

Universitetet i Oslo  
Fysisk institutt

**Elektrisk  
impedansspektroskopi for  
non-invasiv måling av laktat i  
biologisk vev**

Masteroppgave

Thomas Jakobsen

Juni 2009



**Konfidensielt**

Innholdet i denne masteroppgaven er  
unndratt offentligheten frem til 31.12.2010

## Forord

Det er mange som har bidratt til at jeg har kunnet gjennomføre denne masteroppgaven i instrumentering og måleteknikk. Først vil jeg takke min hovedveileder Ørjan G Martinsen for god støtte og viktige bidrag til alle deler av studien. Ørjan har sammen med min andre veileder Sverre Grimnes delt viktig kunnskap om bioimpedans gjennom sin lærebok i bioimpedans, og undervisning i denne, noe som har vært svært viktig for min forståelse av fagområdet.

Ideen om at man kunne bruke bioimpedans til å måle laktatkonsentrasjon i kroppen var det min tredje veileder Håvard Kalvøy som hadde. En delegasjon fra Oslo Bioimpedance Group spiste middag etter en lang dag med foredrag under en verdenskonferanse om bioimpedans i Graz i Østerrike høsten 2007. Jeg var ny i bioimpedansgruppen og fikk være med for å bli kjent med fag og folk. Under middagen snakket jeg mye med Håvard som delte min interesse for idrett. Håvard hadde lenge undret på om laktat hadde innvirkning på impedans, og jeg hadde en del erfaring med laktatmålinger fra forsøk på Norges Idrettshøgskole (NIH). Da middagen var over, var det klart at jeg i min masterstudie skulle studere sammenhengen mellom impedans og laktatkonsentrasjon i vev.

Etter et pilotforsøk på Rikshospitalet ble det bestemt at vi skulle utføre flere forsøk på NIH. Der har jeg fått mye hjelp og feedback fra min far Vidar Jakobsen som er ansatt på NIH. På NIH fikk vi også hjelp og innspill fra fysiologiguru Frank Ingjer som lenge har studert laktat i idrettslig sammenheng. Under in vivo-forsøkene fikk jeg også god hjelp av min bror Einar-Andre Jakobsen, da vi trengte 2 personer for å utføre impedans, laktat og ekspirasjonsgassmålinger. Videre vil jeg takke de 11 forsøkspersonene som presset kroppen sin til det ytterste slik at laktatverdiene dekket hele måleskalaen.

For å kunne sortere ut alle faktorene som endret impedansen uavhengig av laktat, ble in vitro-forsøk på en celleduspensjon utført. I den forbindelse vil jeg takke Doktor Mohammed Reza Mirlashari for celleduspensjonen og god opplæring i K562-cellenes egenskaper.

Til slutt vil jeg takke Janet Bydal, Vidar Jakobsen, Sverre Grimnes, Håvard Kalvøy og Ørjan Martinsen for gjennomlesning av oppgaven og konstruktiv feedback.

Oslo mai 2009  
Thomas Jakobsen

# Innhold

Forord .....	2
Innhold .....	3
Sammendrag .....	4
Abstract .....	4
1 Innledning.....	5
Problemstilling .....	5
2 Teori .....	6
Aktuell teori om elektrisk bioimpedans .....	6
Fireelektrodesystemet.....	11
Laktat.....	12
Alvarenga og Souza sin forskning på feltet .....	14
Multivariatanalyse.....	16
3 Metode.....	18
In vitro-forsøk .....	18
In vivo-forsøk.....	23
Analysemetode .....	27
4 Resultater.....	30
In vitro-resultater.....	30
In vivo-resultater .....	34
5 Diskusjon.....	45
Kvalitetsvurdering av metoden .....	45
Mulige slutninger fra resultatene.....	51
Vurdering av resultatene mot tidligere kunnskap .....	53
6 Konklusjon .....	54
In vitro .....	54
In vivo .....	54
Referanser.....	55
Vedlegg	
Vedlegg 1: Persondata	
Vedlegg 2: Protokollskjema	
Vedlegg 3: Artikkelen til Alvarenga og Souza	

## **Sammendrag**

Ved høy fysisk belastning produserer musklene mye laktat, noe som fører til at den høye arbeidsbelastningen ikke kan opprettholdes særlig lenge. Idrettsutøvere vil gjerne vite hvor høy konsentrasjon av laktat de har ved ulike arbeidsbelastninger, fordi det er en god objektiv indikator på hvor godt kroppen tåler belastningen. Laktatkonsentrasjon måles i dag ved å ta en blodprøve. I denne oppgaven ble det undersøkt om en målemetode basert på bioimpedans kunne gi informasjon om laktatkonsentrasjonen i kroppen ved ulike arbeidsbelastninger. Det ble utført fysiologiske tester på 11 forsøkspersoner med Solartron 1260 og 1294 bioimpedans-analysator, sammen med etablerte målemetoder av laktatkonsentrasjon i blodet. Et fireelektrodeoppsett ble benyttet. Et datasett med et impedansspekter og en laktatkonsentrasjon ble innhentet ved 8-14 ulike ergometersykelbelastninger fra hver forsøksperson. Multivariatanalyse ble utført på måledataene, for å finne en korrelasjon mellom laktat og impedans. Til sammen 127 datasett med impedans og laktatverdier ble analysert. Det viste seg at impedansdataene var ulike fra forsøksperson til forsøksperson. Volum av det målte lårsegmentet og forsøkspersonens fettprosent gjorde trolig utslag på impedansen, noe som igjen førte til at resultatet av multivariatanalysen ikke ble bra da all impedansdata ble analysert sammen. Men hver for seg, og to forsøkspersoner i samme multivariatanalyse gav lovende korrelasjon mellom laktatkonsentrasjon og impedansdata. For at man med større sikkerhet skulle kunne finne hvilke observasjoner som skyldes endring i laktatkonsentrasjonen ble det utført forsøk på en cellesuspensjon. Impedans ble målt på samme måte som på forsøkspersoner ved ulike laktatkonsentrasjoner i cellesuspensjonen. Resultatene av disse forsøkene ble ikke gode siden volumkonsentrasjonen av cellene ikke var stor nok, og måleoppsettet ikke var godt nok.

## **Abstract**

At high physical workloads the muscles produce so much lactate that it is impossible to sustain the high workload for a long time. Athletes want to know how high the concentration of lactate is at different workloads, because lactate concentration is an objective measure on how well the body can handle the workload. Today you have to take a blood sample to measure the lactate concentration. In this study correlation between bioimpedance and lactate concentrations at different workloads was investigated. 11 persons completed a physiological test where impedance was measured with Solartron 1260 and 1294 bioimpedance analyzer, and compared with the lactate concentration in blood. A four electrode system was used. A dataset containing an impedance specter and lactate concentration was collected at 8-14 different bicycle ergometer workloads for each person. Multivariate analysis was performed on the datasets to find any correlation between lactate and impedance. 127 datasets were analyzed. It became clear that the impedance varied between persons. Fat ratio and volume of the measured thigh segment probably made a great difference on the impedance, which led to a bad result when all the datasets was analyzed as one model in the multivariate analysis. Alone and two persons at a time in the multivariate analysis made promising correlation between lactate concentration and impedance. Measurements on cell suspensions were performed to enable a confirmation that the observations originated from changes in lactate concentration. Impedance was measured at different lactate concentrations in the cell suspension. Results from these measurements were not satisfying. The volume concentration of cells was not high enough, and the measurement configuration was not good enough.

## 1 Innledning

Når musklene ikke får nok oksygen til å utføre aerob energiomsetning, utføres anaerob energiomsetning og melkesyre dannes som et av sluttproduktene. Laktat er en del av melkesyre som oppløses i blodet. Laktat har i flere tiår blitt målt invasivt med blodprøver, både på sykehus, i forbindelse med operasjoner, og i idrettslig sammenheng (samtaler med Sverre Grimnes og Frank Ingjer).

I idretten kan laktatkonsentrasjonen i blodet og i musklene (intra- og ekstra-cellulært) brukes som et mål på arbeidsintensitet. Ved høy arbeidsintensitet produseres det melkesyre i muskelcellene og konsentrasjonen av laktat kan bli høy. Dersom produksjonen av melkesyre blir vesentlig større enn organismens mulighet til å eliminere laktat og  $H^+$  vil organismen kunne komme i en situasjon hvor den stivner og således ikke greier å opprettholde den høye arbeidsintensiteten. Anaerob terskel, forkortet AT, er et viktig intensitetsområde ved styring av treningsbelastning. AT er ved den høyeste arbeidsintensiteten, oksygenopptaket og hjertefrekvensen hvor det er likevekt mellom produksjon av melkesyre og eliminasjon av laktat. Med kjennskap til sin intensitet i forhold til AT kan det være til hjelp for idrettsutøveren å styre arbeidsbelastninger under trening og konkurranser. Vanligvis har denne intensitetsreguleringen blitt styrt av hjertefrekvens (HF) og utøverens tretthetsfølelse. Tretthetsfølelsen er subjektiv og er derfor vanskelig å bruke som tilfredsstillende mål på arbeidsintensitet. I dag er HF basert på måling av maksimalpuls den eneste metoden som normalt kan benyttes som en objektiv måte å styre treningsintensiteten på. Denne metoden har dog klare svakheter og vil derfor i en del tilfeller være lite egnet eller sågar misvisende til å styre arbeidsbelastning. (Samtaler med Frank Ingjer våren 2009).

I de siste årene har glukosekonsentrasjonsmålinger ved hjelp av bioimpedans blitt forsket på som en alternativ ikke invasiv målemetode for diabetikere (Huber mfl. 2007). Glukose- og laktatmolekylet har mange likheter. En av forskjellene er at laktatmolekylet har en ladning, noe som vil påvirke impedansen til det biologiske vevet.

Til nå er det lite forskning på laktatspektroskopi i feltet bioimpedans. Alvarenga og Souza (2007) antyder at bioimpedansspektroskopi er en ny metode å finne den anaerobe terskelen på. Så langt forfatteren vet, er det ingen litteratur på området utenom denne artikkelen. Dette kan tyde på at få ser mulighetene med å måle laktatkonsentrasjonen ved bioimpedans, eller at metoden til Alvarenga ikke var god nok. Alvarenga og Souza målte impedansen ved å se på responsen på en trinn eksitasjon. I denne studien gjennomføres impedansmålingene ved å måle impedansen på et bredt spenn av enkeltfrekvenser.

### Problemstilling

Er det mulig å måle laktatkonsentrasjon i vev ved hjelp av elektrisk bioimpedans?

Målet for denne oppgaven er å prøve ut en ny målemetode som benytter elektrisk impedansspektroskopi til å måle konsentrasjonen av laktat i biologisk vev. Hypotesen er at denne målemetoden kan brukes til å måle momentankonsentrasjonen av laktat i musklene over en lengre periode, på samme måte som puls måles. I dag måler man momentankonsentrasjonen av laktat i blodet ved hjelp av venekateter (Jorfeldt m. fl. 1978), men dette er såpass krevende at det kun benyttes i idrettsforskning.

Problemstillingen ble testet ved målinger på personer som utførte en testprotokoll på ergometersyssel. Disse forsøkene ble kalt in vivo-forsøk. Det ble også utført in vitro-forsøk der impedans ble målt på en celleduspensjon med ulike laktatkonsentrasjoner.

## 2 Teori

### Aktuell teori om elektrisk bioimpedans

Impedans  $Z$  måles i ohm [ $\Omega$ ], og den beskriver et materials passive egenskaper til å bremse elektrisk strøm. Enheten kan uttrykkes som forholdet mellom en sinus vekselspenning og en sinus vekselstrøm i en elektrisk krets (Grimnes og Martinsen 2006), jamfør ligning 2.1. Impedansbegrepet kan også brukes når strømmen kun går i én retning. Impedans må være en kompleks enhet, fordi mange materialer som bremser strøm også faseforskyver spenningen i forhold til strømmen. Impedans består av den reelle resistansen  $R$ , og den komplekse reaktansen  $X$ , jamfør ligning 2.2.

$$Z = \frac{v}{i} \quad (2.1)$$

$$Z = R + jX \quad (2.2)$$

Et legemes konduktivitet beskrives av admittans  $Y$  som måles i siemens [ $S$ ]. Admittans er det inverse av impedans.  $Z = 1/Y$ . En samlebetegnelse på impedans og admittans er immittans.

Når man undersøker de passive egenskapene til biologiske materialer kalles det bioimpedans. Det innebærer målinger på alt fra planter og dyr, til levende vev og cellesuspensjoner. De viktigste variablene man i dag vet at varierer med impedans på mennesker er; blodflyt, hjerteaktivitet, respirasjonsvolum, fylningsgrad av blærer, blod og nyrevolumer, livmorkontraksjoner, nerveaktivitet, den galvaniske refleksen på huden, blodcellevolumet, proppdannelser, blodtrykk og saltinnhold i kroppen (Grimnes og Martinsen 2006).

Ledningsevnen i kroppen er ionisk (elektrolytisk), på grunn av det høye saltinnholdet i kroppsvæskene (Grimnes og Martinsen 2006). Kroppen har cirka 154 mmol/L (0,9%) saltinnhold ekstracellulært, og ca 180 mmol/L (1,1%) saltinnhold intracellulært. De viktigste ionene ekstracellulært er  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  med en konsentrasjon på henholdsvis 143 og 103 mmol/L. Til sammenligning er det  $4 \cdot 10^{-5}$  mmol/L  $\text{H}^+$ -ioner ved en pH på 7,4 i kroppen (Grimnes og Martinsen 2008, side 24).

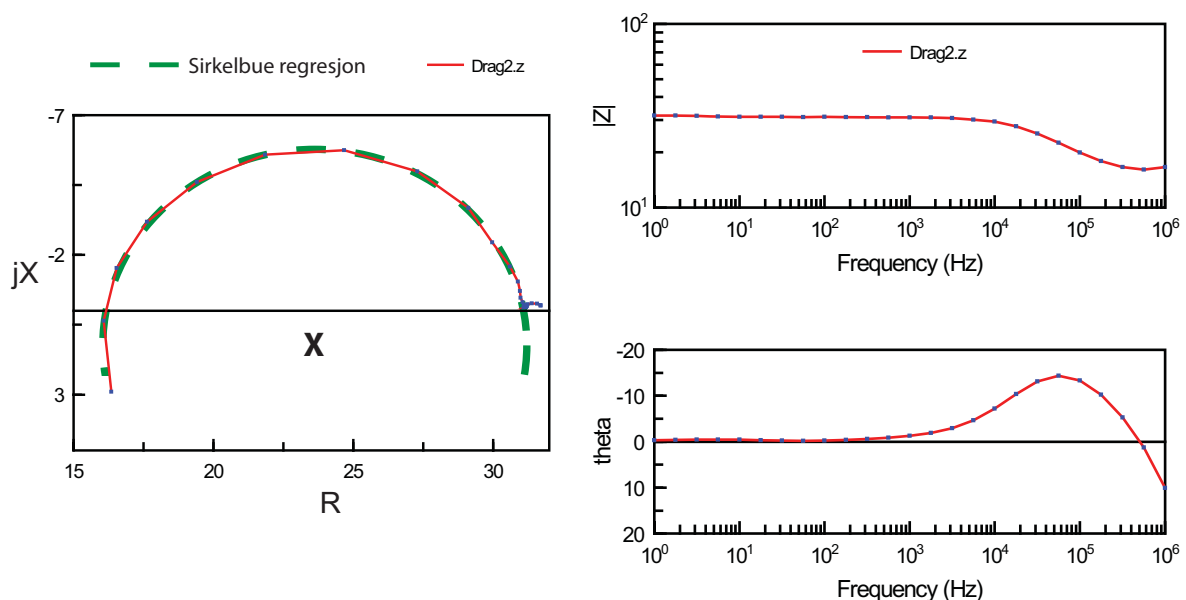
Biologisk vev er komplekst sammensatt. Forståelsen av hva som måles og hvilke effekter måleverdiene skyldes er dermed vanskelig. Dersom det imidlertid blir tatt hensyn til hvordan vevet er bygd opp før målinger blir gjort, kan analysen av måleverdier bli enklere. Det er stor forskjell på om impedansmålinger på muskelvev blir gjort transversalt eller longitudinelt med muskelen, på grunn av sterk anisotropi i muskelvevet (Grimnes og Martinsen 2008, sider 103-106). Bein, hjernevev og lungevev er andre anisotrope vev i kroppen. Fett, blod og andre kroppsvæsker er isotrope. Retningen blodet flyter har stor betydning for ledningsevnen i blodbanen. Sigman med flere beskrev i 1937 hvordan blodets resistans minket ved høyere hastigheter, fenomenet har siden blitt kalt Sigman effekt. Målemetoder med impedans er derfor blitt utviklet for å måle blodflyten på pasienter.

Det er viktig for analysen å vite hvor i vevet man måler. Er elektrodene for små, eller plassert for tett, vil strømtettheten være størst nærmest overflaten av vevet. I huden er impedansen stor, det er derfor stor sannsynlighet for at mesteparten av en slik målingen vil skyldes huden. Gjøres elektrodene større eller plasseres langt fra hverandre, vil strømtettheten dypere i vevet bli høyere, og dermed vil målingen foregå dypere i vevet. (Grimnes og Martinsen 2006). Strømmen som sendes gjennom kroppen ved impedansmålinger vil alltid gå minste motstands

vei. Det betyr at strømmen vil gå gjennom blod, urin, lever og muskler (longitudinelt), fremfor bein, fett, lunge, hjerne og muskler (transverselt).

## Relaksasjon

Når man måler bioimpedans sender man et elektrisk signal gjennom vev. Dette signalet setter opp et E-felt i vevet. E-feltet fører til at partikler som er dipole endrer posisjon (roterer eller flytter på seg). Dette fenomenet kalles relaksasjon. Når E-feltet varierer med frekvensen til signalet, vil dipolene endre posisjon i takt med signalet. Når frekvensen til signalet øker, vil man etter hvert komme til et punkt der partiklene ikke klarer å endre posisjon i takt med signalet. Impedansen vil derfor endres i et frekvensområde, inntil partiklenes posisjon ikke endres i det hele tatt. Frekvensavhengighet på grunn av relaksasjon kalles dispersjon. Midtpunktet i overgangssonen mellom to frekvensuavhengige nivåer kalles dispersjonens karakteristiske frekvens. Frekvensavhengigheten er grunnen til at Bodeplott brukes ved analyse av impedansdata. Figuren til høyre i figur 2.1 viser et eksempel på et Bodeplott av impedansdata målt på lårmuskelen. Grafen viser en dispersjon med en karakteristisk frekvens på ca 40 kHz. De to frekvensuavhengige nivåene er under 5 kHz og over 0,5 MHz.



Figur 2.1. Venstre; Wessel diagram av en typisk bioimpedansmåling med en grønnstiplet sirkelbue regresjon til målepunktene. Høyre; Bodeplott av den samme målingen. Grafer laget i ZView.

Relaksasjonstidene til dipolene varierer med lengden på posisjonsendringen. Dette fører til ulike dispersjoner for forskjellige relaksasjonsfenomener, og dermed ulike frekvenser dispersjonene inntreffer ved. Antall relaksasjoner av samme type bestemmer størrelsen på dispersjonen. Dispersjoner kategoriseres med de fire første bokstavene i det greske alfabetet etter hvilket frekvensområde de inntreffer på. Den største dispersjonen i de fleste impedansmålinger på vev skyldes cellemembranens kapasitive egenskaper. Ved lave frekvenser må strømmen gå utenfor cellene, mens ved høyere frekvenser vil strømmen lett passere cellemembranen, og impedansen vil være lavere.

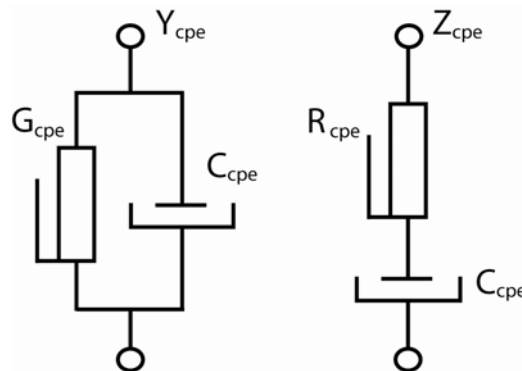
## Elektrisk kretsekvivalenter

Det er vanlig å beskrive objektet som måles med en modell. Det er naturlig at modellen beskrives som en elektrisk ekvivalent krets, fordi vev har kapasitive og resistive egenskaper, og strøm, spenning og motstand er måleparametre. Dermed kan man beskrive de elektriske egenskapene til biologisk vev med serie og parallellkoblinger av resistanser, kondensatorer og noen ganger induktive komponenter. Dette er nyttig når man vet at den døde hornhuden stratum corneum har høy kapasitans, og den levende underhuden stort sett har resistive egenskaper. Forenklet kan dermed huden beskrives som en seriekobling av en kondensator og en motstand. Fordelen med kretsekvivalentene er at egenskapene til komponentene er velkjente, og sammenligninger mellom bioimpedans og elektriske kretser kan gjøres. Som en følge av dette brukes Bodeplott av impedans og permittivitet ofte i analysen av målinger.

## Konstantfaseelementet

På grunn av den høye kompleksiteten i biologisk vev, og et ønske om enkle modeller, har konstantfaseelementet (Constant Phase Element forkortet CPE) oppstått. CPE ble oppfunnet etter at målte data plottet i Wesselplanet gav sirkulære buer som ikke hadde sentrum på den reelle x-aksen. Se figur 2.1 der sentrum av sirkelregresjonen er markert med et kryss.

CPE er ikke en elektrisk komponent, men en matematisk modell med en frekvensavhengighet som kan modelleres slik at fasen  $\varphi$  til immitansen er uavhengig av frekvensen. (Grimnes og Martinsen 2008, side 296). Motstander har  $0^\circ$  faseforsinkelse og kondensatorer har  $90^\circ$  faseforsinkelse. På et CPE velges faseforsinkelsen  $\varphi_{cpe}$  mellom  $0^\circ$  og  $90^\circ$  slik at modellen best mulig beskriver den målte responsen fra vevet. CPE får dermed egenskapene til både en motstand og en kondensator, med nærmest slektskap til den ene eller den andre komponenten, avhengig av hvilken faseforsinkelse som velges. I figur 2.2 er symbolene til konstantfaseelementet tegnet. Symbolene stammer fra elektrolyttisk kjemi, men brukes i impedanssammenheng for å vise at CPE er forskjellig fra vanlige motstander og kondensatorer. Et CPE består alltid av en kondensator og en motstand, for å vise at et CPE er en mellomting mellom en kondensator og en motstand.



Figur 2.2. Symboler for et konstantfaseelement (CPE). Admittansutgaven  $Y_{cpe}$  til venstre, og impedansutgaven  $Z_{cpe}$  til høyre. Tegnet med utgangspunkt i figur 8.6 i Grimnes og Martinsen 2008.



## Colemodellen

Colemodellen ble publisert av K. Cole i 1940. Modellen ble laget for å beskrive dispersjoner i det komplekse Wesselplanet på en enkel matematisk måte. Colemodellen beskrives av en empirisk ligning, som vist i 2.3.

$$Z = R_{\infty} + \frac{\Delta R}{1 + (j\omega\tau_Z)^{\alpha}} \text{ der, } \Delta R = R_0 - R_{\infty} \quad (2.3)$$

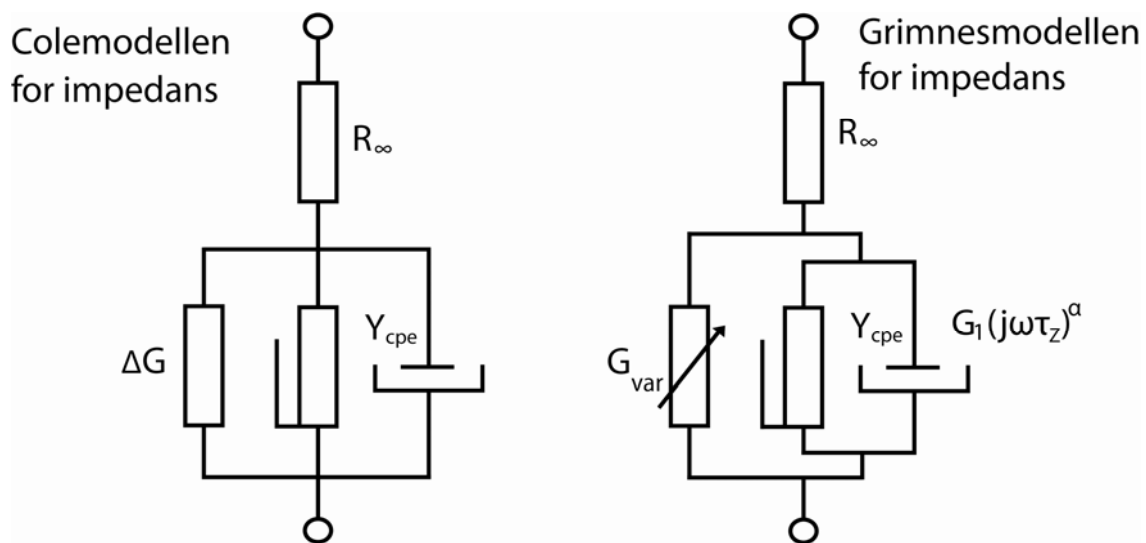
Parametrene  $R_0$ ,  $R_{\infty}$ ,  $\omega$ ,  $\tau_Z$  og  $\alpha$  kan finnes ved å plote impedansdataene i det komplekse Wesselplanet, og utføre en sirkelregresjon på buen til impedanskurven.  $R_0$  og  $R_{\infty}$  er skjæringspunktene mellom x-aksen og sirkelregresjonen for henholdsvis den laveste og høyeste frekvensen. Coleligningen er en parameterfunksjon av vinkelfrekvensen  $\omega$ . Det betyr at man må velge ulike verdier for  $\omega$  for å få punktene på sirkelbuen, dersom man vil plote ligningen for modellen. Toppunktet på sirkelbuen er ved  $\omega = \omega_{Zm}$ , ( $\omega_{Zm}$  er den karakteristiske vinkelfrekvensen). Ligning 2.3 sier da at  $\omega_{Zm} \cdot \tau_Z = 1$ . Dermed bestemmer tidskonstanten  $\tau_Z$  hvilken frekvens som blir modellens karakteristiske frekvens.  $\alpha = \varphi_{cpe}/90^\circ$ .  $\alpha$  er med andre ord bestemt av konstantfaseelementet.

## Grimnesmodellen

Colemodellen er ikke i overensstemmelse med generell relaksasjonsteori (Grimnes og Martinsen 2005). Grimnesmodellen, som er beskrevet i ligning 2.4, er derimot et alternativ som er i overensstemmelse med generell relaksasjonsteori. (Grimnes og Martinsen 2005).

$$Z = R_{\infty} + \frac{1}{G_{\text{var}} + G_1(j\omega\tau_Z)^{\alpha}} \text{ der, } G_1 = \frac{G_{\text{var}}}{(\tau_Z\omega_{Zm})^{\alpha}} \quad (2.4)$$

$R_0$ ,  $R_{\infty}$ ,  $\omega$ ,  $\tau_Z$  og  $\alpha$  er de samme parametrene som i ligning 2.3.  $G_{\text{var}}$  er en ideell uavhengig konduktans som er i parallell med CPE.  $G_{\text{var}}$  er gitt som  $G_{\text{var}} = (R_0 - R_{\infty})^{-1}$ . Når  $G_1 = G_{\text{var}}$  er ligning 2.4 lik ligning 2.3. Det kalles Cole-tilfellet av Grimnesligningen. Dette inntreffer kun ved den karakteristiske frekvensen  $\omega_{Zm}$ . Ellers når  $G_1 \neq G_{\text{var}}$ , er  $\tau_Z$  ikke lenger tidskonstanten som tilsvarer  $\omega_{Zm} \cdot \tau_Z = 1$ .  $\tau_Z$  varierer med  $G_{\text{var}}$ , som er i samsvar med generell relaksasjonsteori. (Grimnes og Martinsen 2005).



Figur 2.3. Kretsekvivalent diagram til Colemodellen (venstre) og Grimnesmodellen (høyre). Tegnet med utgangspunkt i figur 8.14 og 8.20 i Grimnes og Martinsen 2008.

En kretsekvivalent beskriver en dispersjon. Dersom objektet man måler på har flere dispersjoner kan man modellere dette ved å sette flere Cole eller Grimnes modellenheter i serie eller parallell. Videre kan man justere  $\tau$  slik at den karakteristiske frekvensen til dispersjonen sammenfaller med sirkelsegmentets toppunkt.

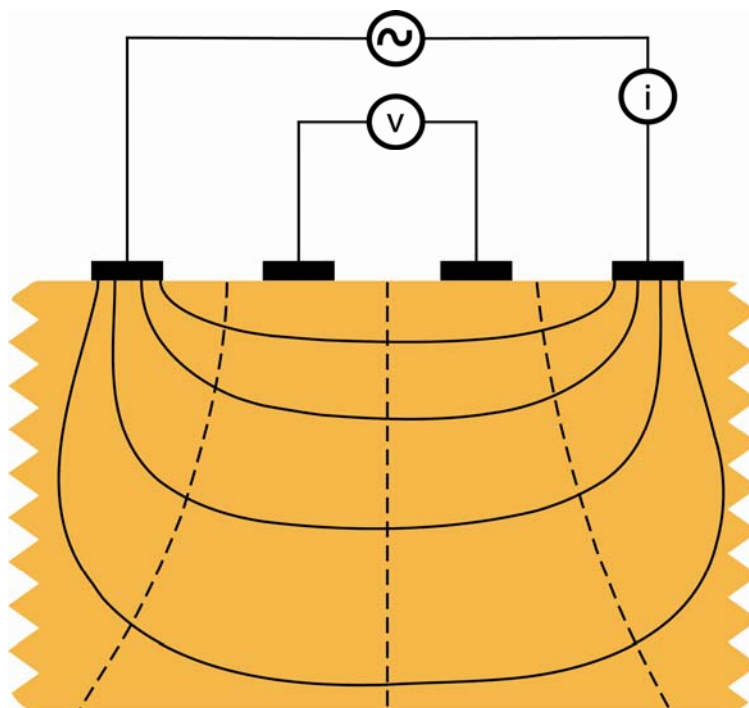
### Elektrodepolarisering

Polarisering av elektroder kan være et problem når man skal utføre bioimpedansmålinger. Polarisingen oppstår fordi det går strøm over grensesnittet mellom hud og elektrode. Strømmen fører til at det legger seg ladning med motsatt polaritet på hver side av elektrodegrensesnittet. Ladningen setter opp et elektrisk felt. Det elektriske feltet gjør at det vil være en potensialforskjell mellom huden og metallet i elektroden. Dette er et problem ved bioimpedansmålinger fordi potensialforskjellen fører til at spenningen vi måler mellom to elektroder ikke er den samme som potensialforskjellen mellom de to målepunktene på huden.

## Fireelektrodesystemet

Et fireelektrodesystem består av to måleelektroder, ofte kalt ”pick up” (PU) elektroder, og to eksiteringselektroder, ofte kalt ”current carrying” (CC) elektroder. Pick up elektrodene måler vevets respons til signalet som sendes mellom CC-elektrodene. Med et fireelektrodesystem måler man derfor egentlig bare vevets overføringsfunksjon. Potensialforskjellen mellom PU elektrodene og strømmen som går mellom CC elektrodene sees på som overføringsparametrene mellom to porter, CC porten og PU porten. (Grimnes og Martinsen 2008, side 193). Denne overføringsfunksjonen tilsvarer impedans når  $Z=v/i$ .

”Fireelektrodeoppsettet er en robust målemetode for impedans, fordi den eliminerer hudens bidrag på impedansen.” (Samtaler med Grimnes 2009). I tillegg kan man se bort fra elektrodepolarisasjonsproblemet fordi det ikke går strøm gjennom PU-elektrodene som måler potensialforskjell. Det er imidlertid en del fallgruver med et fireelektrodesystem. For det første måler man egentlig en overføringsfunksjon, noe som gjør at systemet er veldig følsomt for hvor man plasserer elektrodene. Man må derfor være bevisst på hva som skal måles, og hvor i vevet det befinner seg. For det andre må elektrodene plasseres slik at strømmen påvirker vevet under pick up elektrodene. Man kan kontrollere at overføringsfunksjonen beskriver impedans ved å teste teoremet om resiprositet. Resiprositetsteoremet sier at man måler på et passivt og lineært system dersom impedansen er den samme selv om man bytter CC- med PU-elektrodene. Figur 2.4 viser en skisse av et fireelektrodesystem. Strømtettheten er indikert med hele linjer, mens ekvipotensiallinjene er stiplede. Det oransje vevet er antatt at er isotropt og med lik konduktans.

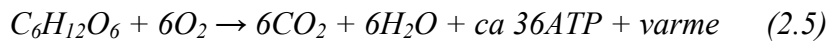


Figur 2.4. Skisse av et fireelektrodesystem. Strømtetthet er indikert med hele linjer, og ekvipotensiallinjene er stiplede. Spenning måles mellom PU-elektrodene i v-symbolet, og strøm måles mellom CC-elektrodene i i-symbolet.

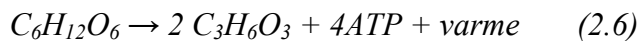
Figur 2.4 viser at strømtettheten er størst under CC-elektrodene. Strømtettheten som funksjon av vertikal avstand fra PU-elektrodene er avhengig av størrelsen på CC-elektrodene og avstanden mellom dem. Ekvipotensiallinjene viser hvordan potensialet i vevet endrer seg i horisontal retning, mens potensialet er tilnærmet konstant i vertikal retning.

## Laktat

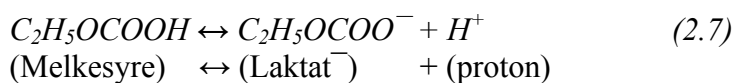
For å utføre kroppens prosesser trengs energiomsetning. Energi overføres fra en tilstand til en annen, når musklene i kroppen arbeider. Da overføres den kjemiske energien i ATP, i forhold til ADP, til mekanisk energi. ADP lades deretter opp til ATP ved celleånding. En av de mest vanlige former for energiomsetning er når glukose og oksygen forbrennes og frigjør energi. Sluttproduktene er varme, vann og CO<sub>2</sub>. Dette kalles aerob celleånding og innebærer glykolysen, sitronsyresyklusen og oksidativ fosforylering. For aerob celleånding kan man sette opp følgende forenklete kjemiske reaksjonsligning:



Ved anaerob celleånding er det for lite oksygen til stede i cellene. Celleåndingen vil da være ufullstendig, og det produseres mindre energi og mer melkesyre. Uten oksygen i det hele tatt, vil kun glykolysen utføres. Denne prosessen bryter ned glukose til pyrodruesukker som blir omformet til melkesyre og litt energi. For glykolysen kan man sette opp følgende forenklete kjemiske reaksjonsligning:

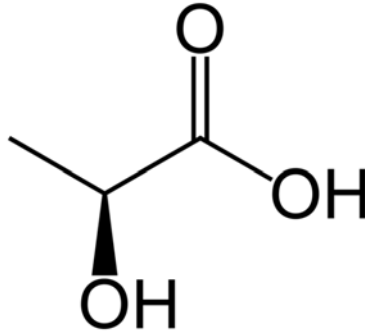


Ut fra de enkle reaksjonsligningene 2.5 og 2.6 kan vi se at aerob celleånding gir ca 9 ganger så mye ATP som fullstendig anaerob celleånding. Det vil naturligvis foregå ulike grader av anaerob celleånding. Mye av melkesyren vil brukes videre til sitronsyresyklusen og oksidativ fosforylering. I overgangen mellom aerob og anaerob energiomsetning finner man den anaerobe terskelen (AT). AT er den høyeste arbeidsbelastningen ved bruk av større muskelgrupper og et dynamisk arbeid hvor organismen er i en likevekt mellom produksjon av melkesyre og eliminasjon av laktat. Anaerob celleånding fører dermed til opphopning av laktat i for eksempel muskelceller. Det er stor uenighet i fysiologiverdenen om hva opphopningen av laktat fører til (Böning og Maassen 2008). De fleste mener at opphopningen er grunnen til at kroppen etter noe tid ikke klarer å utføre arbeid med høy intensitet. Mange mener at opphopningen av laktat og den påfølgende acidosen også fører til smerte og stikking i muskulaturen, noe som gjør anaerobt muskelarbeid ubehagelig. Roberg med flere (2004) mener at smerten og acidosen skyldes det store forbruket av ATP under stort fysisk arbeid, og at det er reaksjonen  $ATP \rightarrow ADP + H^+$  som skaper acidose og smerte.



Etter at melkesyre produseres i glykolysen vil det innstille seg en likevekt i syrereaksjonen mellom melkesyre og laktat, ligning 2.7. Hvilken vei reaksjonen går bestemmes av konsentrasjonen av molekylene på hver side av ligningen, og surhetsgraden til melkesyre. Siden melkesyre har høy surhetsgrad  $pK_a = 3,4$ , vil reaksjonen gå mest mot høyre. Ved  $pH = 7,4$  i muskler og blod vil 91-93% av melkesyre være løst opp til laktat og  $H^+$ . Reaksjonen vil derimot gå mest til venstre i de cellene som tar opp laktat og bruker den i celleåndingen. Normal konsentrasjon av laktat i blodet er 0,5-1,5 mmol/L ved hvile, og ved intens fysisk arbeid kan konsentrasjonen komme opp i over 20 mmol/L. Maksimal laktatkonsentrasjon varierer imidlertid fra person til person. (Samtaler med Jakobsen).

Laktat er en del av melkesyre figur 2.4. Melkesyre er en relativt sterk syre fordi det kan gi fra seg protonet i karboksylsyregruppen når det er i en vannløsning. Idet melkesyremolekylet gir fra seg et proton blir det et laktatmolekyl. Laktat har dermed 5 i stedet for 6 hydrogenatomer, og laktatmolekylet er dermed et negativt ladd ion. Laktat kalles derfor også et salt, og ionet vil være hydratisert når det er vann tilstede. Hydratisering betyr at det legger seg en kappe med vannmolekyler rundt ionet, fordi det negativt ladde laktatmolekylet trekker på de positive hydrogenatomene i vann. Hydratiseringen fører til at laktatmolekylet er løst opp i vann.



*Figur 2.4 Melkesyremolekylet har tre karbonatomer, tre oksygenatomer og 6 hydrogenatomer. Mange av molekylets egenskaper skyldes Karboksylsyregruppen  $-COOH$ , høyre del av molekylet.*

Kroppen har et stort buffersystem som hele tiden prøver å holde pH rundt 7,4. Buffersystemet reduserer acidosen. Buffersystemet gjør at pH blir et dårlig mål på graden av anaerob energiomsetning. Derfor brukes konsentrasjonen av laktat i blodet som mål på hvor stort bidraget fra den anaerobe energiomsetningen har vært. Dette måles oftest ved å ta en blodprøve. Blodprøven analyseres i en laktatanalysator som finner konsentrasjonen av laktat i mmol/L.

Laktat og melkesyre er et sluttprodukt fra den anaerobe energiomsetningen. Laktat fraktes ut og inn gjennom cellemembranen ved hjelp av transportproteiner (Bergersen 2006, sekundærkilde). Laktat er et hydrofilt monokarboksylat, og transportproteinene kalles monokarboksylattransportører. Monokarboksylattransportøren er en kotransportør, det vil si at den frakter et monokarboksylation (for eksempel laktat), sammen med et proton. Dermed fraktes alt fra melkesyremolekylet ut av en anaerobt arbeidende celle. pH og konsentrasjonsgradienten av laktat bestemmer hvor mye transportørene frakter. Ved høy konsentrasjon av laktat inni en celle vil konsentrasjonsgradienten åpne transportørene og drive laktatmolekyler ut i ekstracellulærvæsken, og derfra videre ut i blodet. Leveren og celler som har lav konsentrasjon av laktat vil ta til seg laktatmolekylene og omforme dem til andre molekyler. Leveren vil ved hjelp av ATP bygge laktat opp til glukose i en prosess som kalles glukoneogenese (som betyr nydannelse av glukose). Muskelceller og andre celler vil bruke laktatmolekylene i sin normale celleånding (sitronsyresyklusen og oksidativ fosforylering).

## Alvarenga og Souza sin forskning på feltet

I 2007 skrev Alvarenga og Souza en artikkel om impedansmålinger for å estimere laktatterskelen. Artikkelen ble utgitt i august i forbindelse med en IEEE EMBS (Engineering in Medicine and Biology Society) konferanse. Artikkelen er så vidt forfatteren vet det eneste publiserte arbeidet som utforsker sammenhengen mellom impedansmålinger og laktatkonsentrasjonen i kroppen. Tittelen er "Estimation of the Lactate Threshold Using Bioelectrical Impedance Spectroscopy: A New Noninvasive Method". Hele artikkelen er i vedlegg 3. Merk at laktat terskel er det samme som anaerob terskel.

I tittelen antydes det at de har funnet en ny ikke invasiv metode for å måle laktat, og det vises underveis til en Pearson koeffisient på  $r = 0,96$  mellom impedansmålingene og blodlaktatmålinger. Artikkelen avsluttes med at "The findings of the present study are corroborated in estimation of maximal oxygen uptake by bioelectrical impedance analysis and suggest that the LT (lactate threshold) from BIS (bioelectrical impedance spectroscopy) method should be considered by coaches and athletes as a method for estimating optimal exercise intensity." Fra disse utsagnene blir man ledet til å tro at Alvarenga og Souza har funnet en solid sammenheng mellom laktatkonsentrasjonen i blodet og bioimpedansspektroskopi.

I forsøksprotokollen økes arbeidsbelastningen for forsøkspersonene med jevne trinn, noe som fører til at alle aktivitetssymptomer øker i takt med laktatkonsentrasjonen. Det kan dermed bety at Alvarenga og Souza måler mer enn bare laktatkonsentrasjon med sin bioimpedansspektroskopi. Blant annet øker blodets hastighet gjennom kroppen dramatisk ved fysisk aktivitet (Jorfelt m.fl. 1978). Sigmaneffekten (Sigman med flere 1937) beskriver at resistiviteten til blod minker ved økt blodhastighet, fordi blodlegemene i større grad stiller seg i fartsretningen ved høyere hastigheter. Låret som Alvarenga og Souza måler på, vil ved sykling være den delen av kroppen som arbeider hardest, og vil da ha størst blodgjennomstrømning. Ved utholdenhetsidretter som sykling er det først når blodgjennomstrømningen har nådd sin maksimale hastighet at musklene ikke får nok oksygen, og produksjonen av laktat starter. Det betyr at blodflyt ikke øker proporsjonalt med laktatkonsentrasjonen, og blodflyten vil være en forstyrrende faktor som flytter den impedansmålte laktatterskelen til et lavere belastningsnivå enn det faktiske belastningsnivået. Andre aktivitetssymptomer som påvirker impedansmålingene er svette og svettekanalenes fylningsgrad. Forsøkspersonenes svetting vil både endre saltbalansen i kroppen, og hudens impedansbidrag via svettekanalene. Svetting ved fysisk aktivitet er et kjent fenomen, og varierer i hovedsak med temperatur, luftfuktighet og belastning. Svettingen vil øke i takt med belastningen, men ikke nødvendigvis i takt med laktatkonsentrasjonen.

Ligning 4 i artikkelen som ble brukt for å beregne maksimal hjertefrekvens er kun et overslag. Det er store individuelle forskjeller på dette området. Det ser ut til at denne ligningen ligger til grunn for hvordan Alvarenga og Souza har beregnet gjennomsnittelig hjertefrekvens ved belastningen på anaerob terskel, som andel av maksimal hjertefrekvens. Denne beregningen har de gjort for begge målemetodene, og de skriver at snittet er 82,7% for blodlaktatmetoden, og 83,1% for impedansmetoden. Det første problemet er at ligning 4 er unøyaktig, og Alvarenga og Souza oppgir ikke usikkerheten i disse tallene. Det andre problemet er at disse tallene ikke sier noe mer om sammenhengen mellom målemetodene. Tallene er regnet ut fra hva pulsen var idet de ulike målemetodene fastslo at anaerob terskel var nådd. Det er nevnt tidligere i artikkelen at målemetodene gav like tall for hva som var anaerob terskel. Det virker

derfor som at disse tallene er tatt med fordi de er like hverandre, og på den måten skal gi sterkere inntrykk av at deres nye målemetode virker.

Referansemetoden for å finne den anaerob terskelen ble gjort med Accusport (Tyskland) blodlaktatanalysator. Medbø med flere sammenlignet Accusport med en fotometrisk referansemetode i år 2000, og fant ut at Accusport kun viser riktig på 5 mmol/L. Ved lavere verdier viser Accusport opptil 20% for høyt, og ved høyere verdier viser den opptil 20% for lavt.

Alvarenga og Souzas referansemetode gikk ut på at to blodprøver ble tatt. En før terskel og en etterpå. Deretter ble laktatkonsentrasjonen mellom disse punktene interpolert opp, og det ble fastsatt at en laktatkonsentrasjon i blodet på 3,5 mmol/L tilsvarte anaerob terskel. Det er flere svakheter med denne metoden. For det første vil det være individuelle forskjeller i laktatkonsentrasjon ved anaerob terskel. For det andre vil ikke laktatkonsentrasjonen ha et lineært forløp som funksjon av belastningen. Dette sier Alvarenga og Souza selv i artikkelen, men det er ikke tatt hensyn til dette. ”At rest the BLC (blood lactate concentration) is about 1,0 mM and such concentration normally increases as exercise intensity increases, until a given aerobic exercise intensity where the biological system begins to produce more lactate than the body can eliminate and thus the BLC increase at a greater rate than the exercise intensity.”

## Multivariatanalyse

Multivariatanalyse er et verktøy for å analysere data med mange variable. Det betyr å finne variasjoner og interne sammenhenger i et datasett. Det finnes mange analysemetoder innen multivariatanalyse, men i denne studien ble PLS regresjon metoden benyttet. PLS står for partial least square, men mange mener at det også kan stå for projection to latent structures. Metoden går ut på å lage en modell som best kan forutsi eller forklare Y-variable ut fra flere X-variable. En måling (sample) inneholder en Y-variabel og flere X-variable. X-variablene er måleparametre som analyseres fordi man tror de varierer i takt med, eller kan beskrive endringer i Y-variable. X-variablene er uavhengige variable og blir ofte kalt forklarende variable eller ”predictors”. Y-variable er avhengige variable og er den størrelsen man vil beskrive ved hjelp av regresjonsmodellen. Dette kan være en responsvariabel eller en referansemåling. I PLS regresjon brukes en lignende metode som PCA (principal component analysis). I begge metodene projiseres X-variablene ned på et mindre antall beregnede prinsipalkomponenter (latente vektorer). Den første prinsipalkomponenten inneholder mest variasjon. Forskjellen er at PCA kun bruker X-variablene til å definere eller beregne prinsipalkomponentene, mens PLS metoden bruker informasjon både i X- og Y-variablene til å lage en modell. Det fører til at de første PLS komponentene er mest relevante for modellens evne til å forutsi Y-variablene. Men de første PLS komponentene beskriver fortsatt den største variasjonen i X-variablene, slik som i PCA.

$$X = TP^T + E \quad (2.8)$$

$$\hat{Y} = TQ^T + F \quad (2.9)$$

Modellen som lages kan beskrives matematisk som vist i ligning 2.8 og 2.9.  $X$  er en  $n \times m$  matrise av forklarende variable og  $Y$ -hatt er en  $n \times p$  matrise som inneholder estimat av responsvariabelen  $Y$ .  $T$  er en  $n \times l$  matrise med scores i modellen.  $P^T$  er en transponert  $P$  matrise og  $Q^T$  er en transponert  $Q$  matrise.  $P$  og  $Q$  er henholdsvis  $m \times l$  og  $p \times l$  matriser med loadings i modellen.  $E$  og  $F$  er feilledd i modellen som det blir antatt at har uavhengige og identisk fordelte tilfeldige tall. Hver komponent i modellen får en score og en loading for hver X- og Y-variabel. Scores beskriver tendenser, likheter og ulikheter i samples (målinger). Et samples score kan tolkes som projeksjonen av det samplet ned på PLS komponenten. P-loadings er cosinus til vinkelen mellom retningen til en X-variabel og retningen til en PLS-komponent. Dess mindre vinkelen er, dess større sammenheng er det mellom PLS-komponenten og X-variabelen. P-loadings kan derfor ha verdier mellom -1 og 1. Q-loadings uttrykker sammenhengen mellom Y-variabelen og scores i T-matrisen. Q-loadings er ikke normalisert, og har derfor verdier også utenfor -1 og 1.

PLS regresjon virker ekstra godt når;

- X-variablene uttrykker felles informasjon, dvs. stor grad av korrelasjon eller lineær avhengighet.
- X-variabel matrisen har flere variable enn antall observasjoner (samples).

Ulemper ved PLS regresjonsmetoden er;

- Overestimering dersom de riktige forhåndsregler ikke blir tatt.
- Det er lett å lage en regresjonsmodell, men det kreves veldig god innsikt i PLS-metoden for å kritisere den.



- Siden modellen blir ekstra god når det er flere variable enn samples, blir den dårligere når det er flere samples enn variable.

$R^2$  er et tall som indikerer hvor godt modellen kan forutsi riktige Y-verdier. Dersom  $R^2$  er 1,0 beskriver modellen Y-variabelen perfekt. Hvis  $R^2$  er 0,0 er det ingen sammenheng mellom modellen om Y-variabelen.  $R^2$  kan beskrives som i ligning 2.10 og ligning 2.11.

$$R^2 = 1 - \frac{F}{V} \quad (2.10)$$

$$R^2 = \frac{\hat{V}}{V} \quad (2.11)$$

$F$  er feilleddet i ligning 2.9 for den estimerte Y-variabelen.  $V$  er variansen i den opprinnelige Y-variabelen.  $V\text{-hatt}$  er variansen i den estimerte modellen for Y-variabelen.

Multivariatanalysen i denne oppgaven bruker kryssvalidering av modellen. Det blir derfor oppgitt to  $R^2$ -verdier for hver regresjonsmodell, den ene for kalibreringen av modellen, og den andre for valideringen av modellen. Kryssvalidering går ut på å ta en måling (sample) ut av modellen, og bruke den til å gi inndata. Så ser man om utdata fra modellen tilsvarer den målte Y-verdien. Dette gjøres systematisk på alle målinger for å validere modellen.

### 3 Metode

Det ble utført to typer forsøk, in vitro og in vivo. I in vivo-forsøkene ble det utført impedans og laktatmålinger på forsøkspersoner som gjennomførte en sykkeltest på ergometersykel. På in vivo-forsøkene var det mange variable som har innflytelse på impedansen. Hensikten med in vitro-forsøkene var å se om man kunne finne en korrelasjon mellom laktat og impedans som lignet på noe som ble funnet i in vivo-forsøkene, slik at man med større sikkerhet kan påpeke hvilke observasjoner som skyldes endring i laktatkonsentrasjon.

#### **In vitro-forsøk**

In vitro-forsøket gikk ut på å måle impedansen på en cellesuspensjon, mens konsentrasjonen av laktat ble variert. Et fireelektrodeoppsett ble benyttet. Hypotesen var at cellene ville gi en annerledes impedansrespons med høy laktatkonsentrasjon rundt og i cellene, sammenlignet med lav laktatkonsentrasjon.

Celler i suspensjon ble skaffet fra forskningsavdelingen ved blodbanken på Ullevål sykehus. Forskningsavdelingen har spesialisert seg på dyrking av leukemiceller som egner seg godt til cellesuspensjoner, fordi de kan dele seg uten å være festet til noe. Typen vi fikk var megakarocytceller, som er store celler som utvikler seg til trombocytter (blodplater) i kroppen. Blodplatene gjør at blodet kan koagulere. Celletypen kalles K562, og denne cellelinjen er utledet fra folk med myeloid leukemi. Cellene er ikke klistrende (non-adherent), runde i kantene og har total anaerob forbrenning. At de har anaerob forbrenning betyr at de produserer melkesyre for å få energi til å overleve. Dette igjen betyr at ved høy konsentrasjon av celler vil vi også ha høy konsentrasjon av laktat i suspensjonen. Dette var både positivt og negativt for våre målinger. Alle cellene som ble dyrket på Ullevål sykehus var anaerobe leukemiceller, derfor valgte vi å måle på disse cellene. Leukemicellene levde i et serum som inneholdt glukose (næring), ulike typer proteiner som beholdt miljøet levelig for cellene og noen salter.

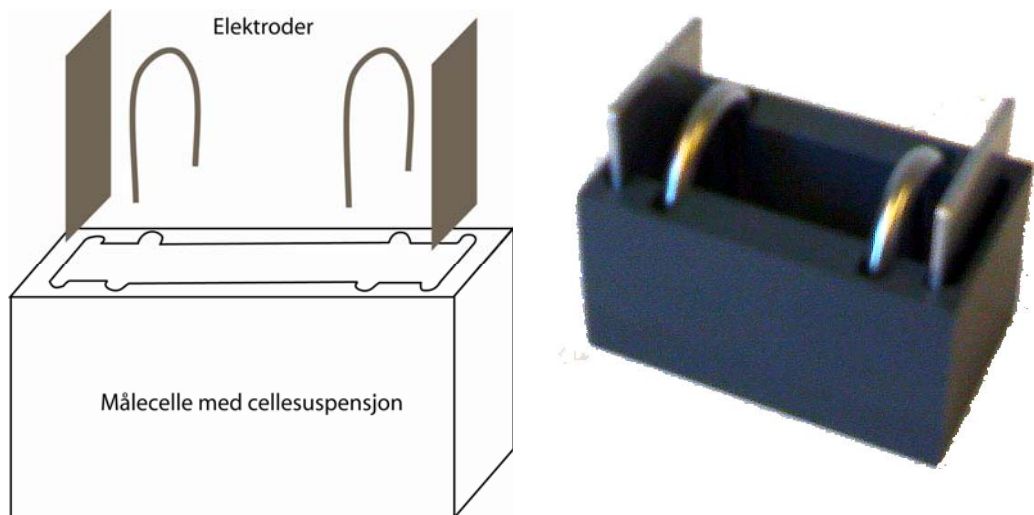
K562-cellene ble blandet ut i to beholdere, en med 10 ml suspensjon med 0,4 millioner celler/ml, og en beholder med 10 ml suspensjon med 0,6 millioner celler/ml. Konsentrasjonen av celler i den opprinnelig cellesuspensjonen på Ullevål sykehus ble målt med en celledeteller til 1,0 millioner celler/ml. Cellesuspensjonene som det skulle utføres impedansmålinger på ble blandet ut til riktig cellekonsentrasjon ved å tilsette serum. All åpen behandling av cellesuspensjonen ble gjort i et sterilt avlukke, med rikelig rengjøring med sprit. Kontaminering av cellesuspensjonen med for eksempel bakterier ville ført til rask celledød, fordi serumet gir gode levetilstander for bakterier. Vi fikk også en beholder med serum, slik at vi kunne gjøre målinger for å bestemme konduktansen og laktatkonsentrasjonen i serumet uten celler.

In vitro-forsøkene ble utført en dag (heretter kalt dag 1) og fire dager (heretter kalt dag 4) etter cellekonsentrasjonen var blitt bestemt nøyaktig på Ullevål sykehus. Cellesuspensjonen ble oppbevart i en inkubator av typen BINDER KB 23. Temperaturen på cellesuspensjonen ble dermed holdt konstant på  $37 \pm 1$  °C da impedansmålinger ikke ble utført. I samråd med Doktor Mohammed Reza Mirlashari som forsker på leukemiceller, ble konsentrasjonen av celler i beholderne antatt ut fra antall dager etter celledelingen. Cellesuspensjonen med 0,6 millioner celler ved utblanding, ble antatt å ha en konsentrasjon på 1,2 millioner celler/ml på dag 4. 1,2 millioner celler/ml er kritisk populasjonsnivå. Ved høyere konsentrasjoner enn dette, vil cellene få for lite næring, ha lav pH og begynne å dø. Doktor Mohammed Reza Mirlashari sa at ”syk cellesuspensjon er gul og grumsete, men gjennomiktig. Bakterieinfisert

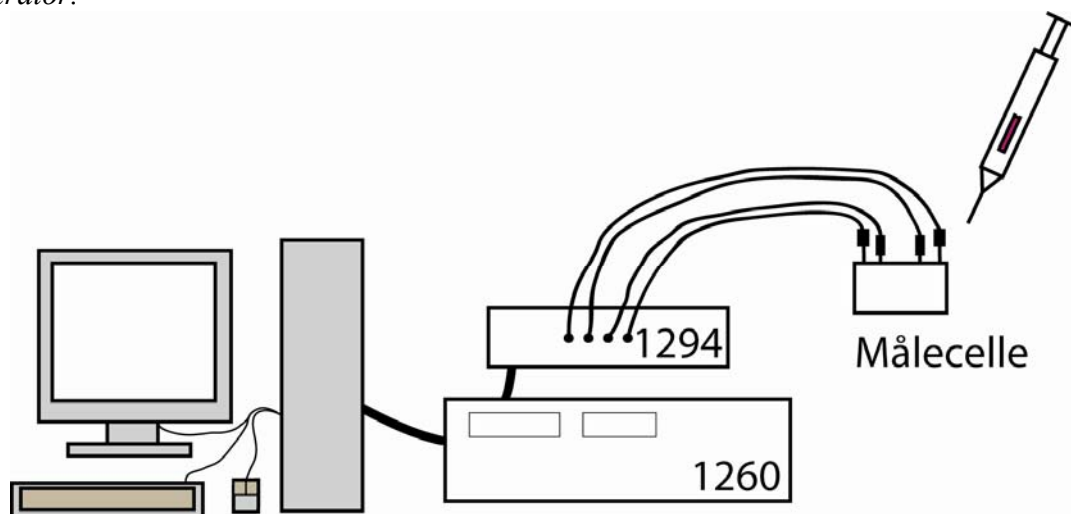
suspensjon er gul, grumsete og hårete”. Friskt serum hadde en sterk rosa-lilla farge, mens frisk cellesuspensjon var gul-rosa og klar.

## Utstyr

- Flere 1 ml plast målepipetter.
- Plasthansker.
- Laktatanalysator; YSI 1500 sport.
- 0,05 ml pipette for oppmåling av væske som injiseres i laktatanalysatoren.
- Destillert vann.
- Referansekonsentrasjoner L-laktat 5 mmol/L og 15 mmol/L; YSI 2327 standard fra YSI Incorporated
- Målecelle med fire elektroder. Se skisse på figur 3.1.
- Fire krokodilleklemmer, festet på elektrodene på målecellen.
- Solartron 1260 + 1294 frekvensanalysator med impedansgrensesnitt.
- PC med programmet zPlot, som var koblet til Solartron 1260.



Figur 3.1. Skisse av målecellen som ble benyttet i in vitro-forsøket til venstre. Bilde av målecellen til høyre. Lengde: 4,0 cm, bredde: 2,3 cm og høyde: 2,0 cm. Skisse laget i Adobe Illustrator.



Figur 3.2. Skisse av oppsett av utstyret brukt i in vitro-forsøket. Fra venstre; pc, impedansanalysator, målecelle og prøvepipette for injeksjon i laktatanalysatoren. Skisse laget i Adobe Illustrator.

Kalibrering av laktatanalysatoren mot referansen på 5 mmol/L ble utført regelmessig og inntil en proSENTS avvik fra referanseverdien ble godtatt. Kontroll av analysatoren ble utført ca hver halvtime ved å måle konsentrasjonen av laktat i referanseløsningen på 5 mmol/L. Ved avvik på mer enn en prosent ble analysatoren kalibrert på nytt. Ved måling av høyere laktatverdier enn 10 mmol/L, ble det utført kontroll mot referanseløsningen på 15 mmol/L. Medbø med flere (2000) konkluderte med at YSI 1500 laktatanalysatorer er mindre nøyaktig ved høye laktatkonsentrasjoner. Derfor ble et avvik på inntil syv prosent godtatt ved kontroll mot 15 mmol/L referanseløsning. Til målingene på dag 4 ble membranen på laktatanalysatoren byttet, dette gav betydelig bedre resultater mot 15 mmol/L referanseløsningen.

Impedansanalysatoren ble satt opp til et fireelektrodesystem. To ledninger fra Solartron 1294 impedansgrensesnittet ble koblet til CC-elektrodene på målecellen, mens to andre ledninger fra 1294 målte potensialforskjellen mellom pickupelektrodene i målecellen. Se figur 3.2 for skisse av måleoppsettet. Solartron 1260 ble satt opp til å skanne et frekvensområde fra 1 Hz til 1 MHz med sinusformede vekselspanningssignaler. Frekvensområdet ble logaritmisk fordelt med 4 frekvenser i hver dekad. Dette gav 25 målepunkter, og det tok 45 sekunder å samle inn en måleserie. Ulike amplituder på sinussignalene ble prøvd. På måleserier med lav impedans (mellom 100 og 200  $\Omega$ ) gav 100 og 500 mV pene kurver i det komplekse planet (Wesselplot). Da impedansen økte ble det brukt amplituder på 500 og 1000 mV. Det ble også prøvd med fast strøm amplitude på sinussignalet. Det gav greie kurver, men siden dette erfaringsmessig er en mindre nøyaktig metode på Solartron 1260/1294 impedansanalysatoren (samtale med Ørjan Martinsen), ble det benyttet fast amplitude på spenningen. Det er usikkert hvorfor fast strøm amplitude fungerer dårligere på Solartron 1260/1294, men det kan være fordi det instrumenteringsmessig er vanskelig å sende en konstant strøm gjennom en krets der resistansen (impedansen) varierer med frekvens.

### **Serummålinger uten og med tilsatt laktat**

Det ble utført målinger på serumet for å kartlegge dets påvirkning på impedans og laktatkonsentrasjon. Disse målingene ble gjort først, slik at man hadde litt erfaring med denne typen målinger, før fremgangsmåten på celleduspensjonsmålingene ble bestemt.

- Alt av måleutstyr, bord og gummihansker ble vasket med sprit før, under og etter forsøkene. Det var spesielt viktig å desinfisere det som skulle i kontakt med serumet.
- Det ble kontrollert at målecellen var helt tørr, før serum ble helt oppi.
- Målingene på serumet ble utført etter en dag i inkubatoren.
- Temperaturen i serumet var 37 °C idet det ble tatt ut av inkubatoren, men temperaturen sank antagelig raskt til lab temperatur (ca 22 °C) da 5 ml serum ble overført med milliliterpipetten til målecellen. Målecellens masse på ca 50 gram ble antatt at raskt tok opp den ekstra varmeenergien til 5 gram serum.
- Laktatkonsentrasjonen på serumet ble målt.
- Referanseløsningen med 15 mmol/L laktatløsning ble tilsatt i porsjoner på 1 ml. Referanseløsningen ble tilsatt med og uten å ta ut 1 ml serum først.
- Impedansmålinger ble utført ved alle ulike konsentrasjoner av laktat.
- Ulike amplituder på den faste sinusspenningen ble prøvd, både for å sjekke linearitet og for å se om kurvene ble penere.
- Det ble kontrollert at serummålingene var lineære ved resiprositet.

### **Cellesuspensjonsmålinger**

Det ble utført 3 måleprosedyrer på celleduspensjon. Alle med ulike fremgangsmåter og ulike celleduspensjonskonsentrasjoner.

## Måleprosedyre 1

På dag 1 ble det utført målinger på suspensjonen som opprinnelig hadde 0,6 millioner celler/ml, og som på dag 1 hadde ca 0,7 millioner celler/ml. Ulike amplituder med strøm og spenning ble testet på disse impedansmålingene. Fast spenningsamplitude ble foretrukket. 15 mmol/L laktat ble tilsatt, og ulike impedansresponses ble logget ved ulike laktatkonsentrasjoner. Disse målingene kunne bare brukes som innledende utforskning av måleprosedyrene og erfaringsbygging. Dette fordi volumet ikke ble holdt konstant. Videre var membranen i laktatanalysatoren gammel, noe som gav unøyaktige målinger ved høye laktatkonsentrasjoner. Dette ble klart da konsentrasjonen av 15 mmol/L referanselaktatløsningen ble målt til 9,67 mmol/L. Kontroll av den samme referanseløsningen ble utført på en annen laktatanalysator på Norges Idrettshøgskole samme dag, og da viste den 13,47 mmol/L. Før de neste måleprosedyrene ble membranen i laktatanalysatoren fornyet. Videre ble det bestemt at hver laktatmåling på celleduspensjoner skulle verifiseres med en måling av referanseløsningen med laktatkonsentrasjoner på 5 eller 15 mmol/L, avhengig av hvilken laktatkonsentrasjon celleduspensjonen var nærmest.

På dette innledende forsøket ble det også erfart at laktatkonsentrasjonen i celleduspensjonen var nesten lik som laktatkonsentrasjonen av referanseløsningen på 15 mmol/L. Det ble derfor bestemt at celleduspensjonen skulle vannes ut på de neste forsøkene. Det så ut til å være den eneste måten å skanne et laktatkonsentrasjonsområde mellom 2 og 15 mmol/L. Ulempen var at konsentrasjonen av celler og serum også ville synke.

## Måleprosedyre 2

- Celleduspensjonen som hadde 0,4 millioner celler/ml på dag 0, ble antatt å ha en konsentrasjon på 1,0 millioner celler/ml på dag 4.
- Laktatanalysatoren ble kalibrert, og kontrollen mot referanseløsningen på 15 mmol/L viste 14,02, som var en betydelig forbedring fra kontrollen på dag 1.
- Impedansanalysatoren ble kalibrert mot testmodulen, og kurvene ble akseptert.
- 5 ml celleduspensjon ble pipettert oppi målecellen.
- Impedansmålinger ble utført. Filene med impedansdata ble navngitt c\_måling1.z og oppover.
- Laktatkonsentrasjonen i målecellen ble målt, og målingen ble verifisert mot 5 eller 15 mmol/L referanseløsning. Det ble generelt tatt to eller flere impedansmålinger på hver laktatkonsentrasjon for å oppdage variasjoner med tiden.
- 1 ml suspensjon ble tatt ut av målecellen for å gjøre plass til 1 ml destillert vann. Dette ble gjort for å holde konstant volum i målecellen ved målingene.
- Det ble brukt to ulike desinfiserte målepipetter. En til å ta ut suspensjon, blande før og etter, og en til å tilsette destillert vann. Dette ble gjort for å unngå forurensning av kilden til destillert vann.
- Det var usikkert hvor lang tid laktat og destillert vann brukte på å komme i likevekt i celleduspensjonen. Blanding med pipette metoden ble derfor utført før og etter tilsetning av destillert vann.
- Målinger ble gjort, og destillert vann ble tilsatt, helt til totalt 8 ml vann var blandet ut i suspensjonen. Da var laktatkonsentrasjonen sunket fra 18,38 til 2,59 mmol/L. Det ble beregnet at konsentrasjonen av celler var sunket fra ca 1 million celler/ml til ca 0,2 millioner celler/ml.

### Måleprosedyre 3

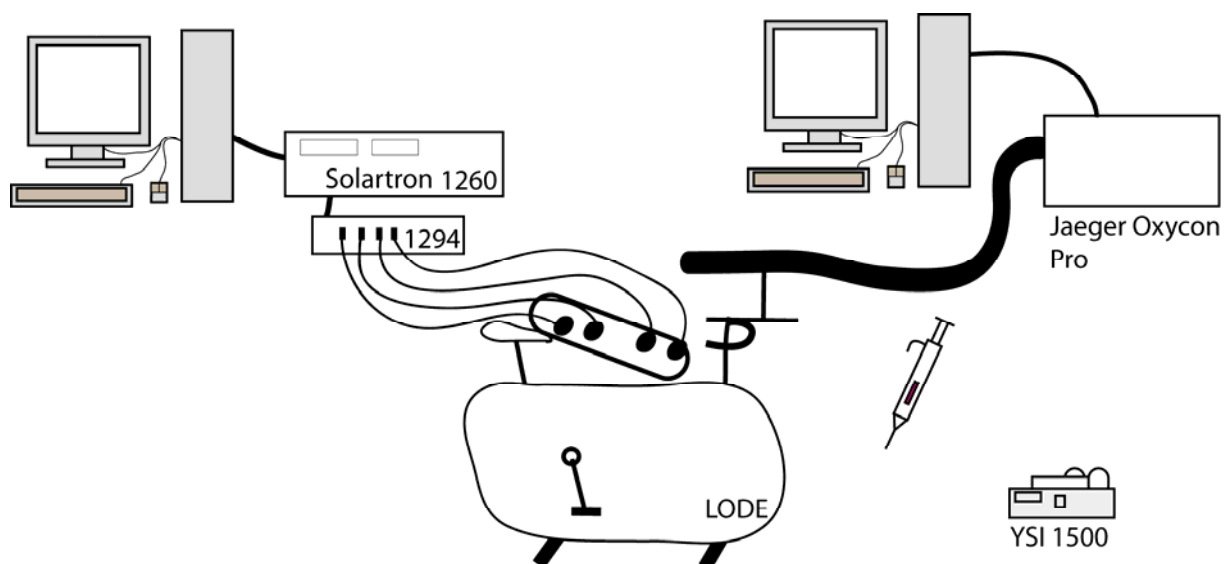
- Til måleprosedyre 3 var det ønskelig med så høy konsentrasjon av celler som mulig. 2 ml suspensjon som hadde en konsentrasjon på 0,6 millioner celler/ml på dag 0, ble blandet med 2 ml fra suspensjonen som var 0,4 millioner celler/ml på dag 0. Dette tilsvarer 0,5 millioner celler/ml på dag 0, og dermed ca 1,2 millioner celler/ml på dag 4.
- Ved denne måleprosedyren var volumet av suspensjonen 4 ml, ikke 5 ml som på de andre måleprosedyrene.
- Impedansanalysatoren ble ikke kalibrert på nytt, siden måleprosedyre 2 ble utført under timen tidligere, og siden kurvene ble kontrollert jevnlig.
- Laktatanalysatoren ble kalibrert på nytt, og godkjent.
- Laktatkonsentrasjon i målecellen ble målt, og verdien ble verifisert ved kontroll mot 15 mmol/L referanseløsning.
- Impedansmålinger med spenningsamplituder på 500mV og 1000mV ble tatt.
- Deretter ble konsentrasjonen av laktat og celler minket. Dette ble gjort på samme måte som i måleprosedyre 2. Blanding av suspensjonen ble utført med pipette for å få en uniform fordeling av laktat og celler. 1 ml suspensjon ble tatt ut av målecellen. 1 ml destillert vann ble tilsatt. Blanding for å få en uniform laktat og cellefordeling ble utført en gang til.
- Deretter ble impedans og laktatkonsentrasjonsmålinger utført.
- Tilleggsimpedansmålinger ble tatt der Wesselplott av måledataene inneholdt støy.
- Deretter ble en ny utvanning foretatt.
- Utvanning av denne suspensjonen ble gjort til totalt 5 ml destillert vann var tilsatt. Da var laktatkonsentrasjonen sunket fra 19,82 mmol/L til 3,76 mmol/L. Konsentrasjonen av celler ble antatt å ha sunket fra ca 1,2 millioner celler/ml til ca 0,3 millioner celler/ml.

## In vivo-forsøk

In vivo-målingene ble utført på forsøkspersoner som utførte fysisk arbeid i form av sykling på ergometersykkel. Laktatkonsentrasjonen i blodet ble målt samtidig som impedansresponsen ble målt med et fireelektrodesystem på låret. Alle målingene ble gjort på fysiologilaboratoriet på Norges Idrettshøgskole. I tillegg til hovedmålingene av laktat og impedans, ble puls og ekspirasjonsgasser målt. 11 forsøkspersoner, 10 menn og 1 kvinne, deltok i forsøkene. Alderen på forsøkspersonene var i gjennomsnitt 31 år, med en spredning fra 14 til 44 år. Aktivitetsnivået på forsøkspersonene varierte fra mosjonister som trente 3-4 ganger i uken, til hardt satsende syklister og løpere. Det ble målt laktatverdier mellom 0,51 mmol/L (hvile) og 11,40 mmol/L (total utmattelse). Den anaerobe terskelen ble beregnet for hver forsøksperson ved hjelp av en modell brukt på NIH som tar hensyn til oksygenopptakmålingene, puls, laktatmålingene og arbeidsbelastningen. Den anaerobe terskelen var i snitt 2,31 mmol/L. Følgende informasjon finnes i vedlegg 1 – forsøkspersondata: alder, høyde, vekt, BMI, anaerob terskel (laktat, HF, VO<sub>2</sub>), maks hjertefrekvens (i forsøket), maks VO<sub>2</sub>, maks laktat, temperatur og lufttrykk under forsøket og arbeidsbelastning (start, terskel og maksimal).

## Utstyr

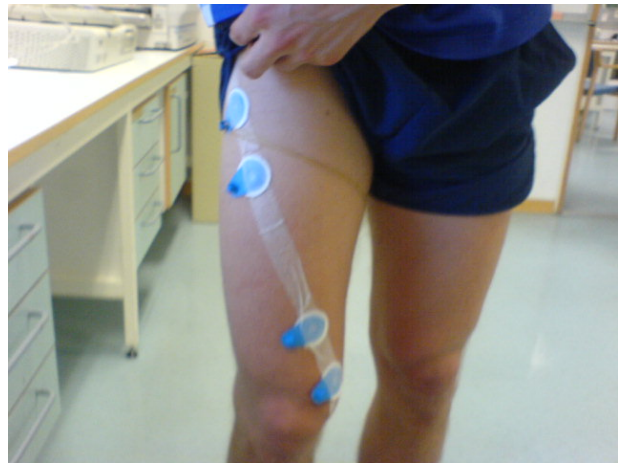
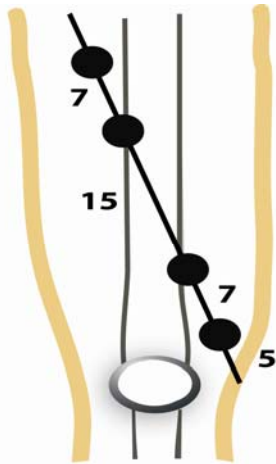
- Lode ergometersykkel med elektronisk kontroll av belastning.
- 2 stk. laktatanalysatorer; YSI 1500 sport.
- Laktat referanseløsning; YSI 2327 Standard fra YSI Incorporated.
- Stikkepenn; Accu-Chek soft dix pro.
- Ag/AgCl engangs elektroder.
- Tape til bruk på hud.
- Solartron 1260 + 1294 frekvensanalysator med impedansgrensesnitt.
- Ekspirasjonsgassanalysator; Jaeger Oxycon Pro.
- Polar pulsklokke med belte av ny type.



Figur 3.3. Skisse av oppsett av utstyr i in vivo-forsøkene. Fra venstre; pc, impedansanalysator, ergometersykkel, lår med elektroder, ekspirasjonsgassanalysator og laktatanalysator nede til venstre.

## Forsøksprosedyre

- Før elektrodene ble satt på forsøkspersonen ble riktige avstander oppmålt, og et stykke tape sikret at elektrodene ble montert på rett plass. Se figur 3.4. Tapen sikret også at elektrodene holdt seg på plass under forsøket.
- Elektroder ble festet på forsøkspersonenes lår så tidlig som mulig, slik at elektrodegelen skulle skape så god kontakt som mulig, før målingene begynte. Dessuten ble eventuell hårvekst på elektrodeområdene fjernet før montering.
- CC-elektrodene ble festet øverst og nederst på lårmuskelen, med PU-elektrodene mellom. Elektrodeplassing med avstander vises i figur 3.4.



Figur 3.4. Skisse av elektrodeplassingene på låret til venstre. Tallene indikerer avstand mellom elektrodensenter i centimeter. Bilde av lår med elektroder til høyre.

- Strømmen mellom CC-elektrodene går dermed longitudinelt med lårmuskelen, og under pickupelektrodene.
- Ergometersykkelen ble så stilt inn.
- Vekt, høyde og alder ble målt eller forespurt forsøkspersonen.
- Laktatanalysatorene og ekspirasjonsgassanalysatoren ble kalibrert med 2 til 3 timers mellomrom.
- Impedansanalysatoren var innstilt til å måle på 25 frekvenser logaritmisk fordelt mellom 1 Hz og 1 MHz, dvs. fire målefrekvenser per dekad. En sinusspenning med 1 volt fast amplitude ble brukt på CC-elektrodene.
- Temperaturen i laboratoriet ble holdt på  $20 \pm 2,5$  °C med klimaanlegget, slik at forsøkspersonen skulle svette minst mulig.
- Laktatkonsentrasjonsmålingen gikk ut på å ta en liten blodprøve fra fingeren til forsøkspersonen.
- Et pennformet apparat (Accu-Chek soft dix pro) laget et lite hull i huden, så dypt at blod kunne presses ut.
- Etter hullet var laget, ble fingeren vasket med destillert vann på en klut, slik at det ikke skulle komme svette og annen forurensing i blodprøven. Deretter ble et tynt prøverør plassert på blodråpen på fingeren. Kapillærkrefter og tyngdekraften trakk så blodet inn i prøverøret. Blodrøvetakningen tok mellom 10 og 30 sekunder, og ble utført samtidig som impedansmålingene.



- Blodprøven ble etterpå overført til laktatanalysatoren som viste laktatkonsentrasjonen på et display når analysen var ferdig. Verdien ble skrevet opp på protokollskjemaet. Se vedlegg 2.
- Dersom blodprøven var stor nok, ble den analysert i laktatanalysator nummer 2 også. Verdien fra denne maskinen ble notert i kolonnen Laktat YSI 2 i protokollskjemaet. Tanken bak to laktatanalysatorer var å få større sikkerhet i denne målingen, ettersom måleverdiene skulle bli betraktet som referanseverdier i analysen av dataene.

Tabell 3.1. Tidsforløp under *in vivo*-forsøkene på ergometersykkel.

Protokoll klokke	Hva
	Hvilemålinger
	10 min oppvarming
	Oppvarmingsmålinger
00:00	Start pulsklokke samtidig som protokollklokka
01:00	Start drag 1. Munnstykke inn, 85 i tråkkfrekvens
06:00	Kort pause, målinger; laktat og impedans
07:00	Start drag 2. Munnstykke inn, 85 i tråkkfrekvens
12:00	Kort pause, målinger; laktat og impedans
13:00	Start drag 3. Munnstykke inn, 85 i tråkkfrekvens
18:00	Kort pause, målinger; laktat og impedans
19:00	Start drag 4. Munnstykke inn, 85 i tråkkfrekvens
24:00	Kort pause, målinger; laktat og impedans
25:00	Start drag 5. Munnstykke inn, 85 i tråkkfrekvens
30:00	Pause. Målinger; laktat og impedans
31:00	Rolig nedsykling
35:00	Målinger; laktat og impedans
36:00	Rolig nedsykling
40:00	Målinger; laktat og impedans
	Lang pause
	Et avsluttende drag 5 min, med munnstykke inn
	Målinger; laktat og impedans

Tidsforløpet under hele testen er beskrevet i tabell 3.1. Da protokollklokken viste ett minutt startet første drag (intervall). ”Munnstykke inn” betyr at et munnstykke med en slange til ekspirasjonsgassanalysatoren ble puttet inn i munnen. Slik at all luften forsøkspersonen pustet ut, ble ført inn i ekspirasjonsgassanalysatoren. Munnstykket ble tatt ut i hver pause, slik at forsøkspersonen kunne gi tilbakemeldinger på belastning og lignende. Første belastning var samme belastning som på oppvarmingen. Hvert drag à 5 minutter hadde konstant belastning.

En trappetrinnsprotokoll ble fulgt, slik at belastningen økte like mye før hvert drag. Hensikten med trappetrinnsprotokollen var at forsøkspersonen skulle være godt under anaerob terskel på de to første dragene, og godt over den anaerobe terskelen på de to siste dragene. Dessuten skulle de to første dragene starte aktivitetssymptomer som svette, økt blodgjennomstrømning og hormonutskillelse, uten at laktatverdiene skulle endre seg. Antall drag i trappetrinnsprotokollen ble bestemt ut fra laktatverdiene til forsøkspersonen. Forsøkspersonene hadde derfor mellom 4 og 8 drag.

Med trappetrinnsprotokollen ønsket vi også at laktatkonsentrasjonen i muskelvevet skulle være lik laktatkonsentrasjonen i blodet på slutten av hvert drag. På denne måten ville det stille seg inn en likevekt av laktat i blodet på hvert trappetrinn, slik at laktatkonsentrasjonen var tilnærmet lik i låret som i fingeren. Kun med lik laktatkonsentrasjon i blodet som i vevet ville det være meningsfullt å sammenligne blodlaktatkonsentrasjon med impedans, fordi impedansmålingene på låret er en måling av hele lårsegmentet (hud, muskelvev, blod og annet vev).

Første måling ble tatt før oppvarming. Hver måling innebar impedansmålinger og en laktatkonsentrasjonsmåling. Ved hver måling ble ledningene mellom impedansanalysatoren og elektrodene koblet på, slik at forsøkspersonen skulle slippe å ha ledningene festet til låret under syklingen. Etter startmålingen ble rolig oppvarming utført ved at forsøkspersonen syklet på en lav belastning i 10 minutter. Avhengig av forsøkspersonens form var belastningen mellom 75 og 150 watt. Etter oppvarmingen ble en ny måling tatt. Deretter ble pulsklokken startet samtidig som protokollklokken.

Det ble tatt målinger i hver pause mellom dragene. Filnavn på impedansmålingen, belastning, lengde på drag, lengde på pause, laktatverdi, hjerterefrekvens og klokkeid ble notert i protokollskjemaet, se vedlegg 2. Forsøkspersonen ble bedt om å ha låret med elektrodene i hvileposisjon, med pedalen i øverste posisjon. På den måten ble det sikret at volumet av låret var det samme på alle målingene. Eventuell svette på låret ble tørket bort med papir. Kommentarer om bevegelser eller mye svette under målingene ble også notert. Impedansdataene ble sjekket i sanntid mens de ble samlet inn. Dersom det ble observert åpenbare bevegelsesartefakter eller annen støy, ble impedansmålingen tatt på nytt. Ekstramålinger ble navngitt med en B bak filnavnet.

Etter trappetrinnsprotokollen ble forsøkspersonen målt hvert 5. minutt, med sykling på lav belastning som pause. Laktatkonsentrasjonen i blodet synker erfaringsmessig raskere ved bevegelse, enn ved total hvile. Da laktatkonsentrasjonen i blodet var nede på hvilenivåer igjen, ble et siste drag gjennomført. Dette draget var på 5 minutter, og forsøkspersonen kunne selv bestemme om han/hun ville ha høy eller svært høy belastning. Betingelsen var at anaerob terskel skulle passeres. Hensikten med dette var at laktatkonsentrasjonen skulle synke i pausen, mens de andre aktivitetssymptomene skulle fortsette mot utmattelse. Deretter skulle vi måle en siste økning i laktatkonsentrasjonen på den siste målingen. Hypotesen var at laktatverdiene kunne styres i motsatt retning av de andre aktivitetssymptomene, og dermed isolere laktat som en uavhengig variabel.

## Analysemetode

I analysedelen av oppgaven var hensikten å finne sammenhenger mellom de målte impedansdataene og de tilhørende blodlaktatkonsentrasjonene. Flere typer impedansdata ble brukt. I analysen av rådata ble de målte resistansene og reaktansene ved 25 frekvenser brukt sammen med tilhørende laktatverdier. I Cole parameter analysen ble parametrene i Cole ligningen funnet og analysert sammen med tilhørende laktatverdier. Ut fra Cole parametrene ble Grimnes parametrene utledet, og analyse av disse parametrene ble også utført sammen med laktatverdiene. Alle tre analysene ble utført på alle in vivo-dataene. Analysen var en type multivariatanalyse som kalles PLS (Partial Least Square). Hensikten med denne analysen er å lage en modell som kan forutsi variable ut fra andre observerte variable. I dette tilfellet var hensikten at modellen skulle kunne forutsi laktatverdier ut fra målte impedansverdier. Hypotesen var at dersom en god PLS modell kunne lages, så fantes det en korrelasjon mellom laktatkonsentrasjonen i vev, og den målte impedansresponsen. Figur 3.5 viser en oversikt over analysemetoden i studien.

Forsøk	Regresjon	PLS-analyse	Resultater
Impedansverdier	Colemodellen Grimnesmodellen	Rådata Coleparametre Grimnesparametre	Korrelasjonskoeffisienter PLS-modeller
Laktatkonsentrasjoner		Laktatverdier	
Programmer	bioimp Zview Excel	Unscrambler Excel	Excel

Figur 3.5. Oversikt over behandlingen av måledata fra innsamling under forsøkene til presentasjon av resultater.

### Analyse av rådata

Rådataene som ble lagret i z-filer under forsøkene, ble overført til programmet Bioimp. Dette er et program som er laget av Jon Kerr Nilsen på oppdrag fra bioimpedans gruppen i Oslo. Dette programmet plotter opp impedansdataene i det komplekse Wessel diagrammet. Deretter kan man velge punkter som man vil gjøre en sirkelregresjon mellom. Man får da ut rådataene og Coleparametrene til hver impedansmåling. Dessuten følger filnavn og et tall som indikerer hvor god regresjonen er, til hver regresjon. Resultatet er en csv fil som kan importeres i Microsoft Excel. I rådataanalysen ble 25 resistansverdier og 25 reaktansverdier sortert hver for seg etter synkende målefrekvens. Filnavn og laktatverdi ble satt på samme linje som tilhørende impedansdata. Se tabell 3.2 for et eksempel.

Tabell 3.2. De første kolonnene i et datasett med rådata fra målinger på en av forsøkspersonene. Kolonnene fortsetter egentlig videre til R25 for resistansen og videre X1-X25 for reaktansen.

Filnavn	laktat	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
drag1.z	1,57	19,977	19,523	20,023	21,221	23,225	26,108	29,359
drag2.z	1,88	19,526	19,147	19,709	20,944	22,956	25,671	28,875
drag3.z	2,99	19,595	19,222	19,769	20,994	23,029	25,9	29,14
drag4.z	5,1	18,673	18,558	19,084	20,284	22,294	25,498	28,675
hvile1.z	3,5	19,26	19,028	19,494	20,732	22,698	25,412	28,321
hvile2.z	1,37	19,732	19,411	19,925	21,139	23,184	26,228	29,464
oppvarming.z	2,06	20,077	19,81	20,336	21,562	23,595	26,536	29,874
siste.z	6,55	19,256	19	19,534	20,817	22,879	25,846	29,371
start.z	1,18	21,076	20,751	21,342	22,56	24,595	27,535	31,012

Disse dataene ble så overført til multivariatanalyseprogrammet The Unscrambler fra Camo Software. I dette programmet ble resistans og reaktans sortert som X-variable, og laktat som Y-variable (se avsnittet om multivariatanalyse i kapittel 2). Filnavnene ble til samples og R1-X25 ble X-variabler. Videre ble X-variablene normalisert ved at hver verdi ble delt på sitt standardavvik. Så ble en PLS-regresjon utført med kryss validering, som gir et mer moderat estimat, enn alternativet som er leverage correction. Dette for å unngå overestimering av korrelasjonen mellom laktat og impedans. På en del av rådatakurvene i Wesselplanet ble det observert støy og usammenhengende kurver ved noen frekvensområder. Da disse frekvensområdene ble fjernet ble modellen ofte forbedret. Andre kurver ble observert som uteliggere på grunn av store avvik fra normalen, også i Bodeplottene. Det var blitt notert under forsøkene at noen av forsøkspersonene satt urolig under målingen. Ved mistanke om bevegelsesartefakter ble målingen forsøkt fjernet fra måleserien. Dersom modellen ble bedre, ble disse målingene holdt utenfor i videre analyse. Svette og dårlig elektrodekontakt kunne også være årsaker til uteliggere som ble holdt utenfor analysen. Resultatet av regresjonen var korrelasjonskoeffisienten  $R^2$ . Korrelasjonskoeffisienten for kalibrering og validering av modellen ble notert i et Excel dokument. I dette Excel dokumentet ble det også notert hvilke målinger og frekvenser som ble ekskludert fra modellen, og begrunnelsen for dette. Rådataene ble også lagret i Unscrambler format, slik at regresjonen enkelt kunne utføres på nytt. Etter analysen av alle forsøkspersonene hver for seg, ble analysen utført med alle målingene i samme modell.

### Analyse av Coleparametere

Coleparametrene fra  $\beta$ -dispersjonen ble funnet for alle impedansmålingene ved hjelp av Bioimp programmet beskrevet i forrige avsnitt. Sirkelregresjonen ble utført på data for hver forsøksperson, og dataene ble holdt separert for hver forsøksperson. Csv filene fra Bioimp, ble som for rådataene, importert i Excel, hvor laktatverdier ble satt sammen med Coleparametrene. Deretter ble dataene overført til Unscrambler. Coleparametrene ble satt som X-variable, og normalisert ved divisjon på standardavviket. Laktat ble Y-variabel, men her ble det ikke foretatt normalisering, fordi det bare var en variabel som er sammenlignbar mellom forsøkspersonene. PLS regresjon med kryss validering ble utført, på samme måte som i rådataanalysen. Men siden Coleparametrene ikke gjenspeiler hele impedansspekteret til målingen, var de lavfrekvente delene av målingen som inneholdt støy, allerede fjernet under sirkelregresjonen. Stygge kurver som tydelig var uteliggere fordi det ikke var mulig å utføre sirkelregresjon, ble utelatt i PLS-analysen. Dette var de samme målingene som ble utelatt under rådataanalysen. Korrelasjonskoeffisienten  $R^2$  ble notert i samme Excel dokument som rådataanalysen, slik at resultatene kunne sammenlignes.

## Analyse av Grimnesparametere

PLS-analysen ble så utført på Grimnesparametrene for å undersøke om Grimnesmodellen kunne beskrive dispersjonenes korrelasjon med laktatkonsentrasjon på en bedre måte enn Colemodellen. Grimnesparametrene ble beregnet fra Coleparametrene i Excel, der  $\tau_Z$  ble valgt til 0,001 sekunder. Dataene ble stilt opp som for de andre analysene, med alt som tilhørte en måling på samme linje, og måleserier fra samme person på eget regneark. Tabell 3.3 viser et eksempel på hvordan Grimnesparametrene kunne se ut i Excel for en forsøksperson.

Tabell 3.3. Hver linje svarer til en måling som ble kalt sample i multivariatanalyseprogrammet. Hvert sample har et filnavn, Y-verdi (laktat) og fem X-verdier (grimnesparametre).

Filnavn	laktat	Gvar	R-uendelig	alfa	tau	G1
drag1.z	1,57	0,0578	19,3281	0,8362	4,1564E-06	1,2691E-04
drag2.z	1,88	0,0587	18,9470	0,8360	4,1226E-06	1,2822E-04
drag3.z	2,99	0,0587	19,1263	0,8398	4,0800E-06	1,2357E-04
drag4.z	5,10	0,0594	18,4017	0,8371	3,4615E-06	1,1106E-04
hvile1.z	3,50	0,0669	18,8723	0,8464	3,2928E-06	1,1184E-04
hvile2.z	1,37	0,0585	19,2177	0,8355	3,5687E-06	1,1366E-04
oppvarming.z	2,06	0,0556	19,5169	0,8303	4,1951E-06	1,2834E-04
siste.z	6,55	0,0522	18,3880	0,8104	4,2001E-06	1,3971E-04
start.z	1,18	0,0547	20,7079	0,8393	4,3261E-06	1,2133E-04

Datsettene ble så overført til Unscrambler hvor Y-variable ble laktat, og X-variable ble Grimnesparametrene. Kryssvalideringsmetoden ble brukt, og de dårlige målingene som ble utelatt i Coleparameter analysen ble holdt utenfor også i denne analysen. Da alle dataene for forsøkspersonene var blitt analysert hver for seg, ble alle dataene satt sammen til en stor PLS-analyse, slik som det ble gjort med rådataene og Coleparametrene.

## Analysemetode av in vitro-data

Analysen av målingene fra in vitro-forsøket på celleduspensjonen ble utført på samme måte som for in vivo-målingene. Men rådata, Coleparametre og Grimnesparametre ble funnet ved hjelp av Z-view i stedet for Bioimp. Dette fordi Bioimp ikke ville lese filene som kom fra Solartron 1260 + 1294 som ble brukt på fysisk institutt. Grunnen antas å være at disse filene ble laget med en nyere versjon av Z-plot. Det ble utført sirkelregresjon i Z-view på en del in vivo-data for å sammenligne resultatene. Det ble konkludert med at forskjellene mellom Coleparametrene funnet i de to programmene var mindre enn 1% for  $R_0$  og  $R_\infty$ , mindre enn 2% for  $\alpha$  og mindre enn 7% for  $\tau$ . PLS regresjon med kryssvalidering og noramlisering av X-variable ble utført på samme måte. Også i disse målesettene måtte noen målinger utelates på grunn av støy. Hvilke målinger som ble utelatt ble notert sammen med korrelasjonskoeffisienten  $R^2$  i Excel. Det ble også utført PLS-regresjon med justerte laktatverdier. Det gikk ut på at laktatverdiene som ble verifisert med 15 mmol/L referanseløsning, ble justert med det avviket laktatanalysatoren hadde i forhold til referanseløsningen. Resultatene fra denne analysen ble også notert i Excel dokumentet. For å sikre at in vitro-målingene ikke bare var en konduktansmåling, ble konduktansparametrene i Cole- og Grimnes-ligningene holdt utenfor i en PLS-analyse. Det betyr at  $R_0$  og  $R_\infty$  ble holdt utenfor, mens  $\alpha$  og  $\tau$  ble sammenlignet med laktat i Colemodellen. Resultatet ble det samme for Grimnesparametrene, fordi kun  $\alpha$  og  $\tau$  var uavhengige av konduktansen, og de er like som  $\alpha$  og  $\tau$  i Colemodellen.

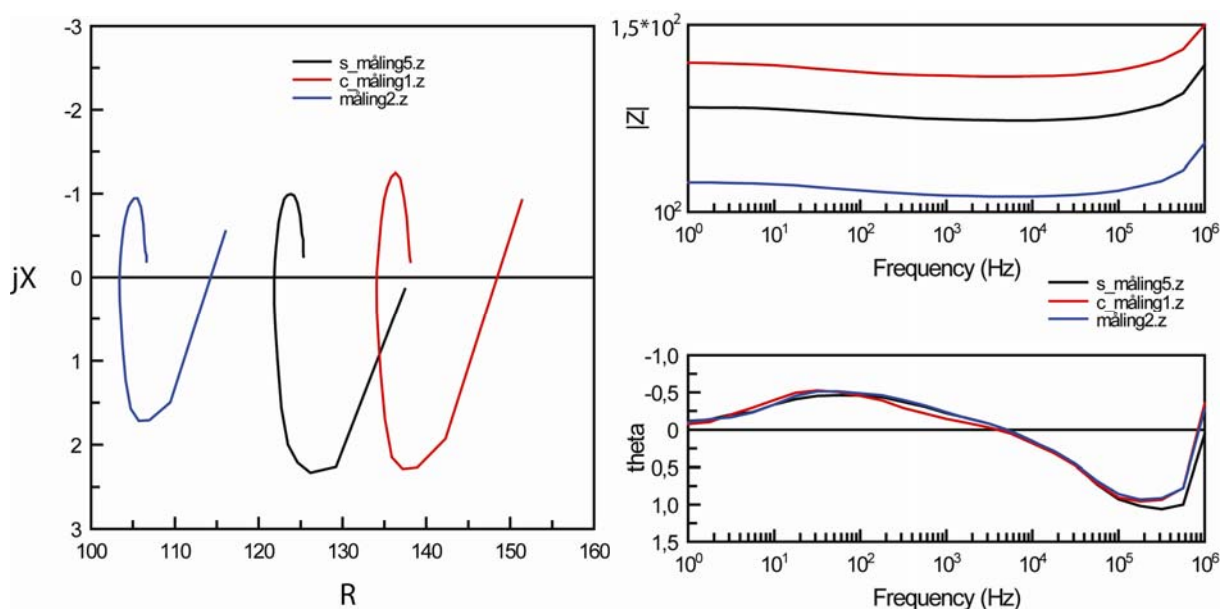
## 4 Resultater

Resultatene er delt inn i in vitro- og in vivo-forsøk. Multivariat analysen på in vitro- og in vivo-forsøkene ble utført hver for seg, og sammenligningen av resultatene blir ikke gjort før i diskusjon og konklusjonskapitlene.

### In vitro-resultater

#### Serumet

Serumet som cellene var i ble analysert slik at man kunne bestemme hvilke observasjoner som skyldtes serum, og hvilke som skyldtes cellene i serumet. Laktatkonsentrasjonen på serumet ble målt til 2,03 mmol/L, og impedansen ble målt til 118  $\Omega$  ved 1 Hz. Ved å ta ut 1 ml serum, og så tilsette 1 ml 15 mmol/L laktatløsning, økte impedansen med ca 25  $\Omega$ , samtidig som laktatkonsentrasjonen økte med ca 2 mmol/L. Da det ble tilsatt 1 ml 15 mmol/L laktat uten å ta ut 1 ml fra serumet først, minket impedansen. Det ble observert at 15 mmol/L laktat øker impedansen, sammenlignet med det lav-ohmige serumet. Serummålingene var lineære ved resiprositetsteoremet. Kurvene var like selv om CC og PU elektrodene ble byttet.



Figur 4.1. WesselploTT av en saltløsningsmåling (blå), serummåling (svart) og en cellesuspensjonsmåling (rød) til venstre. BodeploTT av de samme dataene til høyre. WesselploTTet har ulik skala på aksene, noe som fører til at sirkelsegmentet ser ovalt ut. Kurver laget i ZView.

Målingene på serumet og cellesuspensjonen gav relativt like kurver i Wessel planet. Se figur 4.1. Den tydeligste forskjellen var ulikheten i resistans, som flyttet kurvene langs X-aksen. Forskjellen i resistans gav også utslag på modulen til impedansen  $|Z|$  i BodeploTTet.

Figur 4.1 viser at reaktansen utgjør ca 2  $\Omega$ , samtidig som resistansen er ca 135  $\Omega$ . Det betyr at kun 1,5% av målingen skyldes reaktans. Dette vises også ved at fasevinkelen  $\theta$  er mellom 0 og  $-0,5^\circ$  ved de lavere frekvensene.

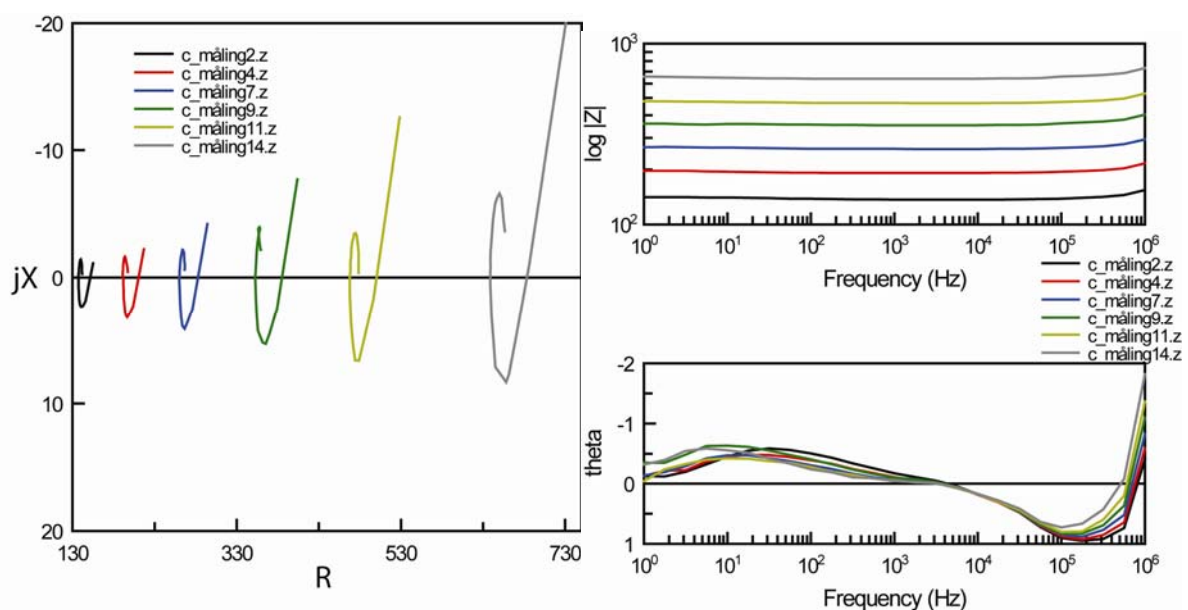
Likhetene i kurveformene kunne også skyldes geometrien til målecellen. Figur 3.1 viser en skisse av målecellen. Impedansmålinger på fysiologisk saltvann ble derfor utført.

Konklusjonen av dette forsøket var at formen på alle kurvene i Wesselplanet ble like, uansett om impedansdataene kom fra cellesuspensjon, serum eller 0,9% saltløsning. Se figur 4.1

### Cellesuspensjonsmålinger

Likheten i kurveformene mellom serummålingene og cellesuspensjonsmålingene kan skyldes at løsningene inneholdt mange av de samme stoffene. Den eneste forskjellen var at celler var tilsatt, og at disse hadde produsert laktat i noen dager. K562 cellene har vanligvis en diameter på 10  $\mu\text{m}$  (Ferret med flere 2000). Volumet av celler ble beregnet til å være 6 % av det totale volumet, ved 1,2 millioner celler/ml.

Den målte laktatkonsentrasjonen var 19,36 mmol/L i cellesuspensjonen med 1,0 millioner celler/ml. Ved 1,2 millioner celler/ml ble laktatkonsentrasjonen målt til 19,95 mmol/L. I fysiologisk sammenheng er dette svært høye laktatverdier.



Figur 4.2. Seks impedansmåleserier med ulik utvanningsgrad av cellesuspensjonen. Lavere konsentrasjon av laktat og celler ved høyere målingsnummer. Wesselplott til venstre og Bodeplott til høyre. Wesselplottet har ulik skala på aksene, noe som fører til at sirkelsegmentet ser ovalt ut. Grafer laget i ZView.

Figur 4.2 viser at den reelle resistansen økte markert da suspensjonen ble vannet ut. Økningen i resistans førte til at sirkelsegmentene flyttet seg langs den reelle X-aksen i Wesselplanet. Resistansøkningen viste seg også i Bodeplottet.

Måling 9 i figur 4.2 er et eksempel på en måleserie som ikke kunne brukes til sirkelregresjon. Da slike kurver ble observert ble det tatt en måling til ved samme utvanningsgrad, men ved en annen amplitude på spennings-signalet. Amplituden ble endret av to grunner. Både for å se om kurvene ble renere (mindre støy), og for å se at kurvene ikke endret seg som funksjon spennings amplitude. Det ble konkludert med at målingene hele tiden var innenfor lineært området. Lavere spenning førte til lavere strøm mellom CC-elektrodene og tilsvarende lavere potensial mellom PU-elektrodene. Impedansen var dermed den samme, jamfør ligning 2.1.

I figur 4.2 ser man at reaktansen øker proporsjonalt med resistansen. Målingene har et jevnt reaktans-/resistansforhold på 1-1,5% ved lave frekvenser.

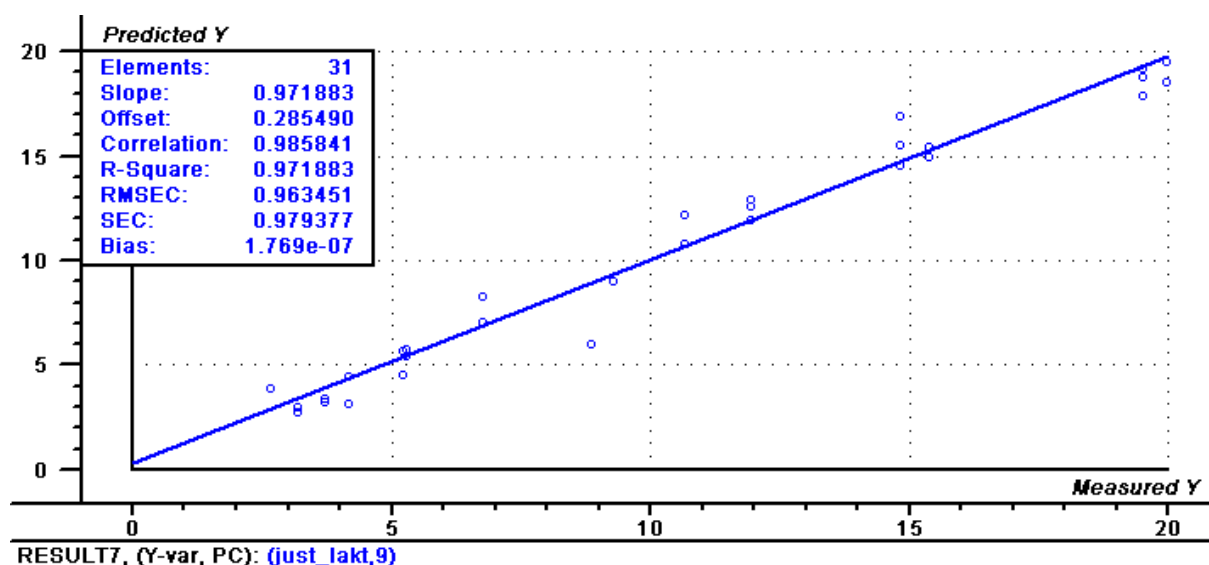
På alle impedansmålingene gjort i målecellen ble fasevinkelen theta positiv på frekvenser over 5kHz. Positiv fasevinkel betyr at man har målt noe induktivt.

Resultatene av multivariatanalysen som ble utført på rådata, Cole-parametre, Grimnes-parametre og parametre fra ZView, vises i tabell 4.1. Tallene i tabellen viser korrelasjonskoeffisienten  $R^2$  til modellen. Dersom  $R^2$  er 1,00, beskriver modellen variansen i laktatkonsentrasjon perfekt. Ved  $R^2$  over 0,6 ansees modellen som en grei, ved  $R^2$  over 0,8 er modellen god. Kalibrerings  $R^2$  sier hvor god modellen passer til de målte dataene. Validerings  $R^2$  sier hvor godt modellen klarer å forutsi laktatkonsentrasjonen ved andre impedansdata.

Tabell 4.1. Resultater fra multivariatanalysen av impedansdataene på cellesuspensjonen. Øverste linje forklarer hva slags impedans regresjon som er brukt. Neste linje forteller om korrelasjonskoeffisienten er fra kalibrering av modellen, eller kryssvalidering av modellen. Første kolonne forteller hvilken forbedring som er gjort på modellen. Forbedringen er beholdt i modellen på neste linje.

Endringer tilført modellen	Rådata		Coleparametre		Grimnesparametre		Parametre i z-view	
	Cal	Val	Cal	Val	Cal	Val	Cal	Val
Alle suspensjonsmålinger	0,96	0,84	0,82	0,77	0,88	0,86	0,89	0,85
Uten målinger med støy	0,96	0,92	0,84	0,82	0,88	0,86	0,89	0,87
Justerte laktatverdier	0,96	0,93	0,84	0,83	0,91	0,87	0,89	0,87
Uten resistansparametre	0,97	0,87	0,66	0,61	0,66	0,63	0,84	0,80

I tabell 4.1 ser vi at regresjonsmodellen bygget på Grimnesparametrene er litt bedre enn modellen bygget på Coleparametrene. Modellen bygget på parametrene hentet fra Z-view er bedre enn Grimnesparametrene. Best korrelasjon er det mellom laktat og rådataene. Dette kan skyldes at noen av modellene er bedre enn andre, eller at det er 50 X-variable i rådatamodellen, 7 parametre fra Z-view, 5 fra Grimnesmodellen og 4 fra Cole-regresjonen. PLS-modellen får dermed flere X-variable som kan forklare variansen i laktatkonsentrasjon. Flere X-variable i forhold til antall samples gjør at PLS-regresjonen virker ekstra godt.

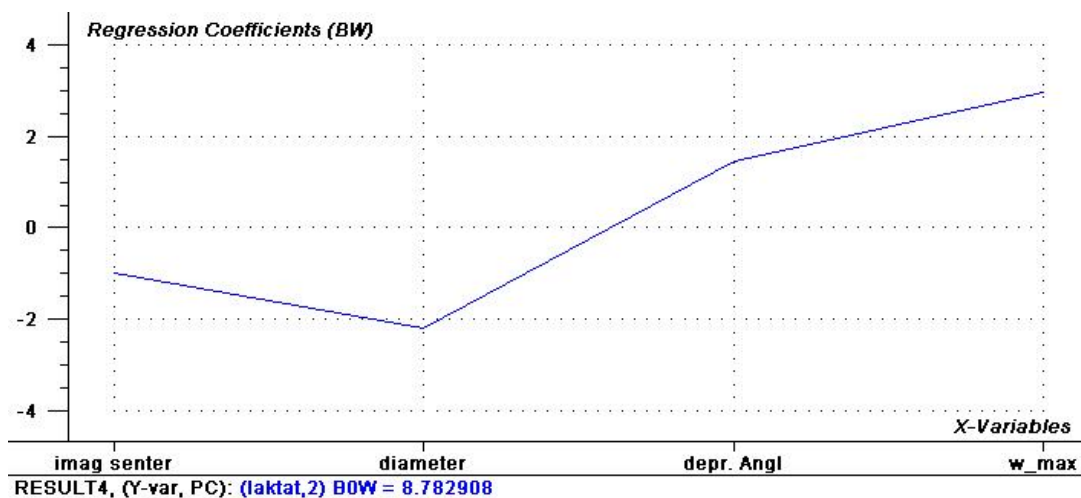


Figur 4.3. Laktatverdier beregnet ut fra PLS-modellen plottet mot målte laktatverdier fra in vitroforsøket. PLS-modellen er basert på reaktansrådataene, fordi de gav best korrelasjon uten resistansvariable. Figuren er fra kalibreringen av modellen. Figur laget i Unscrambler.



Figur 4.3 viser hvor god sammenheng det er mellom de målte og de beregnede laktatverdiene i en av PLS-modellene. Linjen som er trukket er den beste tilpassede linjen til punktene i plottet. Korrelasjonskoeffisienten  $R^2$  kommer fra hvor godt denne linjen passer til punktene.

Tabell 4.1 viser at det er god korrelasjonen mellom impedansmodellen og laktatkonsentrasjonen. Når resistansparametrene som endres på grunn av utvanningen fjernes, blir korrelasjonen dårligere. For Cole- og Grimnes-regresjonsmodellene er det bare alfa og tau som er uavhengige av resistansen, noe som betyr at det bare er 2 parametre igjen å bygge modellen på. Sirkelsegmentparametrene fra Z-view inneholder 2 parametre i tillegg til alfa og tau, som er uavhengige av resistansen. Dette er diameteren på sirkelsegmentet og reaktansverdien til sentrum av sirkelregresjonen. Med disse to blir modellens korrelasjonskoeffisient over 0,8 igjen.



Figur 4.4. Regresjonskoeffisienter til PLS modellen bygget på sirkelsegmentparametrene hentet fra Z-view. Modellen er fra in vitroforsøket, har justerte laktatverdier og er uten resistansparametrene. Regresjonskoeffisientene forteller hvor mye hver X-variabel vektlegges i modellen. Regresjonskoeffisientene er normalisert slik at regresjonskoeffisientene fra alle prinsipalkomponentene er tatt hensyn til. Figur laget i Unscrambler.

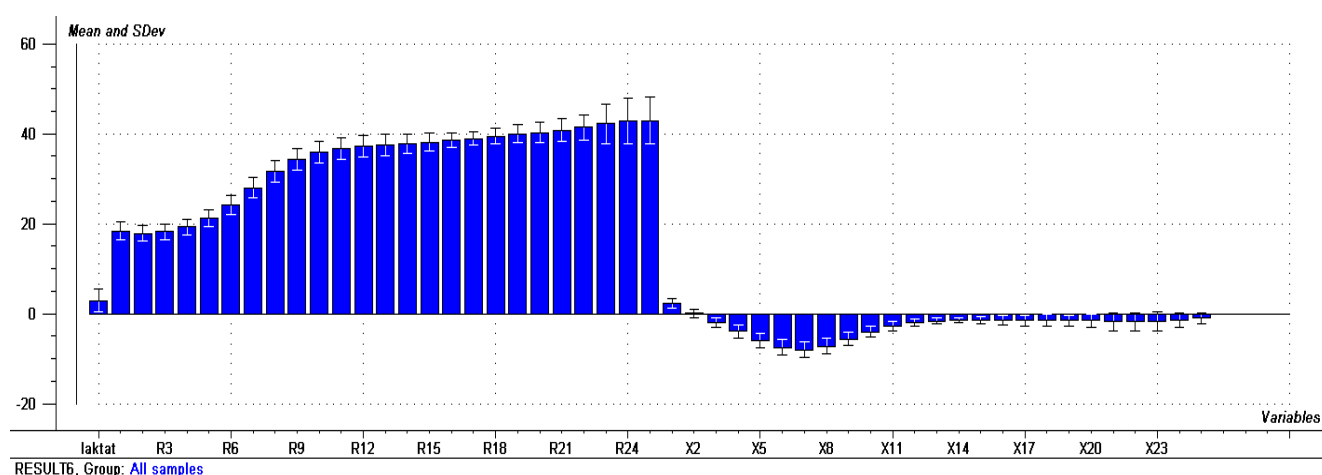
En interessant regresjon er den som gav best korrelasjon med laktat, uten at resistansparametrene var med. Da regner vi ikke med rådataene siden disse har så mange X-variabler. Dette var PLS-modellen som ble bygget på sirkelsegmentparametrene hentet fra ZView. Den hadde henholdsvis 0,84 og 0,80 i kalibrerings og validerings korrelasjonskoeffisient. I figur 4.4 ser man hvilke av impedansparametrene (X-variablene) som korrelerer best med laktatkonsentrasjonen. I figuren ser man at  $\omega$ -max er mest vektlagt. Denne er omvendt proporsjonal med tidskonstanten  $\tau$  som er bedre kjent i impedansregresjon. Etter  $\omega$ -max har diameteren til sirkelregresjonen mest å si for modellen. Diameter koeffisienten har et negativt fortegn, det betyr at diameteren varierer omvendt proporsjonalt med laktatkonsentrasjonen.

## In vivo-resultater

Følgende resultater fra fysiologimålingene finnes i vedlegg 1- forsøkspersondata; BMI, anaerob terskel (laktat, HF, VO<sub>2</sub>), maks hjertefrekvens (i forsøket), maks VO<sub>2</sub>, maks laktat og arbeidsbelastning (start, terskel og maksimal). Blodlaktatkonsentrasjoner mellom 0,50 og 11,03 mmol/L ble målt på forsøkspersonene.

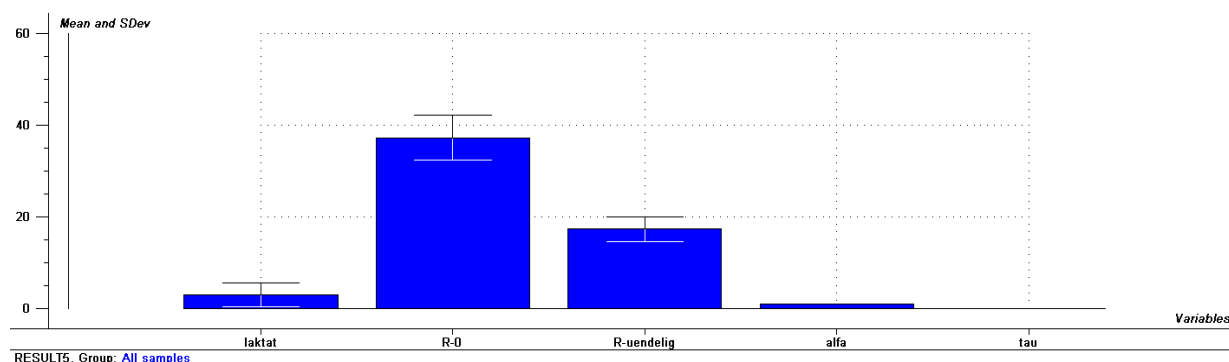
## Rådata

Gjennomsnittet av alle impedansmålingene vises i figur 4.5. Resistansen er liten ved høye frekvenser, og blir større ved lavere frekvenser. Fra resistanssøylene ser man en dispersjon med karakteristisk frekvens rundt R7 (ca 32 kHz). Dispersjonen vises også ved at reaktanssøylene får en bunn rundt R7. Det er verdt å merke seg at standardavviket på resistansen ved de laveste frekvensene er klart større enn de andre standardavvikene. Det store standardavviket viser at det er stor variasjon i måleverdiene.

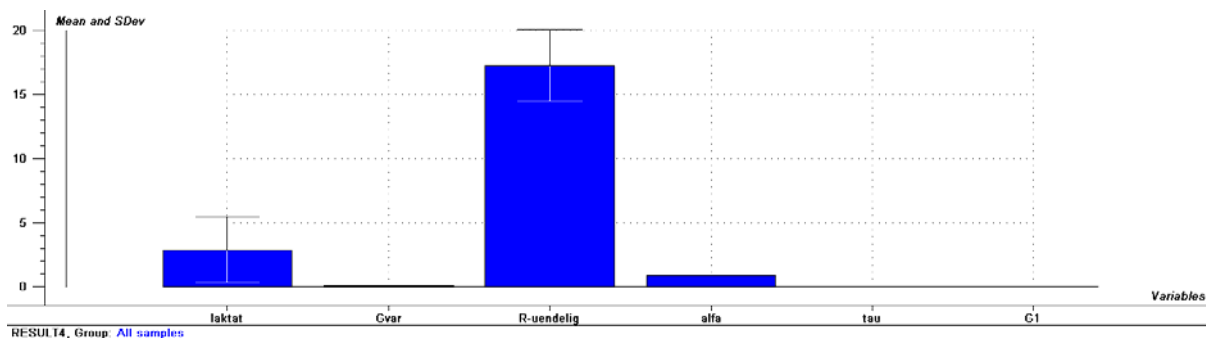


Figur 4.5. Gjennomsnitt og standardavvik av alle støyfrie impedansdata og målte laktatverdier fra in vivo-forsøkene. R1 og X1 er henholdsvis resistans og reaktans målt ved den høyeste frekvensen (1 MHz). R25 og X25 er resistans og reaktans målt ved den laveste frekvensen (1 Hz). Figur laget i Unscrambler.

Figur 4.5 viser viktigheten av å normalisere resistans og reaktans ved å dividere på verdiens standardavvik. Dersom normaliseringen hadde blitt utelatt ville resistansverdiene hatt 5-10 ganger så stor innflytelse i PLS-regresjonen, fordi resistansverdiene er 5-10 ganger så store i absoluttverdi. Laktat er den eneste Y-variabelen, og normalisering trengs ikke siden variabelen er lineær.

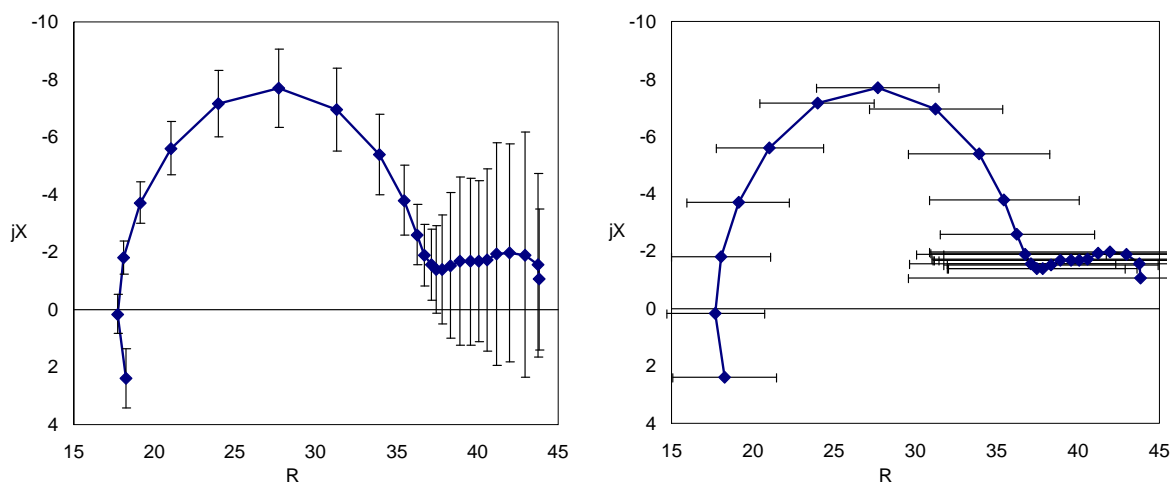


Figur 4.6. Gjennomsnitt og standardavvik av alle støyfrie Coleparametregresjoner, og målte laktatverdier fra in vivo-forsøkene. Figur laget i Unscrambler.



Figur 4.7. Gjennomsnitt og standardavvik av alle støyfrie Grimnesparametregresjoner, og målte laktatverdier fra in vivo-forsøkene. Figur laget i Unscrambler.

Figur 4.6 og 4.7 viser viktigheten av å normalisere Cole- og Grimnesparametrene.  $G_{var}$ ,  $\alpha$ ,  $\tau$  og  $G_1$  er svært små tall i forhold til  $R_\infty$  og  $R_0$ , men variasjonen i disse parametrene er like viktige for at PLS-modellen skal bli god.

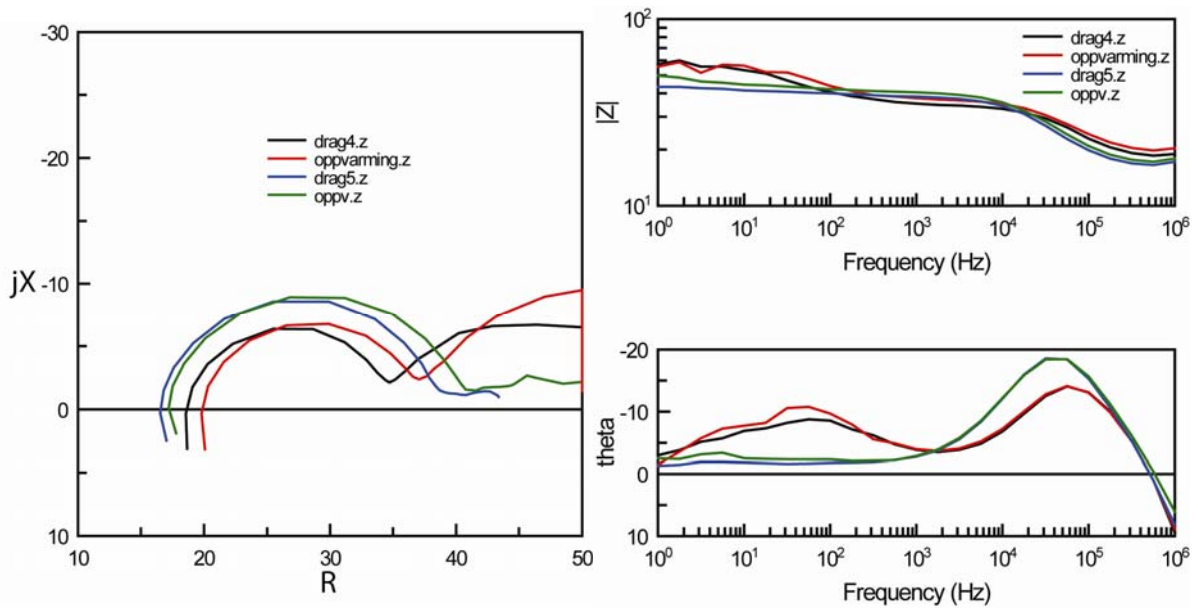


Figur 4.8. Gjennomsnitt av alle støyfrie in vivo-impedansmålinger plottet i Wesselplanet. Standardavvik i reaktans til venstre, standardavvik i resistans til høyre. Frekvensen øker når man følger kurven mot venstre. Grafer laget i Microsoft Excel.

Figur 4.8 viser at gjennomsnittet av impedansdataene gir en tydelig  $\beta$ -dispersjon.  $\beta$ -dispersjonen ble observert på alle støyfrie impedansdataene. Standardavviket på impedansverdiene på  $\beta$ -dispersjonen forteller at det er større variasjon langs resistansaksen, enn langs reaktansaksen. Dette ble også observert i Wesselplott av enkeltmålinger fra ulike forsøkspersoner. Standardavviket er generelt mindre ved høye frekvenser, enn ved lave.

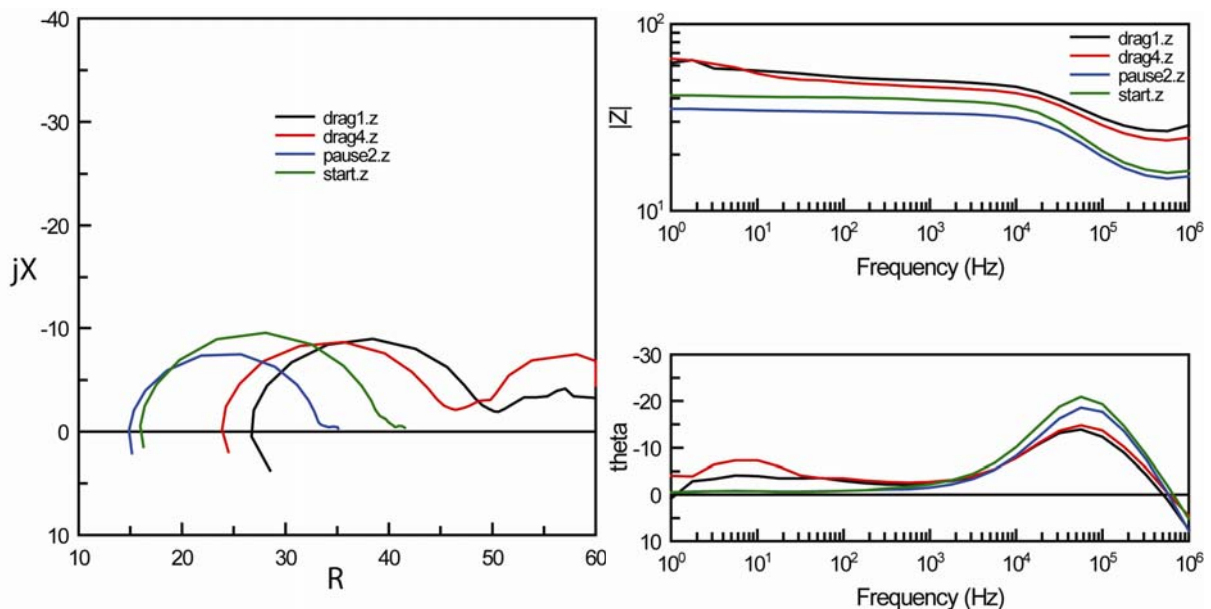
Til høyre i Wesseldiagrammene i figur 4.8 kan man ane en utydelig  $\alpha$ -dispersjon.  $\alpha$ -dispersjonen ble kun observert på et fåtall av de støyfrie impedansdataene. Standardavviket er høyt på  $\alpha$ -dispersjonen både på resistans og reaktans. Dette tyder på at de lavfrekvente målingene varierer fra måling til måling. Denne variasjonen ble som oftest sett på som støy under analysen av enkeltmålinger.

$\alpha$ -dispersjonen ble observert på 9 av 140 målinger, på 3 av 11 forsøkspersoner. Sirkelregresjon ble utført på disse kurvene, og Cole- og Grimnesparametrene ble funnet. PLS-analyse ble utført. Korrelasjonskoeffisienten  $R^2$  for kalibrering av modellen ble 0,57 og 0,50 for henholdsvis Cole- og Grimnesparametrene.



Figur 4.9. Sammenligning av impedansdata fra en stor og en liten forsøksperson. Svart og rød kurve er fra en liten og tynn forsøksperson (FP1), grønn og blå kurve er fra en høy og kraftig forsøksperson (FP5). Fra hver forsøksperson ble de to kurvene med størst ulikhet valgt for å gi inntrykk av variasjonen. Wesseldiagram til venstre, Bodeplott til høyre. Grafer laget i ZView.

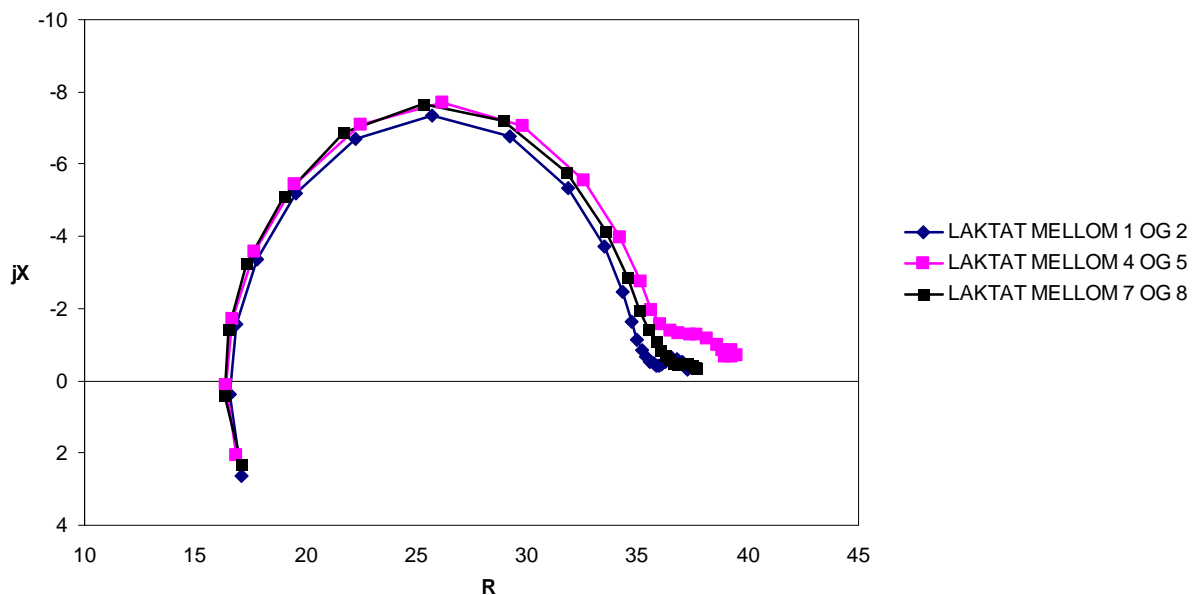
Figur 4.9 viser hvordan forskjellen i størrelse på forsøksperson gir utslag på impedanskurvene. Den største forskjellen mellom forsøkspersonene er volumet av låret. Siden avstanden mellom elektrodene ble holdt konstant, er det tverrsnittet av låret som øker. Radiusen på  $\beta$ -dispersjonen i Wesseldiagrammet økte da diameteren på låret økte.



Figur 4.10. Sammenligning av impedansdata fra forsøkspersoner med høy og lav fettprosent. Svart og rød kurve er fra FP6 med høyere fettprosent enn FP7 som har grønn og blå kurve. Fra hver forsøksperson ble de to kurvene med størst ulikhet valgt for å gi inntrykk av variasjonen. Wesseldiagram til venstre, Bodeplott til høyre. Grafer laget i ZView.

Figur 4.10 viser at det er forskjeller mellom impedansdata på vev med ulik fettprosent. Forskjellen i fettprosent ble antatt ut fra lårmuskelen tydelighet på forsøkspersonene. (Ved mye underhudsfett synes ikke konturene i lårmuskelen). Volumet av låret til de utvalgte forsøkspersonene var relativt likt, uten at dette ble målt. Forskjellen i fettprosent viser seg som forskyvning av dispersjonen langs den reelle resistansaksen. Personen med lavest fettprosent har impedanskurver lengst mot venstre. Det betyr at lite fett og mest muskelvev gir lavest resistans. Det stemmer overens med at fettvev generelt har høyere resistans enn muskelvev longitudinelt. Forskyvningen langs resistansaksen som funksjon av fettprosent viste seg også mellom andre forsøkspersoner.

På dataene fra forsøkspersonene i figur 4.9 var det mer variasjon i impedanskurvene enn i figur 4.8. For å finne ut om det var mulig å observere ulikheter i Wesselplot av impedansdata med ulik laktatkonsentrasjon, ble impedansdata med laktatverdier mellom 1 og 2 mmol/L sammenlignet med impedansdata med laktatverdier mellom 4 og 5 mmol/L, og mellom 7 og 8 mmol/L. Resultatet er presentert i figur 4.11.



Figur 4.11. Wesselplott av gjennomsnitt av impedansdata fra målinger der laktatkonsentrasjonen i blodet var innenfor bestemte områder. Blå graf viser gjennomsnittet av 16 målinger med laktatkonsentrasjon mellom 1 og 2 mmol/L. Rosa graf viser gjennomsnittet av 7 målinger med laktatkonsentrasjon mellom 4 og 5 mmol/L. Svart graf viser gjennomsnittet av 4 målinger med laktatkonsentrasjon mellom 7 og 8 mmol/L. Tre forsøkspersoner er utelatt fra dette snittet på grunn av stor ulikhet fra resten av forsøkspersonene. Grafen laget i Microsoft Excel.

Figur 4.11 viser at det er liten variasjon i Wesselplottet som varierer i takt med laktatverdiene. Blant annet gir en høy laktatkonsentrasjonen en impedansgraf som ligger mellom de to lavere laktatkonsentrasjonsintervallene. Standardavviket til gjennomsnittet av målingene er relativt likt som i figur 4.8. Det betyr at standardavviket er lavt ved de høyeste frekvensene, der kurvene ligger tett. Standardavviket blir større med lavere frekvens, der gjennomsnittskurvene viser større variasjon.

## PLS-analyse

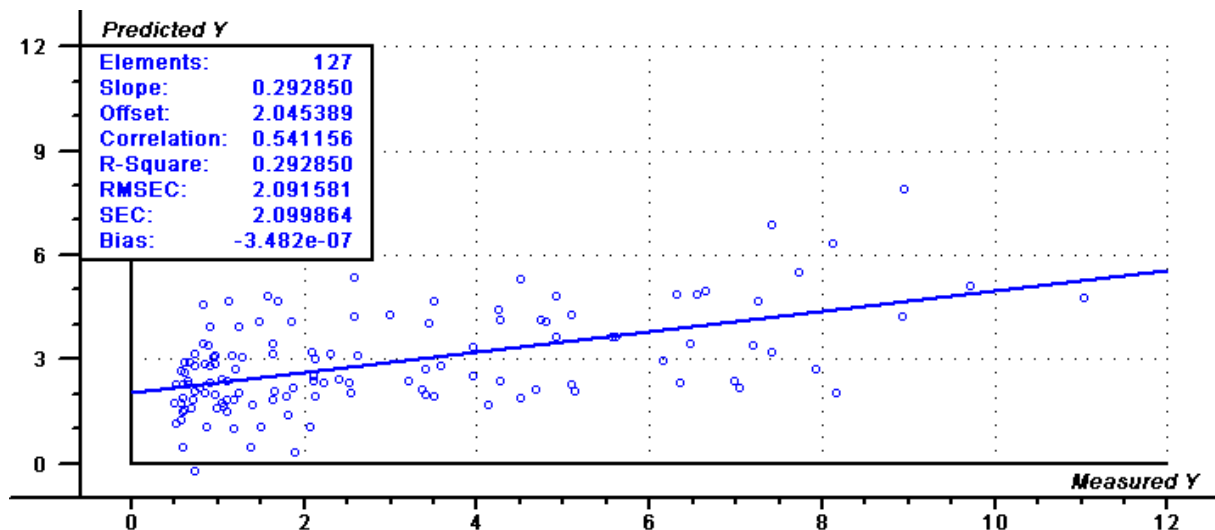
Det var ikke mulig å finne variasjoner i impedansdataene i Wesseldiagram eller Bodeplott, som varierte i takt med laktatkonsentrasjonen. Impedansdata ble derfor analysert sammen med laktatkonsentrasjonsverdiene i multivariatanalyseprogrammet Unscrambler. Resultater fra PLS analysen vises i tabell 4.2.

*Tabell 4.2. Resultater fra PLS regresjonsanalysen av korrelasjonen mellom impedansdata og laktatverdier. Korrelasjonskoeffisienter for kalibrering og validering av PLS-modeller bygget på rådata, Coleparametre og Grimnesparametre. Analysen er utført for hver forsøksperson alene (FP1 til FP11), og alle forsøkspersoner i samme modell (alle1 og alle2). Alle1 inneholder alle måleseriene, mens en del måleserier med støy er fjernet i analysen av alle2.*

Forsøksperson	Rådata		Cole parametre		Grimnes parametre	
	Calibration R <sup>2</sup>	Validation R <sup>2</sup>	Calibration R <sup>2</sup>	Validation R <sup>2</sup>	Calibration R <sup>2</sup>	Validation R <sup>2</sup>
FP 1	0,90	0,21	0,85	0,66	0,85	0,57
FP 2	0,38	0,25	0,60	0,51	0,60	0,47
FP 2	0,47	0,28	0,69	0,51	0,63	0,41
FP 3	0,97	0,42	0,80	0,37	0,84	0,69
FP 4	0,55	0,49	0,60	0,55	0,61	0,55
FP 5	0,99	0,28	0,97	0,91	0,97	0,91
FP 6	0,55	0,39	0,61	0,45	0,58	0,43
FP 7	0,84	0,60	0,62	0,56	0,61	0,55
FP 8	0,94	0,89	0,93	0,88	0,93	0,88
FP 9	0,83	0,51	0,62	0,42	0,69	0,54
FP 10	0,99	0,84	0,94	0,82	0,95	0,83
FP 11	0,91	0,79	0,66	0,47	0,64	0,44
Alle1	0,13	0,04	0,07	0,04	0,09	0,06
Alle2	0,29	0,09	0,06	0,03	0,07	0,04

I tabell 4.2 ser man tydelig at kvaliteten på regresjonsmodellene varierer fra forsøksperson til forsøksperson. Trenden er at Coleparametrene korrelerer bedre enn rådataene, og at Grimnesparametrene korrelerer bedre enn Coleparametrene. En del rådatamodeller korrelerer mye bedre på kalibrering enn validering av modellen. Generelt er korrelasjonskoeffisientene bedre på kalibrering enn validering. Når alle måleserier fra alle forsøkspersoner settes sammen i én modell, blir korrelasjonen med laktatkonsentrasjonen svært dårlig, se figur 4.12.

Det var til sammen 26 av 153 målinger med store avvik som ble fjernet i enkeltpersonanalysen. Det betyr at PLS-modellen "alle2" er beregnet fra 127 målesett med laktat og impedansdata.

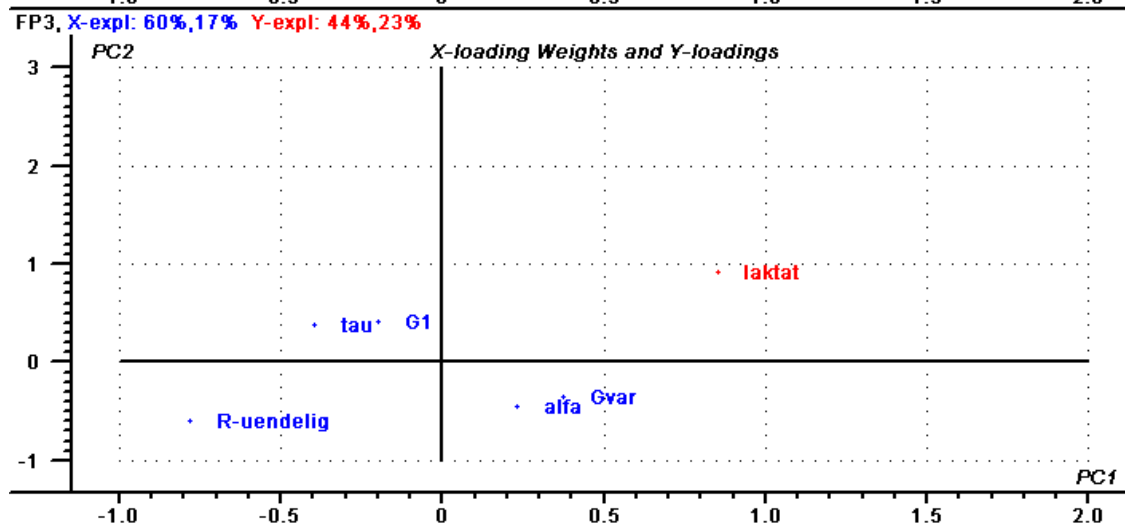
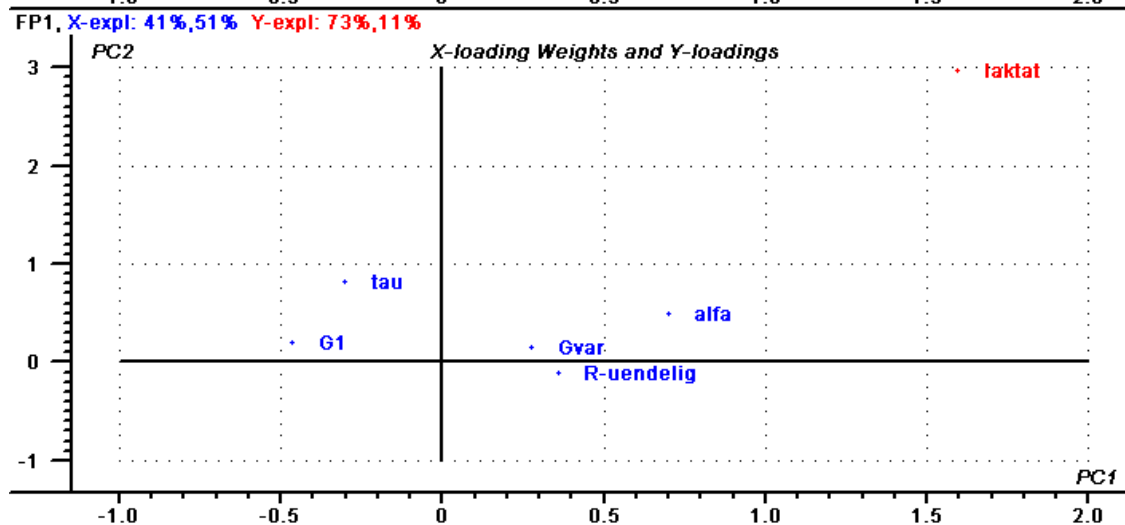
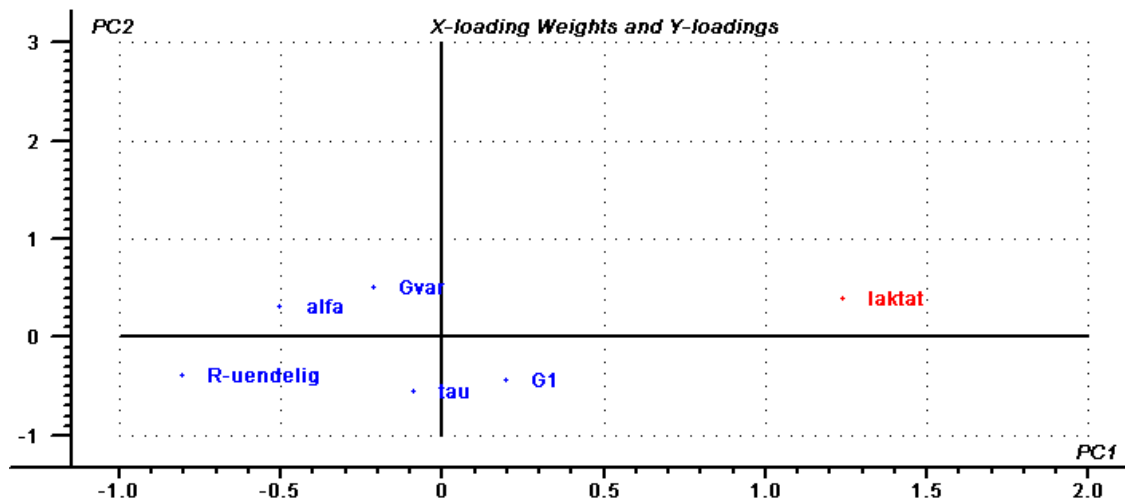


RESULT20, (Y-var, PC): (laktat,7)

Figur 4.12. Resultat av PLS-analyse av alle rådata uten støy. Beregnet laktatverdi fra PLS-modellen er plottet som funksjon av målt laktatverdi. Punktene er fra kalibrering av modellen. Den rette linjen er den best tilpassede linjen til målepunktene. Figur laget i Unscrambler.

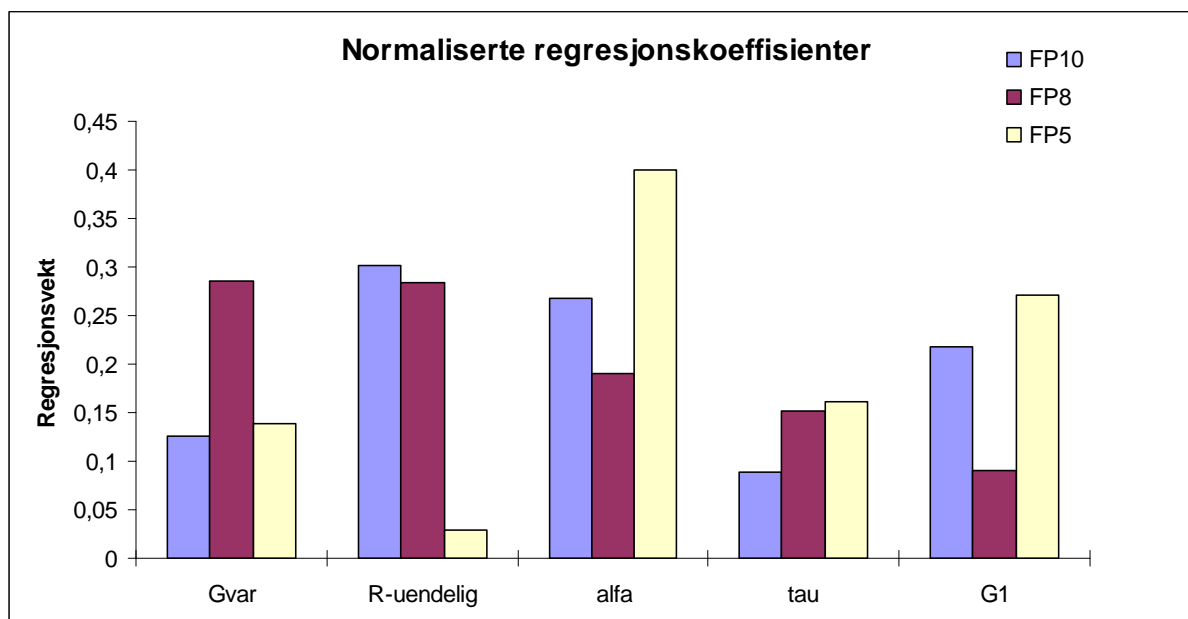
Figur 4.12 viser hvordan korrelasjonen mellom målte og beregnede laktatverdier er. De beregnede laktatverdiene er funnet ut fra kalibrering av PLS-modellen som er laget på grunnlag av målesett med laktat og impedansdata. Figuren viser at det er stor spredning i punktene, og at den best tilpassede rette linjen har en lav korrelasjonskoeffisient på 0,29. Linjen krysser y-aksen langt unna origo, noe som er et svakhetsstegn for PLS-modellen.

For å undersøke ulikheter mellom regresjonsmodellene fra forskjellige forsøkspersoner ble loadingsplott brukt. Figur 4.13 viser loadingsplott av regresjon utført på Grimnesparametrene. Loadingsplottene viser Grimnesparametrenes posisjon i forhold til laktat, plottet mellom de to mest betydningsfulle prinsipalkomponentene (PC1 og PC2). Figur 4.13 viser at noen Grimnesparametre varierer proporsjonalt med laktat hos en forsøksperson, mens de varierer omvendt proporsjonalt hos en annen forsøksperson.  $G_{var}$  varierer proporsjonalt med laktat hos FP3, mens  $G_{var}$  ikke er korrelert med laktat hos FP1. Figur 4.13 viser at regresjonsmodellene varierer sterkt fra forsøksperson til forsøksperson.



Figur 4.13. Tre loadingsplott for forsøkspersonene 1 (øverst), 3 (midten) og 10 (nederst). Loadingsplottet viser hvordan X-variablene (Grimnesparametrene) og Y-variabelen (laktat) plasserer seg i forhold til de to mest betydningsfulle prinsipalkomponentene (PC1 og PC2) i modellen. Prosentandelene nederst på hvert plott sier hvor mye av variasjonen i X- og Y-variablene som er forklart i henholdsvis PC1 og PC2. Figur laget i Unscrambler.





Figur 4.14. PLS-regresjonskoeffisientene til Grimnesparametrene (X-variable) for de tre forsøkspersonene med best korrelasjonskoeffisient. Disse regresjonskoeffisientene sier hvor mye hver X-variabel blir vektlagt i regresjonsmodellen. Hver søyle er summen av absoluttverdien til regresjonskoeffisientene for alle prinsipalkomponentene. Fortegnet til regresjonskoeffisienten er fjernet. X-variable som varierer omvendt proporsjonalt med laktat vil ha et negativt fortegn på regresjonskoeffisienten. Derfor er det egentlig større forskjell mellom regresjonskoeffisientene enn det denne figuren gir inntrykk av. Summen av regresjonskoeffisientene er normalisert slik at summen av søylene for en forsøksperson blir 1. Diagram laget i Microsoft Excel.

Figur 4.14 viser at regresjonsmodellene laget i Unscrambler blir svært forskjellige. Dette vises ved at alle Grimnesparametrene får forskjellige regresjonskoeffisienter avhengig av hvilken forsøksperson de er hentet fra. Forsøksperson 5, 8 og 10 hadde de beste  $R^2$ -verdier for korrelasjonen mellom målt laktatverdi og beregnet laktatverdi fra PLS-modellen. Figur 4.14 viser at det er stor forskjell på hvilke Grimnesparametre som ble vektlagt mest.

For å studere om det var ulikheter i volum av det målte lårsegmentet, fettprosent eller andre faktorer som gjorde at PLS-modellene ble så ulike, ble det utført PLS-analyse på to og to forsøkspersoner som hadde noen like egenskaper.

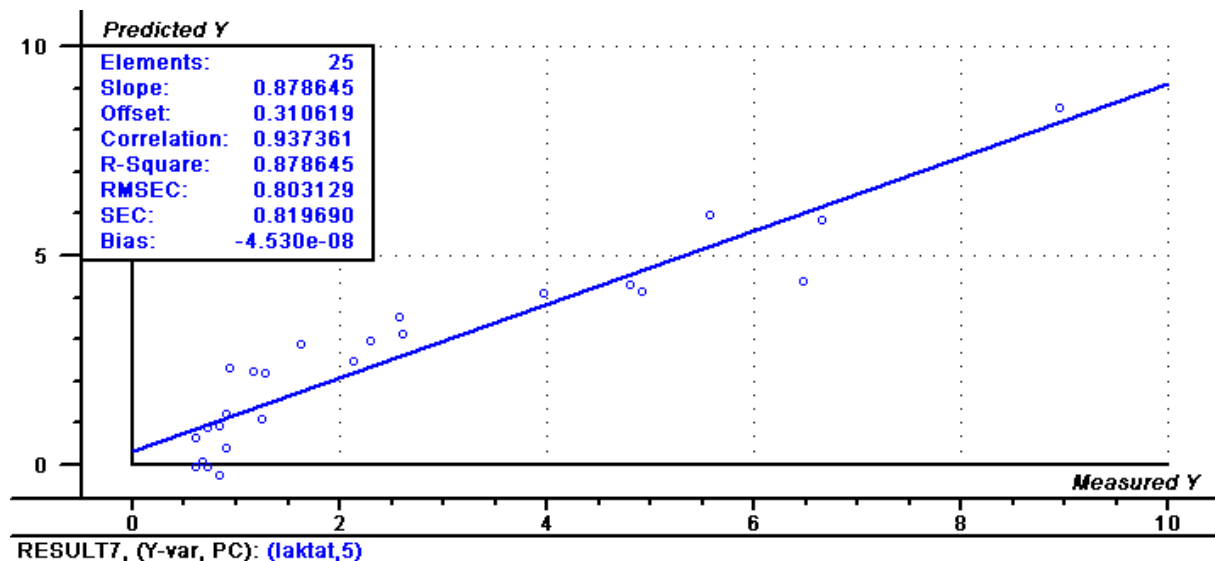
Tabell 4.3. Oversikt over resultatene fra PLS-analysen av to og to forsøkspersoner med noen like egenskaper. BMI er body mass index = vekt/høyde<sup>2</sup>.

Forsøksperson	Rådata		Grimnes parametre		Kommentar
	Calibration $R^2$	Validation $R^2$	Calibration $R^2$	Validation $R^2$	
FP 7 & 8	0,89	0,79	0,82	0,69	Lik BMI og lårdiameter
FP 10 & 11	0,81	0,74	0,44	0,40	Lik fettprosent og BMI
FP 4 & 11	0,86	0,69	0,49	0,37	Lik BMI
FP 5 & 9	0,52	0,32	0,56	0,18	Lik BMI, ulik fettprosent

PLS-analysen av Grimnesparametrene gav lav korrelasjon i forhold rådataanalysen og i forhold til hva man kunne forvente fra enkeltpersonanalysen. Analysen av forsøkspersonene med lik BMI, fettprosent og diameter på låret gav best korrelasjon. Ulik fettprosent men lik

BMI ble observert, noe som bekrefter at BMI tallet har noen svakheter. Eksempelet er FP 5 og FP 9, som har lik BMI, men ulik alder, høyde og fettprosent. Ikke alle relativt like forsøkspersoner med tanke på BMI og fettprosent gav god korrelasjon i PLS-analysen. Dette skyldes i noen tilfeller at en eller begge forsøkspersonene hadde lav korrelasjon i enkeltpersonanalysen.

Figur 4.15 viser at det var mulig å finne en god korrelasjon mellom målt laktatverdi og beregnet laktatverdi fra impedans. Analysen av forsøksperson 7 og 8 gav best korrelasjonskoeffisient. Mens  $R^2$  i individuell analyse var 0,84 og 0,94, ble  $R^2 = 0,89$  for en PLS-modell basert på måledata fra begge forsøkspersonene.



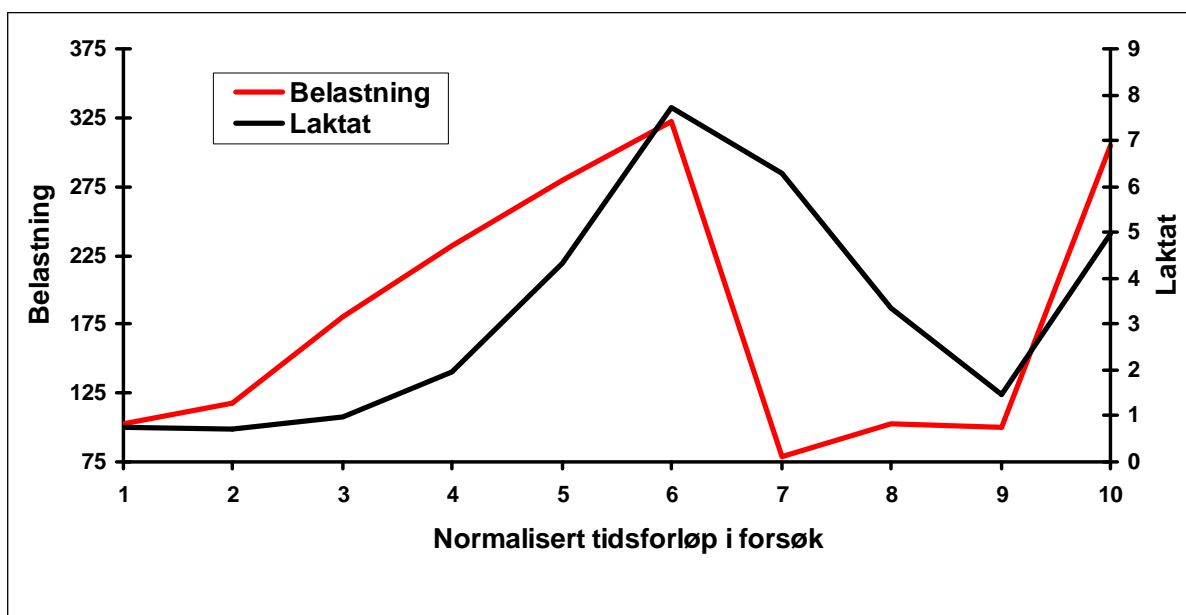
RESULT7, (Y-var, PC): (laktat,5)

Figur 4.15. Resultat av PLS-analyse av rådata fra FP 7 og FP 8. Beregnet laktatverdi fra PLS-modellen er plottet som funksjon av målt laktatverdi. Punktene er fra kalibrering av modellen. Den rette linjen er den best tilpassede linjen til målepunktene. Figur laget i Unscrambler.

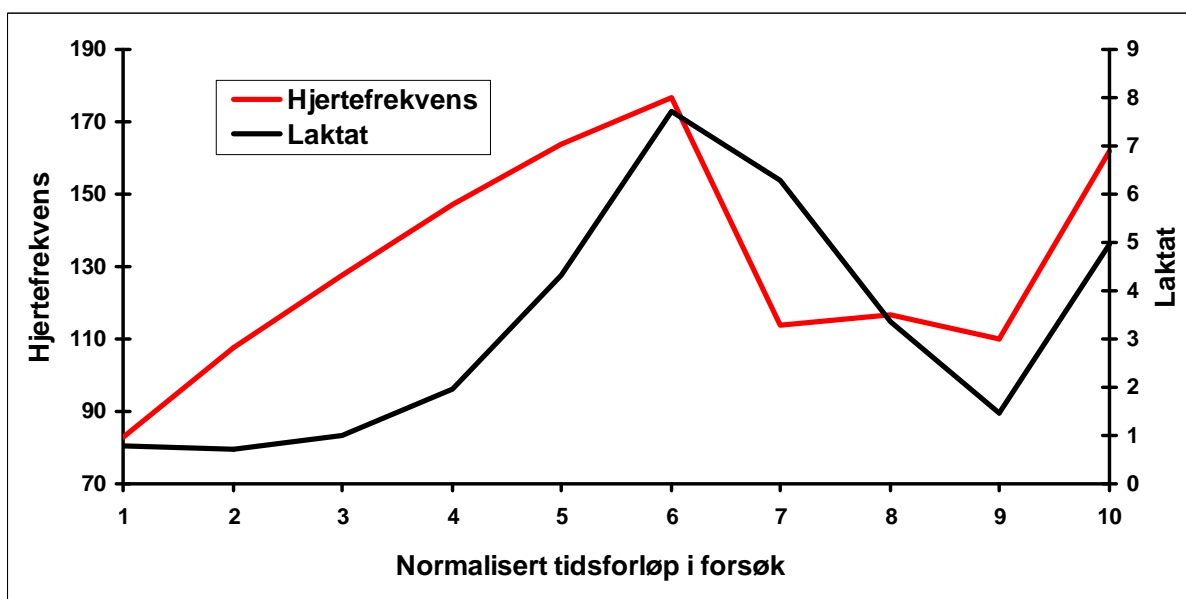
## In vivo-forsøksprotokoll

Under in vivoforsøkene ble ekspirasjonsgasser, puls og belastning målt i tillegg til laktat og impedans. Verdiene fra målingene av ekspirasjonsgasser, puls og belastning ble ikke benyttet direkte i analysen av korrelasjonen mellom laktat og impedans, men de ble brukt til å anslå aktivitets- og utmattelsesnivået til forsøkspersonene. Et mål med trappetrinnsprotokollen var å isolere laktatkonsentrasjonen fra de andre aktivitetssymptomene som påvirket impedansen. Ekspirasjonsgass-, puls- og belastningsverdiene ble derfor sammenlignet med laktatkonsentrasjonen som funksjon av tid. Sammenligningene er vist i figur 4.16, 4.17 og 4.18.

Laktatkurven i figur 4.16 kan indikere at laktatkonsentrasjonen har en eksponentiell utvikling under trappetrinnsprotokollen der belastningen økes med like store trinn. Etter trappetrinnsprotokollen avtar laktatkonsentrasjonen tilnærmet rettlinjert, mens belastningen ble holdt konstant lavt. På det siste draget stiger belastningen brattere enn laktatkonsentrasjonen. Laktatkonsentrasjonen endres naturligvis i takt med belastningen, men etter ulike funksjoner under trappetrinnsprotokollen og med ulike stigningstall under hvileperioden og det siste draget.



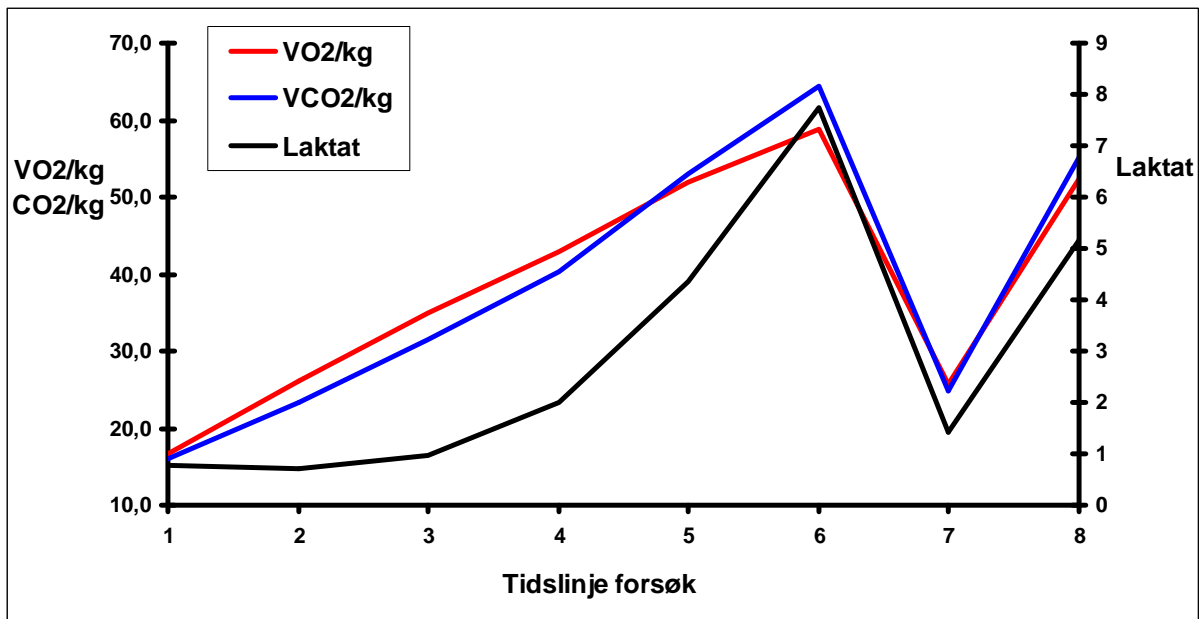
Figur 4.16. Sammenligning av belastning mot laktat målt under forsøkene. Verdiene er gjennomsnittet fra 10 av 11 forsøkspersoner. Rød kurve er belastningen på ergometersykkelen. Svart kurve er gjennomsnittet av laktatverdiene ved de samme belastningene. Målingene etter oppvarmingen tilsvarer 1 på x-aksen, 2-6 er målingene i trappetrinnsprotokollen. 7-9 er hvilemålinger der forsøkspersonen skulle kvitte seg med laktat. 10 på x-aksen er målingene som ble tatt etter det siste draget der laktatverdiene skulle stige brått igjen.



Figur 4.17. Sammenligning av hjerterefrekvens (HF) mot laktat målt under forsøkene. Verdiene er gjennomsnittet fra 10 av 11 forsøkspersoner. Rød kurve er forsøkspersonenes HF idet laktatmålingen ble tatt. Svart kurve er gjennomsnittet av laktatverdiene. Målingene etter oppvarmingen tilsvarer 1 på x-aksen, 2-6 er målingene i trappetrinnsprotokollen. 7-9 er hvilemålinger der forsøkspersonen skulle kvitte seg med laktat. 10 på x-aksen er målingene som ble tatt etter det siste draget der laktatverdiene skulle stige brått igjen.

Fra figur 4.16 og 4.17 ser det ut til at hjerterefrekvensen (HF) til forsøkspersonene er proporsjonal med belastningen. HF har en rettlinjst stigning i trappetrinnsprotokollen, hvorpå

den synker raskt under hvilebelastningene. Laktatkonsentrasjonen stiger eksponentielt under trappetrinnsprotokollen, og synker tregere enn hjerterefrekvensen til hvilenivå under hvilebelastningene.



Figur 4.18. Sammenligning av ekspirasjonsgassverdier med laktatverdier fra in vivo-forsøk. Alle verdier er gjennomsnittet fra 9 av 11 forsøkspersoner. På tidslinjen tilsvarer verdi 1 til 6 trappetrinnsprotokollen der belastningen ble økt med jevne trinn. Verdi 7 og 8 er målinger henholdsvis før og etter det siste draget som ble utført etter en lang pause.

På figur 4.18 ser vi at oksygenopptaket stiger rettlinjet, mens laktatkonsentrasjonen stiger med et eksponentielt forløp under trappetrinnsprotokollen. Mengden av karbondioksid i ekspirasjonsgassene stiger proporsjonalt med oksygenopptaket. Legg imidlertid merke til at før anaerob terskel er karbondioksid mengden lavere enn oksygenopptaket, mens det en stund etter AT er markert høyere. I pausen og på det siste draget følger oksygenopptaket, mengden karbondioksid og laktatkonsentrasjonen hverandre proporsjonalt.

## 5 Diskusjon

### Kvalitetsvurdering av metoden

Dette underkapittelet er et av de viktigste i hele oppgaven, fordi her vurderes metodene som ble brukt i studien av den nye målemetoden. I dette kapittelet kommer også en del forslag til forbedringer av målemetoden og testingen av den.

### Impedansmålingene

Impedansanalysatoren Solartron 1260 + 1294 ble brukt i in vitro- og in vivo-forsøkene. Dette er en dyr impedansanalysator som blir mye brukt i impedansmålinger. De tre størrelsene som har betydning for impedansmålingene er frekvens, spenning og strøm. I følge spesifikasjonene i brukermanualen til Solartron 1260 har frekvensgeneratoren en feilmargin på  $\pm 0,01\%$ . Dette skyldes oppløsningen på frekvensskalaen. Spenningsmålingene har en feilmargin på  $\pm(5\% + 1\%/MHz + 5\text{ mV})$ . Strømmålingene har en feilmargin på  $\pm(5\% + 1\%/MHz + 100\text{ }\mu\text{A})$ . Dette betyr at frekvensen målingen tas ved blir svært nøyaktig, mens impedansverdien (spenning/strøm) blir mindre nøyaktig. Det er viktig å påpeke at impedansanalysatoren ikke har blitt kalibrert på 6 år, og at produsentens garanti for usikkerhetsverdiene kun gjelder i et år etter kalibrering.

Teoremet om resiprositet ble testet på in vitro-målecellen. Kurvene i Wesselplottet var like selv om CC- og PU-elektrodene ble byttet. Det betyr at løsningen i målecellen var passiv og hadde lineær oppførsel under målingene. Siden måleobjektet var lineært, må det passive fireelektrodesystemet og dets overføringsfunksjon også ha vært lineære.

Teoremet om resiprositet ble ikke testet på in vivo-målingene. Hadde det blitt gjort kunne vi kanskje oppdaget tidligere at mange målinger ble ødelagte på grunn av svette mellom CC og PU-elektrodene. Høy konduktans i svetten trakk PU-potensialet opp til CC-potensialet, fordi avstanden mellom CC og PU-elektrodene var kortere enn avstanden mellom PU-elektrodene. CC-spenningen hadde fast amplitude, og strømmen økte dermed ikke proporsjonalt med at spenningsfallet mellom PU-elektrodene økte. Dette førte til at overføringsfunksjonen til fireelektrodesystemet målte impedansen til svetten og ikke vevet. Disse målingene ville kanskje blitt erklært ulineære dersom resiprositetsteoremet hadde blitt testet. For å unngå ødelagte målinger på grunn av svette kunne vi smurt isolerende og svettehemmende vaselin mellom elektrodene.

Elektrodene var små og plassert med stor avstand. Dette oppsettet gir en måling som måler dypt (Grimnes og Martinsen 2008, side 189-190). Impedansen av hele låret ble dermed målt. Avstanden mellom elektrodene ble holdt konstant på alle målingene på alle forsøkspersonene. Diameteren på låret bestemte dermed volumet av vevet som ble målt. I studien viste det seg at impedansen varierte med volumet av vev mellom PU-elektrodene. En mulig forbedring av elektrodeoppsettet kunne være å variere avstanden mellom PU-elektrodene i forhold til diameteren på låret, slik at det målte volumet blir det samme. Man kan da flytte CC-elektrodene lengre unna låret, og passe på at PU-elektrodene ikke kommer for nærme hverandre.

Noen lavfrekvensdata ble kanskje dårlige på grunn av for kort integrasjonstid under målingene. Integrasjonstiden er tiden impedansen måles (integreres over) ved hver målefrekvens. Ved lave frekvenser tar det lengre tid å integrere over en periode enn hva det gjør ved høyere frekvenser. Desto flere perioder målingen integreres over, desto bedre klarer

en faselåst (lock-in) forsterker i Solartron 1260 å fjerne støy, og dermed gi mindre usikkerhet i målingen (Grimnes og Martinsen 2008, sider 238-240). Standardinnstillingene på impedansanalysatoren ble brukt, noe som gav like lang integrasjonstid på 1 MHz som 1 Hz. Målingene tok cirka 30 sekunder, delt på 25 målinger betyr det at integrasjonstiden på hver måling var ca 1 sekund. Dette var uheldig, og kan ha ført til den observerte støyen på de laveste frekvensene på enkelte forsøkspersoner. En bedre metode ville vært å integrere impedansen over et antall perioder. Da ville signalet vært like mange perioder i vevet på alle frekvenser. En hel impedansmåling (25 frekvenser mellom 1 Hz og 1 MHz) hadde ikke trengt å ta lengre tid. Vi hadde satt 45 sekunder som øvre grense for tiden en impedansmåling skulle ta, fordi trappetrinnsprotokollen var avhengig av at pausene ikke ble så lange at laktatkonsentrasjonen sank mye.

Minimum 15 perioder ved hver frekvens ble prøvd på in vitro-målingene. Det gav like kurver som da integrasjonstiden var 0,2 sekunder for 1 Hz og 1 MHz. Ved å kun integrere over 0,2 sekunder ved 1 Hz blir målingen feil, og vi burde kunne observert dette avviket.

### **Laktatmålingene**

Vi hadde tre alternativer å velge mellom da vi skulle finne laktatkonsentrasjonen i vev med en etablert metode; biopsi, venekateter og blodlaktatmåling. Å ta biopsi av låret ved ulike laktatkonsentrasjoner var uaktuelt på grunn av den store graden av invasivitet. Det ville også blitt altfor omfattende å måle momentankonsentrasjon med venekateter, fordi det stiller svært høye krav til sterilitet og medisinsk utstyr. Det ble derfor fastslått at å måle laktatkonsentrasjon fra en blodprøve var den beste referansemetoden for vår studie. Feilen ved å bruke dette som referanse mot impedans er at laktatanalysatoren måler laktatkonsentrasjonen i blodet, mens impedansmålingene måler hele lårsegmentet under PU-elektroden. Laktatkonsentrasjonen er høyere i muskelvevet (muskelcellene) enn i blodet ved anaerobt arbeid, men det er rimelig å anta at laktatkonsentrasjonen i blodet varierer proporsjonalt med laktatkonsentrasjonen i muskelcellene. Vi antok at det ville innstilles en likevekt i laktatkonsentrasjonen mellom blodet og resten av vevet, siden hvert drag med konstant belastning varte i 5 minutter.

I metodekapittelet ble det påpekt en del svakheter med laktatanalysatoren YSI 1500 sport. J. I. Medbø med flere (2000) fant at usikkerheten i YSI 1500 analysatorene var i størrelsesorden  $\pm 10\%$ . De observerte også at to YSI 1500 analysatorer kunne ha et konstant avvik på 20%. Medbø med flere brukte alltid nye membraner. Deres store avvik skyldtes derfor ikke gammel membran, slik det gjorde i vår in vitro-studie. Disse funnene indikerer at YSI 1500 ikke er en perfekt referansemetode. Men det var den beste referansemetoden vår studie hadde tilgang og ressurser til. Dessuten varierte ikke våre to YSI laktatanalysatorer like mye som Medbø sine. Vi brukte den ene som standard, og den andre til kontroll. Forskjellen mellom YSI 1 og YSI 2 der vi fikk tatt to målinger var med 95,5% sannsynlighet  $4,3 \pm 6,0\%$ . Våre laktatanalysatorer ble med jevne mellomrom kalibrert mot 5 mmol/L referansevæske. Feilmarginen i laktatanalysatormålingene blir antatt å være ca  $\pm 10\%$ .

### **PLS-analysen**

En ulempe med PLS-analysemetoden er at den ikke gav stabile resultater alle gangene. Ved PLS-analyse med mange flere samples enn variable ble det noen ganger observert korrelasjonskoeffisienter som varierte mellom 0,03-0,32 med helt likt datagrunnlag. Dette skjedde dog sjeldent, og ble kun observert 3-4 ganger.

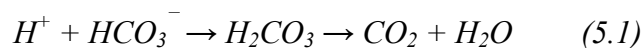
## In vivo-forsøksprotokoll

Arbeidsbelastningen var den eneste variabelen vi kunne styre. Fra figur 4.16-4.18 ser man hvor godt vi lyktes i å separere laktatkonsentrasjonen fra de andre aktivitetssymptomene. På forhånd antok vi at blodgjennomstrømningen ville være proporsjonal med belastningen frem til anaerob terskel (AT), fordi kroppen mobiliserer blodgjennomstrømningen mot det maksimale før organismen må ty til anaerob energiomsetning. På grunn av Sigmaneffekten (Sigman m.fl. 1937) var vi opptatt av at vi skulle få noen målinger mens blodgjennomstrømningen økte, mens laktatkonsentrasjonen holdt seg lav. Figur 4.17 en kontroll på om vi klarte dette, fordi hjertefrekvensen (HF) er proporsjonal med blodgjennomstrømningen. På figur 4.17 ser vi at på de 3 første målingene holdt laktatkonsentrasjonen seg tilnærmet konstant, mens hjertefrekvensen øker fra 83 til 127 slag/min. Deretter øker laktatkonsentrasjonen brattere og brattere langs noe som ligner et eksponentielt forløp, noe som tyder på at AT er passert. Samtidig stiger HF rettlinjert med litt avtagende stigning på de høyeste belastningene i trappetrinnsprotokollen. På hvilebelastningene (7,8 og 9 i figur 4.17) synker HF raskt ned til hvilenivået, mens laktatkonsentrasjonen synker mye tregere. Dette tyder på at vi lyktes godt med å unngå proporsjonalitet mellom blodgjennomstrømning og laktatkonsentrasjon.

Forløpet til oksygenopptaket og karbondioksidmengden i utpust var også ganske forskjellig fra forløpet til laktatkonsentrasjonen under forsøket. Ekspirasjonsgasskurvene var dog likere laktat enn HF, noe som kan begrunnes med at oksygenopptak og karbondioksid i utpust er nærmere knyttet til energiomsetningen og dermed produksjonen av laktat, enn hva HF er.

Resultatet av denne sammenligningen viser hvor vellykket forsøksprotokollen var i å isolere laktatvariabelen fra de andre variablene. Kurvene viser at det er en sammenheng mellom laktat og de andre aktivitetssymptomene, men vi klarte til en viss grad å skille variablene ved flere stadier av protokollen. Ved denne graden av sammenheng mellom laktat og de andre aktivitetssymptomene som påvirker impedansen kan man stole relativt mye på at korrelasjonen mellom laktat og impedans funnet i multivariatanalysen er korrekt.

Jamfør figur 4.18 er det naturlig at mengden karbondioksid i utpustet er forsinket i forhold til mengden oksygen tatt opp av kroppen under en trappetrinnsprotokoll, fordi oksygen må tas opp før forbrenningen kan skje, og karbondioksidet kan pustes ut igjen. Ved de høyeste belastningene steg karbondioksidverdiene høyere enn oksygenopptakverdiene. Dette skyldes at kroppens buffersystem tar til seg  $H^+$ -ionene som kommer fra melkesyren. Hydrokarbonat-ionene danner hydrokarbonat, som skilles ut som vann og karbondioksid i lungene. Se ligning 5.1. Figur 4.18 er dermed et bevis på at gjennomsnittet av våre forsøkspersoner var godt over anaerob terskel.



## Avviksanalyse

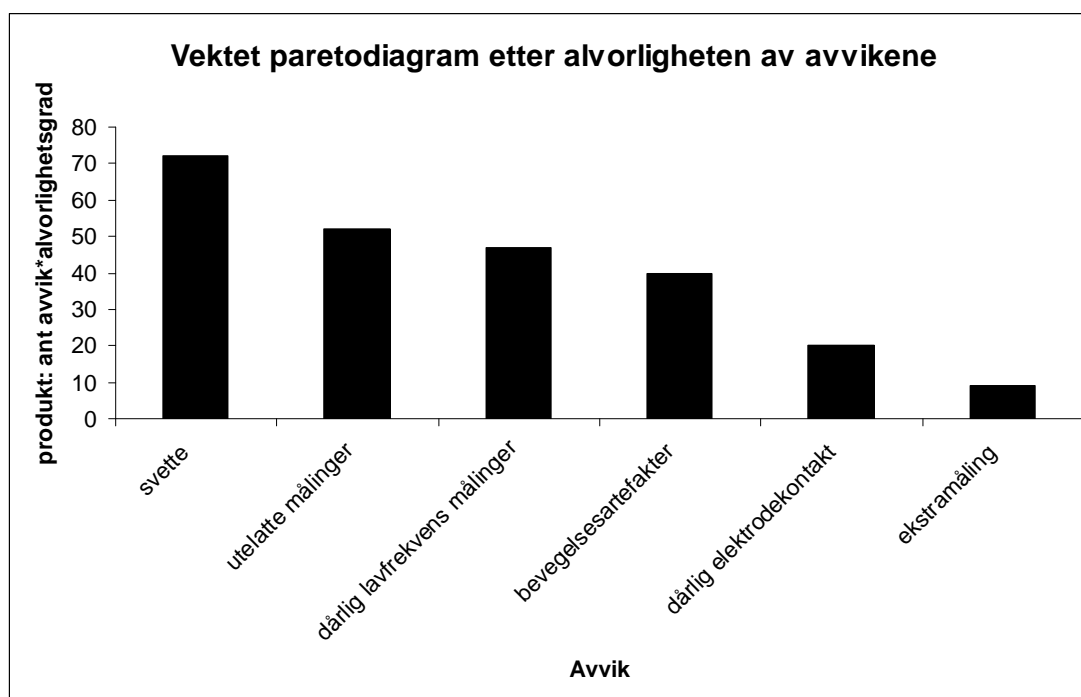
Siden in vivo-målingene inneholdt så mange avvik, ble det utført en telling av hvor mange målinger som ble tatt ut av analysen. Videre ble avvikene vektet etter alvorlighetsgrad, og betydning på analysen. Resultatet av avviksanalysen ble lagt inn i et vektet Paretdiagram, se figur 5.1. Vektingen med hensyn på alvorlighetsgrad vises i tabell 5.1. I tabellen vises også antall avvik av hver type.

Tabell 5.1. Årsaker til at noen målinger avviker fra gjennomsnittelig impedansdata. Avviket er vektet etter alvorlighetsgraden av avviket i forhold til PLS-analysen. Produktet av antall avvik og alvorlighetsgrad er utgangspunktet for Paretodagrammet.

	svette	utelatte målinger	dårlig lavfrekvens målinger	bevegelsesartefakter	dårlig elektrodekontakt	ekstramåling
Alvorlighetsgrad	4	2	1	5	5	1
Antall avvik	18	26	47	8	4	9
Produkt	72	52	47	40	20	9

Målinger med bevegelsesartefakter og dårlig elektrodekontakt førte til at impedansmålingen ikke kunne brukes i PLS-analysen, fordi det gav totalt usammenhengende impedansplott. Disse årsakene ble derfor vektet høyest i avvikanalysen. Impedansmålinger som ble kortsluttet på grunn av svette mellom CC og PU elektrodene var vanskelige å oppdage, fordi måledataene gav like kurver som riktige måledata i Wesselplanet. Men målinger som ble kortsluttet av svette kunne ikke brukes i PLS-analysen, og fikk derfor stor verdi på alvorlighetsgrad. Målinger som ble fjernet før analysen ble vektet med en faktor 2, fordi det ikke er krise å fjerne noen målinger. Det er uheldig dersom for mange målinger fjernes fra analysen. I PLS-analysen ble 17% (26 av 153) av målingene utelatt.

Dårlige lavfrekvensmålinger gjorde at en del målepunkter måtte fjernes fra rådataanalysen. Med Cole- og Grimnesmodellene hadde ikke lavfrekvensmålingene noe å si for analysen, fordi sirkelregresjonen ble gjort på  $\beta$ -dispersjonen. Dårlig lavfrekvens avviket ble derfor vektet med en lav verdi. Ekstramålinger ble tatt på grunn av at det ble observert støy under forsøkene. Ekstramålingene gav mer data til multivariatanalysen, noe som var positivt, og ekstramålingene fikk dermed lav alvorlighetsgrad i avvikanalysen.



Figur 5.1. Vektet paretodigram som viser hvilke avvik som har mest å si for PLS-analysen.

Paretodigrammet fastslår at svette er det største problemet ved in vivo-målingene. Dernest er målinger som ble utelatt i analysen. Ekstramålingene og dårlig elektrodekontakt er avvikene som har minst å si for korrektheten av multivariatanalysen.



## In vitro

Det ble tilsatt destillert vann til cellesuspensjonsløsningen for å endre laktatkonsentrasjonen i løsningen, og dermed laktatkonsentrasjonen i suspensjonen. En effekt av dette var at konsentrasjonen av celler gikk ned. Men siden det osmotiske forholdet i løsningen ble endret, hadde cellene sannsynligvis lik volumkonsentrasjon, fordi de trekker til seg mer vann. Lav konsentrasjon av ioner ekstracelleulært fører til lavere konsentrasjon av ioner intracelleulært. Ettersom vann passerer cellemembranen lettere enn ioner, vil vann trekkes inn i cellene raskere enn ioner sendes ut. Dette avhenger av hvor mange ionetransportører K562 cellene har, og hva slags ioner som var i suspensjonen. Vi vet at det var høy konsentrasjon av laktationer i suspensjonen, og dermed høy konsentrasjon av  $H^+$ -ioner. Det er også stor sannsynlighet for at K562-cellene har monokarbonsyrlattransportøren beskrevet av L H Bergersen 2006 (sekundærkilde), fordi K562-cellene kun baserer seg på anaerob celleånding. Dette taler imot at volumkonsentrasjonen av cellene holdt seg konstant.

Den positive fasevinkelen over 6 kHz målt på serumet og cellesuspensjonen tyder på at fasen til spenningen er foran fasen til strømmen. Det betyr at man har målt induktive egenskaper på måleobjektet. Vev er først og fremst kjent for resistive og kapasitive egenskaper. Men ved god ledningsevne i vevet, vil vevets induktive egenskaper vises. Dersom vi antar at cellesuspensjonen har selvinduktivitet som biologisk vev kan vi regne ut om vi har målt selvinduktans. Vev og ledere har en selvinduktans på cirka 1  $\mu H$ /meter. Når målecellen er 3 cm lang, og ledningsparene fra Solartron 1294 er ca 1 meter tilsammen, blir selvinduktansen  $L \approx 1 \mu H$ . Frekvensen der induktansen er størst er  $f = 100 \text{ kHz}$  som gir  $\omega = 2 \cdot \pi \cdot 10^5 \text{ rad/sek}$ .  $Z_L = j\omega L = j \cdot 0,6 \Omega$ . Ettersom reaktansen er summen av suspensjonens induktive og kapasitive egenskaper, er det mulig at de positive reaktansmålingene skyldes at suspensjonens induktive egenskaper er større enn de kapasitive ved høye frekvenser. De observerte reaktansverdiene kan også skyldes selvinduktans i målesystemet generelt, og da ledningene som går til elektrodene spesielt.

På figur 4.2 ser man at reaktansen øker når resistansen øker, ved målinger med økende utvanningsgrad. Målingene har et konstant reaktans-/resistansforhold på 1-1,5%. Siden mesteparten av modulen skyldes den reelle resistansen, er det mulig at oppløsningen av reaktansen kan bli for liten til å avsløre de små endringene i reaktans. Det er derfor mulig at den målte endringen i reaktans på in vitro-dataene skyldes at utstyret ikke strekker til. En annen mulig forklaring er at suspensjonens kapasitive egenskaper øker når konsentrasjonen av ladningsbærere blir lavere.

Herman P Schwan skrev om målinger på cellesuspensjoner i 1957 (side 174): "It becomes increasingly difficult to provide sufficient resolution to detect the extremely small reactive impedance component of cellular suspensions as the frequency decreases." Schwan mente man måtte ha godt måleutstyr med høy oppløsning, siden reaktanskomponenten i impedansen på cellesuspensjoner er så liten. Solartron impedansanalysatoren som ble brukt i vår studie har tilstrekkelig oppløsning til å måle den lave reaktansen, men det avhenger av at volumkonsentrasjonen av celler er høy. Cellesuspensjonen det ble målt på i vår studie hadde en maksimal konsentrasjon på 1,2 millioner celler/ml. Dette tilsvarer en volumkonsentrasjon på 6% med en cellediameter på 10  $\mu m$  (Ferret med flere 2000). Når volumkonsentrasjonen er så liten som 6% og dispersjonen fra relaksasjonsfenomener er små, er det liten sannsynlighet for at vi i vår studie målte egenskapene til cellene. Dette bekreftes av at kurveformene i Wesselplanet målt på cellesuspensjon ble like som kurveformene målt på serumet og saltløsningen, se figur 4.1. Den lille dispersjonen som ble observert på alle disse løsningene skyldes sannsynligvis måleoppsettet og målecellens egenskaper. Det eneste som ble målt i in

vitro-forsøket var derfor hvordan resistansen varierte med ulike konsentrasjoner av ladningsbærere i løsningen.

Hensikten med in vitro-forsøket var at laktat ionene skulle påvirke cellene på en måte som endret impedansen slik at vi kunne måle det. At strømmen går rundt eller gjennom cellene ved ulike frekvenser, er den vanligste mekanismen bak dispersjonen som oppstår i frekvensområdet som ble målt i denne studien. Ettersom volumkonsentrasjonen av celler var så liten, var ikke måleoppløsningen tilstrekkelig til at det var mulig å observere denne dispersjonsmekanismen. Mesteparten av strømmen gikk utenfor cellene uansett.

Dersom man skulle gjort celledensitetsmålingene på nytt burde man hatt større volumkonsentrasjon av celler, fordi man da lettere kunne skille cellenes påvirkning på målingene, fra serum og målecellens påvirkning. Vi er usikre på om det var positivt eller negativt at K562-cellene hadde anaerob celleånding. Det hadde vært spennende å se om man kunne observere forskjeller på målingene ut ifra metoden man endret laktatkonsentrasjonen i suspensjonen på. Det er mulig at tilsetning av laktat er den beste metoden.

## Mulige slutninger fra resultatene

### In vitro

Målingene på serumet var viktige for å se hvilken innvirkning serumet hadde på impedans og laktatmålingene. Ved å ta ut 1 ml serum, og så tilsette 1 ml 15 mmol/L laktatløsning, økte impedansen med ca 25  $\Omega$ , samtidig som laktatkonsentrasjonen økte med ca 2 mmol/L. Dette må bety at konsentrasjonen av ioner i serumet var vesentlig høyere enn konsentrasjonen av laktat ioner i laktatløsningen. Da det ble tilsatt laktat uten å ta ut 1 ml fra serumet først, sank impedansen. Dette må bety at impedansen synker når volumet øker, selv om man tilsetter en løsning med høyere impedans. Erfaringene fra serummålingene var at det måtte benyttes samme volum på målinger som skulle sammenlignes. Hvis noe skulle tilsettes, ble det først tatt ut tilsvarende volum, slik at volumet holdt seg konstant.

Hovedresultatene fra in vitro-forsøket vises i tabell 4.1, som inneholder korrelasjonskoeffisienter fra multivariatanalysen. Tolkningen av disse resultatene avhenger av om man tror at cellene i suspensjonen har hatt innvirkning på resultatene eller ikke.

Dersom man tror at det var for lite celler, må resultatene tolkes som at multivariatanalysen har funnet korrelasjon mellom konsentrasjon av ladningsbærerne i løsningen og den målte laktatkonsentrasjonen, og at dette ikke skyldes relaksasjonsfenomener. Det vil si at in vitro-forsøkene kun var konduktansmålinger. De observerte dispersjonene som det ble utført sirkelregresjon på, må dermed skyldes andre fenomener enn laktats interaksjon med cellene.

Dersom man tror at det var tilstrekkelig med celler i suspensjonen, kan det godt hende at dispersjonen skyldes relaksasjonsfenomener mellom cellene og laktat ioner. Men ettersom hele løsningen ble vannet ut, vil dispersjonen også skyldes relaksasjonsbevegelser fra de andre ladningsbærerne som var i cellesuspensjonen. Med denne tolkningen kan man si at det er god korrelasjon mellom laktatkonsentrasjon og den målte impedansen i cellesuspensjon.

Det er et godt tegn for gyldigheten av multivariatanalysen at korrelasjonen blir bedre når målinger med støy blir utelatt og laktatverdiene blir justert til bedre verdier. Det kan tyde på at man kan få enda bedre korrelasjon med enda mer nøyaktige målemetoder for laktat og impedans.

Korrelasjonen holdt seg bra da konduktansparametrene ble tatt ut av multivariatanalysen. Det kan tolkes som at det skjedde noe mer enn en konduktansendring i cellesuspensjonen da den ble vannet ut.

### In vivo

Det var store individuelle forskjeller mellom forsøkspersonene. Vi antar at de viktigste årsakene til forskjellene i impedans i det målte lårsegmentet var volum og andelen av fett, muskelvev og blodårer. Siden disse faktorene endret seg fra forsøksperson til forsøksperson var det vanskelig å finne en god korrelasjon i PLS-analysen av alle forsøkspersonene. Den dårlige korrelasjonen da alle forsøkspersonene ble analysert kan også skyldes at det ble for mange samples (målesett) i forhold til antall variable i PLS-modellen. Det var 127 samples i analysen av alle støyfrie måledata. I analysen av rådata er det 50 variable, mens det kun er 4 og 5 variable i analysen av Cole- og Grimnesparametrene. Tilsvarende ble korrelasjonen 0,29 på rådata, og 0,06 og 0,07 på henholdsvis Cole- og Grimnesparametrene.

De store individuelle forskjellene i impedansdata mellom forsøkspersonene viser seg også i PLS-analysen av enkeltpersonene. Selv om korrelasjonskoeffisienten var stor på mange forsøkspersoner, viser det seg at PLS-modellene ble svært ulike. Figur 4.13 viser hvordan de to mest signifikante prinsipalkomponentene (PC1 og PC2) plasserer seg i forhold til Grimnesparametrene (som gav best korrelasjon med laktat). Det er tydelig at de samme Grimnesparametrene ikke plasserer seg på samme sted i koordinatsystemet, noe som betyr at PLS-modellene er ulike. Figur 4.14 viser hvilke Grimnesparametre som vektlegges mest i PLS-modellene. Her ser vi også at det er stor forskjell fra forsøksperson til forsøksperson.

I denne studien har det vært størst fokus på  $\beta$ -dispersjonen, som skyldes at strømmen går gjennom cellemembranen ved høy frekvens. Både Cole og Grimnes parametrene ble funnet ut ifra den observerte  $\beta$ -dispersjonen. Vi klarte ikke å få gode målinger på de lavere frekvensene der den interessante  $\alpha$ -dispersjonen inntreffer. Før studien begynte var det i det lave frekvensområdet vi hadde størst forventninger, siden dette er det impedansområdet man vet minst om hvilke fenomener som står bak.

## Vurdering av resultatene mot tidligere kunnskap

Det har vært lite forskning på sammenhengen mellom laktatkonsentrasjonen i vev og bioimpedans. Den eneste artikkelen undertegnede har kjennskap til, er skrevet av Alvarenga og Souza fra Rio de Janeiro i Brasil. I vår studie har vi opplevd at generelle forskjeller mellom forsøkspersonene er en av de største utfordringene med å finne en sammenheng mellom laktatkonsentrasjon og impedans. Dette innebærer volum av det målte lårsegmentet (ulik diameter på låret), fettandel i underhuden og ulik svetteaktivitet. Disse variablenes påvirkning på impedans nevnes ikke i artikkelen til Alvarenga og Souza. Dette øker min tvil til den høye korrelasjonen som ble funnet mellom impedans og blodlaktatkonsentrasjon av Alvarenga og Souza.

Forsøksprotokollen til Alvarenga og Souza går til 150 watt for alle forsøkspersoner. Dette virker som en lav maksimalbelastning dersom hensikten er å få forsøkspersonen over anaerob terskel. Det er mulig at Alvarenga og Souza ikke hadde en testsykkel som gav like nøyaktige belastningsverdier som vår elektroniske testsykkel. Dessuten vil forsøkspersoner ha anaerob terskel på ulike belastninger, avhengig av hvor godt trent de er (Wasserman med flere 1973), og hva slags trening de har drevet med. I vår studie observerte vi forsøkspersoner som hadde anaerob terskel på 360 watt, og noen tålte å ligge 5 minutter med 550 watts belastning. Dessuten hadde 9 av våre 11 forsøkspersoner anaerob terskel på arbeidsbelastninger over 150 watt. Når Alvarenga og Souza gjorde forsøk på 50 idrettsstudenter må noen av deres forsøkspersoner ha hatt anaerob terskel over 150 watt.

Jeg mener mine argumenter tyder på at Alvarenga og Souza har for dårlig innsikt i treningsfysiologi. Videre tviler jeg på at resultatet av studien deres er så god som de skriver. Dessuten er det ikke publisert mer om videre arbeid etter denne studien. Med et så godt resultat ville man anta at videre arbeid ville være å utvikle instrumentering til allment bruk. Det er derfor mulig at Alvarenga og Souza har holdt videre arbeid hemmelig, eller at de har funnet ut at målemetoden har mange svakheter, og ikke korrelerer godt nok med referansemetoden.

## 6 Konklusjon

### In vitro

Det var for lav volumkonsentrasjon av celler til at påvirkningen fra laktat på cellene gav utslag på impedansen. Den gode korrelasjonen mellom laktatkonsentrasjon og impedansverdier må skyldes at laktatkonsentrasjonen endret seg proporsjonalt med konsentrasjonen av serum og alle andre ladningsbærere i suspensjonen. Det var derfor ikke hensiktsmessig å sammenligne impedansdataene funnet i in vitro-forsøkene med in vivo-forsøkene. Det er kanskje mulig å gjøre bedre målinger på andre celletyper som har større volumkonsentrasjon.

### In vivo

Det ble gjort 127 gode impedansmålinger som ble sammenlignet med laktatmålinger tatt i samme tidsrom. Det var ikke mulig å se direkte sammenhenger mellom laktatverdier og Wessel- og Bodeplott av impedansdataene. Det ble observert i Wesselplottene at impedanskurvene var forskjellige fra forsøksperson til forsøksperson. Volum av det målte lårsegmentet og fettprosent i låret ble sett på som de to største årsakene til forskjellene i impedanskurvene.

PLS-analysen viste en tydelig korrelasjon mellom laktat og impedans på alle forsøkspersonene hver for seg. Disse PLS-modellene var imidlertid forskjellige, og da data fra alle forsøkspersonene ble analysert sammen, var den beste korrelasjonskoeffisienten 0,29 for alle rådata. Da det ble laget PLS-modeller med måledata fra to forsøkspersoner som hadde lik BMI (body mass index), omtrent like store lår eller lik fettprosent økte korrelasjonskoeffisienten. Dette tyder på at det kan være mulig å måle laktat med bioimpedans dersom man tar høyde for flere av de individuelle forskjellene som vi observerte.

Siden det er så mange variable som spiller inn på impedansmålingene, vil jeg tro at fremtidige impedansstudier på laktat bør benytte multisensorsystemer, slik som Huber med flere (2007) gjør med glukosemålingene sine.

Med utgangspunkt i resultatene i denne studien er jeg skeptisk til at den gode korrelasjonen som Alvarenga og Souza fant i 2007, faktisk er korrelasjonen mellom anaerob terskel og impedansspekteret de målte. Erfaringen fra vår studie er at impedansspekteret endrer seg så mye fra forsøksperson til forsøksperson at man trenger mer avanserte målemetoder enn det vi og Alvarenga brukte for å korrigere for de individuelle ulikhetene.

Konklusjonen er at det ikke ble funnet entydige bevis på at det er mulig å måle laktatkonsentrasjonen i låret ved hjelp av bioimpedans. Vi fant dog heller ingen bevis på det motsatte.

## Referanser

### Bøker:

Grimnes S og Martinsen ØG (2008): "Bioimpedance and bioelectricity basics, second edition". *Academic Press*. Oxford UK. 488 sider.

### Del av bøker:

Abdi H (2007): "Partial least square regression (PLS regression)", i: Salkind N J (ed.): "Encyclopedia of Measurement and Statistics". *Thousand Oaks (CA)*: Sage USA. sider 740-744.

### Artikler:

Alvarenga RL og Souza MN (2007): "Estimation of the Lactate Threshold Using Bioelectrical Impedance Spectroscopy: A New Noninvasive Method," *Proceedings of the 29th Annual International Conference of the IEEE EMBS 2007, Engineering in Medicine and Biology Society.*, volum 1, sider 3052-3055.

Bergersen LH (2006): "Laktat i hjernen - uten å surne", *Tidsskrift for den norske legeforening*, volum 16, sider 2094-2097. Sekundærkilde.

Böning D og Maassen N (2007): "Point:Counterpoint: Lactic acid is/is not the only physicochemical contributor to the acidosis of exercise", *J. Appl. Physiol.*, volum 105, sider 358-359.

Ferret E, Evrard C, Foucal A, Gervais P (2000): "Volume Changes of Isolated Human K562 Leukemia Cells Induced by Electric Field Pulses". *Biotechnology and Bioengineering*, volum 67, sider 520-528.

Grimnes S og Martinsen ØG (2005): "Cole Electrical Impedance Model – A Critique and an Alternative". *IEEE transactions on biomedical engineering*, volum 52, sider 132-135.

Grimnes S og Martinsen ØG (2006): "Bioimpedance". *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering.*, volum 1, sider 438-447.

Huber D, Falco-Jonasson L, Talary M, Stahel W, Stadler N, Dewarrat F og Caduff A (2007): "Multi-sensor data fusion for non-invasive continuous glucose monitoring," *Proceedings of the 10th International Conference in Information Fusion*, volum 1.

Jorfeldt L, Juhlin-Dannfelt A og Karlsson J (1978): "Lactate release in relation to tissue lactate in human skeletal muscle during exercise". *J. Appl. Physiol.*, volum 44, sider 350-352.

Medbø JI, Mamen A, Holt Olsen O og Evertsen F (2000): "Examination of four different instruments for measuring blood lactate concentration". *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, volum 60, sider 367-380.

Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D (2004): "Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis", *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, volum 287, sider 502-516.

Schwan HP (1957):"Electrical properties of tissue and cell suspensions". *Advances in Biological and Medical Physics*, volum 5, sider 147-209.

Sigman E, Kolin A, Katz LN og Jochim K (1937):"Effect of motion on the electrical conductivity of the blood". *Am J Physiol.*, volum 118, sider 708-719.

Wasserman K, Whipp BJ, Koyl SN og Beaver WL (1973):"Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise". *J. Appl. Physiol.*, volum 35, sider 236-243.

**Figurer:**

Melkesyremolekylet. [Online [http://en.wikipedia.org/wiki/Lactic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Lactic_acid)  
[Hentet 21.januar 2009]



## Vedlegg 1: Persondata

Forsøksperson nummer	alder	høyde	vekt	BMI	AT laktat	AT HF	AT VO2	maks HF	maks VO2	maks laktat
FP 1	14	175	55,0	18,0	3,23	150	36,1	186	56,0	6,55
FP 2	44	183	85,0	25,4	2,20	143	44,6	168	56,0	8,12
FP 3	39	190	84,7	23,5	2,19	154	50,6	185	64,6	11,40
FP 4	32	194	82,4	21,9	2,09	152	36,0	184	46,0	7,92
FP 5	23	197	95,5	24,6	2,05	158	54,3	179	67,0	6,97
FP 6	31	165	61,1	22,4	2,25	154	46,8	183	56,4	7,19
FP 7	30	193	86,2	23,1	2,14	166	55,9	183	68,4	6,47
FP 8	39	190	84,4	23,4	2,33	152	45,9	176	62,1	10,76
FP 9	38	178	78,0	24,6	2,18	132	40,8	174	52,2	8,15
FP 10	23	183	75,0	22,4	2,33	146	44,9	177	64,3	6,35
FP 11	31	177	69,4	22,2	2,47	143	46,6	185	61,9	8,93
Gjennomsnitt	31	184	77,9	22,9	2,31	150	45,7	180	59,5	8,07
Standardavvik Populasjon	8	9	11,4	1,9	0,31	9	6,2	5	6,5	1,62

Forsøksperson nummer	temp °C	luft trykk [hPa]	Belastning [W]		
			start	AT	maks
FP 1	22	1003	100	130	210
FP 2	24	1003	125	283	375
FP 3	17	996	150	287	375
FP 4	19	1004	75	170	225
FP 5	17	995	150	364	550
FP 6	19	997	100	196	250
FP 7	19	997	100	318	375
FP 8	17	995	125	268	375
FP 9	18	996	150	227	350
FP 10	24	967	75	145	200
FP 11	19	997	100	214	300
Gjennomsnitt	20	995	114	236	326
Standardavvik Populasjon	2	10	27	71	98



# Estimation of the Lactate Threshold Using Bioelectrical Impedance Spectroscopy: A New Noninvasive Method

R. L. Alvarenga and M.N. Souza, *Member, IEEE*

**Abstract**—Bioelectrical Impedance Spectroscopy (BIS) is a noninvasive technology with potential application to study exercise physiology as body composition and estimation of maximal oxygen uptake. The aim of the study was to compare the power at lactate threshold (WLT) obtained using blood lactate concentration (BLC) with the power at lactate threshold from BIS (WBT). Fifty physical education students, 35 men and 15 women (age:  $24.1 \pm 5.5$  years; height:  $168.6 \pm 24.6$  cm; weight:  $70.1 \pm 9.8$  kg), undergoing incremental cycle ergometer test (ICET) have participated of the study. Significant correlations ( $p < 0.05$ ) for Pearson coefficient were found between the two methods ( $r = 0.96$ ) and standard error of estimate (SEE) = 5.6 W. The mean value showed  $66.7 \pm 20.3$  W and  $66.7 \pm 21.1$  W between the invasive technique (WLT) and noninvasive technique (WBT), respectively. The results of this study suggest that BIS, when applied with the ICET, is a valid method to estimate the power at LT.

## I. INTRODUCTION

Analysis of the blood lactate concentration (BLC) at specific situations of exercise has been suggested as a method to obtain important information regarding the metabolic characteristic of athletes, leading to a better adjust of the intensity used during aerobic physical training. According to Billat [1] the blood lactate measurements is an excellent tool for prediction of exercise performance and for the control of training.

Lactate is a metabolite of glycolitic-lactate system [2] and lactate threshold (LT) is defined as the optimal exercise intensity correlated to a given value of lactate and that has been widely used as an objective measure the ideal aerobic exercise intensity in both athletes and patients. The terms anaerobic threshold (AT) or ventilatory threshold (VT) are also used to express techniques from expired gas and ventilatory measurement applied to yield the same goal in what concerns the ideal aerobic exercise intensity.

This work was supported in part by the Brazilian Governmental Agencies CNPQ and CAPES.

R.L. Alvarenga is with Biomedical Engineering Program – COPPE and with the Physical Education School, Federal University of Rio de Janeiro, RJ - Brazil (e-mail [jveloso@peb.ufrj.br](mailto:jveloso@peb.ufrj.br)).

M.N. Souza is with Biomedical Engineering Program – COPPE and with the Electronics Department of Polytechnic School, Federal University of Rio de Janeiro, RJ - Brazil (55 21 2562-8582, Fax: 55 21 2562-8591, e-mail: [souza@peb.ufrj.br](mailto:souza@peb.ufrj.br)).

At rest the BLC is about 1.0 mM and such concentration normally increases as exercise intensity increases, until a given aerobic exercise intensity where the biological system begins to produce more lactate then the body can eliminate and thus the BLC increases at a greater rate that the exercise intensity.

Invasive techniques to quantify BLC are normally expensive. The two most used methods are the electrochemical analyzer (YSL 2300 STAT Yellow Spring Co., U.S.A.), requiring blood haemolysis and enzymatic determination, and the reflectance photometry using a lactate analyzer (Accusport, Germany). Such equipments are expensive or in the case of a minor cost in equipment acquisition (the latter method) the cost of the required straps makes these techniques expensive to be used in large scale. Moreover, as many other invasive techniques, both need aseptic environment to be performed, suffering from problems associated to contamination. In addition some athletes present aversion to this type of exam.

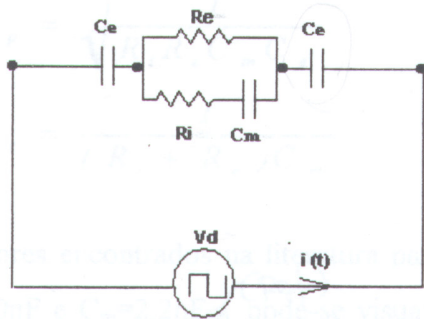
Until recently the determination of the lactate threshold was just performed in laboratories of Universities, due to the relative high cost of the equipment and/or the straps used for the blood lactate dosage, discouraging the use of this resource as a practical method for exercise prescription.

The aim of the study was to develop an alternative method to determine the ideal aerobic exercise intensity using bioimpedance spectroscopy (BIS) and that supply results comparable with the ones determined using conventional invasive lactate measures (LT).

## II. METHODOLOGY

### A. The technique

The BIS technique was the one based on the current response to the voltage step [3] and that presents the advantage of needing just one excitation waveform, in opposition to the classical sinusoidal scan method used by the most available multi-frequency analyzers. The basic concept of the method is depicted in fig. 1, where  $R_e$  and  $R_i$  represent respectively the extra and intracellular resistances of the biological segment under investigation;  $C_m$  is the membrane capacitance associate to the segment; and  $C_e$  is the capacitance associate to the interface electrode-tissue and represents a simplification of the impedance due to the interface electrode-tissue. It was demonstrate [3] that for the considered electric model the current response  $i(t)$  can be expressed by equation (1).



**Figure 1: Electric model for the bioimpedance of the biological segment used to estimate the current response to a voltage step excitation.**

$$i(t) = ip \left[ \left( k_1 e^{p_1 t} \right) + \left( k_2 e^{p_2 t} \right) \right] \quad (1)$$

where,  $ip$ ,  $k_1$ ,  $p_1$ ,  $k_2$  and  $p_2$  are constant dependent on the circuit elements and also on the voltage step amplitude  $vd$ .

From the theoretical expectation of  $i(t)$  (1) and its experimental counterpart, one can expect to estimate the electric parameters of bioimpedance model. In the present work a multiparametric optimization procedure based on a steepest gradient method was used to estimate the best parameters that fit the experimental data in the least square sense. From the raw basic parameters others parameters can be calculate, in particular, the infinite resistance ( $R_{inf}$ ) defined as the parallel of  $Re$  and  $Ri$  (equation 2).

$$R_{inf} = (Re Ri) / (Re + Ri) \quad (2)$$

An academic prototype was designed and implemented in the Biomedical Instrumentation Laboratory of the Biomedical Engineering Program – COPPE at Federal University of Rio de Janeiro to generate the excitation and acquire the data of the current response associated to the BIS method. The prototype was developed as a virtual instrument using Labview. 6.0 (*National Instruments*), under a platform of the mobile hardware - laptop Toshiba (Pentium 500 MHz), and a plate of acquisition National PCM-CIA, model DAQCard 6062E (12 bits, 500 kHz). Besides the data acquisition the virtual instrument also perform the bioimpedance parameters estimates. This prototype has been used elsewhere to investigate other applications of the BIS technique, as for example, the assessment of fat mass and fat free mass [3], the fluid balance in newborns [4] and osteoarthritis diagnosis [5].

After some preliminary tests searching for the best protocol to the electrodes placement, the final measurements were performed using a pair of stainless steel electrodes in left thigh, where the first electrode were placed at 5 cm above patella border and other one 25 cm set apart.

### B. Subjects

Fifty physical education students (35 men and 15 women) undergoing incremental cycle ergometer test (ICET) have participated of the study. The subjects were instructed to arrive at the laboratory in a rested and fully hydrated state, at least 3 h post-prandial, and to avoid hard exercise in the 48 h preceding a test session.

Before the study, all subjects came to the laboratory to familiarize themselves with the testing procedures, in particular the use of the cycle ergometer.

The study was performed according to the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the Federal University of Rio de Janeiro and before the experiments were undertaken, an informed consent was obtained from each subject.

### C. Blood analysis

Blood samples for determining of lactate concentration was collected at ear lobe at rest and after every 3 min of exercise and processed by an automated lactate analyzer (Accusport, Germany), which showed good correlation when compared with gold-standard [6]. The analyzer was calibrated with known lactate standards.

### D. Protocol

In order to determine LT an incremental test was performed on a cycle ergometer (Monark, Brazil) at a pedalling frequency of 60 cycles/min until volitional exhaustion. The exercise started at a workload of 30 W and as increased by 30 W every 3 minutes until 150 W. In these measurements, five exercise levels were reached according to each subject's capacity. Power output, heart rate, and BIS data were determined at the end of each load level and BLC was measured 1 minute after. The duration of the whole test ranged between 15 and 20 min.

The workload at LT (optimal exercise intensity) using invasive technique (WLT) was estimate as the intensity corresponding to 3.5 mM of BLC and determined through linear interpolation using the two estimate of BLC associated to the two collected blood samples. The workload using the noninvasive BIS technique (WBT) was obtained using linear regression from BIS parameters.

Heart rate (Hr) was also measured throughout the exercise bouts with radiotelemetry (Polar Vantage XL, Stamford, CT).

The ambient temperature and humidity were measurement. Air temperatures for the ICET was set to  $28 \pm 2.5^\circ\text{C}$ . Relative air humidity values for cycle ergometer test was  $57.4 \pm 12.6\%$ . The sequence of tests was counterbalanced to minimize the influence of an order effect.

### E. Statistical Analyses

All statistical analysis was performed using Matlab software (Mathworks, Natick, MA). The arithmetic mean and standard deviation (mean±SD) were used for descriptive statistics. The correlation between LT determined from BLC (WLT) and the estimated LT from BIS (WBT) were calculated using Pearson correlation ( $r$ ) and the magnitude of the error was calculated as the standard error of estimate (SEE).

## III. RESULTS

Descriptive characteristics of the study population are presented in Table 1.

TABLE 1  
SUBJECT CHARACTERISTICS

Characteristics	Subjects
Age (Yr)	24.3 ± 5.2
Height (cm)	170.2 ± 21.0
Weight (kg)	70.12 ± 10.0

All exercise tests were completed without complications. It was possible to determine the WLT using BLC and estimated WBT in all subjects. The latter estimate was performed using the difference of infinite resistance ( $\Delta R_{inf}$ ) at rest and at workload of 150 W (equation 3).

$$WBT = (-2.72 \times \Delta R_{inf}) + 147.19 \quad (3)$$

where  $\Delta R_{inf}$  is expressed in  $\Omega$  and WBT in W.

Table 2 presents the behavior of the infinite resistance ( $\Omega$ ).

TABLE 2  
BEHAVIOR OF THE INFINITE RESISTANCE

Rinf	Values ( $\Omega$ )
At rest	295.1 ± 120.4
At 150 W	265.5 ± 119.5
$\Delta R_{inf}$	-29.6 ± 7.4

There was no difference between in the mean values of the LT obtained using the two protocols, where the mean values were  $66.7 \pm 20.3$  W and  $66.7 \pm 21.1$  W for the invasive technique (WLT) and noninvasive technique (WBT), respectively. The graphic representation of the LT values considering the techniques is depicted in Figure 2.

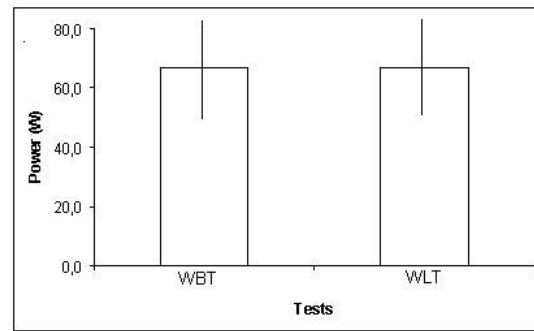


Figure 2: Comparison between the WBT and WLT techniques.

Significant correlations ( $p < 0.05$ ) for Pearson's product moment coefficient were found between the two methods for LT ( $r = 0.96$ ) and the standard error of estimate (SEE) was 5.6 W.

Figure 3 depicted the scatter plot of the WLT and WBT for all the fifty subjects and also the linear best fit. The residuals between the estimated of LT performed by WLT and WBT are illustrated in Figure 4.

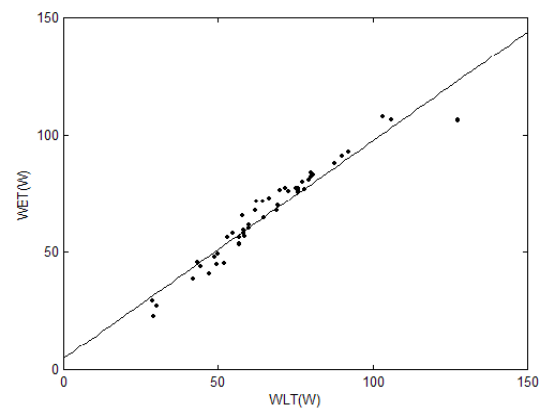


Figure 3: Scatter plot for WLT and WBT.

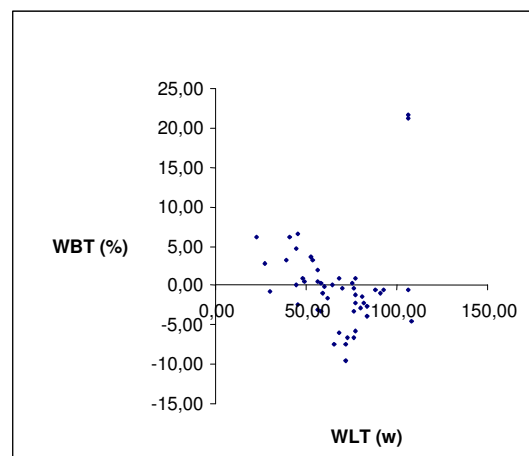


Figure 4: Comparison between WLT and WBT using Bland-Altman plot.

The mean value for the HR was 82.7% of the maximal heart rate (Hrmax) calculated from the ICET for the WLT technique and 83.1% for the WBT, where Hrmax was calculated from the Equation 4

$$\text{Hrmax} = 220 - \text{age} \quad (4)$$

#### IV. DISCUSSION

The lactate test has been accepted as one of the best physiological markers for exercise prescription in physical training. There are evidences that the performance in continuous and prolonged sportive activities is better correlated with the LT than the ones associated with the maximum aerobic power.

Wasserman et al. [7] originally proposed the AT to predict aerobic endurance capacity by respiratory gas exchange, but this technique and others that use ventilatory measurement and gas analysis are very expensive.

The use of the blood lactate concentration has been shown to be a good technique in the assessment, prescription and monitoring of the sportive training, especially for high-level athletes who need accuracy and sensibility in the determination of optimal training parameters. Despite of this, authors [8] have argued the necessity of determination of the LT using noninvasive techniques.

The literature has reported BIS as an important alternative method in many fields that investigate physiological changes associated with variations on electric conduction characteristics [3], [4], [5].

Many researchers have studied BIS during exercise. Elleby et al. [9] studied the changes of segmental electric resistance at thigh after half marathons and Stahn et al. [10] estimate the maximal oxygen uptake by bioelectrical impedance analysis. However, for the best of our knowledge the estimation of LT using BIS has not been studied yet. This study seems to be the first to address LT assessment by BIS and to define a protocol for electrodes placement to such purpose.

The present study examined the relationship between WBT and WLT in a heterogeneous sample of 35 men and 15 women. The aim was to develop a prediction formula for estimating LT from BIS measurements. Our findings indicate that WBT was strongly correlated to the WLT and that the BIS method seems a valid method for estimating LT within the adult subjects. The correlation for predicting LT from BIS within these was  $r=0.96$  and standard error of estimate (SEE)=5.6 W.

Thompson et al. [11] suggests that there is a linear relationship between intracellular water (ICW) and metabolic stress in skeletal muscle during exercise, on the basis of the significant correlation between pH and ICW variation, the intracellular acidification primarily accounts for increase in ICW during exercise.

BIS is a method that measures tissue conductivity and such conductivity is proportional to the amount of segmental fluid and also to the local acidosis.

The findings of the present study are corroborated in estimation of maximal oxygen uptake by bioelectrical impedance analysis [10] and suggest that the LT from BIS method should be considered by coaches and athletes as a method for estimating optimal exercise intensity.

#### REFERENCES

- [1] V. Billat, "Use of blood lactate measurements for prediction of exercise performance and for control of training," *Sports Med.*, pp. 22:157-75, 1996.
- [2] G. A. Brooks, "Intra and extra-cellular lactate shuttles," *Med. and Sci. in Sports and Exercise*, vol. 32, pp. 790-99, 2000.
- [3] C. E. B. Neves and M. N. Souza, "A method for bio-electrical impedance analysis based on a step-voltage response," *Physiol. Meas.*, vol. 21, no. 1, pp. 395-408, 2000.
- [4] D. O. Mendonça, E. J. B. Zaeyen, and M. N. Souza, "Assessment of fluid balance in neonates using biomedance," *Proceedings of the 23rd International Conference on the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. Istanbul, Turkey, pp. 1-4, 2001.
- [5] R. L. Alvarenga., and M. N. Souza, "Assessment of knee osteoarthritis by bioelectrical impedance," *The 25th Annual International Conference of the IEEE Engineering In Medicine And Biology Society*, Cancun, México, 2003.
- [6] J.W. Fell, "Evaluation of the accusport lactate analyzer," *Int. J. of Sports Med.*, vol. 19, pp. 199-204, 1998.
- [7] K. Wasserman, B. J., Whipp, and S. N. Koyal, "Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise," *J. Appl. Physiol.*, vol. 35, pp. 236-43, 1973.
- [8] B. S. Denadai, C. C. Greco, and M. Teixeira, "Blood lactate response and critical speed in swimmers aged 10-12 years of different standards," *J. of Sports Sci.*, vol 18 no.1, pp. 779-84, 2000.
- [9] B. Elleby, L.F. Knudsen, B.H. Brown, C.E. Crofts, M.J. Woods, and E.A. Trowbridge. "Electrical impedance assessment of muscle changes following exercise," *Clin. Phys. Physiol. Meas.*, vol. 11, pp. 159-166, 1990.
- [10] A. Stahn, E. Terblanche, S. Grunert, and G. Strobel, "Estimation of maximal oxygen uptake by bioelectrical impedance analysis," *Eur. J. Appl. Physiol.*, vol. 96, pp. 265-273, 2006.
- [11] R. T. Thompson, M. K. Raja, G. H. Raymer, G. R. Moran, G. Marsh, "Changes in tissue water content measured with exercise measured with <sup>31</sup>P-MRS during progressive forearm multiple-frequency bioimpedance and metabolism," *J Appl Physiol*. vol. 101, pp. 1070-1075, 2006.