns en pärm där bokningar för kejsarsnitt fylls i. I Lund tar läkaren vid bokning kontakt med operationsavdelningen via telefon och söker en ledig tid. I Malmö går läkaren ner till operationsavdelningen och tittar själv i pärmen efter en tid för det planerade kejsarsnittet. Om det inte finns en passande tid på den egna avdelningen måste läkaren ringa till de andra klinikerna i Region Skåne för att hitta en ledig tid. Detta resulterar i att patienten tvingas pendla till en annan klinik inom Skåne när kejsarsnittet ska ske. Dessutom får patienten sällan reda på sin operationstid vid besöket utan hon kontaktas när en tid är inbokad.

<sup>2</sup>Specialistläkare inom förlossningsvård

Efter att operationen bokats in, skrivs den in i pärmen och registreras i Orbit.

Processen ser liknande ut i Region Östergötland. Obstetrikeren gör en operationsanmälan på papper som lämnas till en operationsplanerare. Ett datum föreslås men den definitiva planeringen görs fyra veckor innan beräknat förlossningsdatum. Därefter bokas patienten i tidböcker i Obstetrix och journalsystemet Cosmic.

På Akademiska sjukhuset i Uppsala sker bokning också manuellt via en koordinator. Obstetrikeren ringer till koordinatören eller fyller i ett papper med information om patienten och koordinatören bokar därefter en tid för kejsarsnitt i ett operationsplaneringsprogram där det direkt går att se vilka datum som är tillgängliga för bokning.

De viktigaste slutsatserna om problematiken i arbetsprocessen vid bokning av planerade kejsarsnitt redovisas nedan.

- Det är blandade känslor för IT-system som hjälpmedel inom sjukvården. Många upplever att programmen som används arbetar emot personalen istället för med. De olika programmen kommunicerar inte med varandra och samma information måste ofta skrivas in manuellt i flera IT-system. Det tar även lång tid att starta upp programmen.
- Programmen som används är onödigt avancerade och personalen får ingen ordentlig utbildning i hur de ska användas.
- Operationsplaneringsverktyget Orbit upplevs som krångligt med mycket klickande, i form av bekräftelserutor och flikar, och en svårighet att hitta rätt funktioner. Det finns mycket möjligheter med programmet och det går att utformas efter individuella preferenser men detta har inte sjukvårdspersonalen tid med. De vill ha ett program som bara ska gå att starta och använda direkt.
- "Först till kvarn" gäller för tiderna som finns för planerade kejsarsnitt. Läkare med bra kontakter kan gå runt kösystem och få tider före andra. Detta resulterar i ett försämrat arbetsflöde som skapar missnöje på klinikerna.
- Inplanerade patienter som opereras akut innan sin bokade tid, stryks över i pärmen och nya bokningar skrivs till i kanten. Det blir snabbt plottrigt och svåröverskådligt i pärmarna, vilket ökar risken för att det blir fel när nya bokningar skrivs in.
- När ett akut kejsarsnitt måste genomföras, blir de kejsarsnitt som var planerade vid den aktuella tiden uppskjutna. De görs då istället senare under samma dag eller, i de fall då det inte finns tid, ombokas. Ombokningen görs antingen genom att boka en befintlig ledig tid eller genom att flytta en annan inplanerad patients operation. Detta kan dock resultera i att de kejsarsnitt som skjutits upp blir akuta istället.
- Om en operation blir inställd hittas en ersättande patient. För att det ska kunna ske måste operationen dels avbokas i Orbit och dels strykas i den berörda klinikens pärm. Görs inte avbokningen i Orbit blir operationstiden inte utnyttjad. Samma sak händer om kejsarsnittet görs akut

natten innan den planerade operationsdagen och det inte uppfattas att operationen redan är utförd.

- Patienter tycker att det känns otryggt när de gått till samma läkare på en klinik men blir opererade på en annan klinik på grund av att det inte finns lediga tider på den ursprungliga kliniken.
- Vilken obstetriker som utför snittet och vilken narkosläkare som deltar beror på vem som är i tjänst vid tillfället. Ibland vill läkaren dock operera sin egen patient, speciellt vid mer komplicerade fall.
- Patienten kommer på inskrivningsbesök två eller tre dagar innan inbokad operationstid. En sjuksköterska går igenom en checklista med patienten, som därefter har ett kort samtal med en obstetriker och slutligen samtal med en narkosläkare för att besluta vilken bedövning som skall ges i samband med operationen.
- På grund av resursbrist görs även andra operationer, utöver kejsarsnitt, i kvinnoklinikens operationssalar. Planerade kejsarsnitt har lägre prioritet än många andra operationer, vilket leder till att de kan flyttas för andra operationers skull.

Härefter följer de slutsatser som erhöles från undersökningen angående den tekniska lösningen.

- Personalen söker en modern lösning som kan förenkla arbetet för dem vid planering av planerade kejsarsnitt. Någon typ av bokningsprogram efterfrågas, men personalen vill inte ha ännu ett krångligt program som ger dem mer arbete istället för att förenkla.
- All personal ska inte kunna boka tider i ett program, men alla ska ha möjligheten att få en överblick över vilka lediga och bokade tider som finns. Olika åsikter fanns i Lund och i Malmö om vem som ska kunna boka tider i ett bokningsprogram. Läkarna vill själva kunna boka direkt medan operationsplanerarna i Lund vill att de ska vara de enda som kan göra bokningar. Läkarna ska fortfarande ringa till dem men de har möjlighet att se vilket sjukhus som har bokningsbara tider. Idén om att endast vissa koordinatörer skulle ha möjlighet att utföra bokningar delas även av några i chefsposition. Dock tycker de flesta av de som intervjuats att den mest effektiva lösningen är ett bokningsprogram där läkarna kan boka själva eftersom det går snabbt att använda och möjliggör att tiden kan bokas in direkt under patientbesöket.
- Det är en fördel om programmet inkluderar alla de sjukhus som det är möjligt att boka tid på, men det ska inte gå att boka en tid på en annan klinik än den egna genom programmet, utan att avtala genom ett telefonsamtal.
- Bokningsprogrammet ska kunna uppdateras kontinuerligt för att lättare kunna upptäcka operationstider som avbokats. Detta eftersom det är viktigt att snabbt kunna få tillgång till information om att en operationstid har blivit ledig för att undvika tomma luckor i schemat när lediga tider inte utnyttjas.
- Om en operation utförs tidigare än planerat så ska det ändå gå att se att en operation varit inplanerad på den ursprungliga tiden.

Den information om patienten och operationstillfället som

måste ingå i programmet inkluderar:

- Patientens personuppgifter
- Indikation på varför kejsarsnitt planeras in
- Information om patienten har blodsmitta eller diabetes
- Anmälande läkare
- Mottagande personal av bokning
- Datum för inskrivningsbesök

### Bokningsprogrammet

Som ett förslag på lösning av problematiken i arbetsflödet på Kvinnoklinikerna på Skånes Universitetssjukhus har en prototyp av ett elektroniskt bokningsprogram utvecklats. Programmet ska på ett lättöverskådligt sätt ge en tydlig och aktuell bild av vilka lediga och bokade operationstider som finns på alla förlossningskliniker inom Region Skåne. Bokningsprogrammet har fått namnet SectioPlan, som i talsammanhang kan förkortas till S-Plan, och kommer i utvecklingsfasen att vara fristående från alla andra program på sjukhusen. Det ska dock ligga inom sjukhusets interna nätverk Sjunet [12].

SectioPlan ska utgå ifrån ett veckoschema där lediga tider finns markerade i grönt, bokade i rött och användarens egna bokningar är markerade i lila (se figur 1). Det ska vara möjligt att bläddra mellan olika veckor för att kunna titta på tider flera veckor framåt samt att zooma ut till månads- eller årsvy. Genom att klicka på olika tider i schemat kan användaren interagera med programmet.

SectioPlan vänder sig till tre olika typer av användare: personal på kliniken som bara vill få en översikt av lediga och bokade tider, läkare som vill boka tider samt administratörer som kan lägga till, ändra och ta bort tider. I programmet finns därför en behörighet för bokning och en administrativ behörighet. Personal med bokningsbehörighet, som främst kommer att vara läkarna, ges alltså möjligheten att boka tider utan någon mellanhand eftersom det bara kommer att finnas förbestämda bokningstider som inte går att ändra. Registrering av nya tider eller ändring av tider kan endast utföras av koordinatörer med administratörsbehörighet. Övrig personal som endast har läsbehörighet kan logga in via en egen inloggning för att få en översikt av lediga och bokade tider.

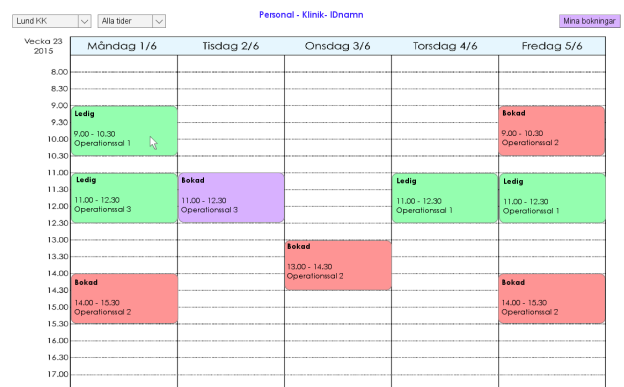
Upplägget i programmet bygger på att användaren på ett intuitivt sätt leds genom den process som varje funktion är kopplad till. En flödesprocess med de funktioner som inkluderas i bokningsprogrammet har skapats så att det på ett tydligt sätt är möjligt att se hur de olika funktionerna är relaterade till varandra. Grundtanken är att programmet på så sätt ska vara så pass enkelt att användarna inte behöver mer djupgående utbildning än en kort introduktion.

Efter utveckling av den första prototypen, genomfördes två uppföljningstillfällen med personal som intervjuats i ett tidigare skede i undersökningen. Ett antal viktiga slutsatser, som presenteras nedan, gjordes gällande funktionerna i programmet:

- Det är viktigt att kunna upprepa tillagda tider så att vissa tider återkommer kontinuerligt varje vecka. Då behöver inte administratören lägga till en tid i taget.
- Vid exempelvis felberäkning av förlossningsdatum ska det vara möjligt att flytta en inbokad patient utan att behöva ta bort och fylla i alla uppgifter på nytt.

- Om en inbokad patient opereras akut innan den planerade operationstiden, ska tiden bli ledig men informationen om att den ursprungliga patienten haft en annan planerad tid ska kunna sparas.
- Patientens graviditetsvecka ska framgå när hon bokas in för kejsarsnitt.
- Rutinen kring inskrivningsbesöket ändrades under projektets gång. Nu görs det istället under samma dag som själva operationen, vilket innebär att information om detta datum inte längre behövs.
- Det är viktigt att programmet är så enkelt som möjligt. Om för mycket information behöver skrivas in, kan detta, på grund av oaksamhet, medföra risker.

Med hjälp av dessa slutsatser gjordes några slutgiltiga ändringar hos funktionerna i prototypen, som därefter ansågs vara färdig. Nedan redovisas de olika funktionerna i programmet.



Figur 1. Schema-överblick av programmet.

**Boka ledig tid:** För att boka en tid klickar användaren på en ledig tid, varefter en informationsruta, som visar den mest väsentliga informationen om den lediga tiden, dyker upp. Genom att trycka på *Boka* tas användaren vidare till bokningsformuläret (se figur 2). Formuläret inkluderar all information som läkaren och operationsplanerare måste ha om patienten och dess operation. Den information som administratören lade in vid registreringen och ID-namnet på den läkare som gör bokningen går inte att ändra på och de rutorna är därför gråmarkerade. Efter väsentlig information om patienten och operationstillfället fyllts i och bokningen gjorts får användaren en bekräftelse och den gröna rutan ändrar färg till lila.

**Mina bokningar:** Under knappen *Mina bokningar* finns en lista på den inloggade läkarens bokningar, vilket inkluderar patienternas namn och operationsdatum. När ett namn klickas på, visas en ruta med information motsvarande den som fylldes i vid inbokningen. Samma sak händer om användaren trycker på *Mer info* i rutan som dyker upp när en lila, bokad ruta i schemaöversikten väljs. Det går också att välja att trycka på *Ändra* i informationsrutan och då får användaren upp bokningsformuläret igen.

Figur 2. Boka tid - bokningsformuläret.

**Lägga till och ta bort tid:** I administratörens överblick finns en knapp med texten *Lägg till tid*. När användaren trycker på den kan en ny tid läggas till genom att välja datum i en kalender, fylla i start- och sluttid och operationssal (se figur 3). Det finns också en valfri funktion, *Upprepa*, som kan kryssas i om samma tid kommer att vara återkommande. Upprepningen kan väljas att vara varje dag, varje vecka eller varje månad till och med ett valt datum. Klinik kan inte ändras eftersom en användare endast ska kunna lägga in nya tider på sin egen klinik. När tiden läggs till hamnar den i en lista i hörnet för att ge en överblick över vilka tider som lagts till under sessionen. Det går också att markera tider i listan för att ta bort eller ändra dem.

Figur 3. Tilläggning av tid i admin-inloggningen.

**Ändra tid:** Om läkaren av någon anledning vill boka om en patients tid, måste en förfrågan skickas till administratören, som då kan boka om patienten till en ledig tid på ett annat datum. När detta gjorts kommer en markering synas i den bokade rutan. Denna finns för att tydliggöra att denna operation bokats om en gång och på så sätt kunna undvika att samma patient ombokas flera gånger.

**Filtrera efter klinik och/eller tid:** Eftersom flera kliniker kan vara anslutna till systemet så kan filtrering göras utefter om tider från *Alla kliniker* eller en specifik ska visas. Det går

också att välja om *Alla tider*, *Lediga tider* eller *Bokade tider* ska visas. De olika filtreringarna går också att göra oberoende av varandra.

Bokning kan dock inte göras på andra kliniker inom Region Skåne än på Skånes Universitetssjukhus, utan detta måste avtalas via telefon.

**Bevakning av vecka:** Om en läkare inte får tag på en passande ledig operationstid till sin patient kan det hända att patienten måste opereras i en annan stad i Skåne. Det innebär att patienten måste pendla och kan skapa en stor otrygghet hos denna. Med hjälp av en bevakningsfunktion i bokningsprogrammet kan läkaren bevaka den bestämda veckan då patientens operation ska ske och få ett meddelande om en tid på det egna sjukhuset blir ledig.

#### IV. DISKUSSION

Detta projekt har gått ut på att undersöka möjligheterna till ett enklare och mer organiserat arbetsflöde för planerade kejsarsnitt på kvinnoklinikerna i Lund och Malmö. Undersökningen har lett fram till att ett bokningsprogram utvecklats. Idéen om bokningsprogrammet har från första intervjun till sista uppföljningsmötet uteslutande mötts av positiva reaktioner. Det bekräftar att det finns ett verkligt behov att fylla där befintliga verktyg inte räcker till. I operationsplaneringsverktyget Orbit saknas den, för planerade kejsarsnitt, väsentliga funktionen att på ett enkelt sätt kunna se och boka lediga tider. Då det administrativa arbetet utgör en betydande del av läkarens arbetstid, är det en fördel om de åtgärder som kan vidtas för att minimera detta också genomförs. Runtringningen som läkarna på kvinnoklinikerna i Malmö och Lund gör är arbete som skulle kunna överlåtas till någon annan. Genom att skapa ett förbättrat arbetsflöde skulle arbetet även kunna minskas. Då sparar det både in på onödigt arbete för personalen och kostnader för Region Skåne.

#### Utmaningar med dagens organisation

Sjuksköterskor och annan personal uppger under intervjuerna att de skulle kunna överta många arbetsuppgifter från läkare samtidigt som arbete som utförs av sjuksköterskor skulle kunna utföras av medicinska sekreterare. Det finns alltså en förskjuten fördelning bland arbetsuppgifterna i vården, där olika professioner utför arbetsuppgifter som egentligen skulle kunna överlåtas till personal med annat eller mindre ansvar. Eftersom läkares lönekostnader generellt sett är betydligt högre än för annan sjukvårdspersonal skulle en förändring i arbetsfördelningen innebära att en dyr resurs då kan användas mer kostnadseffektivt.

Under intervjuerna bekräftades även modellen med de olika "världarna", *Cure*, *Care*, *Control* och *Community*, av vilka slutsatsen drogs angående vikten av att, vid analys av arbetsflöden, just ta hänsyn till de olika perspektiven i sjukvården. Det kan alltså redan existera risk för uppkomst av konflikter mellan de olika världarna i sjukvården eftersom de ofta arbetar mot olika mål. Ett tydligt exempel är konflikten mellan operationsavdelningen och operatören, i detta fall obstetrikern. Operatörens uppdrag är att under vissa dagar operera inbokade

patienter. Personal på operationsavdelningen arbetar kontorstider. Om schemat för operationer blir förskjutet och risken finns att den sista operationen inte kan slutföras inom ramen för de ordinarie arbetstiderna så skjuts den upp. Detta sker eftersom det inte är rimligt att personal på en operationsavdelning ska jobba övertid den utsträckning som behovet finns. Konflikt kan uppstå mellan den opererande läkaren, vars mål är att operera sina egna patienter, och operationspersonalen när dessa operationer skjuts upp. SectioPlan kan vara ett bra hjälpmedel på vägen med att lösa denna konflikt eftersom överblicken över schemat och dess eventuella förskjutningar och ändringar blir bättre. På så sätt kan dialogen mellan involverade avdelningar förbättras eftersom ovissheten som uppkommer i dagens arbetsflöde bevisligen skapar konflikter och otydlighet mellan personalgrupper.

Det problematiska arbetsflödet kring planerade kejsarsnitt kan resultera i inställda operationer, vilket innebär stora och onödiga kostnader för Region Skåne. Det är svårt att, i litteraturen, hitta prislappar på kostnader för inställda operationer, men i en revisionsrapport för inställda operationer i Region Skåne från 2012, uppges det att kostnaden för att driva en operationssal, exklusive personalkostnader, är cirka 10 200 kronor per timme. I rapporten finns ett räkneexempel, baserat på statistik för inställda operationer år 2011, där kostnaden för outnyttjade operationssalar var cirka 15,7 miljoner kronor på ett år. I exemplet inkluderades alla planerade operationer i Skåne och inte bara planerade kejsarsnitt. Även om kejsarsnitt inte är den största andelen operationer som utförs, påverkar det ändå den totala statistiken och kostnaderna. Därför är det viktigt att arbeta för att förbättra arbetsflödet och därmed minska riskerna för alla typer av inställda operationer, även planerade kejsarsnitt [8].

### *SectioPlans roll i planeringsprocessen*

I nuläget kommuniceras förändringar i kejsarsnittsplaneringen på kvinnoklinikerna muntligt eller via pärmen och ibland inte alls. Bristen på tydlig kommunikation leder till en osäkerhet vilket kan göra att personal vid upprepande tillfällen måste försäkra sig om att information nått fram genom att exempelvis ringa [9]. SectioPlan gör att pärmen inte behöver användas i planeringen av planerade kejsarsnitt. Programmet skulle därför med fördel kunna implementeras i Region Skåne, vilket också har efterfrågats av flertalet av de intervjuade ur personalen. Att det går att se tider på alla anslutna kliniker åtgärdar ursprungsproblemet med läkarnas rundringning mellan kliniker samtidigt som det lokala arbetsflödet struktureras upp.

Utöver att programmet ger en överblick över lediga och bokade tider och på så sätt ger användaren bokningsmöjlighet, har funktionen *Mina bokningar* inkluderats. Det finns ingen motsvarighet till detta i dagens arbetsflöde, men det är något som kan bidra till att upprätthålla strukturen i arbetsflödet och till att ge läkaren bättre kontroll, speciellt i de lägen då läkaren önskar operera sin egen patient.

En viktig aspekt som var nödvändig att ta hänsyn till vid utvecklingen, var vem som skulle ha behörighet att göra vad. Bland de intervjuade var åsikterna delade mellan att det endast

skulle vara koordinatörer som skulle kunna boka respektive att läkare skulle kunna göra det självständigt. Orosmomentet låg i att läkare själva skulle kunna lägga till operationstider utöver de tillgängliga, vilket ibland sker i dagens planeringsprocess, och det skulle skapa problem i planeringen. Lösningen med att endast användare med en administratörsbehörighet ska kunna lägga in vilka tider som är bokningsbara, blev därför väl mottagen vid uppföljningen. Dessutom ger detta möjlighet till en överflyttning i rätt riktning av det administrativa arbetet, då en koordinator, som kan vara både sjuksköterska eller medicinsk sekreterare, tar över läkarnas tidigare arbete med att hitta de lediga tiderna. Dessa meddelas istället direkt till koordinatören som registrerar tiderna i programmet. Eftersom det är sjuksköterskorna som i nuläget arbetar med administrationen kring planerade kejsarsnitt skulle ansvaret som koordinator bli en naturlig roll för dem att ta, vilket också framkom under intervjuerna.

En annan aspekt som var viktig att tänka på vid utveckling av bokningsprogrammet var att det skulle innehålla så lite information om patienterna som möjligt. Detta poängterades av personal under flera intervjuer då en onödig risk för bortfall av information kan uppstå om programmet innehåller för många funktioner.

En positiv sideeffekt av bokningsprogrammet är att statistik om bokningarna kan insamlas. Möjligheten att få en bild av hur väl kvinnoklinikens operationsresurser utnyttjas kan användas till att effektivisera arbetet med planerade kejsarsnitt.

### *Hållbar utveckling*

Ur ett ekonomiskt perspektiv kan ett bokningsprogram bidra till att minska antalet tomma operationssalar och därmed kostnaderna för dessa. Genom att dessutom minska det administrativa arbetet kan stora utgifter i form av lönekostnader användas för mer vinstgivande ändamål.

Ett bokningsprogram kan även hjälpa till att skapa en bättre arbetsmiljö på sjukhuset, både för personal och patienter. Personalen kan få bättre uppsikt över inbokade operationer och patienten kan, som tidigare nämnt, få reda på sin operationstid direkt vilket innebär större patient empowerment<sup>3</sup>. Bokningsprogrammet värnar om den personliga integriteten i och med att åtkomligheten till patienternas personliga information är begränsad då det krävs en inloggning och åtkomsten även skyddas av sjukhusets intranät.

Miljömässigt kommer ett bokningsprogram leda till mindre pappersanvändning då pärnarna och dess utskrivna scheman blir överflödiga. Om programmet dessutom bidrar till att förbättra sjukvårdens syn på IT-system kan detta leda till mindre pappersanvändning i allmänhet på sjukhusen i Skåne.

### *Framtidsutsikter*

Införandet av ytterligare ett IT-system i sjukvården kan, som tidigare nämnts, komma att möta ett visst motstånd. Att programmet i nuläget endast består av ett användargränssnitt gör därför att möjligheten finns för att integrera programmet med

<sup>3</sup>En term som beskriver främjandet av aktivt patientdeltagande i vårdprocessen [13].



redan befintliga. Det skulle kunna fungera som en applikation till Orbit och därigenom möjliggöra informationsutbyte mellan dessa. Det finns dessutom mycket utrymme för utveckling av befintliga och nya funktioner. Funktionen *Bevakning av vecka* skulle kunna bli en väntelista, så istället för att bokningen sker med först-till-kvarn-principen kan bevakningen innebära att den läkare som först registrerar en bevakning på en viss vecka också får möjlighet först att boka en tid som blivit ledig.

I nuläget går det, genom funktionen *Filtrera efter klinik*, att se lediga operationstider för alla kliniker i Region Skåne, men för att boka på andra kliniker än i Lund och Malmö, måste personalen där kontaktas. Detta skulle i framtiden kunna utvecklas till att samtliga tider på anslutna kliniker är bokningsbara.

Bokningsprogrammet har främst baserats på den information som erhållits från de nio utförda intervjuerna. I en fortsättande del av projektet skulle en större undersökningsgrupp behöva intervjuas och ges möjlighet att kommentera på det nuvarande användargränssnittet. Utvecklingen av SectioPlan har hittills dessutom skett med inriktning mot Region Skåne och speciellt Skånes Universitetssjukhus då det har funnits närmast till hands för intervjuer och studiebesök. Dock finns utrymme för att utveckla idén och använda programmet på andra sjukhus i Sverige. Vid kontaktande av sjukhus utanför Region Skåne framkom det att dessa också skulle gynnas av ett bokningsprogram, då operationsanmälan även här utfördes manuellt på papper. Därför är det också en fördel att programmet utvecklats fristående från andra system, eftersom detta, kombinerat med programmets okomplicerade utformning, gör att det är enkelt att anpassa efter andra regioners och sjukhus behov. Programmet är innovativt på det sätt att det är skapat utifrån ett behov i sjukvården. Det uppmuntrar i sin funktion till ett rakt och simpelt arbetsflöde som oavsett var det används kan se liknande ut. Då regionernas rutiner kring planerade kejsarsnitt skiljer sig ur många avseenden, kan ett gemensamt bokningsprogram vara en bit på vägen mot en mer sammanhållen sjukvård.

## V. SLUTSATSER

En slutsats är att IT-system kan effektivisera det administrativa arbetet i sjukvården om de är användarvänliga, anpassade till sitt användningsområde och utvecklade i samråd med personal. Då kan den manuella hantering, som innebär ökande risk för informationsförluster, minskas. En annan viktig slutsats är att personalen på kvinnoklinikerna på Skånes Universitetssjukhus utför mycket administrativt arbete som skulle kunna reduceras. Flera IT-system, som inte kommunicerar med varandra, används parallellt, vilket snarare innebär en börda än en underlättande faktor för personalen. I nuläget har bristen på fungerande IT-system gjort att personalen använder papper och telefonsamtal för att boka planerade kejsarsnitt. Utifrån detta kan slutsatsen dras att med hjälp av ett elektroniskt bokningsprogram skulle planeringsarbetet och kommunikationen kunna förbättras - både lokalt men även mellan de olika kvinnoklinikerna.

## VI. EFTERORD

Vi vill tacka vår kliniska handledare Monica Lilja, som introducerat oss till problemställningen samt kopplat ihop oss med personal på klinikerna och hjälpt oss på vägen. Vi vill även tacka vår tekniska handledare Martin Stridh, som stöttat oss genom projektets gång och kommit med bra feedback på rapportens innehåll, och Andreas Herbst, som givit oss förslag på personer att intervjua. Till sist vill vi tacka alla som deltagit i undersökningen genom att ställa upp på intervjuer och på så sätt givit oss värdefull kunskap och idéer till bokningsprogrammet.

Arbetet har gjorts gemensamt och en tydlig dialog har alltid funnits mellan Isabelle och Nadia under projektets gång. Intervjuerna leddes av Nadia medan Isabelle förde anteckningar. Utvecklingen och designen av bokningsprogrammet gjordes gemensamt och hela arbetsprocessen strukturerades upp med en planering och olika delmål. Det möjliggjorde också arbete med skrivandet av rapporten på egen hand vid behov, men majoriteten av den har skrivits tillsammans.

## REFERENSER

- [1] Vårdanalys, 2013. *Ur led är tiden - Fyra utvecklingsområden för en mer effektiv användning av läkares tid och kompetens*. Stockholm: Myndigheten för vårdanalys. s. 10, 59-84
- [2] Norbäck LE, Targama A., 2009. *Det komplexa sjukhuset - att leda djupgående förändringar i en multiprofessionell verksamhet*. Borås: Studentlitteratur AB.
- [3] Christian CK, Gustafson ML, Roth EM, Sheridan TB, Gandhi TK, Dwyer K, Zinner MJ, Dierks MM., 2006. A prospective study of patient safety in the operating room. *Surgery*, 139(2), s.159-173.
- [4] Region Skåne, 2015. *Obstetrix*. [Online] Tillgänglig på: <http://vardgivare.skane.se/it2/it-stod-och-tjanster-a-o/obstetrix/> [Hämtad 3 mars 2015].
- [5] EVERY Healthcare Systems AB, 2011. *Orbit 5, Ett system för operationsplanering, Funktionsbeskrivning*. [Internt dokument] Januari 2015
- [6] Karolinska sjukhuset, 2015. *Kejsarsnitt* [Online] Tillgänglig på: <http://www.karolinska.se/for-patienter/alla-mottagningar-och-avdelningar-a-o/kvinnokliniken/bb-avdelningar/bb-huddinge-k77/kejsarsnitt/> [Hämtad 21 januari 2015].
- [7] Vårdgivarwebb Region Östergötland, 2015. *Sectio, rutiner vid planerat sectio* [Online] Tillgänglig på: <http://vardgivarwebb.regionostergotland.se/Startsida/PM-medicinska-o-vardadm/PM-dokument/Barn-och-Kvinnocentrum/Kvinnoklinikerna-i-Ostergotland/Medicinska-PM/Sectio-rutiner-vid-planerat-sectio-/> [Hämtad 21 januari 2015].
- [8] KPMG AB, 2012. *Region Skåne Revisionsrapport Inställda operationer* [Online] KPMG AB. Tillgänglig på: <https://www.skane.se/Upload/Webbplatser/Revisionen/2012/Kollegiem%C3%B6te%20120320/Rapport%20inst%C3%A4llda%20operationer120320.pdf> [Hämtad 24 april 2015].
- [9] Hall D., 2013. *Operationsprocessen - Operationsplaneringssystemets betydelse för patientsäkerheten vid kirurgi*. Examensarbete 15 hp (Magister). Linköpings Universitet.
- [10] Vanberkel PT, Boucherie RJ, Hans EW, Hurink JL, van Lent WA, van Harten WH., 2011. Accounting for inpatient wards when developing master surgical schedules. *Anesthesia Analgesia*, 112(6), s. 1472-1479.
- [11] EaSynth Solution Inc. Ltd., 2015. ForeUI [Datorprogram] EaSynth Solution Inc. Ltd. Tillgänglig på: <http://www.foreui.com/> [Hämtad 5 mars 2015].
- [12] Sjunet, 2015. *Sjunetkoppling landsting och regioner* [Online] Tillgänglig på: [http://www.inera.se/KONTAKT\\_KUNDSERVICE/Driftstatus/Sjunetuppkopplingar/Sjunetkoppling-Landsting/](http://www.inera.se/KONTAKT_KUNDSERVICE/Driftstatus/Sjunetuppkopplingar/Sjunetkoppling-Landsting/) [Hämtad 14 april 2015].
- [13] Segen, J, 2011. *Segen's Medical Dictionary*. Farlex Inc. Tillgänglig på: <http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/patient+empowerment> [Hämtad 29 april 2015].
- [14] *Medicinsk ordbok*. Tillgänglig på: <http://medicinskordbok.se/component/content/article/9-b/52183-elektiv> [Hämtad 29 april 2015].

# Triggning av aktionspotential i daggmusk med hjälp av ultraljud

Innas Forsal (BME-12), Yann Moreau Brunn (BME-12)

**Sammanfattning**—Ultraljud som behandlingsmetod mot Parkinsons sjukdom, epilepsi, depressioner och hjärnskakningar var idén som låg till grund för rapporten. Idén bygger på att ultraljudsvågor med låg frekvens och låg effekt ska kunna ta sig in i hjärnan och där trigga neuronal aktivitet för att på så sätt förhindra nedbrytning av nervceller. Rapportens huvudsyfte var att utreda möjligheterna med att få ultraljud att trigga nervsignaler. För att nå dit utfördes först mätningar på daggmusk där målet var att mäta upp en aktionspotential. I de första försöken skedde stimuleringen av daggmuskens nerv elektriskt via två nålelektroder där registreringen också nyttjade två nålelektroder. Mätuppställningen bestod bl.a. av en funktionsgenerator för stimulering, en förstärkare dit de registrerande elektroderna anslöts och ett datainsamlingskort som kopplades till en laptop för insamling av data. Ingen aktionspotential hittades vilket ledde till kommande försök där istället mekanisk stimulering användes genom att det petades på en av daggmuskens ändar. Mätningarna skedde här både noninvasivt, genom att daggmusken lades på en stålträdsbädd, samt invasivt med nålelektroder. Resultaten var även här fruktlösa. Det sista försöket använde sig av en reglerbar förstärkare med likadan mätuppställning som i de första försöken. Ingen aktionspotential kunde uppmätas. Gemensamt för försöken var närvaron av för mycket brus och en ständigt bottnande mätkurva vilket försvårade mätningarna av aktionspotentialen avsevärt. Projektet nådde p.g.a. bristen av tillfredsställande resultat aldrig fram till försök med ultraljud. För vidare studier rekommenderas ett bandpassfilter runt 300–3000 Hz, förstärkare med förstärkning kring 1000 gånger lite beroende på elektrodplacering och mätningar på hummer istället för daggmusk.

## I. INTRODUKTION

ULTRALJUD associeras ofta med diagnostik, ofta som ett verktyg för att undersöka gravida kvinnor. Idag anser dock forskare att ultraljud kan få nya användningsområden såsom kontroll av hjärnaktivitet från utsidan utav skallen. Patienter med Parkinsons behandlas idag med hjälp av elektroder som sätts in i hjärnan och sedan stimulerar nerverna. Behandlingen är invasiv och själva operationen är komplicerad med många möjliga komplikationer som följd. Även personer med epilepsi eller svåra depressioner kan behandlas med implantat i hjärnan i form av elektroder. Om det hade varit möjligt att ha en icke-invasiv behandling som gav samma effekt som implantaten skulle riskerna med ingreppen elimineras och leda till att stimulering av nerver nu var tillgänglig för en större del av befolkningen. Förutom de kliniska fördelarna med ultraljud som ett behandlingsverktyg så kan denna teknik även användas mer kommersiellt för att till exempel förhindra sekundära skador som uppstår efter hårda slag mot huvudet hos idrottare.

Inlämnat den 10 juni 2015  
 Emejladress: {mte12ifo@student.lu.se, abt08ymo@student.lu.se}  
 Handledare: Tomas Jansson, Medicinsk Teknik

Det finns ingen bra behandlingsmetod mot hjärnskakningar idag och de långvariga effekter dessa kan ge upphov till såsom Alzheimers. Genom att skicka ultraljudsvågor med låg frekvens och låg effekt kan hjärnan luras att tro att skadade nerver fortfarande fungerar som de ska [1]. Tanken är att detta ska hämma de förlopp som bryter ner skadade nervceller. Ultraljud som behandlingsmetod för ovan nämnda problem har stor potential för både allmänheten och sjukvården på grund av dess tillgänglighet och skonsamhet. Syftet med denna rapport är att undersöka huruvida ultraljud kan trigga en nervimpuls. Till att börja med ligger fokus på att mäta upp en aktionspotential i en daggmusk för att sedan kunna gå vidare med ultraljudstester.

För att tillhandahålla en förståelig översikt över potentiella mekanismer som ultraljud kan tänkas ha på neuronal stimulering föreslår Tyler en hypotes. Denna bygger på att ultraljud skapar effekter på viskoelastiska neuron och deras omgivande vätskemiljö vilket i sin tur leder till förändringar i membranets permeabilitet för olika joner. Detta leder till att aktionspotentialer kan starta [2]. Experimentell data tyder på att ultraljud är en spännande plattform för att utveckla framtida terapeutiska neuromodulationsmetoder. I Tyler et al [3] triggar man neuronal aktivitet i en mushjärna med transkraniellt pulsat ultraljud.

I forskningsrapporten av Stauning [4] och i bachelorprojektet av Kold [5] undersöks det huruvida The Hodgkin-Huxley Model eller The Soliton Model är bäst lämpad för att beskriva en nervsignals egenskaper. Genom att i en daggmusk trigga en aktionspotential i vardera ände och därefter se om dessa signaler släcker ut varandra eller passerar varandra kan lämplig modell utses. Detta i sig är inte av intresse för denna rapport men mätuppställningarna som här används är av stort intresse för detta projekt då det är just på daggmusk det ska försökas trigga en aktionspotential, först med elektrisk stimulering. Artikeln av Shannon et al [6] som visar en annan mätuppställning av intresse där stimuleringen istället sker mekaniskt genom att peta på daggmusken. Här beskrivs även olika problem som kan tänkas dyka upp under mätningarna.

## II. BAKGRUND

### A. Nervcellen och dess signalöverföring

Ett klassiskt neuron består utav en cellkropp, flera förgrenade dendriter vars uppgift är att ta emot den inkommande signalen, samt ett axon som för signalen vidare till axonterminaler vilka tillhör synapsen, se figur 1. Här sker kommunikation med andra celler. Neuron återfinns som sensor, motor- samt interneuron i olika former och storlekar men gemensamt för alla är att de består av tidigare nämnda delar. Dendriternas och

cellkroppens plasmamembran är känsliga för kemisk, elektrisk eller mekanisk stimulering. Dessa typer av stimuleringar kan ge upphov till en aktionspotential, en elektrisk impuls, som sedan förflyttar sig längs med axonet.

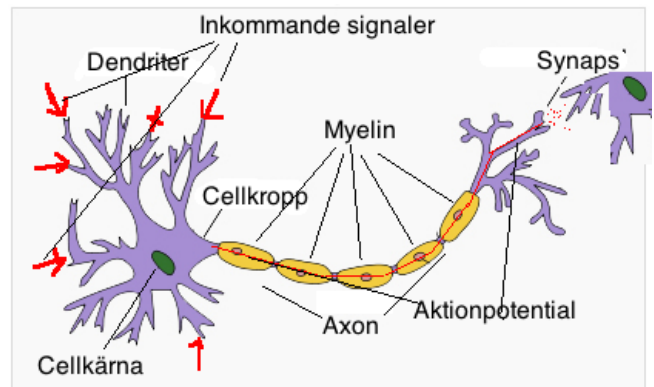
En cell helt utan påverkan från olika typer av stimuleringar har ett polariserat plasmamembran, detta då utsidan av membranet innehåller ett överskott av positiva laddningar och insidan ett överskott av negativa laddningar. Potentialskillnaden som uppstår över plasmamembranet benämns membranpotential. Är cellen i ett ostört tillstånd kallas potentialen för vilopotential som för neuronet ligger på  $-70\text{ mV}$ .

Utöver den laddningsskillnad som finns över membranet skiljer sig även jonsammansättningen i den intra- och extracellulära vätskan åt. Den intracellulära vätskan innehåller höga koncentrationer av positivt laddade kaliumjoner. Den extracellulära vätskan har höga koncentrationer av positivt laddade natriumjoner samt negativt laddade kloridjoner. För att upprätthålla dessa skillnader mellan neuronets ut- och insida är plasmamembranet selektivt permeabelt. Permeabiliteten kommer av att det i plasmamembranet sitter olika typer av membrankanaler. Läckkanalerna är alltid öppna och här går natrium och kaliumjoner passivt från hög till låg koncentration för att utjämna koncentrationsskillnader. Gated channels är jonkanaler med portar som öppnar och stänger sig passivt under speciella förhållanden, exempelvis vid en förändring i spänning.

För att en potentialskillnad ska upprätthållas över plasmamembranet måste en aktiv transport ske för att motverka den passiva transporten av kalium- och natriumjoner. Detta sker med hjälp av bärarprotein som fungerar som jonpumpar. Natriumkaliumpumpen byter ut tre intracellulära natriumjoner mot två extracellulära kaliumjoner. Detta leder till en nettoförlust av positiva laddningar hos cellen vilket resulterar i överskottet av negativa laddningar intracellulärt.

Stimuleringar som förändrar plasmamembranets permeabilitet för natrium och kalium alternativt förändrar aktiviteten hos pumpar påverkar cellens membranpotential. Exempel på stimuli som påverkar detta är mekaniskt tryck och temperaturförändringar. Ofta går jonkanaler från att vara stängda till öppna efter stimulering vilket leder till att fler joner förflyttar sig över membranet och membranpotentialen påverkas därmed. Öppnas natriumjonkanaler kommer fler natriumjoner tränga in i cellen och membranpotentialen kommer stiga (nära sig  $0\text{ mV}$ ). Då membranpotentialen når tröskelvärdet  $-55\text{ mV}$  triggas en aktionspotential, i neuron även kallad nervimpuls, vilket innebär en förändring av membranpotential över hela plasmamembranet. Voltage gated (spänningsportade) natriumjonkanaler, jonkanaler som öppnar och stänger sig med ändringar i spänning, öppnas och natriumjoner strömmar in i cellen vilket leder till en depolarisering.

Aktionspotentialen startar av att en graderad depolarisering, som är stor nog, öppnar spänningsportade natriumkanaler. Kanalerna öppnas vid en membranpotential på  $-55\text{ mV}$  även kallad tröskelvärdet. När dessa kanaler öppnas flödar natriumjoner in i cytoplasman och en snabb depolarisering äger rum. Nu innehåller den inre membranytan mer positiva än negativa joner och membranpotentialen har ökat från  $-55\text{ mV}$  till ett positivt värde. Då membranpotentialen närmar sig  $+30$

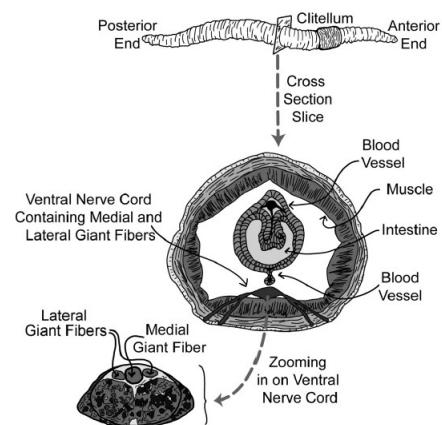


Figur 1. Översikt över nervcellen [7].

$\text{mV}$  stänger sig de spänningsportade natriumkanalerna. Detta steg sammanfaller med att spänningsportade kaliumkanaler öppnar sig. Positivt laddade kaliumjoner förflyttar sig ut från cytosolen vilket leder till att membranpotentialen går mot vilopotential. Repolariseringen tar vid. De spänningsportade kaliumkanalerna börjar stängas då membranpotentialen närmar sig en normal vilopotential på ca  $-70\text{ mV}$ . Fram till att alla kanaler har stängts fortsätter kalium att lämna neuronet vilket leder till en liten hyperpolarisering, d.v.s. membranpotentialen närmar sig  $-90\text{ mV}$ . Slutligen då alla spänningsportade kanaler stängts har membranpotentialen åter nått vilopotential vilket innebär att en ny aktionspotential kan ta vid [8].

## B. Daggmasken

Daggmasken är ett ryggradslöst djur vilket innebär att den har en ventral nerv längs med magen till skillnad från ryggradsdjur som har en dorsal nerv i form av ryggmärgen som går längs hela baksidan. Daggmaskar kan delas in i tre delar, en anterior ände, en posterior ände samt clitellum som är det reproduktiva segmentet, se figur 2.



Figur 2. Daggmaskens anatomi, den översta delen, och inzoomning av ett snitt med fokus på nerverna, undre delen [6].

Daggmaskar har tre stora myeliniserade nervfibrer, en stor medial nervfiber och två stora laterala nervfibrer. Dessa fibrer

går längs med daggmascens hela längd och hittas i daggmascens ventrala nervsträng. De laterala nervfibrerna skickar sensorisk information från den posteriora delen medan den mediala nervfibern skickar sensorisk information från den anteriora änden av masken. Diametern på den mediala nervfibern är  $0,07\text{ mm}$  och för den laterala  $0,05\text{ mm}$ , dock kan variationer på diametern på nervfibrerna finnas mellan de olika daggmascarterna [9]. De två laterala nervfibrerna går ihop via olika sammanbindningar och anses därför vara ett funktionellt axon istället för två. Storleken på de olika nervfibrernas diameter är olika vilket resulterar i olika nervhastigheter. Ju större diameter nerven har desto snabbare skickas signalerna [10].

### III. MATERIAL

- Mätkammare
- Hewlett Packard 3314A Functiongenerator
- Oscilloskop
- Instrumentförstärkare
- 100x-förstärkare
- 2150x-förstärkare med inbyggt filter
- Reglerbar förstärkare
- Ström-/spänningskälla
- National Instruments Multifunctional I/O (NI-DAQ)
- 3D-printer Ultimaker<sup>2</sup>
- 99.8 % etanol
- Daggmasc, *Dendrobaena*

Mjukvara:

- Autodesk Fusion 360
- DAQMX SOFTWARE (+DAQ device drivers)
- National Instruments Labview
- National Instruments Device Monitor
- Cura 14.12.1

### IV. METOD

Mätkammaren designades i Autodesk Fusion 360 och printades ut i Ultimaker<sup>2</sup>. För mått och bild på kammaren se Appendix I. Fyra elektroder tillverkades genom att löda ihop en vanlig synål i rostfritt stål med en elkabel.

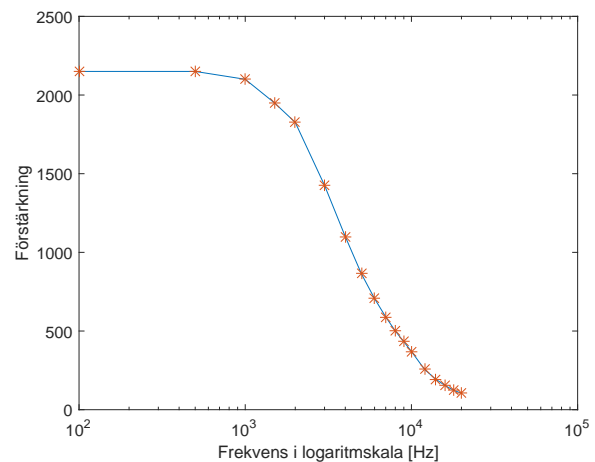
Funktionsgeneratorns SYNC-utgång kopplades in till NI-DAQ-kortet för att synkronisera stimuleringspulsen med insamlingen av data. Stimuleringssignalen skickades via funktionsgeneratorns OUT-utgång. Signalen var en fyrkantsvåg med en frekvens på  $20\ 000\text{ Hz}$  där amplituden successivt ökades från  $0\text{ V}$ – $5\text{ V}$  peak-to-peak. En period skickades var  $1,5$  sekund genom att dels ställa in N till 1 samt använda funktionen Burst.

Kontroll av stimuleringsignal samt SYNC från funktionsgeneratorn, signal ut från förstärkaren samt signaler från de olika instrument som användes gjordes kontinuerligt med hjälp av ett oscilloskop.

Labview användes för att kunna analysera den data som hade samlats in. Programmet använder sig av ett blocksystem och de block som användes var DAQ Assistant samt Waveform Graph. Dessa block möjliggör bl.a. att kunna följa datainsamlingen från de registrerande elektroderna i grafer samt att

ställa in triggning [11]. Beroende på hur man kopplar in i de registrerande ingångarna i NI-DAQ kommer inställningarna skilja sig. I detta fall användes ingångarna AI0, GND samt AI4. Beroende på vilka två som användes ställdes RFS eller Differential in vid terminalkonfigurationen. För att kunna trigga kopplades SYNC utgången till NI-DAQ's PF10 utgång samt GND [12]. Inställningarna för triggningen gjordes sedan i LabView. Triggern gör det möjligt att kunna följa vad som händer precis efter att en stimuleringspuls skickats vilket presenteras i Waveform Graph [11].

En instrumentförstärkare med  $<100x$  förstärkning användes, den fungerade optimalt för relativt låga frekvenser. Utöver det nyttjades två specialbyggda förstärkare med  $2150x$  respektive  $100x$  förstärkning. Förstärkaren på  $2150x$  hade ett inbyggt lågpasfilter med bibehållen förstärkning upp till ett par  $kHz$ , se figur 3.  $100x$ -förstärkaren förstärkte signalen maximalt upp till  $2\text{ kHz}$ . Senare byttes resistorn ut i  $2150x$ -förstärkaren så att förstärkningsgraden istället kunde regleras.



Figur 3. Förstärkningens frekvensberoende hos  $2150x$ -förstärkaren.

Daggmascarna som användes i de olika försöken sövdes ner olika mycket med en lösning bestående av  $10$ – $25\%$  etanol och resterande del vatten. Daggmascen placerades därefter i mätkammaren som i sin tur ställdes i en plåtburk för att minimera störningar utifrån. Elektroderna placerades så att de stimulerande elektroderna låg cirka  $0,5\text{ cm}$  ifrån varandra.  $2\text{ cm}$  från dessa fanns två registrerande elektroder med ca  $1\text{ cm}$  mellan sig. Elektroderna bestod dels av synålar för invasiv mätning samt av ståltrådar för noninvasiv mätning. Samtliga försök upprepades med flera olika daggmascor. Även försök på osövda daggmascor genomfördes.

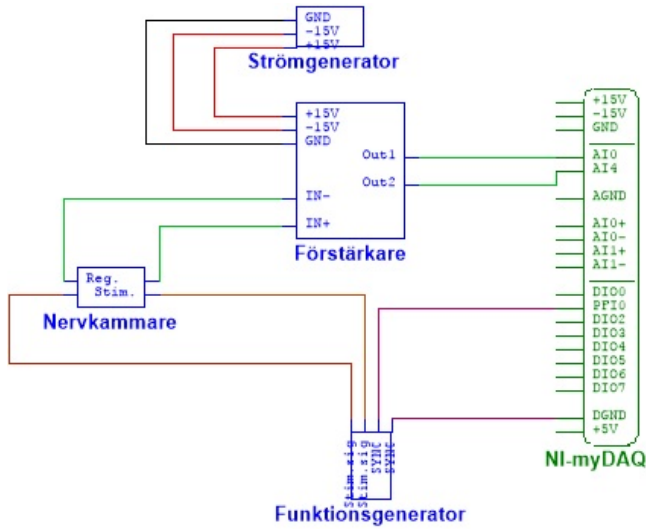
I försök 1 till 3 bestod mätupställningen av spänningskälla, förstärkare, National Instruments Multifunctional I/O (NI-DAQ) och en funktionsgenerator, se figur 4. I försök 4 skedde stimuleringen mekaniskt d.v.s. ingen funktionsgenerator nyttjades, se Appendix II. Mätupställningen till försök 5 påminde om försök 1-3 men med endast en registrerande elektrod, se Appendix III.

## A. Försök 1-3

## V. RESULTAT

## A. Försök 1

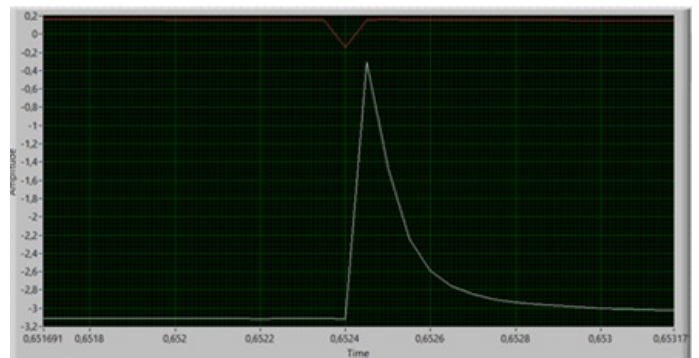
För att testa om mätuppställningen fungerade utfördes ett pilotförsök. Detta med 100x förstärkning där standarduppställningen för stimulering och registrering nyttjades enligt figur 3 där datainsamlingen skedde invasivt via synålselektroder. Till en början användes 24k sampelrate och 24k sampel vilket gav ett mätområde på 1 s som uppdaterades kontinuerligt. En intressant signal fångades upp  $5 * 10^{-5}$  s efter stimulering, se figur 7. Denna återkom vid upprepade tillfällen med varierande amplitud. Dock var inte signalen en aktionspotential eftersom den hade såpass varierande amplitud att den uppstod för snabbt efter stimulering. Signalen tros istället ha varit en artefakt uppkommen som en följd av stimuleringsimpulsen. Eftersom avståndet mellan stimulerande och registrerande elektrod var runt 2 cm och nervsignalens hastighet var över 1m/s sänktes antalet sampel till 480 vilket motsvarade ett mätfönster på 0,02 s. Trigfunktionen aktiverades. Det känsligare mätfönstret resulterade i att höga brusnivåer upptäcktes, artefakten från tidigare försök kvarstod, se figur 8. Förstärkningen på 100x tycks inte ha räckt för att signalen av intresse skulle hamna ovanför brusnivåerna.



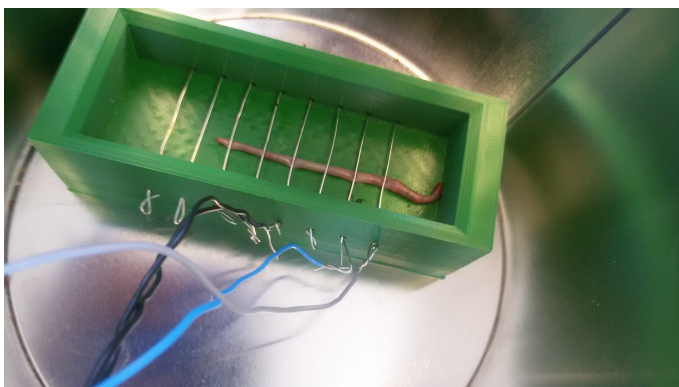
Figur 4. Kopplingsschema för försök 1-3.



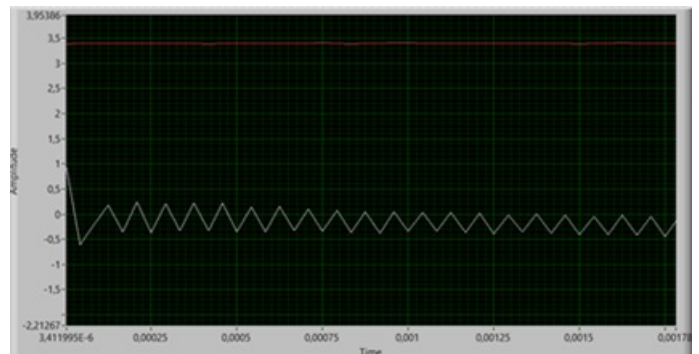
Figur 5. Dagmaskuppkoppling för försök 1 och 2. Blå och grå nålelektrod för stimulering, övriga för registrering.



Figur 7. Inzoomad mätkurva från försök 1. Överst stimulussignalen där stimulusartefakten ses framträda kort därefter.



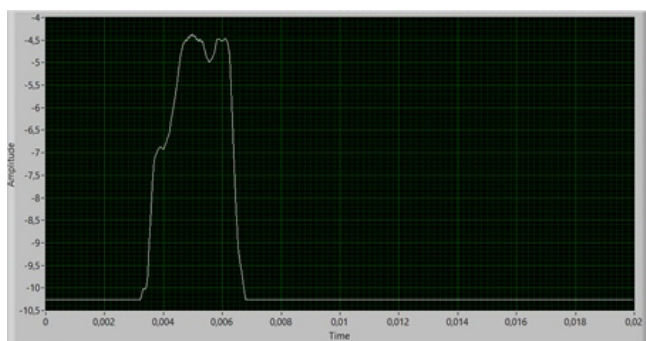
Figur 6. Dagmaskuppkoppling för försök 3. Grå och blå för stimulering, svarta för registrering.



Figur 8. Triggningfunktionen aktiverad, mätningarna startar då stimulerings-signalen skickas. Stimulusartefakten syns nederst längst till vänster.

### B. Försök 2

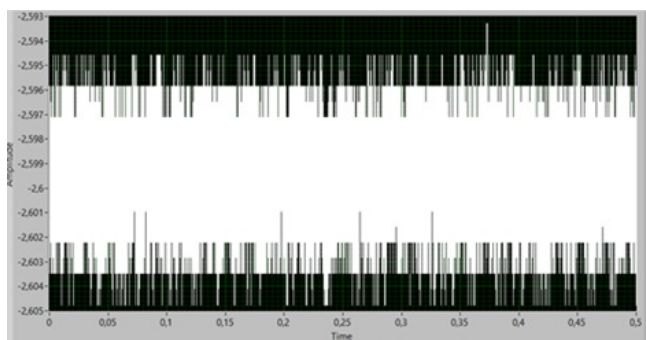
För att undersöka om en starkare förstärkning skulle ge bättre resultat användes en 2150x-förstärkare med inbyggt filter. En signal dök ibland upp i mätfönstret där den snabbt bottnade på drygt -10 V, som i figur 9. Således återgavs inte en kontinuerlig mätning av den elektriska aktiviteten i daggmasken. För att testa huruvida det hade att göra med nedsövningen av masken utfördes istället ett test på en osövd mask. Endast registrerande elektroder fördes in i masken. Problemet kvarstod, ingen kontinuerlig signal gick att mäta vilket upplevdes som ytterst märkligt då en mask i rörelse definitivt bör generera mycket elektrisk aktivitet, se figur 9. Förstärkningen misstänks ha varit för kraftig för att signalen skulle hamna i mätområdet.



Figur 9. Resultat från försök 2.

### C. Försök 3

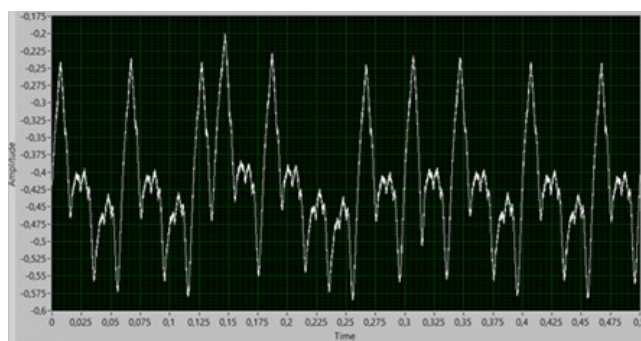
För att undersöka om noninvasiv stimulering fungerade bättre användes en modifierad försöksupställning där daggmaskens ventrala sida, för bättre kontakt, placerades mot en ståltrådsbädd. Två av ståltrådarna fungerade som stimulerande elektroder samt två andra hade till uppgift att registrera. Tester både på levande och sövda maskar utfördes både med 2150x-förstärkaren samt med instrumentförstärkaren med <100x förstärkning. Resultaten för de två olika förstärkarna var fruktlösa då mätresultaten likt tidigare försök bottnade kring -10V samt var för brusiga (se figur 10) för att en eventuell aktionspotential skulle kunna urskiljas. För att förbättra kontakten mellan daggmasken och elektroderna ytterligare klämdes den in under ståltrådsbädden med den ventrala sidan uppåt men resultaten förblev oförändrade.



Figur 10. Resultat från försök 3.

### D. Försök 4

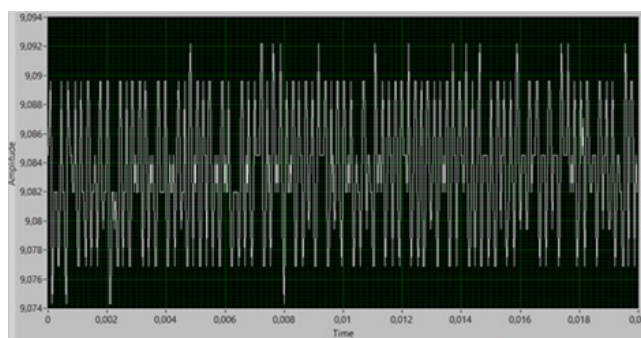
För att testa om mekanisk stimulering fungerade bättre användes en försöksupställning med två registrerande elektroder där daggmasken stimulerades genom att den petades på i en av dess ändar. Tester utfördes både med invasiv samt noninvasiv registrering d.v.s. med synålselektroder respektive med ståltrådsbädd. För kopplingsschema se Appendix II. Kontinuerlig datainsamling med förstärkaren på 2150x gav samma resultat som för övriga försök, en bottnande mätkurva. Med <100x-förstärkaren upptäcktes något som skulle kunna ha varit aktionspotentialer när mätningar på en levande mask utfördes utan stimulering. Se figur 11. Troligtvis är det inte aktionspotentialer då pulstiden är betydligt längre än det förväntade på 2-5 ms.



Figur 11. Resultat från försök 4.

### E. Försök 5

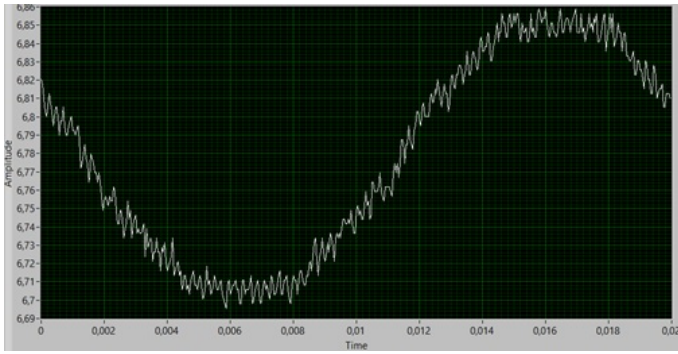
För att testa en ny mätupställning nyttjades två stimulerande nålelektroder samt en registrerande där den andra ingången till förstärkaren jordades. För kopplingsschema se Appendix III. Varken för 2150x- eller instrumentförstärkaren upptäcktes någon aktionspotential, se figur 12.



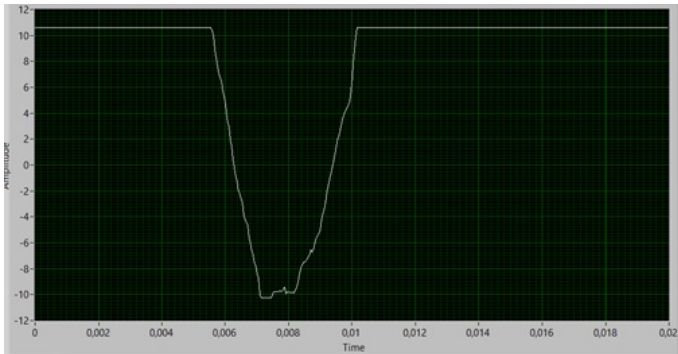
Figur 12. Resultat från försök 5.

### F. Försök 6

För att testa om en mindre förstärkning kunde leda till en uppmätt aktionspotential byttes resistorn som satt i 2150x förstärkaren ut mot en vars resistans kunde varieras. Resistorn skruvades på så att 1000x-förstärkning uppnåddes, detta med hjälp av oscilloskop. Mätningar på en levande mask utfördes, se figur 13 och figur 14. Resistansen varierades sedan med liknande resultat som följd.



Figur 13. Resultat från försök 6.



Figur 14. Resultat från försök 6.

## VI. DISKUSSION

### A. Daggmasken

Daggmasken som användes i experimentet ingår i släktet *Dendrobaena* och har en medellängd på 7 cm. Daggmaskarna som vanligtvis används vid liknande experiment tillhör släktet *Lumbricus terrestris* och dessa är 10-20 cm. Valet av daggmask kan ha påverkat resultaten då storleken på en aktionspotential beror på ifall axonet är myeliniserat eller inte och på vilken diameter axonet har. Ett myeliniserat axon med en stor diameter kommer ha högre amplitud på aktionspotentialen samt ha en snabbare fortledning av signalen.

I försöken antas det att mätningen av aktionspotentialen sker extracellulärt, d.v.s. aktionspotentialen mäts utanför nerven och inte i den. Signaler från extracellulära aktionspotentialer är ca 100 gånger mindre än de intracellulära. För att mäta aktionspotentialen intracellulärt krävs dissekering av daggmasken. Det är svårt att dissekera en daggmask så att nerven blottas vilket upptäcktes efter några försök. Metoden lämnades därför därhän trots att signalen är starkare och därmed borde vara enklare att upptäcka. Stauning [4] utför mätningar på dissekerade daggmaskar men han mäter även på hummer. Hummer hade kunnat vara ett fördelaktigt alternativ till daggmasken då det är lättare att komma åt hummernes nerv och amplituden på aktionspotentialen hos denne är högre än i daggmasken.

Att lägga daggmasken i 10 % etanollösning i 5 min brukar räcka för att den ska vara nedsövd i 30 minuter. Denna koncentration upplevdes inte fungera med maskarna i dessa försök vilket ledde till en ökning upp till 25 %. Problemet med att söva maskarna för mycket är att de till slut kan sluta excitera nervimpulser. Är de inte tillräckligt sövda kan signalen som mäts visa muskelkontraktioner istället för aktionspotentialer. Detta kan vara fallet i försök 4, se figur 11. När det kommer till förberedelse av daggmaskar är det svårt att garantera att excitation kommer kunna äga rum. Det finns ett fenomen som kallas nonspiking worm preparation som leder till att ingen aktionspotential kan mätas. Det beror på att masken antingen är i en för brusig miljö eller att den blivit för djupt nedsövd [6]. Ett annat problem med att daggmaskarna inte var ordentligt nersövda var att de efter en tid började dela på sig i två bitar. Detta ledde till att en ny daggmask fick prepareras vilket gjorde mätproceduren något utdragen.

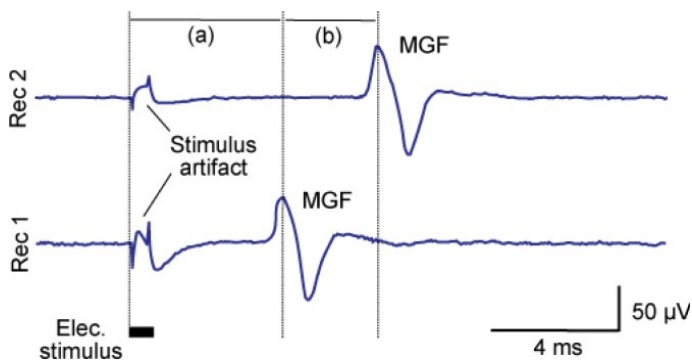
### B. Mätutrustning/uppställning

Det vanligaste problemet vid experiment med daggmaskar är att försöken utförs i miljöer som är för brusiga vilket resulterar i att aktionspotentialen, som har en låg amplitud, inte kan urskiljas från det omgivande bruset. Genom att använda ett bandpassfilter reduceras brusnivåerna. Utöver det kan elkablarna tvinnas parvis. Kontakten mellan mask och elektroder är också något att tänka på. Förstärkare som används i de flesta experiment brukar ligga på 880-1000 gångers förstärkning. Därtill används ett bandpassfilter på 300-1300 Hz eller 300-3000 Hz [6]. Innan användning av 2150x-förstärkaren/filter undersöktes det hur mycket den förstärkte för olika frekvenser, se figur 3. Från figur 3 upptäcktes det att filtret faktiskt började dämpa efter 3000 Hz men med en fortsatt ganska kraftig förstärkning. Dessutom dämpar filtret inte för de allra lägsta frekvenserna vilket i detta fall hade varit att föredra.

I de första försöken upptäcktes en artefakt som började en kort tid efter att stimulus skickats. Denna artefakt är normal och omnämns som stimulusartefakt av Kladt [9], se figur 15. Dock kan den höga amplituden på artefakten vålla problem. Det kan leda till att signalen av intresse inte upptäcks då amplituden på denna kan vara förhållandevis liten i jämförelse med stimulusartefakten. För att undvika detta problem kan ett bättre filter nyttjas.

Under experimentets gång upplevdes olika problem med respektive förstärkare. Med 100x- och <100x-förstärkaren var de största problemen elektromagnetiskt brus som gjorde signal-till-brusförhållandet för litet för att en aktionspotential skulle kunna urskiljas. Med 2150x-förstärkaren upptäcktes ett annat problem. Signalen bottenade vid -10,4 V vilket innebar att signalen förstärkts såpass mycket att den hamnat utanför -10 V - 10 V. Detta ledde till tester med en dynamisk förstärkare med en reglerbar resistor där förstärkningen kunde varieras från 100 och uppåt. Även här bottenade signalen. Detta kan förklaras av att förstärkaren blev för instabil och att där fanns för mycket brus i utgången på förstärkaren vilket gjorde att DAQ-kortet endast visade -10,4V. Ett bandpassfilter inställt för att skära bort det mesta bruset skulle kunna vara en potentiell lösning. En annan bakomliggande anledning till den bottenande

signalen kan vara att filtret inte verkar ha fungerat som det skulle. Detta kan ha lett till att brus förstärktes så mycket att det hamnade över de gränser som DAQ-kortet klarar av vilket resulterar i en signal vid  $-10,4V$ . Dock är det märkligt att detta inte gick att åtgärda med en reglerbar förstärkare. När det kommer till DAQ-kortet som användes finns det begränsningar beroende på vilka uttag som används. Beroende på ifall man kopplar in RSE, använder jord och AI0, eller Differential, AI0 och AI4, så kan kortet visa amplituder mellan  $\pm 10V$  respektive  $\pm 20V$ . Ligger signaler över dessa gränser klipps de av så att hamnar innanför fönstret.



Figur 15. Samma artefakt som vi kan se i försök 1 [6].

## VII. SLUTSATSER

Tanken med projektet var att försöka trigga en nervimpuls i en dagmask med hjälp av ultraljud. Trots en rad olika försöksupställningar och modifierade mätningar har det inte gått att mäta upp en aktionspotential vilket gjort att experimenterande med ultraljud inte genomförts. Projektet har ändå lagt en grund för vidare mätningar på området. Olika problem som är viktiga att tänka på vid vidare undersökningar presenteras. Kanske är det bättre att mäta på hummer istället för dagmask då hummern har en mer lättåtkomlig nerv som ger en större amplitud på aktionspotentialen vilket underlättar mätningarna. Det är viktigt att ha ett bra bandpassfilter som reducerar brusnivån då det annars är mycket svårt att hitta en aktionspotential. Förstärkningen bör anpassas efter hur nära nerven elektroderna sitter. Kablar bör vara skärmade hela vägen till förstärkaren för att stänga ute elektriska signaler utifrån.

## VIII. EFTERORD

Ett stort tack riktas till projektets handledare Tomas Jansson, avdelningschef för Medicinsk teknik/Kliniska vetenskaper, Lunds Universitet, som har varit en stor stöttepelare längs vägen. Han har fungerat som ett bollplank så att idéer, funderingar och frågor som dykt upp under projektets gång har kunnat redas ut. Han har även hjälpt till med diverse utrustningsrelaterade problem såsom att löda nålelektroder och bygga filter/förstärkare. Axel Tojo, Forskningsingenjör LTH, är en annan person som varit till stor hjälp. Inte minst i designandet av mätkammaren där programmet Autodesk Fusion 360 nyttjades. Hela biomedicinsk teknik-avdelningen

på LTH ska också ha ett tack för att de hjälpt till med att räta ut frågetecken och låna ut utrustning.

## IX. APPENDIX

### A. Appendix I

Mått kammare:

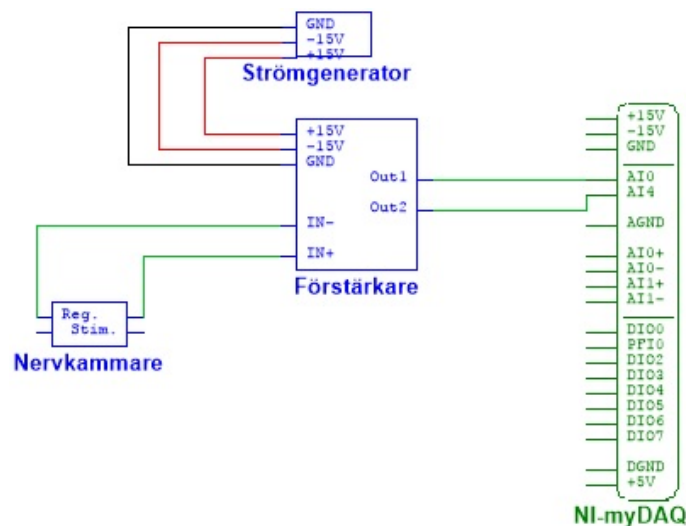
- Innerdel :  $114 * 50 * 19mm$
- Ytterdel:  $130 * 50 * 40mm$
- Avstånd till hål:  $19mm$
- Avstånd mellan olika hål:  $10mm$
- Lock :  $130 * 50 * 15mm$
- Diameter hål på lock:  $26,4mm$  och har en kant som är på  $1,2mm$



Figur 16. Färdig mätkammare i programmet Autodesk Fusion 360 [13].

### B. Appendix II

Försök 4



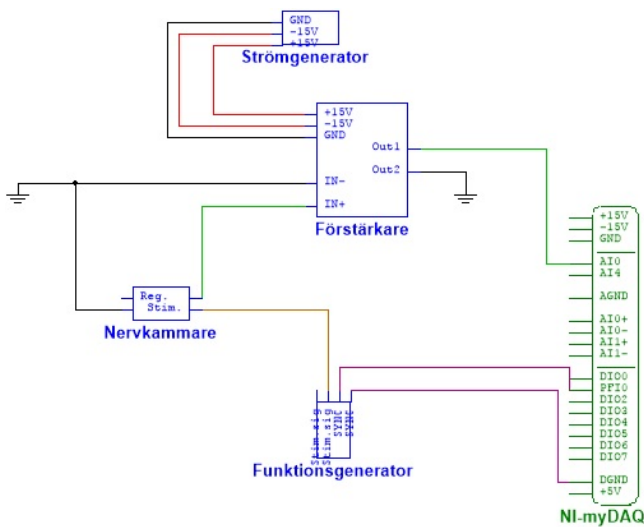
Figur 17. Kopplingsschema för försök 4.



## C. Appendix III

## Försök 5

[20] Project Gutenberg Self-Publishing Press, Eisenia annelid, may, 2015, [Online], [http://self.gutenberg.org/articles/eisenia\\_%28annelid%29](http://self.gutenberg.org/articles/eisenia_%28annelid%29)



Figur 18. Kopplingsschema för försök 5.

## REFERENSER

- [1] W. J. Tyler "The mechanobiology of brain function" *Nature reviews. Neuroscience*, vol.13, 2012.
- [2] W. J. Tyler "Noninvasive neuromodulation with ultrasound ? A continuum mechanics hypothesis" *Neuroscientist OnlineFirst*, 2010.
- [3] W. J. Tyler, Y. Tufali, A. Matyushov, N. Baldwin, M. L. Tauchmann, J. Georges, A. Yoshihiro, S. I. H. Tillery "Transcranial pulsed ultrasound stimulates intact brain circuits" *Pearson New International Edition, Sixth Edition*, 2014.
- [4] M. T. Stauning "Kollision af aktionspotentialer" *Forskningsårsrapport. Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, University Copenhagen*, 2014.
- [5] J. H. Kold. "Collision between nerve signals" *Bachelor project. Membrane Biophysics Group. Niels Bohr Institute, University Copenhagen*, 2013.
- [6] K. M. Shannon, G. J. Gage, A. Jankovic, W. J. Wilson, T. C. Marzullo, "Portable conduction velocity experiments using earthworms for the college and high school neuroscience teaching laboratory" *Advances in Physiology Education*, 2013.
- [7] Hjärnfysik, Löpning, synapser och serotonin, [Online], may, 2015, [http://hjarnfysik.blogspot.se/2013\\_03\\_01\\_archive.html](http://hjarnfysik.blogspot.se/2013_03_01_archive.html)
- [8] F. H. Martini, E. F. Bartholomew "Essentials of Anatomy and Physiology" *Pearson New International Edition, Sixth Edition*, 2014.
- [9] N. Kladt U. Hanslik, H. G. Heinzel "Teaching basic neurophysiology using intact earthworms" *The Journal of Undergraduate Neuroscience Education (JUNE), Institut fuer Zoologie, University of Bonn*, 2010.
- [10] Backyard Brains, Experiment: Comparing Speeds of Two Nerve Fiber Sizes, 2015, [Online], <https://backyardbrains.com/experiments/comparingNerveSpeed>
- [11] National instruments, LabView, 2015, [Online], <http://sweden.ni.com/labview>
- [12] National instruments, USER GUIDE AND SPECIFICATIONS NI USB-6008/6009, 2015, [Online], <http://www.ni.com/pdf/manuals/371303m.pdf>
- [13] Autodesk 360, 2015, [Online], <http://www.autodesk.com/products/fusion-360/overview>
- [14] W. D. Jones "Sound waves for brain waves, Researches use ultrasonic pulses to control the brain activity" *IEEE SPECTRUM*, 2009.
- [15] Wikipedia, Transcranial pulsed ultrasound, [Online], may, 2015, [http://en.wikipedia.org/wiki/Transcranial\\_pulsed\\_ultrasound](http://en.wikipedia.org/wiki/Transcranial_pulsed_ultrasound)
- [16] National instruments, 2015, [Online], <http://sweden.ni.com/>
- [17] Cornodon, Earthworm: Nervous system, 2015, [Online], [http://cronodon.com/BioTech/Earthworm\\_NS.html](http://cronodon.com/BioTech/Earthworm_NS.html)
- [18] Wikipedia, Dendrobaena veneta, may, 2015, [Online] [http://sv.wikipedia.org/wiki/Dendrobaena\\_veneta](http://sv.wikipedia.org/wiki/Dendrobaena_veneta)
- [19] Wildscreen Arkive, Earthworm Lumbricus terrestris, may, 2015, [Online], <http://www.arkive.org/earthworm/lumbricus-terrestris>

# Utveckling av experimentell utrustning för blodtrycksstyrd reglering av läkemedelstillförsel

Eleni Kamvissis (BME-13), Lisa Ulfwi (BME-12)

**Sammanfattning**—Bristen på organ är idag ett stort problem inom sjukvården. På grund av instabilitet i cirkulationssystemet hos donatorn blir organen snabbt oanvändbara. Genom att tillföra en kombination av läkemedel kan blodtrycket hos donatorn stabiliseras i upp till 24 timmar. Syftet med projektet var att utveckla ett automatiserat system för läkemedelstillförsel där blodtrycket kan hållas stabilt i upp till 24 timmar efter att donatorn har avlidit. På så vis kan organen hållas i ett bra skick i väntan på donation. Projektet gjordes i samarbete med Igelösa Life Science AB, ett medicintekniskt forskningsföretag i Lund, och är en fortsättning på ett tidigare projekt. Arbetet innebar utveckling av mjukvara för insamling av en blodtryckssignal och styrning av en infusionspump, hårdvara för förstärkning av blodtryckssignalen samt konstruktion av en isolerande box för att bygga in hårdvaran för användning vid tester i labbmiljö. Arbetet resulterade i en prototyp för ett fungerande automatiserat system. En blodtryckssignal registreras av en tryckgivare vars utsignal är spänningsskillnaden mellan uppmätt tryck och atmosfärstrycket. Utsignalen förstärks och skickas in till ett datainsamlingskort. I datainsamlingskortet analog-till-digital-omvandlas signalen och skickas in till ett reglerprogram i datorn. Programmet analyserar signalen och skickar kommandon till en infusionspump. Systemet är ännu inte testat in vivo, men har potential till att bli ett välfungerande system som kan användas på intensivvårdsavdelningar i framtiden. Prototypsystemet kan bidra till resultat som kan förbättra donations- och transplantationsvården.

## I. INTRODUKTION

**D**EN 1 januari 2015 väntade 756 personer i Sverige på att få ta emot ett eller flera organ [1]. Bristen på organ är idag ett stort problem inom sjukvården. Antalet organdonationer räcker inte till för att hjälpa alla som är i behov av ett eller flera nya organ och i Sverige dör cirka 50 patienter årligen i väntan på ett nytt organ [2]. Organbristen beror på flera olika faktorer. En anledning är att många av de avlidna patienterna inte har tagit ställning till om de vill donera sina organ eller inte när de dör [3].

En annan anledning är att organen snabbt blir oanvändbara. Det beror på den instabilitet som uppstår i cirkulationssystemet hos hjärndöda patienter, det vill säga de potentiella organdonatorerna. Instabiliteten beror på att flera viktiga fysiologiska funktioner slutar fungera då patienten blir hjärndöd. Görs inget åt denna instabilitet, eller om den behandlas felaktigt, tar organen skada och går då inte att använda för donation. För att kunna bibehålla en stabil cirkulation har Stig Steen och hans forskarteam på Igelösa Life Science AB utvecklat en kombination av läkemedel som ska stabilisera

blodtrycket i upp till 24 timmar efter inträffad hjärndöd och på så vis bibehålla organens kvalitet. De blodtryckshöjande läkemedel som används är adrenalin och noradrenalin. Dessa är mycket potenta vilket kräver att de ges under kontrollerade förhållanden med kontinuerlig och noggrann tillförsel [4].

### A. Bakgrund

Projektet är en fortsättning på det projekt som påbörjades under 2014 års kandidatarbete av Karin Wingren och Stina Andersson Eriksson. Ett grundläggande bakgrundsarbete och samarbete med både ingenjörer och läkare från Igelösa Life Science AB och experter inom elektronik från LTH resulterade i en demonstrator på ett komplett reglersystem. Förra året lades själva grunden till projektet med research, inköp av komponenter, ett kretsschema till en förstärkarkrets samt enklare lösningar för både krets och program [5].

### B. Syfte

Syftet med projektet var att utveckla ett automatiserat system för läkemedelstillförsel där blodtrycket kan hållas på en stabil nivå i upp till 24 timmar efter att donatorn har avlidit. På så vis kan organen hållas i ett bra skick i väntan på donation. Genom att använda vårt system ska flera olika organ kunna tas tillvara på och en donator kan rädda livet, inte bara på en, utan på upp till åtta andra personer.

## II. METOD

Först av allt gjordes en återblick på förra årets arbete. Ett möte hölls på Igelösa Life Science AB där alla inblandade kontaktpersoner och förra årets kandidatarbetare var närvarande: Stig Steen, Audrius Paskevicius, Trygve Sjöberg, Tomas Jansson, Björn Wohlfart, Stina Andersson Eriksson och Karin Wingren. Stina och Karin höll ett kort föredrag om deras arbete; hur de gått till väga, vilka slutsatser de kommit fram till och hur arbetet ska byggas vidare. De gick även igenom allt material såsom krets och LabVIEW-program översiktligt.

För att få inspiration till designaspekterna i utformningen av systemet gjordes ett besök på Thorax Intensivvårdsavdelning på Skånes Universitetssjukhus i Lund. Ett krav för att en patient ska vara en potentiell donator är att denne vårdas på en intensivvårdsavdelning [6]. Det var därför bra att få en bild över den miljö där det framtida systemet kan komma att användas.

### A. Hårdvara

Systemet från förra året består av en infusionspump för utveckling i labbmiljö (Microprocessor-Controlled Syringe

Inlämnat den 25 juni 2015

E-post: elt12eka@student.lu.se, mte12lul@student.lu.se

Teknisk handledare: Tomas Jansson, Institutionen för Biomedicinsk Teknik

Klinisk handledare: Audrius Paskevicius, Igelösa Life Science AB

Pump SP210IWZ, World Precision Instruments, Sarasota FL, USA) [7], ett DAQ-chassi (cDAQ-9172, National Instruments, Austin TX, USA) [8] och en DAQ-modul (NI9205, National Instruments, Austin TX, USA) [9] för inläsning och omvandling av analog-till-digital signal, en demonstrator av en förstärkarkrets och en tryckgivare [5].

Förstärkarkretsen uppfyllde inte våra krav och byggdes därför upp på nytt på en projektplatta. En anledning till detta var att kretsen var för skör för att på ett säkert sätt kunna användas för testning i labbmiljö. Med råd från den kliniska handledaren, Audrius Paskevicius, gjordes en del justeringar på kretsen. Bland annat byttes tryckgivarkontakten ut. Tryckgivaren är en engångsprodukt som ska lätt ska kunna bytas ut mellan patienterna. På demonstratorn var denna fastlödd och gick därför inte att byta ut. Några överflödiga kapacitanser togs bort och en indikatorlampa för drift lades till.

Ett beslut togs att inte ta isär kretsen från projektbrädan utan i stället bygga upp den på nytt med nya komponenter direkt på kretskortet. Den främsta anledningen var att vi inte ville ta isär kretsen var att vi behövde en fungerande förstärkarkrets för att kunna utveckla mjukvaran. Den nya kretsen byggdes sedan in i en låda med korrekta in- och utgångar.

### B. Mjukvara

Det reglerprogram som utvecklades förra året var endast en demonstrator av ett färdigt program, och användes som utgångspunkt då ett nytt reglerprogram anpassat till labbmiljöer utvecklades. Reglerprogrammet byggdes upp i LabVIEW, en plattform som med hjälp av ett grafiskt programmeringsspråk används för att utveckla och designa system. Det är en passande plattform att utveckla ett regleringsprogram i, och är även den plattform som användes under förra årets arbete. Då LabVIEW inte är ett program som är bekant sedan tidigare inleddes projektet med att bli insatt i hur det fungerar. Hjälp togs av vår tekniska handledare Tomas Jansson, som har varit kursansvarig för LabVIEW-kurser på Lunds Tekniska Högskola, för att få tillgång till lämpligt nybörjarmaterial. Därefter spenderades tid med att läsa igenom de olika hjälpavsnitten i LabVIEW, titta på diverse instruktionsvideor på National Instruments hemsida samt göra sökningar på LabVIEW-forum på internet [10].

### C. Kalibrering

När systemet var färdigställt gjordes en kalibrering för att justera mätosäkerheten. Kalibrering gjordes av de olika delarna av systemet var för sig.

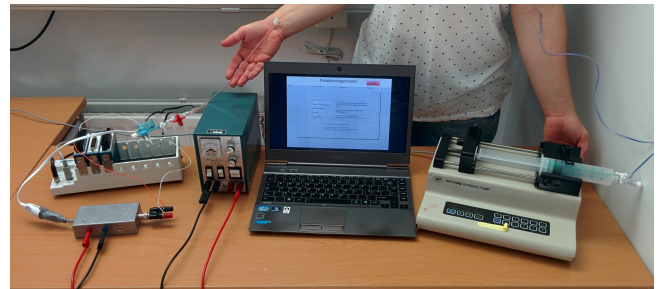
Pumpkalibreringen genomfördes genom att fylla en spruta med vatten och sedan köra pumpen med en bestämd hastighet under en bestämd tid. Den valda hastigheten låg inom det hastighetsintervall som kommer att användas i praktiken, vilket enligt Trygve Sjöberg är 0.1 - 5 ml/h. Då infusionssprutorna som kommer användas i kliniken är av storlek 50 ml gjordes fem testkörningar med hastigheten 5 ml/h under en timmes tid. Den i programmet inställda hastigheten jämfördes sedan med den faktiska hastigheten det tog för sprutan att tömmas.

För att kalibrera kretsen användes en vattenpelare där en centimeter vatten motsvarar cirka 0,735559 mmHg. Enheten

mmHg användes då detta är standardenheten för mätning av blodtryck. Trycksignalen som skickades in i förstärkarkretsen gav en spänning, mätt i V, i reglerprogrammet. Vid tretton vattenpelarnivåer, jämnt fördelade mellan 0 - 100 cm, noterades den korresponderande spänningen och ett linjärt samband kunde beräknas med hjälp av linjär regression i programmet MATLAB. De uppmätta värdena och regressionslinjen plottades sedan tillsammans i en graf.

## III. RESULTAT

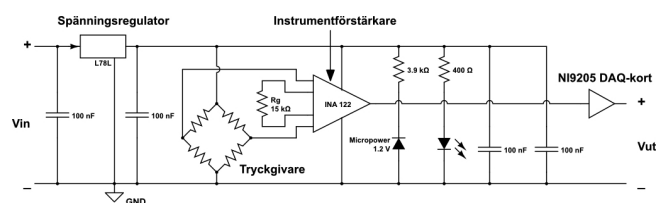
Projektet resulterade i ett fungerande system som i stora drag är uppbyggt på följande vis: Det tryck som skall mätas tillförs tryckgivaren, antingen via en artärnål kopplad till en patient eller genom att pumpa luft med en spruta. Tryckgivaren är en piezoresistiv sensor som mäter tryckskillnaden mellan det uppmätta trycket och atmosfärstrycket. Tryckskillnaden genererar en spänning som förstärks av en krets och skickas in till ett datainsamlingskort (DAQ NI9205). I DAQ-kortet analog-till-digital-omvandlas signalen och skickas in till ett reglerprogram i en dator. Programmet analyserar signalen och skickar kommandon till en infusionspump. Pumpen ger sedan läkemedel till patienten, se figur 1.



Figur 1. Fullständigt uppkopplat system.

### A. Hårdvara

Förstärkarkretsen i sin helhet illustreras i kopplingsschemat i figur 2. Tryckgivaren (Blood Pressure Sensor 1620, Measurement Specialties Inc., Fremont CA, USA) [11] spänningmatas med 5 V genom en positiv spänningsregulator av modell TO-92 L78L från ST Microelectronics [12]. Detta för att stabilisera spänningen runt 5 V, vilket är inom tryckgivarens operativa område. Hela kretsen spänningmatas med 6,5 V DC. För att minimera störningar har två kapacitanser på 100 nF kopplats före respektive efter spänningsregulatorn.

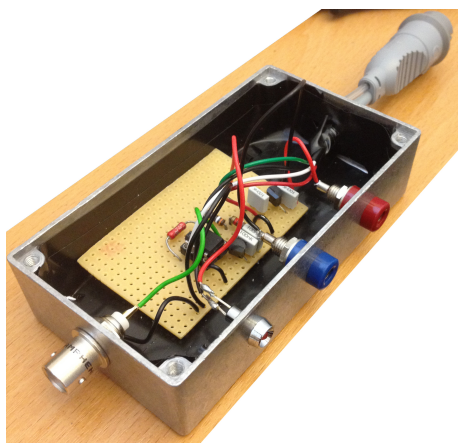


Figur 2. Kretsschema till förstärkarkretsen.

Utsignalen från tryckgivaren skickas sedan in i instrumentförstärkaren INA 122 från Texas Instruments, som

med den valda resistansen 15 k $\Omega$ , förstärker signalen 18,3 gånger [13]. Genom att koppla en 1,2 V spänningsreferens [14] och en 3,9 k $\Omega$  resistans efter instrumentförstärkaren höjs nollnivån till 1,2 V. Detta är viktigt för att kunna detektera små signaler samt för att undvika mätfel. Utsignalen från INA 122 skickas sedan in i DAQ-kortet5 [9] vilket i sin tur förstärker signalen ytterligare 50 gånger som sedan skickas vidare in i datorn via en USB-anslutning. Mellan instrumentförstärkaren och DAQ-kortet har ytterligare två kapacitanser kopplats för att filtrera bort brus och störningar. En lysdiod har även kopplats in för att indikera om kretsen är i drift.

För att på ett säkert sätt kunna använda systemet i labbmiljö, byggdes kretsen in i en metallbox, se figur 3. På metallboxens sidor borrades hål för de olika in- och utgångarna till boxen. Ingångarna till spänningsmataren och lysdioden sattes på en av boxens långsidor, ingången till DAQ-kortet på ena kortsidan och ingången till tryckgivaren på motsatt sida. Tryckgivaren är den del av hårdvaran som kommer att vara kopplad direkt till patienten, och den måste även vara lätt att byta ut då det är en engångsartikel. Av den anledningen sattes den ingången ensam på en av kortsidorna. Spänningskällan och DAQ-kortet kommer inte att vara i närheten av patienten, dessa komponenter kommer heller inte att behöva bytas ut mellan patienterna. Därför var det lämpligt att placera dessa på boxens andra sidor.



Figur 3. Förstärkarkretsen inbyggd i en metallåda.

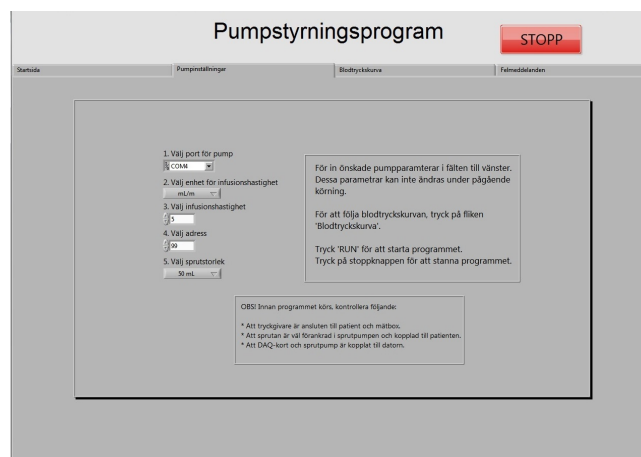
För att enkelt kunna få ut trycksignalen till DAQ-kortet används en BNC-utgång. I nuläget kopplas DAQ-kortet samman med kretsen med en BNC-till-banankontakt-adapter.

Metallådan kläddes invändigt in i eltejp för att isolera den från kretsen.

## B. Mjukvara

1) *Användargränssnitt:* När programmet öppnas möts användaren av ett tydligt och enkelt användargränssnitt, se figur 4. Gränssnittet är uppbyggt av ett antal flikar som gör det lätt att navigera mellan programmets olika funktioner. Innan själva reglerprogrammet körs igång krävs det att användaren gör ett antal inställningar. Användaren väljer:

- Inkörspport till datorn för pumpen



Figur 4. Användargränssnittet i LabVIEW - Pumpinställningar.

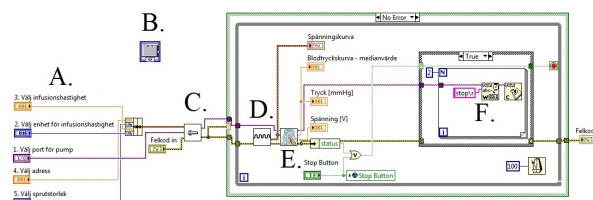
- Enhet för infusionshastighet
- Infusionshastighet
- Adress för pumpen
- Sprutstorlek

Ovanstående val görs via ett antal rullmenyer och genom att fylla i de önskade värdena, se figur 4. När inställningarna är gjorda är det klart att köra programmet.

En av funktionerna i användargränssnittet är att det uppmätta medianblodtrycket kan ses som en kurva i ett diagram. Programmet samplar blodtryckssignalen i fem sekunder åt gången, vilket gör att kurvan i diagrammet uppdateras var femte sekund. Utöver diagrammet går det även att se värdet på det uppmätta blodtrycket samt spänningsskillnaden i två separata indikatorboxar.

För att avsluta programmet, samt även för att stanna pumpen, finns en stor och tydlig stoppknapp.

2) *Utvecklar miljö:* Det första som sker i programmet, se figur 5, är att de av användaren valda pumpinställningarna [A] skickas till pumpen med hjälp av ett antal givna kommandon [C]. När alla inställningar är gjorda går programmet vidare in i huvudloopen, där resten av programmet körs tills användaren trycker på stoppknappen. Det går därför inte att ändra pumpens inställningar när programmet startats. Användargränssnittet hanteras i programmets frontpanel, och syns därför endast som en ikon i utvecklar miljön [B].



Figur 5. Utvecklar miljön i LabVIEW.

Väl inne i huvudloopen sker först insamling av mätdata från DAQ-kortet, vilket görs med hjälp av de inbyggda funktioner som finns i LabVIEW [D]. Mätdata som samlas in

är spänningsskillnaden mätt i V som uppstår i tryckgivaren. För att analysen av mätdatan ska bli så korrekt som möjligt, är det viktigt att programmet samplar så pass många gånger som krävs för att få med tillräckligt med information om trycksignalen. Det är också viktigt att samplinghastigheten är tillräckligt snabb för att hinna med blodtrycksförändringarna. Efter diskussion med vår tekniska handledare valdes samplingshastigheten till 1000 sampel per sekund och antal sampel till 5000 sampelvärden per insamlingscykel. Det innebär att programmet samplar blodtryckssignalen 5000 gånger under fem sekunder innan mätdatan analyseras. Efter samplingen tas medianvärdet ut. Anledningen till att det är mest lämpligt att plocka ut medianvärdet är att det blir minst påverkan av eventuella felmätningar eller extraslag då, till skillnad om exempelvis medelvärde använts.

Det som samlats in är en spänningsskillnad, men i användargränssnittet ska ett blodtryck presenteras. Med hjälp av kretskalibreringen beräknades en funktion som omvandlar spänning, V, till tryck, mmHg (Se ekvation 1). Efter omvandlingen jämförs blodtrycket med de, av Igelösa Life Science AB, önskade blodtrycksgränserna 60 till 90 mmHg [E].

Systemet är reglertekniskt simpelt och använder en så kallad on/off-funktion. Det innebär att pumpen har två lägen; på och av. När det inkommande blodtrycket är för lågt sätts pumpen igång och när blodtrycket är för högt stängs pumpen av. Är blodtrycket inom gränserna fortsätter pumpen med samma kommando som tidigare.

När användaren trycker på stoppknappen, eller om något fel skulle uppstå, stänger programmet av sig själv och pumpen [F].

Utvecklingsmiljön för de olika underprogrammen i reglerprogrammet visas i figur 7-9 i bilagan till denna rapport.

### C. Kalibrering

Resultatet av pumpkalibreringen visade att den inställda hastigheten, 5 ml/h, stämde överens med den volymen pumpen gav ut i de fem försöken. Enligt vår kliniska handledare Audrius Paskevicius bör noggrannheten för infusionshastigheten vara ungefär 10-20 %, vilket systemet uppfyllde.

Det linjära samband som skapades i MATLAB med linjär regression (ekvation 1), lades in i programmet för att användaren ska kunna se blodtrycket istället för spänningen.  $y$  är blodtrycket i mmHg och  $x$  är spänningen i V.

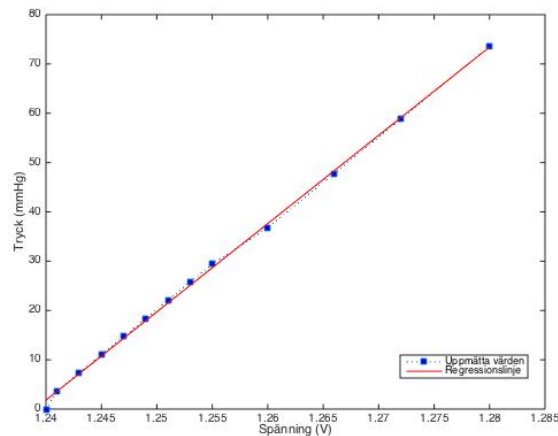
$$y = 1790,716779x - 2218,682647 \quad (1)$$

Det linjära sambandet med de uppmätta värdena samt regressionslinjen visas i figur 6.

## IV. DISKUSSION

### A. Hårdvara

Då vi snabbt insåg att förstärkarkretsen inte motsvarade våra krav försökte vi bygga upp den igen själva men fick det inte att fungera. Eftersom vi har begränsad erfarenhet av hur en krets ska byggas upp tog det tid att förstå hur komponenterna skulle placeras på projektbrädan. Mycket tid fick dessutom läggas på att läsa in sig på databladen för de olika komponenterna. Till



Figur 6. Linjärt samband mellan spänning (V) och tryck (mmHg).

slut fick vi be vår kliniska handledare Audrius om hjälp och det visade sig att det bland annat var glapp i en av kontaktorna.

Även uppbyggandet och fastlösdandet av kretsen på själva kretskortet tog lång tid då vi ville ha en kompakt krets samt undvika att dra alltför många trådar mellan komponenterna. Efter att ha löst ihop kretsen visade det sig att den inte fungerade, vilket efter en lång felsökningsprocess visade sig bero på en trasig komponent. Den trasiga komponenten, spänningsregulatorn, byttes ut och kretsen fungerar nu som den ska.

### B. Mjukvara

I LabVIEW finns ett färdigbyggt DAQ-inläsningssystem som ska förenkla processen för datainsamling från DAQ-kort. Ett problem som uppstod var att programmet inte fungerade att köra då detta användes, vilket då gav ett felmeddelande till resten av programmet. Anledningen till att det inte fungerade är inte helt klar, men det berodde troligtvis på överbelastning av DAQ-kortet. Vi byggde därför upp ett eget DAQ-inläsningssystem med hjälp av de grundfunktioner som finns för DAQ i LabVIEW. Detta gjordes så avskalat som möjligt för att undvika liknande fel som tidigare samt för att spara datorkraft.

Inbyggt i LabVIEW finns en funktion som heter error-handling som ger felmeddelanden vid eventuella fel vid körning av program. Så fort ett felmeddelande uppstår i en del av programmet så skickas detta vidare till resten av programmet och gör att funktionerna slutar köras. Error-handlingfunktionen är implementerad i hela reglerprogrammet och är inbyggd på så vis att hela programmet och pumpen stoppas så fort det uppstår ett fel. Till en början avslutades programmet utan att stänga av pumpen, något som skulle kunna vara förödande då systemet används på en patient. Av den anledningen togs error-handlingfunktionen bort i den delen av programmet som skickar stoppkommando till pumpen. Syftet med detta är att pumpen ska kunna stängas av, även om error-handlingfunktionen visar felmeddelanden.

Tanken var att det skulle finnas en startknapp i användargränssnittet som sätter igång hela programmet.

Försök gjordes med att implementera detta med hjälp av funktionen XControl, men funktionen störde och blockerade andra viktiga funktioner i programmet. En ytterligare funktion som försökte implementeras var att utrusta flikarna med navigeringsknappar; "Nästa" och "Föregående". Även denna funktion störde andra viktiga funktioner i programmet och prioriterades därför bort då vi ville prioritera funktion framför design. Båda dessa funktioner ska kunna fungera i programmet om de implementeras på rätt sätt. Om ytterligare tid funnits hade detta kunnat arbetas vidare på.

Ett ytterligare problem vi stötte på var att pumpen inte stannade när vi tryckte på stoppknappen och avslutade programmet. Problemet försvann när programmet kördes i felsökningsläget, så kallat highlight execution mode. För att lösa detta testade vi att lägga till en rad olika loopar och tidsfördröjningar runt stoppkommandot. Till slut kom vi fram till att pumpen behöver få stoppkommandot två gånger för att stoppas. Detta löstes genom att lägga stoppkommandot i en for-loop som utförs två gånger.

### C. Kalibrering

Det gjordes bara fem testkörningar av infusionspumpen. Fler ansågs inte nödvändigt då den inställda hastigheten väl stämde överens med den uppmätta volymen pumpen gav ut. Det hade varit önskvärt att göra fler körningar med fler hastigheter för att få ett ordentligt statistiskt underlag men vi valde att inte lägga tid på detta då det hade krävt ett omfattande och tidskrävande arbete.

De skillnader som möjligtvis kan uppstå beror främst på osäkerheten i sprutdiametern. Osäkerheten för systemet i sig kan lösas med hjälp av en regleralgoritm, men osäkerheten i sprutdiametern är något som aldrig kommer kunna elimineras helt och hållet. Det beror på att det alltid kommer skapas små skillnader mellan sprutorna vid tillverkningen.

### D. Framtidsutsikter & hållbar utveckling

Om mer tid hade funnits till projektet, hade vissa delar av systemet kunnat förbättras och vidareutvecklas. Istället för att lägga till finesser och finslipningar på systemet, togs beslutet att lägga fokus på att få ett simpelt system som fungerar att testa i labbmiljö. Detta känns nödvändigt då nästa steg i arbetet är att testa systemet in vivo. Nedan redovisas en del av de förbättringar som hade kunnats göras på systemet.

Reglerprogrammet använder en on/off-funktion för reglering av infusionspumpen. Det hade varit önskvärt om systemet istället kunde anpassa olika hastigheter beroende på inkommande blodtryck. Målet för framtiden är att använda ett mer avancerat reglersystem, möjligtvis en PID-regulator.

I nuläget används en dockningsmodul, ett DAQ-kort, för insamling av mätdata samt för A/D-omvandling. Modulen är klumpig, har många sladdar och är inte anpassad för att användas i sjukhusmiljö runt en patient. Det finns smidigare omvandlare som kan användas istället, något som är nödvändigt då systemet ska användas på patienter. Detta är något som inte ryms inom kandidatarbetets tidsram, men det är dock en förbättring som måste göras någon gång i framtiden.

Kretsen är konstruerad på ett sådant sätt att ett lågpasfilter kan läggas till om signalen skulle behöva filtreras. Brus är något som alltid kan uppstå vid mätning av signaler och brusreducering kan behövas om det stör signalen väsentligt. Detta är inget som har varit ett problem vid signalbehandlingen och därför har detta inte gjorts.

Personalen på Thorax Intensivvårdsavdelning i Lund såg stora möjligheter i att använda ett automatiserat reglersystem på andra patienter än hjärndöda. I dagsläget finns få automatiserade system för läkemedelstillförsel som används inom vården, vilket betyder att det finns stora möjligheter och användningsområden för systemet i framtiden.

En viktig del av arbetet är att göra systemet så hållbart som möjligt när det gäller materialval samt mängden material. Vi har försökt bygga upp ett system som är lätt att tvätta av, så att den ska kunna återanvändas på flera patienter. Den enda delen av systemet som inte går att återanvända är tryckgivaren som är en engångsprodukt. Vi har valt att använda oss av en tryckgivare som redan används på patienterna i dagsläget, vilket gör att sjukhuset slipper köpa in onödig specialutrustning endast för vårt system.

För att minska kostnaderna samt göra systemet så enkelt som möjligt att implementera i vården, ska systemet kunna kopplas in till befintlig utrustning. Det vill säga till de blodtrycksmätare och infusionspumpar som redan finns på sjukhusets intensivvårdsavdelningar. Som det ser ut idag finns det redan en mängd olika maskiner och annan utrustning runt patienten som personalen redan är väl förtrogen med. Att kunna erbjuda en produkt som går att koppla in till redan befintlig utrustning vet vi är uppskattat hos vårdpersonalen.

### E. Etiska aspekter

Organdonation är ett ämne som väcker många känslor och etiska frågeställningar. Att hålla en hjärndöd patient vid liv för att rädda en annan kan i mångas ögon ses som fel och oetiskt.

Vi vill poängtera att vårt system inte kommer förändra hur sjukvården sköter patienterna, utan det enda systemet gör är att 'köpa tid' inför en eventuell organdonation och se till att organen hålls i ett bra skick. Det finns idag begränsningar i hur länge sjukvården får lov att hålla en potentiell organdonator vid liv och vi överskrider inte denna tidsgräns med vårt system. Enligt Lag om kriterier för bestämmande av människans död (SFS 1987:269) får livsuppehållande vård, i syfte för att bevara organ eller annat biologiskt material i avvaktan på donation, inte fortgå i mer än 24 timmar efter fastställande av hjärndöden [15].

Vårt system kommer endast användas på de patienter där antingen patienten själv eller dess anhöriga har sagt ja till att donera organen. Detta finns reglerat i Socialstyrelsens föreskrifter om Donation och tillvaratagande av organ, celler och vävnader (SOSFS 2009:30) samt i Lag om transplantation m.m. (SFS 1995:831) där det står skrivet att patientens inställning till organdonation undersöks, antingen genom att söka i donationsregistret eller genom att diskutera frågan med anhöriga, innan ytterligare beslut om donation fattas [16] [17]. Patientens inställning till donation är aldrig känd för sjukvårdspersonalen som vårdar patienten och det finns alltså ingen risk för att

patienten får en sämre vård just på grund av dennes inställning till organdonation.

## V. SLUTSATSER

Vi har utvecklat en prototyp på ett fungerande automatiserat system för läkemedelstillförsel baserat på blodtrycksövervakning. Systemet har inte testats in vivo men har stor potential till att bli ett välfungerande system som kan användas på intensivvårdsavdelningar i framtiden. Vårt prototypsystem kan bidra med resultat som kan leda till en förbättrad donations- och transplantationsvård.

## VI. EFTERORD

Vi vill tacka alla de personer som hjälpt oss på vägen med utvecklingen av vårt system.

Tack till personalen på Igelösa Life Science AB för frågeställning, material samt sakkunskap i området donation- och transplantationsvård. Främst tack till:

- Docent Trygve Sjöberg
- Professor och Överläkare Stig Steen
- Civilingenjör Audrius Paskevicius

Tack till vår tekniska handledare Tomas Jansson, Institutionen för Biomedicinsk Teknik, Lunds Tekniska Högskola, för allt stöd och hjälp.

Tack till Medicinsk Teknik, Skånes Universitetssjukhus i Lund, för lån av kontorslokal, utrustning samt experthjälp.

Tack till Biomedicinsk Teknik, Lunds Tekniska Högskola, för lån av utrustning.

Författarna till denna artikel har bidragit lika mycket i detta projekt.

## BILAGA

På nästa sida visas de olika underprogrammen i reglerprogrammet; pumpinställningar, DAQ-inläsning samt pumpreglering.

## REFERENSER

- [1] Socialstyrelsen. (2015). *Livsviktigt – om organ- och vävnadsdonation* [Online]. Tillgänglig: <http://www.livsviktigt.se/omdonation/statistik/Sidor/default.aspx>. Hämtad: 2015-03-25, 14.19.
- [2] MOD - Mer Organdonation. *Situationen i Sverige* [Online]. Tillgänglig: <http://merorgandonation.se/om-organdonation/organdonation-sverige/>. Hämtad: 2015-03-25, 14.16.
- [3] Socialstyrelsen. (2013). *Organdonatorer i Sverige 2013 – en rapport baserad på dödsfall inom intensivvården*. Juni, 2014.
- [4] S. Steen, T. Sjöberg, Q. Liao, G. Bozovic och B. Wohlfart, "Pharmacological normalization of circulation after acute brain death", *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, vol. 56, no. 8, s. 1006-1012, 2012.
- [5] S. Andersson Eriksson och K. Wingren. "Automatiserad reglering av läkemedelstillförsel baserat på blodtrycksövervakning", *Proceedings of Clinical Innovation, Bachelor of Science Projects in Biomedical Engineering, Lund University*, vol. 1, 2014.
- [6] 1177 Vårdguiden. (2011). *Organdonation* [Online]. Tillgänglig: <http://www.1177.se/Skane/Regler-och-rattigheter/Organdonation/?ar=True>. Hämtad: 2015-03-25, 14.17.
- [7] World Precision Instruments. (2007). *SP200 Series Microprocessor-controlled syringe pumps. Instruction Manual*. [Online]. Tillgänglig: [http://www.wpiinc.com/clientuploads/pdf/SP200\\_IMs.pdf](http://www.wpiinc.com/clientuploads/pdf/SP200_IMs.pdf). Hämtad: 2015-05-17, 18.23.
- [8] National Instruments. (2008). *User guide and specifications NI cDAQ-9172* [Online]. Tillgänglig: <http://www.ni.com/pdf/manuals/371747f.pdf>. Hämtad: 2015-05-17, 18.53.
- [9] National Instruments. (2008). *Operating instructions and specifications NI 9205* [Online]. Tillgänglig: <http://www.ni.com/pdf/manuals/374188d.pdf>. Hämtad: 2015-05-17, 18.08.
- [10] National Instruments - LabVIEW System Design Software [Online]. Tillgänglig: <http://www.ni.com/labview/>. Hämtad: 2015-05-14, 08.53.
- [11] Measurements Specialities Inc. (2014). *Pressure sensor - 1620* [Online]. Tillgänglig: <http://www.meas-spec.com/downloads/1620.pdf>. Hämtad: 2015-05-17, 17.48.
- [12] ST Microelectronics. (2015). *L78L Positive Voltage Regulators* [Online]. Tillgänglig: <http://www.st.com/web/en/resource/technical/document/datasheet/CD00000446.pdf>. Hämtad: 2015-05-17, 17.50.
- [13] Texas Instruments. (1997). *Single Supply, MicroPower Instrumentation Amplifier* [Online]. Tillgänglig: <http://www.ti.com/lit/ds/symlink/ina122.pdf>. Hämtad: 2015-05-17, 17.54.
- [14] Texas Instruments. (2000). *LM185/LM285/LM385 Adjustable Micropower Voltage References* [Online]. Tillgänglig: [https://www1.elfa.se/data1/wwwroot/assets/datasheets/ixLM185-285-LM385\\_dat\\_en.pdf](https://www1.elfa.se/data1/wwwroot/assets/datasheets/ixLM185-285-LM385_dat_en.pdf). Hämtad: 2015-05-17, 18.00.
- [15] SFS 1987:269. *Lag om kriterier för bestämmande av människans död* [Online]. [http://www.riksdagen.se/sv/Dokument-Lagar/Lagar/Svenskforfattningssamling/Lag-1987269-om-kriterier-fo\\_sfs-1987-269/](http://www.riksdagen.se/sv/Dokument-Lagar/Lagar/Svenskforfattningssamling/Lag-1987269-om-kriterier-fo_sfs-1987-269/). Hämtad: 2015-05-08, 12.14.
- [16] SOFS 2009:30. *Donation och tillvaratagande av organ, vävnader och celler* [Online]. <http://www.socialstyrelsen.se/publikationer2010/2010-1-15>. Hämtad: 2015-05-08, 12.14.
- [17] SFS 1995:831. *Lag om transplantation m.m* [Online]. [http://www.riksdagen.se/sv/Dokument-Lagar/Lagar/Svenskforfattningssamling/Lag-1995831-om-transplantat\\_sfs-1995-831/](http://www.riksdagen.se/sv/Dokument-Lagar/Lagar/Svenskforfattningssamling/Lag-1995831-om-transplantat_sfs-1995-831/). Hämtad: 2015-05-08, 12.13.

