

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za elektrotehniko

Tomaž Jarm

**VPLIV ELEKTROTERAPIJE NA PARAMETRE  
PREKRIVITVE IN OKSIGENACIJE TUMORJEV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 1999



Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za elektrotehniko

Tomaž Jarm

**VPLIV ELEKTROTERAPIJE NA PARAMETRE  
PREKRIVITVE IN OKSIGENACIJE TUMORJEV**

DOKTORSKA DISERTACIJA

MENTOR

Izr. prof. dr. Damijan Miklavčič, univ. dipl. inž. el.

SOMENTOR

Izr. prof. dr. Gregor Serša, univ. dipl. biol.

Ljubljana, 1999



## Zahvala

*Za strokovno vodstvo in pomoč pri nastajanju disertacije se iskreno zahvaljujem mentorju in predstojniku Laboratorija za biokibernetiko na Fakulteti za elektrotehniko, izrednemu profesorju Damijanu Miklavčiču, ki je z nasveti in potrpežljivostjo spremljal in usmerjal moje delo že od diplome dalje.*

*Še med dodiplomskim študijem me je v področje biomedicinske tehnike in v resnično prijetno okolje Laboratorija za biokibernetiko pritegnil moj prvi mentor in predstojnik Laboratorija, akademik profesor Lojze Vodovnik. Za vse najlepša hvala!*

*Večina eksperimentalnega dela na živalih je bila opravljena na Oddelku za tumorsko biologijo Onkološkega inštituta v Ljubljani. V prvi vrsti se želim zahvaliti somentorju in predstojniku Oddelka, izrednemu profesorju Gregorju Serši za izkazano strokovno pomoč in nasvete ter za to, da je omogočil izvedbo poskusov v laboratorijih svoje skupine. Iskrena hvala dr. Maji Čemažar za učne ure pri delu z živalmi in pomoč pri izvedbi poskusov. Hvala tudi Miri Lavrič in Karmen Zajc za tehnično podporo.*

*V svoji matični skupini Laboratorija za biokibernetiko se zahvaljujem Mojci Pavlin za pomoč pri numeričnih simulacijah transporta svetlobe v tkivih, vsem drugim članom Laboratorija pa za prijazno in stimulatивно delovno okolje.*

*Del poskusov z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) je bil opravljen na Department of Biomedical Engineering and Medical Physics, Keele University, Stoke-on-Trent, v Veliki Britaniji. Zahvaljujem se predstojniku profesorju Petru Rolfu za gostoljubje v skupini ter dr. Y.A.B.D. Wickramasinghu in dr. Marku Deakinu za pomoč pri poskusih.*

*Meritve z metodo NIRS (inštrument OS30) in z inštrumentom Eppendorf Histogram so bile opravljene na Institut für Medizinische Strahlenbiologie, Universitätsklinikum Essen v Nemčiji. Tu sem dolžan zahvalo predstojniku Inštituta profesorju Christianu Strefferju za gostoljubje v skupini in dr. Fritzu Steinbergu (NIOS GmbH, Essen), dr. H.-J. Röhrbornu, dr. Geru Hilkenu, Tamari Mußfeldt in Evi Grau za pomoč ter tehnično podporo pri pripravi in izvedbi poskusov.*

*Del poskusov z metodo barvanja tkiva je bil opravljen na Institute Gustave-Roussy, Villejuif, v Franciji, za kar se zahvaljujem dr. Lluisu M. Miru.*

*Iskrena hvala staršem, prijateljem in Mateji za ljubezen, spodbude, razumevanje in potrpežljivost.*

*Tomaž Jarm*



# Kazalo

Povzetek	1
Abstract	3
<b>1 Uvod</b>	<b>5</b>
1.1 Elektroterapija tumorjev	5
1.2 Pomen prekrvljenosti in oksigenacije tumorjev	7
1.3 Namen študije	9
<b>2 Optična spektroskopija tkiv</b>	<b>11</b>
2.1 Razvoj metod optične spektroskopije tkiv	11
2.2 Zakaj bližnje-infrardeča svetloba?	12
2.3 Fizikalno ozadje tkivne spektroskopije	13
2.3.1 Absorpcija svetlobe	15
2.3.2 Sipanje svetlobe	15
2.3.3 Slabljenje svetlobe v tkivu	16
<b>3 Materiali in metode</b>	<b>19</b>
3.1 Tumorski model	19
3.2 Elektroterapija	20
3.3 Anestezija poskusnih živali	21
3.4 Bližnje-infrardeča spektroskopija	22
3.4.1 Merjenje z inštrumentom NIRO <sub>2</sub> X-2	22
3.4.2 Merjenje z inštrumentom OS 30	24
3.4.3 Simulacija z metodo Monte Carlo	26
3.5 Polarografična oksimetrija	29
3.5.1 Teorija polarografičnega merjenja kisika	29
3.5.2 Izvedba meritve	31
3.6 Merjenje prekrvljenosti z barvilom Patent modro	32
3.6.1 Opis delovanja merilne metode	32
3.6.2 Izvedba poskusov	33
3.7 Merjenje prekrvljenosti z rubidijem <sup>86</sup> Rb	34
3.8 Statistična obdelava rezultatov	35
<b>4 Rezultati</b>	<b>37</b>
4.1 Bližnje-infrardeča spektroskopija	37
4.1.1 Merjenje z inštrumentom NIRO <sub>2</sub> X-2	37
4.1.2 Merjenje z inštrumentom OS 30	47
4.1.3 Simulacija z metodo Monte Carlo	50
4.2 Polarografična oksimetrija	51
4.3 Merjenje prekrvljenosti z barvilom Patent modro	56
4.4 Merjenje prekrvljenosti z rubidijem <sup>86</sup> Rb	58

<b>5</b>	<b>Razprava</b>	<b>65</b>
5.1	Bližnje-infrardeča spektroskopija	65
5.1.1	Merjenje z inštrumentom NIRO <sub>2</sub> X-2	65
5.1.2	Merjenje z inštrumentom OS 30	67
5.1.3	Simulacija z metodo Monte Carlo	67
5.2	Polarografična oksimetrija	68
5.3	Merjenje prekrvljenosti z barvilom Patent modro	68
5.4	Merjenje prekrvljenosti z rubidijem <sup>86</sup> Rb	70
5.5	Sinteza	70
<b>6</b>	<b>Sklep</b>	<b>77</b>
	<b>Dodatek A.1</b>	<b>79</b>
	<b>Dodatek A.2</b>	<b>89</b>
	<b>Dodatek A.3</b>	<b>97</b>
	<b>Dodatek B.1</b>	<b>103</b>
	<b>Dodatek B.2</b>	<b>129</b>
	<b>Dodatek C</b>	<b>143</b>
	<b>Literatura</b>	<b>153</b>
	Zahteva po priznanju avtorstva za izvirnost prispevkov	159
	Izjava	161



# POVZETEK

Različni avtorji so v preteklosti pokazali, da je možno z uporabo enosmernih električnih tokov delno zaustaviti rast čvrstih tumorjev tako pri poskusnih živalih kot pri ljudeh. Velikost tumorjev različnih vrst se delno zmanjša že po enkratni terapiji. Čeprav ti tumorji čez nekaj časa ponovno zrastejo, je zavora v rasti v primerjavi z netretiranimi tumorji dovolj očitna, da je raziskava mehanizmov izkazane protitumorske učinkovitosti smiselna. Le če bomo dobro poznali zakonitosti, po katerih deluje enkratna terapija, nam bo morda uspelo razviti bolj učinkovito terapevtsko shemo elektroterapije.

Vpliv elektroterapije na prekrvitev in oksigenacijo tumorskega tkiva je eden od možnih mehanizmov protitumorskega delovanja enosmernega električnega toka. Kisik je nenadomestljiv za življenje vseh aerobnih organizmov. Obstaja vrsta metod, s katerimi lahko merimo različne fiziološke parametre v organizmu, ki so tako ali drugače povezani s stanjem prekrvljenosti in oksigenacije. Nekatere metode so invazivne; na primer polarografično merjenje parcialnega tlaka kisika v tkivu in analiza plinske sestave arterialne krvi. Pri teh metodah je pogosto treba vzeti vzorec tkiva za analizo. S tem nasilno posegamo v tkiva, ki jih preučujemo, to pa vpliva na vrednost izmerjene veličine. Zato te metode niso primerne za dolgotrajno neprekinjeno spremljanje dogajanja ali za pogosto ponavljanje meritev. Poleg tega te metode omogočajo le zajemanje statičnih podatkov, saj vsaka meritev velja le za trenutek, ko vzamemo vzorec.

Zaradi naštetih razlogov se vedno bolj uveljavljajo neinvazivne metode za merjenje prekrvljenosti in oksigenacije tkiv. Med njimi imajo pomembno mesto optične metode, kakršna je bližnje-infrardeča spektroskopija. Z bližnje-infrardečo spektroskopijo lahko z merjenjem absorpcije svetlobe v bližnje-infrardečem področju neinvazivno in neprekinjeno spremljamo koncentracije pomembnih sestavin, ki sodelujejo pri dostavi kisika v organizmu. To so na primer hemoglobin, mioglobin in celo encimi, ki nastopajo v dihalni verigi v mitohondrijih. Tako lahko opazujemo procese, ki se

dogajajo na celičnem nivoju, na zadnji stopnji transporta kisika v aerobnih organizmih. Tega nam neposredno ne omogoča nobena druga znana metoda.

V pričujočem delu predstavljamo študijo, ki smo jo opravili na dveh živalskih tumorskih modelih, in sicer na fibrosarkomu Sa-1 na miših A/J in na fibrosarkomu LPB na miših C57Bl/6. Preučevanja vpliva elektroterapije na parametre prekrvljenosti in oksigenacije tumorjev smo se lotili s štirimi različnimi merilnimi metodami:

- bližnje-infrardeča spektroskopija z dvema povsem različnima izvedenkama te metode (NIRS);
- polarografično merjenje parcialnega tlaka kisika v tkivu ( $pO_2$ );
- ocenjevanje prekrvljenosti tumorjev z metodo barvanja tkiva *in vivo* z barvilom Patent modro-vijolično (PBV);
- ugotavljanje prekrvljenosti tumorjev z merjenjem vsebnosti radioaktivnega izotopa rubidija ( $^{86}Rb$ ).

Rezultati, ki smo jih dobili z različnimi merilnimi metodami, se medsebojno podpirajo in dopolnjujejo. Z vsemi uporabljenimi metodami smo pokazali, da elektroterapija pomembno zmanjša pretok krvi skozi tumorje. Posledica je poslabšanje preskrbe tumorjev s kisikom. Učinki so dozno odvisni od amplitude toka in od trajanja terapije. Tumorji Sa-1 se močnejše odzovejo na elektroterapijo kot tumorji LPB. Dinamika sprememb med elektroterapijo in v dnevih po elektroterapiji kaže, da je vpliv elektroterapije na prekrvljenost verjetno najpomembnejši mehanizem protitumorskega delovanja v obeh tumorskih modelih. Dobra korelacija med rezultati obeh izvedenk metode NIRS in rezultati uveljavljenih invazivnih metod obeta, da bo za merjenje parametrov prekrvljenosti v prihodnje možno vrsto invazivnih metod nadomestiti z neinvazivnimi optičnimi metodami.

# **ABSTRACT**

## **The effects of electrotherapy on parameters of perfusion and oxygenation of tumours**

It has been shown in the past that electrotherapy with low level direct current induces a significant level of tumour growth retardation when applied to solid tumours in experimental animals and in humans. Treated tumours of various types are partially retarded in their growth after a single treatment. Even though growth of the tumours continues after a certain period of regression, the growth delay of treated tumours with respect to control tumours is significant enough so that investigation of the mechanisms underlying this antitumour action is meaningful and necessary. If the mechanisms of a single shot treatment are well understood, one can reasonably expect to be able to design a more effective treatment schedule.

One of the proposed mechanisms for demonstrated antitumour effectiveness of electrotherapy has been the effect of direct electric current on tumour perfusion and oxygenation of tumour tissue. Oxygen plays a crucial role in existence of all aerobic organisms. Several methods are in use for measurement of different physiological parameters that can be used for description of perfusion and oxygenation status in tissue. Some of them are invasive, like the polarographic measurement of oxygen partial tension in tissue and arterial blood gas measurements. Being invasive, these methods interfere with the tissue under investigation or require samples to be taken in order to perform the measurement. As such, these methods are not particularly useful for long-time or frequent measurements, especially not in humans. They also yield a very limited static information since the data they provide are valid only at one particular moment when the sample was taken.

The noninvasive methods for measurement of perfusion and oxygenation in tissue are gaining on their importance, in particular the optical methods. Near-infrared spectroscopy (NIRS) is one of these methods. By measurement of absorption of light in the near-infrared spectrum the near-infrared spectroscopy enables noninvasive and continuous monitoring of several biological compounds in the tissue which are important for delivery and utilising of oxygen, like haemoglobin, myoglobin and even certain enzymes involved in the respiratory chain in mitochondria. Therefore we can take a look at processes going on at cellular level - at the last stage of oxygen transport in aerobic organisms, which is not achievable by any other known method.

In this thesis a study of two experimental tumour models is presented. Fibrosarcoma Sa-1 on A/J mice and fibrosarcoma LPB on C57Bl/6 mice were used. The effects of electrotherapy on parameters of perfusion and oxygenation were studied by means of four different methods:

- Near-infrared spectroscopy (NIRS) implemented in two completely different ways;
- Polarographic measurement of oxygen partial pressure in tissue ( $pO_2$ );
- Estimation of tumour perfusion by means of *in vivo* tissue staining method using Patent blue-violet dye (PBV);
- Measurement of tumour perfusion by the radioactive rubidium extraction technique ( $^{86}Rb$ ).

The results of different methods are mutually supportive and complementary. It has been shown by all the methods that tumour blood flow is significantly reduced by the application of electrotherapy. Thus the oxygen supply to treated tumours was reduced. The effects of electrotherapy are dose-dependent. They depend both on the current amplitude and on the duration of the treatment. The Sa-1 tumours were affected by electrotherapy to a greater extent than the LPB tumours. The dynamics of perfusion changes during treatment and especially in the days following the treatment support the hypothesis that the effect of electrotherapy on perfusion of tumours might be the most important mechanism of the demonstrated antitumour action of electrotherapy in both tumour models. The good correlation of the results of both varieties of NIRS method on one side and all invasive methods on the other side indicates that the invasive methods for perfusion measurement may be replaced in the future by the noninvasive optical methods.

# 1 UVOD

## 1.1 Elektroterapija tumorjev

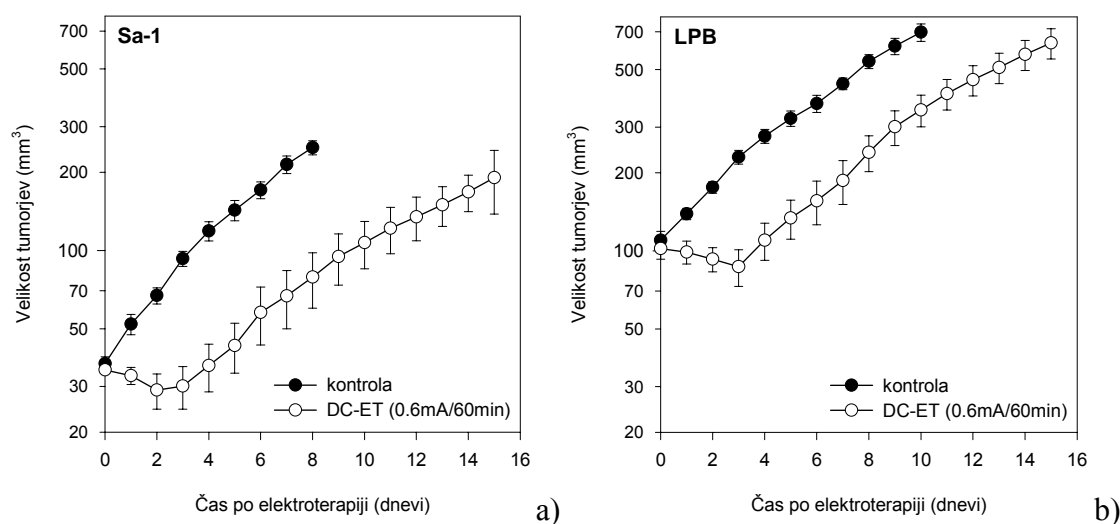
Več avtorjev je v študijah na različnih živalskih modelih in s kliničnimi poskusi dokazalo, da lahko z uporabo šibkih enosmernih električnih tokov zaviralno delujemo na rast čvrstih tumorjev [1 - 7]. Zamisel za elektroterapijo tumorjev z enosmernim tokom je verjetno nastala na podlagi trditve, da so hitro rastoča tkiva v organizmu električno negativna glede na sosednja tkiva. To velja tudi za tumorje, katerih glavna značilnost je nenadzorovana hitra rast, ki je posledica porušene regulacije delitve tumorskih celic. Elektroterapija je ena od alternativnih oblik terapije lokalnih malignih tvorbov, ker jo apliciramo lokalno na samem tumorju, zato so stranski učinki na normalno tkivo relativno majhni in prehodnega značaja.

Med parametri elektroterapije, ki so jih uporabili različni avtorji, so velike razlike, kar otežuje sistematično iskanje mehanizmov protitumorskega delovanja [8]. Razlike se pojavljajo v oblikah, materialu, številu in namestitvi elektrod, v amplitudi in trajanju električnega toka in v shemi terapije (enkratna, večkratna, kontinuirana terapija). Poleg tega so bile študije opravljene na različnih tumorskih modelih in pri različnih velikostih tumorjev. Težko pričakujemo, da so pri vseh različnih kombinacijah elektroterapij in tumorskih modelov mehanizmi delovanja elektroterapije enaki. Najverjetneje gre pri vseh za kombinirane učinke različnih mehanizmov.

Če zanemarimo termične učinke električnega toka (hipertermija - segrevanje tkiva), ki so pri uporabljenih jakostih toka zanemarljivi [5, 8], je eden od najbolj očitnih posledic dolgotrajnejše aplikacije enosmernega toka elektroliza, do katere pride ob elektrodah v tkivu. Zaradi elektrokemičnih reakcij ob elektrodah se pH vrednosti zelo spremenijo, vendar so dokazali, da so te spremembe izrazito lokalnega značaja [8]. V anodni in katodni konfiguraciji elektrod, ko je ena od elektrod nameščena v tumor, je vsaj del odmiranja tumorskega tkiva gotovo posledica sprememb pH okoli elektrode. Ta

možnost pa ni verjetna za konfiguracijo "polje", pri kateri sta obe elektrodi nameščeni zunaj tumorja. Poleg tvorjenja  $H^+$  in  $OH^-$  ionov ob anodi oziroma katodi igra pri nekaterih kovinskih elektrodah določeno vlogo citotoksični učinek kovinskih ionov in snovi, ki nastanejo zaradi raztapljanja anodne elektrode [9]. Ena od možnih razlag izhaja iz dejstva, da se celice, ki so izpostavljene električnemu toku, nahajajo v električnem polju, zaradi katerega se spremeni transmembranska napetost celic, to pa vpliva na prenos snovi preko membrane [10]. S poskusi *in vitro* so dokazali, da se lahko poveča aktivnost nekaterih celic imunskega sistema pod vplivom zunanega električnega polja [11].

Fibrosarkom SA-1 na miših A/J in fibrosarkom LPB na miših C57Bl/6 sta tumorska modela, na katerem so opravili obsežne raziskave vpliva elektroterapije na rast tumorjev [7, 8, 12, 13]. Za tumorje Sa-1 so pokazali, da je zavora v rasti teh tumorjev praktično enaka pri vseh treh različnih konfiguracijah elektrod. Pri "anodni" in "katodni" je ena od stimulacijskih elektrod (anoda ali katoda) vstavljena v notranjost podkožnega tumorja, druga pa v podkožje v bližini tumorja. Pri tako imenovani postavitvi "polje" pa sta obe elektrodi v podkožju zunaj tumorja, tako da se tumor nahaja na sredini med obema vzporedno vstavljenima elektrodama. Tako tumorskega tkiva mehansko ne poškodujemo. Zavora v rasti pri vseh treh postavitvah elektrod je bila približno enaka, kljub različni porazdelitvi nekrotičnega področja v tumorjih po terapiji [8, 12]. Ugotovili so, da je zastoj v rasti dozno odvisen od amplitude toka in trajanja terapije [7, 13]. To potrjuje ugotovitev, da je čas zastoja v rasti tumorjev, ki je pomemben parameter za ocenjevanje uspešnosti terapije, funkcija električnega naboja za amplitude toka okoli 1 mA, ki v času terapije steče skozi tkivo med elektrodama [5]. Slika 1.1.1 prikazuje rast tumorjev SA-1 in LPB po enkratni terapiji z enosmernim električnim tokom amplitude 0,6 mA in trajanja 1 uro.



**Slika 1.1.1:** Rast tumorjev Sa-1 (a) in LPB (b) po enourni elektroterapiji s tokom 0,6 mA pri namestitvi elektrod v konfiguraciji "polje". Podane so povprečne vrednosti za 7 - 8 živali in standardne napake povprečja [13, 14].

Omenimo še dodatno uporabnost elektroterapije, čeprav se v pričujočem delu ne ukvarjamo z njo. Z elektroterapijo pomembno povečamo učinkovitost drugih oblik terapije. Obstajajo študije izboljšanja delovanja kemoterapevtika bleomicina in modifikatorjev biološkega odziva, kot so tumorski nekrozni faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-2 (IL-2) in interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) [15 - 19]. Pri dozah kemoterapevtikov, ki same skoraj ne učinkujejo, daje kombinirana uporaba elektro- in kemoterapije večje protitumorske učinke, kot jih lahko pričakujemo iz preproste vsote učinkov posameznih terapij, kar kaže na sinergizem v delovanju kombinirane terapije.

## 1.2 Pomen prekrvljenosti in oksigenacije tumorjev

Že dolgo je znano, da so tumorji slabše preskrbljeni s kisikom in hranilnimi snovmi kot normalna tkiva [20 - 26]. Za to je več razlogov, posledice pa so prav tako raznolike. Zato, da bi dosegle ciljno celico, morajo vse snovi skozi tri transportne faze: s krvjo po telesu v kapilarno ožilje, preko sten kapilar v medcelični prostor in po medceličnini do celic.

Glavni razlog za zmanjševanje prekrvljenosti tumorskega tkiva je slabša ožiljenost zaradi rasti tumorske mase. V začetni fazi makroskopske rasti tumorji uporabljajo normalno ožilje organa, v katerem rastejo. Po določenem času se začne razvijati novo tumorsko ožilje, ki v rasti ne more slediti množenju tumorskih celic. Tako se povečujejo razdalje med kapilarami, dolžina žil se povečuje, njihova funkcionalnost pa zmanjšuje. Razmerje med površino žil in velikostjo tumorja se zmanjšuje, tumorska masa je vedno bolj neenakomerno prekrvljena. Prihaja tudi do delnega ali popolnega zastoja v pretoku krvi skozi dele tumorja. K temu prispeva povečan pritisk tkiva na ožilje in nenormalno nizek pritisk v venoznem delu tumorskega ožilja [20]. Ker se kri le počasi premika, se povečuje nevarnost za nastanek krvnih strdkov, ki lahko povsem zamašijo tanke žile [27]. Razvijajo se povezave med arterijskim in venskim delom ožilja, ki kri speljejo mimo tumorja namesto skozenj.

Molekule prestopajo iz krvi v medcelični prostor tkiva predvsem s konvekcijo in difuzijo [26]. Difuzija neke snovi je sorazmerna površini sten kapilar in gradientu koncentracije te snovi preko sten kapilar. Konvekcija je sorazmerna iztekanju tekočine skozi stene kapilar v medcelični prostor. To iztekanje pa je sorazmerno površini sten kapilar in razliki med gradientoma hidrostatskega in osmotskega pritiska med notranjostjo in zunanostjo kapilar. Ugotovili so, da je prepustnost sten kapilar v tumorjih pravzaprav večja kot v normalnem tkivu, vendar povečan tlak v tumorskem tkivu preprečuje večjo ekstravazacijo snovi [28].

Tudi v medceličnem prostoru molekule potujejo z difuzijo in konvekcijo. Glede na relativno velike gradientne koncentracij v smeri stran od kapilar bi pričakovali izdatno difuzijo snovi skozi prostor, toda gradient tlaka v nasprotni smeri izniči ta učinek in preskrbljenost celic s potrebnimi snovmi hitro upada z oddaljevanjem od kapilar.

Zaradi pomanjkanja kisika se povečuje delež glikolize v metabolizmu tumorskih celic. Zato se zniža vrednost pH, to pa povzroči večjo viskoznost krvi v tumorju in tako

še slabšo prekrvljenost. Zaradi vsega naštetega se dostava kisika tumorskim celicam dramatično zmanjša. Čeprav se zaradi splošnega pomanjkanja kisika poveča njegova ekstrakcija iz krvi, to ne more nadomestiti nezadostne prekrvljenosti.

Kisik potuje z difuzijo in konvekcijo od kapilar v medcelični prostor, zato se v splošnem z oddaljenostjo od kapilar naglo zmanjšuje parcialni tlak kisika in se hkrati veča delež odmrlih celic. Histološke preiskave so pokazale, da so včasih v neposredni bližini kapilar, torej v dobro vaskulariziranih področjih tumorja, območja nekrotičnega tkiva, medtem ko so lahko v drugih primerih daleč stran od kapilar področja živih celic. Vsaj delno lahko to nelogičnost pojasnimo z nefunkcionalnostjo tumorskega ožilja. Dobra ožiljenost ne pomeni nujno dobre prekrvljenosti. Poleg tega je zaradi slabega pretoka krvi skozi tumor nasičenost krvi s kisikom (relativna koncentracija oksigeniranega hemoglobina) zelo nizka.

Veliko je eksperimentalnih dokazov za to, da sta pomanjkanje kisika in hranilnih snovi (glukoze) ter nizka pH vrednost v tumorjih faktorja, ki zaviralno delujeta na rast tumorskih celic tako v razmerah *in vitro* kot *in vivo* [23].

Tumorska hipoksija je torej posledica strukturno in funkcionalno nenormalne mikrocirkulacije v tkivu, zaradi česar pride do nezadostne ekstravazacije kisika in drugih snovi ter do zastoja v odstranjevanju izločkov [29]. Tako lahko delno pojasnimo odpornost nekaterih tumorjev na radioterapijo in tiste kemoterapevtike, ki delujejo predvsem na deleče se celice [30, 31]. Delež celic, ki ne sodelujejo v rasti, je namreč v slabo prekrvljenih tumorjih povečan zaradi pomanjkanja potrebnih snovi. Po terapiji je vsaj del tumorskega tkiva uničen in sčasoma so razkrojki odstranjeni. Tumorska masa se zmanjša, zato se zopet poveča prekrvljenost in prej nedeleče se celice, ki niso izgubile klonogene sposobnosti, se znova vključijo v delitveni cikel in tumor znova zraste. Z nekaterimi sredstvi lahko delno povečamo oksigenacijo tumorjev pred terapijo, da bi tako povečali učinkovitost terapije. Organizem lahko izpostavimo povišanemu pritisku kisika. S tem dvignemo nasičenost krvi s kisikom, ali pa z vazodilatatorji povzročimo razširjenje žil in tako boljši pretok. Pokazalo pa se je, da se tumorsko tkivo na te ukrepe odziva v manjši meri kot normalno tkivo. Ožilje, ki je nastalo z neoangiogenezo v tumorju, je funkcijsko slabše razvito od prvotnega ožilja, ker v stenah nima razvitih gladkih mišičnih vlaken in ni oživčeno, zato se na primer slabše odzove na vazodilatatorje [20].

Do kliničnega diagnosticiranja hipoksije oziroma hiperoksije pride z večino uveljavljenih metod in v večini primerov relativno pozno; pravzaprav gre pri tem za ugotavljanje posledic hipoksije in hiperoksije, ko je za učinkovito posredovanje lahko že prepozno [32]. Standardne metode ugotavljanja oksigenacije, kot sta na primer merjenje vsebnosti plinov v arterielni krvi ali polarografično merjenje parcialnega tlaka kisika, so invazivne, drage in pogosto boleče. Poleg tega nam ne omogočajo kontinuiranega spremljanja dinamičnih sprememb, saj je njihov rezultat statična informacija, ki velja le v času, ko je opravljena meritev. Od tod torej izhaja velik pomen metod za neinvazivno spremljanje oksigenacije.

Zavedati se moramo, da različne metode ugotavljanja stanja prekrvitve in oksigenacije ne dajejo enakovrednih rezultatov, ker lahko vzroki za pomanjkanje ali



višek kisika nastopajo na različnih fizioloških nivojih. Tako je lahko hipoksija na primer posledica povečane potrebe po kisiku v tkivu, premajhnega pretoka krvi, premajhne celotne vsebnosti kisika v krvi ali nizkega nasičenja krvi s kisikom. Poleg tega merilne metode delujejo na podlagi različnih fizikalnih principov in z nobeno od njih ne moremo zajeti vseh pojavov, povezanih s preskrbo s kisikom. Različne metode omogočajo merjenje parametrov oksigenacije v krvi, v medceličnem prostoru in na mitohondrijih v celicah. Vsaka od metod ima svoje prednosti in slabosti, zato je poznanje razlik med njimi ključnega pomena za uspešno diagnostiko. Za vse metode lahko nastopijo okoliščine, v katerih rezultati ne odražajo resničnega stanja, in sicer včasih do te mere, da te metode popolnoma odpovedo.

### **1.3 Namen študije**

V naši študiji smo uporabili štiri povsem različne metode za ugotavljanje stanja prekrvljenosti in oksigenacije tumorjev. Razlogov za to je bilo več. V prvi vrsti smo želeli zajeti čim bolj različne pokazatelje prekrvljenosti in oksigenacije, ker lahko s primerjavo rezultatov različnih metod, s katerimi merimo različne, vendar med seboj povezane parametre, bolje osvetlimo dogajanje kot z rezultati vsake metode posebej. Na drugem mestu smo imeli pred očmi preverjanje in ovrednotenje manj znanih in uveljavljenih metod z že uveljavljenimi, saj je to praktično edina pot za prodor novih tehnologij v širšo uporabo, še posebno pa to velja za metode, ki jim želimo utreti pot v klinično okolje.



## 2 OPTIČNA SPEKTROSKOPIJA TKIV

### 2.1 Razvoj metod optične spektroskopije tkiv

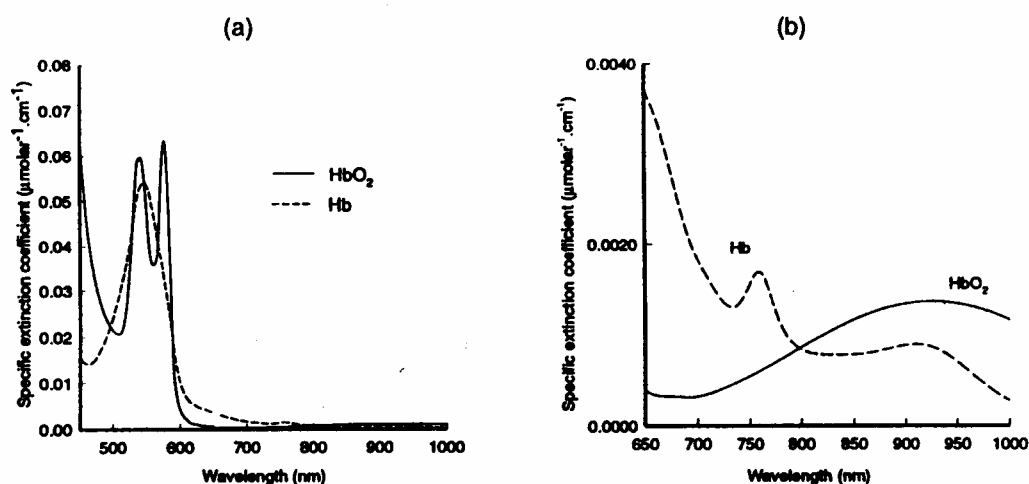
Zgodovinsko gledano je optična spektroskopija morda eden od najstarejših načinov za diagnosticiranje zdravstvenega stanja pri človeku [33]. Že od nekdaj so ljudje na podlagi barve kože in posameznih organov ali tkiv odkrivali bolezenska stanja. Barva kože se spreminja zaradi dogajanja v njej in pod njo. Elektromagnetno valovanje zunaj vidnega območja lahko prav tako nudi pomembno informacijo o stanju v organizmu, vendar si moramo pri zaznavanju takih signalov pomagati s tehniko.

Prvi dokumentirani primer klinične uporabe optične spektroskopije za merjenje oksigenacije je bil ušesni spektrometer, ki ga je leta 1942 razvil G.A. Millikan [34]. Z njim so merili spremembe v barvi kože na uhlju, ki so bile v dobri korelaciji z vsebnostjo nekaterih plinov v krvi. Nekoliko pozneje so ugotovili, da lahko ugotavljajo nasičenje arterialne krvi s kisikom z merjenjem absorpcije svetlobe pri dveh valovnih dolžinah in z dodatnim merjenjem arterialnega utripanja (pulzna oksimetrija). Leta 1977 je F. Jöbsis pokazal, da lahko z merjenjem absorpcije svetlobe pri več različnih valovnih dolžinah v bližnje-infrardečem območju neinvazivno ugotavljamo parametre oksigenacije celih organov [35]. Njegovi poskusi na možganih in srčni mišici mačk, pri katerih je meril parametre pretoka krvi, nasičenosti krvi s kisikom in transporta kisika v celice, veljajo za začetek razvoja biomedicinske bližnje-infrardeče spektroskopije (angl. *near-infrared spectroscopy - NIRS*).

## 2.2 Zakaj bližnje-infrardeča svetloba?

Svetloba v bližnje-infrardečem (angl. *near-infrared* - *NIR*) območju elektromagnetnega spektra je še posebno primerna za opazovanje tkiva, ker je njena vdorna globina veliko večja kot pri vidni svetlobi. Signal NIR svetlobe lahko zaznamo tudi tedaj, ko je med oddajnim in sprejemnim mestom do 8 centimetrov tkiva. Razlogi za to "prepustno okno" v NIR območju so optične lastnosti glavnih sestavnih delov tkiva. Človeško telo sestavlja okoli 70% vode in 20% maščob. Obe sestavini imata zelo podoben absorpcijski spekter. V ultravijoličnem območju voda in maščobe zelo močno absorbirajo svetlobo. Absorpcija je mnogo nižja v vidnem in NIR območju do valovne dolžine približno 1200 nm, ko postane zopet prevelika, da bi svetloba lahko prodirala v tkiva. V vidnem delu spektra močno absorbirajo tkivna barvila (kromofori), kot sta hemoglobin in mioglobin ter citokromi (encimi v stenah mitohondrijev). Njihova absorptivnost pa močno pade v NIR območju. Čeprav predstavljajo le majhen del tkiv, odločilno vplivajo na prepustnost tkiva za svetlobo, poleg tega pa njihove lastnosti omogočajo optično merjenje prekrvljenosti in oksigenacije [33].

Hemoglobin je rdeče barvilo, ki ga najdemo v rdečih krvnih celicah. Barvo mu dajejo štirje atomi železa, na katere se lahko reverzibilno vežejo molekule kisika. Tako lahko kisik s krvjo dospe v vsak del telesa. Hemoglobin močno absorbira svetlobo v vidnem delu spektra in tako preprečuje vidni svetlobi prodiranje v tkiva (slika 2.2.1a). Absorpcija močno pade v bližnje-infrardečem območju. Poleg tega imata oksigenirana in deoksigenirana oblika hemoglobina v tem območju različne absorpcijske spektre (slika 2.2.1b), kar omogoča detektiranje vsake oblike posebej. V mišičnih celicah najdemo barvilo mioglobin, ki služi kot "shramba" kisika v mišicah in omogoča, da se lahko aktivnost mišic po potrebi začasno in zelo hitro poveča [33]. Mioglobin ima zelo podobne absorpcijske lastnosti v bližnje-infrardečem delu spektra kot hemoglobin. Razmerje oksigeniranega in deoksigeniranega mioglobina in dinamika sprememb tega razmerja daje sliko o preskrbljenosti s kisikom in o fizični kondiciji mišic.



**Slika 2.2.1:** Absorpcijska spektra oksigeniranega ( $\text{HbO}_2$ ) in deoksigeniranega ( $\text{Hb}$ ) hemoglobina [36]. Na sliki b) je v drugačnem merilu predstavljen desni del slike a) (valovne dolžine od 650 nm naprej).

Kar 95% kemične energije, ki je potrebna za normalno delovanje celic, nastane ob oksidacijski razgradnji visokoenergetskih hranilnih snovi (na primer glukoze). Pri tem iz anorganskih fosfatov in molekul adenozin difosfata nastajajo molekule adenozin trifosfata (ATP), ki so vir energije za procese, kot so mehansko gibanje, aktivni transport snovi in sinteza za življenje organizma potrebnih snovi. ATP lahko nastaja tudi brez prisotnosti kisika ob razgradnji glukoze z glikolizo, vendar tedaj dobimo za vsako razgrajeno molekulo glukoze le 2 molekuli ATP, medtem ko jih z razgradnjo ob prisotnosti kisika nastane kar 36 [37]. Za energetske zahtevne procese je zato oksidacijski metabolizem glukoze nenadomestljiv vir energije. V kemijskih reakcijah, povezanih z oksidacijskim metabolizmom glukoze, sodelujejo kot katalizatorji različni encimi, ki se nahajajo na notranji membrani mitohondrijev in tvorijo tako imenovano dihalno verigo, vzdolž katere se prenašajo elektroni, ki v zaključni fazi reducirajo molekularni kisik. Za nas so zaradi optičnih lastnosti najbolj zanimivi encimi citokromi. Ti zaradi sprejemanja in oddajanja elektronov prehajajo iz reduciranega v oksidirano stanje in obratno. Vsi citokromi imajo zelo podobne absorpcijske lastnosti in ker vsi vsebujejo kemično skupino "hem" (tako kot hemoglobin), imajo predvsem v ultravijoličnem in vidnem delu spektra podobne lastnosti kot hemoglobin. Poseben primer pa je citokrom-c-oksidadza (ali citokrom aa3), ki nastopa v zadnjem členu dihalne verige in vsebuje dva atoma bakra, ki sodelujeta pri prenosu elektronov v dihalni verigi. Zaradi enega od njiju izkazuje oksidirani citokrom aa3 v bližnje-infrardečem območju šibek lokalni maksimum v absorpciji, kar omogoča detektiranje sprememb v redoks stanju tega citokroma (razmerje med koncentracijama reduciranega in oksidiranega citokroma) s pomočjo optične spektroskopije [37].

Teoretično lahko v živem tkivu z metodo bližnje-infrardeče spektroskopije (NIRS) ugotovljamo spremembe v koncentracijah vseh naštetih kromoforov z merjenjem sprememb v absorpciji svetlobe pri določenih valovnih dolžinah. Ker se njihove absorpcijske lastnosti spreminjajo z oksidacijo in redukcijo oziroma z oksigenacijo in deoksidacijo, nam lahko podatki o spremembah koncentracij posameznih oblik kromoforov dajo pomembno informacijo o transportu kisika na nivoju pretoka krvi (hemoglobin) ter o njegovi dostopnosti in porabi v celicah (mioglobin in citokrom aa3). Metoda je bila prvotno razvita za spremljanje oksigenacije možganov s ciljem detekcije bolezenskih stanj pri normalno in pri prezgodaj rojenih novorojencih [34, 37, 38], vendar jo teoretično lahko uporabimo na katerem koli tkivu, ki vsebuje zadostne količine naštetih kromoforov in katerega optične lastnosti dovolj dobro poznamo. Z metodo NIRS je mogoče detektirati nastajajoče stanje celične hipoksije še preden se pojavijo značilni klinični simptomi.

## 2.3 Fizikalno ozadje tkivne spektroskopije

Svetloba je neionizirno elektromagnetno valovanje valovnih dolžin med približno  $10^{-9}$  in  $10^{-3}$  m. V grobem lahko ta del spektra razdelimo na ultravijolično ( $\lambda \approx 1 - 380$  nm), vidno ( $\lambda \approx 380 - 780$  nm) in infrardečo ( $\lambda \approx 730$  nm - 1 mm) svetlobo [39]. Pri teoretični obravnavi razširjanja svetlobe lahko seveda izhajamo iz osnovne teorije elektromagnetnega polja, ki jo zapišemo z Maxwellovimi enačbami, vendar pogosto naletimo na tako zapletene probleme, da ta pristop odpove. To še posebej velja za

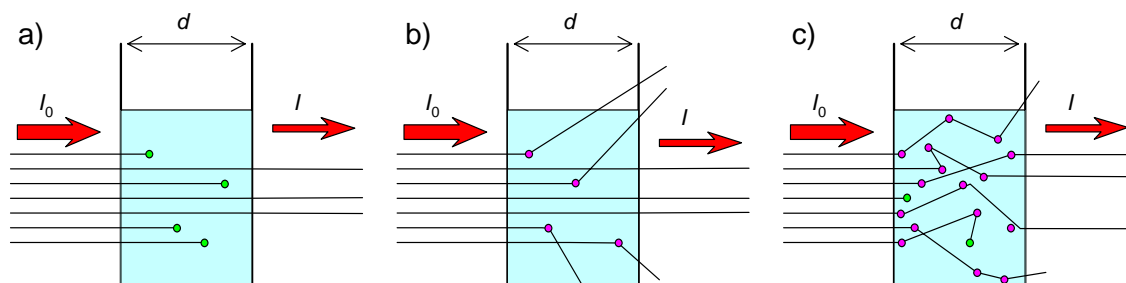
razširjanje svetlobe v mediju, kjer zaradi velike gostote delcev (nehomogenosti lomnih količnikov) prihaja do večkratnega sipanja svetlobe. Zelo značilen primer za medij, v katerem pred vsemi pojavi prevladuje večkratno sipanje svetlobe, je biološko tkivo.

Zgodovinsko gledano so se problemov večkratnega sipanja v mediju lotevali na dva različna načina. Prvi, analitični pristop, izhaja iz osnovnih enačb elektromagnetnega polja, kot so splošno znane Maxwellove in valovna enačba, iz katerih lahko ob upoštevanju lastnosti sipanja in absorpcije svetlobe pridemo do nove sisteme enačb, ki matematično korektno vključujejo pojave, kot so večkratno sipanje, uklon in interferenca. V praksi je tovrstni analitični zapis največkrat neizvedljiv, zato se avtorji zatekajo k različnim poenostavitvam (približnim teorijam), ki vsaka daje koristne rezultate le za ozko omejeno območje uporabe [40].

Drugi pristop, tako imenovana *transportna teorija* (angl. *transport theory*), pa ne izhaja iz opisa razširjanja svetlobe kot elektromagnetnega valovanja, ampak se ukvarja s transportom energije v mediju, ki vsebuje delce. V obliki, kot jo poznamo danes, jo je pod imenom *teorija sevalnega prenosa* (angl. *radiative transfer theory*) zapisal Chandrasekhar [41], čeprav so njeni začetki še zgodnejši [40]. Osnovna enačba te teorije, imenovana *enačba prenosa* (angl. *equation of transfer*) ali *transportna enačba*, je po obliki enaka Boltzmannovi enačbi iz kinetične teorije plinov. Enačbo so veliko uporabljali za reševanje različnih fizikalnih problemov, predvsem pri prenosu sevalne energije v različnih medijih, od atmosfer planetov, zvezd in galaksij, do biološkega tkiva.

Oba pristopa (analitična teorija in transportna teorija) imata različni izhodišči, čeprav obravnavata iste probleme. Pokazati se da, da med nekaterimi veličinami ene in druge obstajajo matematične povezave [40].

Za slabljenje svetlobnega toka v tkivu sta odgovorna dva procesa — absorpcija in sipanje elektromagnetnega valovanja [33, 36]. Oba sta odvisna od valovne dolžine svetlobe in od optičnih lastnosti opazovanega medija. Teoretična obdelava pojavov, povezanih z interakcijo med svetlobo in tkivom, skozi katerega se širi svetloba, je odvisna od razmerja prispevkov absorpcije in sipanja k slabljenju signala in je na splošno izredno zapletena. V bioloških tkivih sicer močno prevladuje sipanje [33], z metodo bližnje-infrardeče spektroskopije pa merimo spremembe v absorpciji.



**Slika 2.3.1:** Slabljenje svetlobnega toka (intenzitete) v dani smeri zaradi absorpcije (a), enkratnega sipanja (b) in večkratnega sipanja ter absorpcije (c).

### 2.3.1 Absorpcija svetlobe

Intenziteta svetlobe v dani smeri v mediju, ki absorbira, pojema po eksponencialnem zakonu (slika 2.3.1a) [36]:

$$I(d) = I_0 \cdot e^{-\mu_a \cdot d} . \quad (2.1)$$

Veličini  $I_0$  in  $I$  sta intenziteta svetlobe (enota  $\text{Wm}^{-2}$ ) na mestu vstopa svetlobe v medij in na mestu, kjer svetlobo zaznavamo na razdalji  $d$  (enota cm) od vstopnega mesta. Konstanta  $\mu_a$  (enota  $\text{cm}^{-1}$ ) je absorpcijski koeficient raztopljenega absorberja. Slabljenje je posledica pretvarjanja svetlobne energije v toplotno energijo absorberja in ga lahko izrazimo kot:

$$A_n = \ln \frac{I_0}{I} = \mu_a \cdot d . \quad (2.2)$$

Če namesto naravnega logaritma uporabimo desetiški logaritem, pridemo do zapisa, ki je osnovna enačba algoritmov, ki jih uporabljamo pri analizi signalov, dobljenih s pulzno oksimetrijo in z najpreprostejšo izvedenko metode NIRS:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \alpha \cdot c \cdot d . \quad (2.3)$$

Slabljenje  $A$  (enota optična gostota OD - angl. *optical density*) pove, za koliko velikostnih razredov se je zmanjšala intenziteta svetlobe zaradi absorpcije. V enačbi 2.3 nastopata specifični koeficient slabljenja  $\alpha$  (enota  $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) in koncentracija raztopljenega absorberja  $c$  (enota  $\mu\text{M}$ ), ki sta bila v enačbi 2.2 skrita v absorpcijskem koeficientu  $\mu_a$ . Slabljenje je sorazmerno koncentraciji absorberja. Če imamo opravka z  $n$  absorberji, zapišemo enačbo 2.3 kot:

$$A = \left( \sum_{i=1}^n \alpha_i \cdot c_i \right) \cdot d . \quad (2.4)$$

### 2.3.2 Sipanje svetlobe

Svetlobni signal v tkivu oslabi bolj, kot bi pričakovali samo od absorpcije [33, 36]. To je posledica dejstva, da posamezni fotoni spreminjajo smer potovanja v mediju zaradi trkov ob različne delce. V bioloških tkivih so trki fotonov z delci večinoma elastični, kar pomeni, da fotoni ob trkih ne izgubljajo kinetične energije, temveč le spremenijo smer potovanja. Sipanje je dejansko posledica razlik v lomnih količnikih med posameznimi sestavinami tkiva [33]. Za enkratno sipanje lahko enačbo za slabljenje svetlobnega toka zapišemo podobno kot za absorpcijo:

$$A_n = \ln \frac{I_0}{I} = \mu_s \cdot d . \quad (2.5)$$

Ta enačba je veljavna le za enkratno sipanje, za primer torej, ko vsak foton spremeni smer potovanja kvečjemu enkrat (slika 2.3.1b). V realnih razmerah v tkivu prihaja do večkratnih trkov fotonov z delci. V tem primeru slabljenje zaradi sipanja ni več enostavno sorazmerno  $\mu_s$ , marveč postane funkcija geometrije predmeta, po katerem se širi svetloba. Del fotonov se po večkratnih odbojih lahko vrne v območje prvotnega snopa svetlobe (slika 2.3.1c).

Zaradi heterogene sestave vseh bioloških tkiv je matematična obravnava in modeliranje prenosa svetlobe skozi tkiva zelo zapleten problem, ki se mu ne moremo izogniti, če želimo ovrednotiti meritve, dobljene s katero koli obliko optične spektroskopije. Pogosto za modeliranje transporta svetlobe v tkivih uporabljamo metodo Monte Carlo.

### 2.3.3 Slabljenje svetlobe v tkivu

Videli smo, da intenziteta svetlobe v izbrani smeri pri potovanju skozi snov slabi zaradi absorpcije in sipanja. V tkivih predstavlja sipanje več kot 90% celotnega slabljenja signala v dani smeri [36]. To je največja težava pri kvantifikaciji meritev. Zaradi večkratnega sipanja moramo upoštevati dodatno slabljenje, iz istega razloga pa je srednja dolžina poti fotonov, ki jih detektiramo, bistveno daljša od fizične razdalje med oddajnim in sprejemnim mestom. To dejansko povprečno optično pot, imenovano diferencialna dolžina poti  $\beta$  (enota cm), definiramo kot:

$$\beta = B \cdot d . \quad (2.6)$$

Pri tem je  $B$  faktor diferencialne dolžine optične poti (FDDOP), s katerim množimo fizično razdaljo med oddajnim in sprejemnim mestom. Tako pridemo na enačbo tako imenovanega modificiranega Beer-Lambertovega zakona, ki opisuje slabljenje svetlobe v tkivu:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \alpha \cdot c \cdot B \cdot d + G . \quad (2.7)$$

V členu  $G$  (enota OD) so skriti vsi "neobvladljivi" prispevki k slabljenju:

- učinek sipanja;
- absorpcijske izgube neidentificiranih absorberjev;
- izgube svetlobe zaradi prehajanja svetlobe prek mej med sredstvi z različnimi lomnimi količniki, pri čemer pride do odboja dela svetlobe.

Ker je člen  $G$  neznanka, po enačbi 2.7 ne moremo izračunati absolutne koncentracije  $c$  iz izmerjenega slabljenja  $A$ . Pri predpostavki, da so vse spremenljivke, zajete v  $G$ , v času opazovanja nespremenljive in da se spreminja le koncentracija opazovanega kromofora, lahko spremembo slabljenja zapišemo kot:

$$\Delta A = \alpha \cdot \Delta c \cdot B \cdot d . \quad (2.8)$$



Če imamo opravka z  $n$  različnimi absorberji in če merimo slabljenje svetlobe pri  $n$  različnih valovnih dolžinah svetlobe, preide enačba 2.8 v matrično obliko, iz katere lahko po invertiranju izrazimo spremembe v koncentracijah kromoforov s spremembami v slabljenju svetlobe pri različnih valovnih dolžinah. Z metodo NIRS opazujemo spremembe v koncentracijah oksigeniranega in deoksigeniranega hemoglobina ( $HbO$  in  $HbR$ ) ter nivoja oksigenacije encima citokrom-c-oksidge ( $Cyt$ ). Osnovna enačba algoritmov v inštrumentih za NIRS se zato glasi ( $\lambda_i$  so valovne dolžine uporabljene svetlobe):

$$\begin{bmatrix} \Delta c_{HbO} \\ \Delta c_{HbR} \\ \Delta cyt \end{bmatrix} = \frac{1}{d} \cdot \begin{bmatrix} a_{HbO}(\lambda_1) & a_{HbO}(\lambda_2) & a_{HbO}(\lambda_3) \\ a_{HbR}(\lambda_1) & a_{HbR}(\lambda_2) & a_{HbR}(\lambda_3) \\ a_{cyt}(\lambda_1) & a_{cyt}(\lambda_2) & a_{cyt}(\lambda_3) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \Delta A(\lambda_1) \\ \Delta A(\lambda_2) \\ \Delta A(\lambda_3) \end{bmatrix}. \quad (2.9)$$



## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Tumorski model

Pri preučevanju vplivov elektroterapije s šibkim enosmernim električnim tokom na parametre oksigenacije in prekrvitve tumorjev smo uporabili dva različna tumorska modela, na katerih smo v preteklosti že opravili obsežne druge raziskave [8, 9, 13]. To sta bila fibrosarkom Sa-1 na miših A/J in fibrosarkom LPB na miših C57Bl/6. Obe vrsti miši imata normalno razvit imunski sistem. Uporabljali smo zdrave živali obeh spolov, ki so bile ob času nasaditve tumorjev stare med 8 in 12 tednov. Naselili smo jih v standardne kolonije in jih hranili *ad libitum*.

Čvrste podkožne tumorje obeh celičnih linij smo pridobili z nasaditvijo približno  $5 \cdot 10^5$  (linija Sa-1) oziroma  $1 \cdot 10^6$  (linija LPB) živih celic v suspenziji s fiziološko raztopino (0.9% NaCl). Celice so bile injicirane v podkožje približno na sredini desnega boka živali. Celice za nasaditev smo pridobili bodisi iz ascitične oblike tumorjev (Sa-1) ali iz celične kulture *in vitro* (Sa-1 in LPB) [42, 43].

Poskuse smo izvedli, ko so tumorji dosegli velikost med 50 in 100 mm<sup>3</sup>. Uporabljena tumorska modela imata zelo različno dinamiko rasti [8, 13]. Tumorji Sa-1 so želeno velikost dosegli v približno 8 do 10 dneh, tumorji LPB pa v približno 15 do 25 dneh. Velikost tumorjev  $V$  smo ocenili po formuli za elipsoid  $V = \pi abc/6$ , pri čemer so  $a$ ,  $b$  in  $c$  trije medsebojno pravokotni premeri tumorja izmerjeni s pomičnim kljunastim merilom. Za meritve z metodo NIRS smo dlako z merilnih mest odstranili s kemičnim depilacijskim sredstvom en dan pred meritvijo, zato da se je iritacija kože, ki bi sicer vplivala na mikrocirkulacijo v koži, do meritve že polegla.

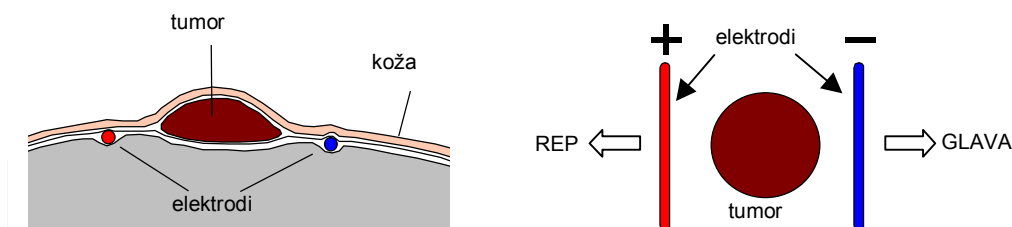
Poskusi na živalih so bili opravljeni po vnaprejšnji odobritvi pristojnih organov v Sloveniji, Veliki Britaniji, Nemčiji in Franciji. Vsi postopki ravnanja z živalmi so bili v skladu z zakonodajo omenjenih držav za ravnanje s poskusnimi živalmi.

## 3.2 Elektroterapija

V vseh študijah smo izvedli elektroterapijo z enosmernim električnim tokom (DC-ET) po ustaljenem protokolu iz prejšnjih študij učinka tovrstne terapije na rast tumorjev [7, 8]. Jakost električnega toka, je bila med 0,3 in 0,9 mA, trajanje terapije pa med 30 in 60 minut. Električni tok smo dovedli prek para igelnih elektrod premera 1 mm in dolžine približno 2 cm iz zlitine platine in iridija (Pt/Ir 90/10%). Elektrode so imele gladko zaobljene konice, da smo se izognili velikim tokovnim gostotam ob ostrih robovih. Jakost toka ob vklopu in izklopu DC-ET smo postopoma večali na končno vrednost.

Par elektrod je bili nameščen v tako imenovani konfiguraciji "polje", kar pomeni, da sta se obe elektrodi nahajali zunaj tumorja. Skozi drobne odprtine v koži, narejene z injekcijsko iglo premera 1,2 mm, sta bili vstavljeni vzporedno v podkožje na dveh nasprotnih straneh tumorja. Tumor se je tako nahajal na sredini med obema elektrodama na razdalji 5 mm ali več od vsake elektrode. Pozitivna elektroda (anoda) je bila vedno nameščena na repni (kaudalni) strani tumorja, negativna (katoda) pa na strani proti glavi (kranialno). Slika 3.2.1 shematično prikazuje namestitvev elektrod.

Vse živali v kontrolnih skupinah, katerih tumorji niso bili tretirani z elektroterapijo, so bile obravnavane na enak način kot živali v skupinah z elektroterapijo, le da električni tok ni bil vključen.



**Slika 3.2.1:** Položaj elektrod glede na podkožni tumor za elektroterapijo pri namestitvi elektrod v konfiguraciji "polje".

### Poimenovanje eksperimentalnih skupin živali

Eksperimentalne skupine živali označujemo v nadaljevanju po enotni nomenklaturi, iz katere je razvidno, za kateri tumorski model je šlo, in kakšna terapija je bila izvedena na tumorju, in sicer:

- tumor LPB na črnih (Black) miših C57Bl/6
  - B0.0/00 kontrola: tok 0,0 mA, trajanje 00 min;
  - B0.6/30 DC-ET: tok 0,6 mA, trajanje 30 min;

B0.6/60 DC-ET: tok 0,6 mA, trajanje 60 min;

- tumor Sa-1 na belih (White) miših A/J
  - W0.0/00 kontrola: tok 0,0 mA, trajanje 00 min
  - W0.6/30 DC-ET: tok 0,6 mA, trajanje 30 min
  - W0.6/60 DC-ET: tok 0,6 mA, trajanje 60 min
  - W0.9/60 DC-ET: tok 0,9 mA, trajanje 60 min
  - W0.3/60 DC-ET: tok 0,3 mA, trajanje 60 min

### 3.3 Anestezija poskusnih živali

Anestezija poskusnih živali med poskusi je bila potrebna iz več razlogov. Prvi cilj je bil minimizacija stresa živali zaradi elektroterapije, ki je bila relativno dolgotrajna, in bi kljub le lokalni invazivnosti povzročila nepotrebno bolečino. Pri meritvah  $pO_2$  s polarografično metodo in pri vseh meritvah z bližnje-infrardečo spektroskopijo pa je bila za kakovostno meritev potrebna tudi dolgotrajna (tudi več kot dve uri trajajoča) imobilizacija in negibnost merilnega mesta - tumorja, kar smo lahko zagotovili le z anestezijo.

Živali smo anestezirali bodisi z enfluranom ali isofluranom. Oba sta klinično uveljavljena inhalacijska anestetika s podobnim vplivom na stanje organizma. Oba zagotavljata hiter nastop potrebne anestezije in analgezije ter zelo hitro zbujanje živali po prekinitvi dovajanja. Stranski učinki so minimalni [44]. V večini poskusov smo ju dovajali v plinski mešanici kisika  $O_2$  in dušikovega oksidula  $N_2O$  v volumskem razmerju 50%/50%. Pri poskusih z metodo NIRS (inštrument OS30) in z metodo polarografičnega merjenja  $pO_2$  je bila plinska mešanica karbogen (5%  $CO_2$  in 95%  $O_2$ ). Ker smo uporabili odprt respiratorni krog za dovajanje anestetika, je bil potreben pretok plina skozi miniaturno masko med 1 in 1,5 l/min. Začetna koncentracija enflurana ali izoflurana med indukcijo anestezije je bila med 3 in 3,5%. V času 3 do 5 minut po začetku anestezije smo koncentracijo znižali na končno vrednost 1,5 do 2%, kar je bilo dovolj za ohranjanje dolgotrajne in stabilne anestezije med meritvijo.

Med anestezijo so bile živali imobilizirane na grelni plošči, s katero smo poskrbeli za stalno telesno temperaturo živali. Zaradi anestezije bi v nasprotnem primeru zelo hitro prišlo do močne podhladitve živali. Avtomatska regulacija gretja je zagotavljala rektalno temperaturo v območju 37 - 38°C, kar je normalna fiziološka temperatura za miši, pri čemer temperatura grelne površine ni smela preseči 40°C.

Pri poskusih z metodo NIRS (inštrument OS30) in z metodo polarografičnega merjenja  $pO_2$  smo meritve opravili štiri ure po koncu elektroterapije DC-ET oziroma štiri ure po "lažni" terapiji na kontrolnih živalih. Živali so si v teh štirih urah opomogle od dolgotrajnejše anestezije med terapijo. Po preteklem intervalu štirih ur smo živali ponovno anestezirali za meritev. Na večini teh živali smo opravili tako meritve NIRS kot  $pO_2$ . Deset minut po začetku anestezije smo najprej na več merilnih mestih na tumorju, v neposredni okolici tumorja in na stegenski mišici izvedli meritve z inštrumentom NIRS, deset minut kasneje pa smo začeli z merjenjem  $pO_2$  v tumorju.

## 3.4 Bližnje-infrardeča spektroskopija

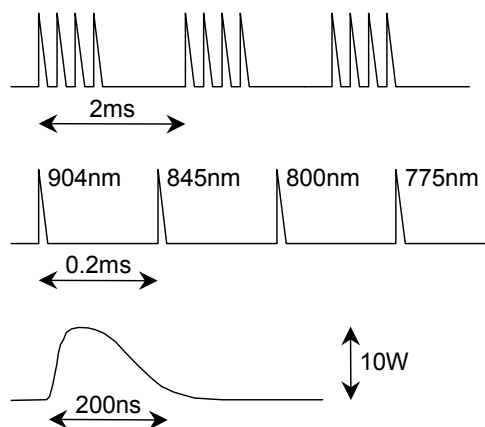
V dveh ločenih študijah smo za merjenje parametrov prekrvitve in oksigenacije tumorjev uporabili dva povsem različna inštrumenta za bližnje-infrardečo spektroskopijo. V eni (poskusi so bili opravljene na Onkološkem inštitutu v Ljubljani in na Keele University v Veliki Britaniji) smo uporabili spektrofotometer NIRO<sub>2</sub>X-2, v drugi pa inštrument OS30 (poskusi na Universitätsklinikum Essen v Nemčiji). Inštrumenta se razlikujeta po principu delovanja, načinu uporabe in izmerjenih veličinah.

### 3.4.1 Merjenje z inštrumentom NIRO<sub>2</sub>X-2

#### *Inštrumentacija*

Za neprekinjeno merjenje parametrov prekrvitve in oksigenacije v tumorjih pred, med in takoj po elektroterapiji (DC-ET) smo uporabili inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2 (Keele University, Stoke-on-Trent, Velika Britanija). Inštrument je namenjen eksperimentalnemu delu na živalih in klinični uporabi, saj zadošča predpisom za varno uporabo na ljudeh [45]. Po načinu delovanja spada v skupino metod NIRS, pri katerih merimo samo slabljenje svetlobe pri več valovnih dolžinah, kar omogoča izračun sprememb koncentracij kromoforov od začetnega nivoja, ne pa tudi absolutnih koncentracij (enačba 2.9 v prejšnjem poglavju).

Bližnje-infrardečo svetlobo generirajo štiri polprevodniške laserske diode z nazivnimi valovnimi dolžinami 775, 800, 845 in 904 nm (razred laserjev 3B). Spektralna širina izsevane svetlobe med točkama 50% jakosti je 3,5 nm. Diode prožimo zaporedno v pulzih (slika 3.4.1). Maksimalna moč izsevane svetlobe posameznega pulza, ki traja 200 ns, je 10W. Zamik med pulzi posameznih diod je 200 μs, ponavljalna frekvenca proženja vsake diode pa 500 Hz, tako da povprečje izsevane moči ne presega 4 mW. Delovanje inštrumenta v celoti nadziramo z računalnikom preko serijska RS232 povezave, ki je izvedena optično. Tako je zagotovljena galvanska ločenost med viri omrežne napetosti in inštrumentom, ki ga v kliničnem okolju napaja izolacijski transformator.



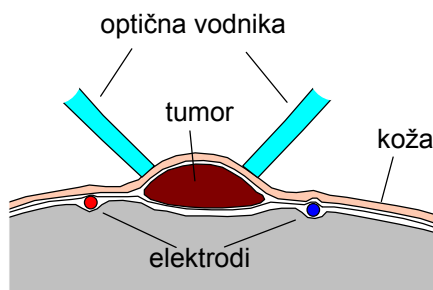
**Slika 3.4.1:** Časovno zaporedje proženja laserskih diod v inštrumentu NIRO<sub>2</sub>X-2.

Svetlobo laserskih diod vodimo do objekta opazovanja po oddajnem snopu optičnih vlaken. S sprejemnim snopom zbiramo svetlobo, ki je presvetlila dani objekt, in jo vodimo do sprejemnega modula. Tu z nizko pasovnim optičnim filtrom najprej odstranimo vidni del svetlobe iz okolice. Plazovna fotodioda je detektor svetlobe. Predojačevalnik pretvori tok fotodiode v napetostni signal, ki je nato še dodatno ojačen. To ojačenje, kot tudi izhodno moč laserskih diod, lahko nastavljamo glede na potrebe. Signal vodimo preko multiplekserja na A/D pretvornik in od tod v krmilni računalnik. Računalniški program avtomatsko krmili delovanje oddajnega in sprejemnega modula inštrumenta, zajema in shranjuje podatke ter sprotno izrisuje merjene veličine. S sprotnim povprečevanjem določenega števila vzorcev izločimo del šuma v signalu še pred preračunavanjem sprememb slabljenja svetlobe pri izbranih štirih valovnih dolžinah v spremembe koncentracij kromoforov.

### *Izvedba meritev*

V študiji, ki smo jo izvedli na Keele University v Veliki Britaniji, smo prvotno uporabljali dva inštrumenta NIRO<sub>2</sub>X-2, pri čemer smo z enim spremljali dogajanje v tumorju, drugi pa je rabil za hkratno spremljanje dogajanja v normalnem mišičnem tkivu na stegnu ali v možganih. S tem smo hoteli ugotoviti, ali lokalna terapija tumorja vpliva na prekrvitev v drugih tkivih (mišica ali možgani), ki niso neposredno izpostavljena električnemu toku. Potrjena je bila predpostavka, da ni učinka v tkivih, ki niso izpostavljena DC-ET [46], zato smo v nadaljevanju opustili merjenje v mišici in možganih.

Sprejemni in oddajni optični vodnik (optodi) sta bila pritrjena na mikromanipulator, s katerim smo optična vodnika pripeljali do merilnega mesta. Optodi sta bili prislonjeni ob kožo na tumorju, kot kaže slika 3.4.2. Zaradi majhnih dimenzij merilnega objekta optod ni bilo možno pritrditi na telo živali. Zato so bile meritve zelo občutljive na vse premike tkiva, ki se jim v celoti nismo mogli izogniti kljub anesteziji. Z meritvijo smo začeli približno 10 minut po začetku anestezije in vstavitvi elektrod. Vedno smo počakali, da se je stanje anesteziranih živali ustalilo in da smo vsaj 10 minut zajemali stabilen signal, preden smo vključili DC-ET. Meritev je bila zaključena 15 minut po koncu terapije z DC-ET.



**Slika 3.4.2:** Položaj optičnih vodnikov na tumorju za meritve z inštrumentom NIRO<sub>2</sub>X-2.

### *Uporabljene eksperimentalne skupine živali*

B0.0/00	tumor LPB na miših C57Bl/6; kontrola (N=13)
B0.6/60	tumor LPB na miših C57Bl/6; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 60 min (N=28)
W0.0/00	tumor Sa-1 na miših A/J; kontrola (N=11)
W0.6/60	tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 60 min (N=21)

## 3.4.2 Merjenje z inštrumentom OS30

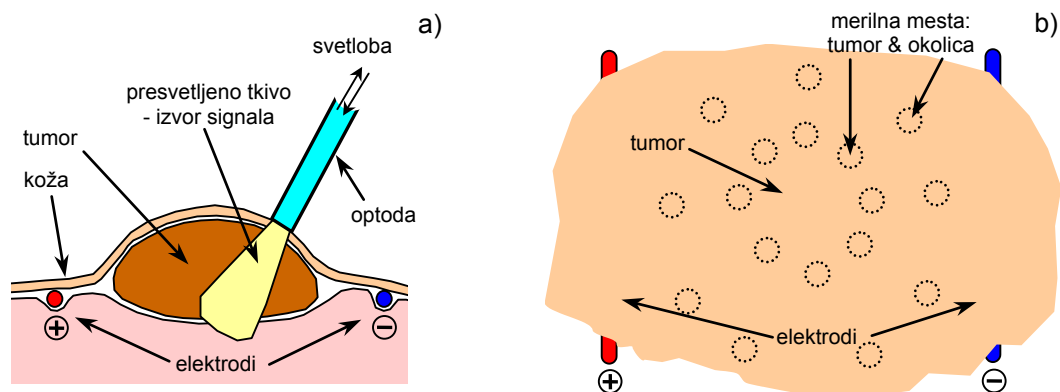
### *Inštrumentacija*

Inštrument OS30 (NIOS GmbH, Essen, Nemčija) je tako kot njegova predhodnika OS10 in OS20 naprava povsem svojega tipa iz družine inštrumentov za bližnje-infrardečo spektroskopijo tkiv. Od drugih klasičnih in že uveljavljenih oblik metode NIRS se razlikuje predvsem po principu delovanja in merilnih zmožnostih, ki naj bi jih omogočal, saj naj bi bilo z njim mogoče meriti absolutne vrednosti koncentracij različnih oblik hemoglobina in citokromov, kar je še danes največji izziv razvijalcev inštrumentacije za metodo NIRS. Uporabe tega inštrumenta smo se lotili z veliko previdnostjo in predvsem iz radovednosti, ker smo želeli primerjati rezultate OS30 z rezultati drugih metod, predvsem pa z rezultati klasičnega inštrumenta za NIRS NIRO<sub>2</sub>X-2.

Opis delovanja, ki sledi, je v celoti povzet po navodilih za uporabo OS30 [47]. OS30 deluje v tako imenovanem odbojnem načinu delovanja. Belo svetlobo, ki jo generira halogenska žarnica (moč 8 W), fokusira in prenese do tkiva kvarčno optično vlakno. Svetlobo, ki na istem mestu pride nazaj iz tkiva, druga optična vlakna vodijo do modula za zajemanje in analizo signala. Najprej uklonska mrežica razbije sprejeto svetlobo v razponu valovnih dolžin med 500 in 1000 nm na posamezne spektralne komponente z resolucijo manj kot 1 nm, ki jih detektira občutljiva CCD kamera. Vzorcna frekvenca za zajemanje celotnega spektra je 1000 Hz. Podrobnosti fizikalnega principa, na katerem je zasnovan algoritem za obdelavo signalov pri OS30, niso znane, ker jih proizvajalec zaradi uveljavljanja patentnih pravic še vedno ljubosumno skriva. Razvili so poseben fizikalno-matematični model, v katerem je izvedena primerjava med *"spektralno porazdelitvijo entropije zaznanih fotonov"* in kalibracijskimi spektri (tako imenovanimi *prstnimi odtisi*) za vse merjene veličine, ki so koncentracije kromoforov (hemoglobini in citokrom aa3). Tak način merjenja naj bi omogočal sproten izračun absolutnih vrednosti koncentracij kromoforov. Inštrument je v ta namen opremljen z visokozmogljivim računalniškim sistemom.

Pri vseh različicah metode NIRS je eno od vprašanj vedno tudi volumen in oblika dela tkiva, iz katerega izvira signal. Pri inštrumentu OS30, ki deluje v odbojnem načinu delovanja, je optični vodnik (optoda) en sam. V njem je na sredini eno oddajno optično vlakno in več sprejemnih optičnih vlaken, ki so koncentrično razporejena okoli oddajnega. Signal naj bi zato izviral iz dela tkiva oblike prisekanega stožca z zgornjim premerom ob optodi 1 mm, spodnjim premerom približno 3 mm in višino 4 mm (slika 3.4.3a). Volumen tako objetega tkiva je približno 13  $\mu$ l [47].





**Slika 3.4.3:** Namestitve kombiniranega optičnega vodnika na tumor za meritve z inštrumentom OS30. a) shematični prikaz namestitve v prerezu; b) merilna mesta na tumorju in v njegovi neposredni okolici.

Naprava podaja izmerjene vrednosti s frekvenco 1 Hz. V našem primeru so to koncentracije oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR) in skupnega (HbT) hemoglobina ter nasičenost hemoglobina s kisikom (Sat). Arterijalna nasičenost hemoglobina s kisikom je klinično pomemben podatek. Merijo jo s pulzno oksimetrijo. Metoda NIRS ne loči med arterielno, venozno in kapilarno krvjo, zato moramo podatek o nasičenosti hemoglobina s kisikom razumeti kot povprečje za celotno kri v presvetljenem tkivu.

### *Izvedba meritev*

Meritve parametrov prekrvitve in oksigenacije z inštrumentom OS30 (HbO, HbR, HbT in Sat) smo opravili 4 ure po koncu elektroterapije. Z meritvijo smo začeli 10 minut po začetku anestezije. Na treh anatomskih lokacijah pri vsaki živali smo v naslednjem vrstnem redu izvedli več meritev:

- tumor (7 - 14 merilnih mest);
- neposredna okolica tumorja med elektrodama - normalno tkivo (7 - 14 merilnih mest);
- stegenska mišica na levi nogi (tumor je na desnem boku) (5 - 8 merilnih mest).

S kože nad mestom, kjer smo želeli opraviti meritve, smo s kemičnim depilacijskim sredstvom en dan pred meritvijo odstranili vso dlako. Na vsakem anatomskem mestu smo izvedli več neodvisnih meritev, s katerimi smo želeli pokriti čim večji del tkiva. Za tumor in njegovo okolico to shematsko prikazuje slika 3.4.3b. Optični vodnik je bil pritrjen na mehanično roko, s katero smo konico optode prislonili ob tkivo. Trudili smo se, da je bil kot med površino kože in optodo 90 stopinj in da je bil pritisk na tkivo čim manjši in vedno enak, ker pritisk na tkivo lahko spremeni mikrocirkulacijo in povzroči lokalni zažem žil. Zajemanje podatkov na posameznem merilnem mestu je trajalo 10 - 15 sekund (10 - 15 vzorcev). Celoten cikel meritev na vseh treh anatomskih lokacijah na posamezni živali s skupno približno 25 merilnimi

mesti s po 10 - 15 sekundami za vsako merilno mesto in s časom, potrebnim za premik z enega mesta na drugo, je tako zahteval približno 10 minut.

### *Eksperimentalne skupine živali*

B0.0/00	tumor LPB na miših C57Bl/6; kontrola (N=8)
B0.6/30	tumor LPB na miših C57Bl/6; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 30 min (N=7)
B0.6/60	tumor LPB na miših C57Bl/6; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 60 min (N=6)
W0.0/00	tumor Sa-1 na miših A/J; kontrola (N=10)
W0.6/30	tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 30 min (N=5)
W0.6/60	tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 60 min (N=7)
W0.9/60	tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,9 mA, trajanje 60 min (N=6)
W0.3/60	tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,3 mA, trajanje 60 min (N=4)

### 3.4.3 Simulacija z metodo Monte Carlo

Metode Monte Carlo so statistične metode, ki so zasnovane na teoriji verjetnosti. Ena od možnih oblik uporabe teh metod je modeliranje transporta delcev v mediju. V simulaciji Monte Carlo sledimo potovanju vseh generiranih delcev skozi medij. Gre za približno, stohastično simulacijo determinističnega sistema. Uporabljamo jo takrat, ko ne znamo, ali pa je pretežko najti analitično rešitev danega problema. S simulacijo Monte Carlo lahko odgovorimo na vprašanja o območju razširjanja delcev, o povprečni dolžini poti delcev ter o porazdelitvi dolžin poti posameznih delcev. Končne rezultate dobimo s povprečenjem vrednosti vseh simuliranih eksperimentov, kar pomeni, da se statistična napaka manjša s kvadratnim korenom števila generiranih poskusov. Največja prednost metod Monte Carlo je enostavnost izvedbe, slabost pa čas, ki je potreben za generiranje in spremljanje dovolj velikega števila posameznih delcev.

Transport svetlobe v tkivu je značilen primer fizikalnega pojava, pri katerem je zaradi prevladujočega sipanja fotonov in heterogene strukture tkiv nemogoče analitično izračunati porazdelitev svetlobnega toka v tkivu. Zato simulacijo Monte Carlo veliko uporabljajo za ovrednotenje merilnih območij in delovanja optičnih metod za meritve v tkivih. V disertaciji se ne ukvarjamo z obsežno problematiko transporta svetlobe v tkivih in s teorijo ter algoritmi za simulacijo tega procesa z metodo Monte Carlo, ker je vse to dokumentirano v zelo obsežni literaturi, na primer [48 - 53]. Podajmo le tiste pojme in veličine, ki so pomembne pri simulaciji transporta svetlobe z metodo Monte Carlo v sipajočem mediju, kakršno je biološko tkivo [54]:

- *Transportna enačba* [41] je osnovna enačba, ki opisuje interakcijo svetlobe z medijem, v katerem se svetloba širi:

$$\mathbf{s} \cdot \nabla I(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = -(\mu_a + \mu_s)I(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + \mu_s \int_{4\pi} p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')I(\mathbf{r}, \mathbf{s}') d\omega' \quad (3.1)$$

V enačbi nastopajo *specifična intenziteta*  $I(\mathbf{r}, \mathbf{s})$  (enota  $\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \text{sr}^{-1}$ ), *fazna funkcija*  $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$  in absorpcijski ter sipalni koeficient  $\mu_a$  in  $\mu_s$  (enota  $\text{m}^{-1}$ ). Leva stran enačbe

3.1 predstavlja spremembo *specifične intenzitete* svetlobnega toka v točki  $\mathbf{r}$  in v smeri  $\mathbf{s}$ . Na desni strani sta prispevka k tej spremembi in sicer zmanjšanje intenzitete v dani smeri  $\mathbf{s}$  zaradi absorpcije in sipanja (prvi člen) in povečanje intenzitete zaradi sipanja svetlobe iz vseh drugih smeri  $\mathbf{s}'$  v dano smer  $\mathbf{s}$  (integracijski člen). Integriramo po prostorskem kotu  $4\pi$ .

- $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$  ali  $p(\vartheta)$ : *Fazna funkcija*, ki podaja verjetnost za sipanje fotona ob posameznem trku s strukturami medija iz prvotne smeri premege potovanja  $\mathbf{s}$  v novo smer  $\mathbf{s}'$ . Navadno privzamemo, da je *fazna funkcija* le funkcija medsebojnega kota  $\vartheta$  med  $\mathbf{s}$  in  $\mathbf{s}'$ , ne pa dejanskih smeri  $\mathbf{s}$  in  $\mathbf{s}'$ . Dejanske oblike fazne funkcije navadno ne poznamo, izkazalo pa se je, da jo za tkiva dovolj dobro opiše analitična *Henyeey-Greensteinova funkcija*, ki jo podaja enačba:

$$p(\vartheta) = \frac{w(1-g^2)}{(1+g^2-2g\cos\vartheta)^{3/2}} \quad (3.2)$$

- $g$ : *Koeficient anizotropije* ali *povprečni kosinus fazne funkcije*, ki je definiran z enačbo 3.3, v kateri integriramo po prostorskem kotu  $4\pi$ . Parameter  $g$  lahko zavzame vrednosti med  $-1$  in  $+1$ . Če je  $g$  blizu  $-1$ , prevladuje v mediju sipanje v smeri nazaj, če je blizu  $+1$ , prevladuje sipanje v smeri naprej. Vrednost  $g=0$  pomeni, da gre za izotropen medij, v katerem je verjetnost za sipanje v vse smeri enaka. V bioloških tkivih se giblje vrednost  $g$  med  $0,9$  in  $1$ , torej prevladuje sipanje v smeri naprej [54].

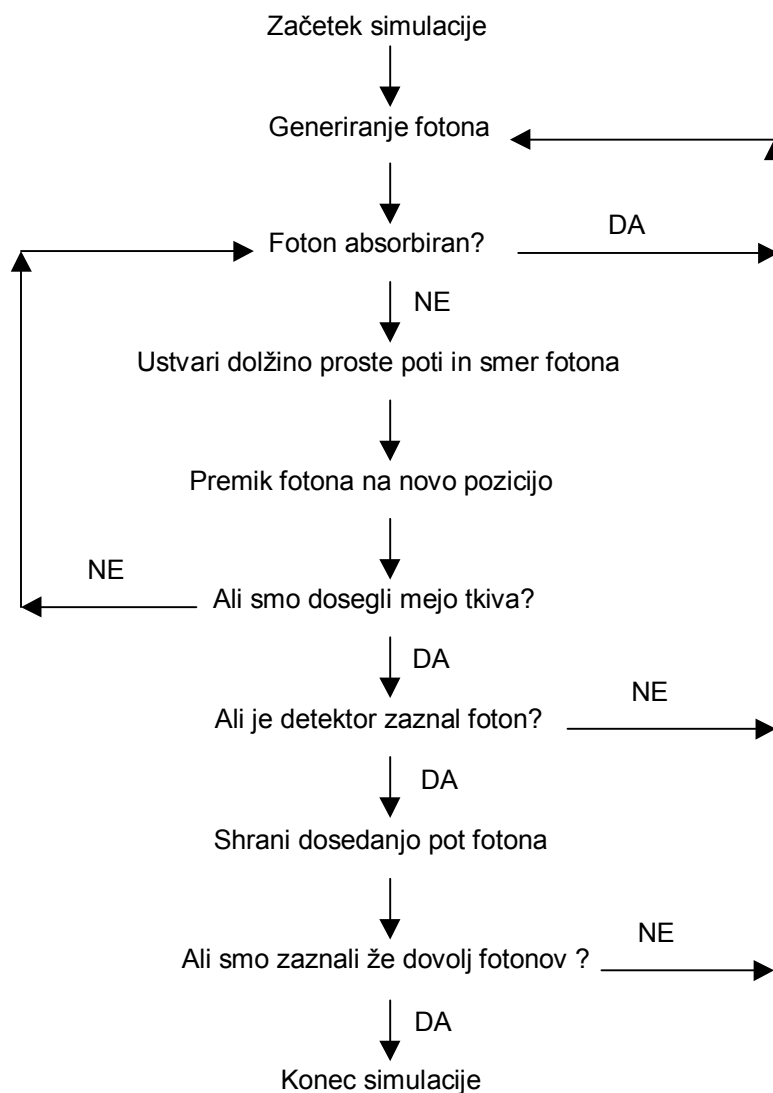
$$g = \int_{4\pi} p(\vartheta) \cos\vartheta d\omega \quad (3.3)$$

- $w$ : *Albedo*, ki pove, kolikšen delež slabljenja svetlobnega toka v mediju odpade na sipanje. *Albedo* je definiran z enačbo 3.4, v kateri sta  $\mu_a$  in  $\mu_s$  absorpcijski in sipalni koeficient. Vrednosti  $w$  se gibljejo med  $0$  in  $1$ . Vrednosti blizu  $1$  pomenijo, da v mediju prevladuje sipanje nad absorpcijo, kar velja za tkiva.

$$w = \frac{\mu_s}{\mu_a + \mu_s} \quad (3.4)$$

- $1/\mu_t$ : *Povprečna dolžina proste poti* med zaporednima interakcijama med tkivom in fotonom, ki je definiran kot obratna vrednost koeficienta slabljenja  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ . Enota *povprečne dolžine proste poti* je  $\mu\text{m}$ .

Slika 3.4.4 prikazuje diagram poteka simulacije, ki smo jo uporabili pri našem delu za ovrednotenje območja tumorja, iz katerega izvira signal pri meritvah z metodo NIRS [55]. Računalniški program smo napisali v programskem paketu Borland Pascal 7.0. Predpostavili smo, da ima tumor obliko elipsoida s premeri  $8, 8$  in  $3$  milimetre in da je optično homogen. Optične lastnosti tumorskega tkiva smo povzeli iz dostopne literature [54, 56]. Pri simulaciji smo upoštevali odboje fotonov na meji zrak - tkivo, do katerih pride zaradi različnih lomnih količnikov obeh sredstev, ter numerično aperturo optičnih vodnikov, ki smo jih uporabljali pri meritvah na tumorjih.



**Slika 3.4.4:** Diagram poteka simulacije z metodo Monte Carlo za modeliranje transporta svetlobe v tkivu.

En simulacijski tek je predstavljal pot enega fotona od izvora (prestop iz oddajnega optičnega vodnika v tkivo) do detekcije, če je do nje sploh prišlo (prestop iz tkiva v sprejemni optični vodnik). Če je do detekcije fotona prišlo, potem smo shranili njegovo celotno pot, to je položaje vseh točk, v katerih je prišlo do sipanja. Simulacijo smo zaključili, ko smo zaznali zadostno število fotonov. Vsak premik fotona na poti je zahteval generacijo štirih naključnih števil: za določitev dolžine naslednjega premika, za določitev smeri gibanja glede na dosedanjo smer (polarni in azimutni kot) in za odločitev, ali bo po premiku na naslednje mesto prišlo do absorpcije ali do ponovnega sipanja. Prostornino tumorja in okolice smo diskretizirali v kocke s stranico  $55\ \mu\text{m}$ . Za vsako od teh kock smo določili uteženo vsoto vseh sipanj vseh zaznanih fotonov, ki so se zgodila v posamezni kocki. Na ta način smo pridobili diskretizirano prostorninsko mrežo z gostotami interakcij med fotoni in tkivom, ki jo lahko grafično predstavimo in iz nje izračunamo oceno deleža presvetljenega dela tumorja in deleža zaznanega signala, ki izvira iz tkiv zunaj tumorja.

Simulacijo smo izvedli za različne kombinacije vrednosti optičnih parametrov  $g$ ,  $w$  in  $1/\mu_t$ , ker teh lastnosti za naše tumorje ne poznamo, dokaj zanesljivo pa lahko sklepamo, da so znotraj meja izbranih vrednosti parametrov, ki so bile:

- albedo  $w$ : od 0,994 do 0,998
- koeficient anizotropije  $g$ : od 0,93 do 0,97
- povprečna dolžina proste poti  $1/\mu_t$ : od 25 do 60  $\mu\text{m}$ .

Vse simulacije smo opravili za dve različni merilni konfiguraciji:

- za presvetlitveni način, v katerem deluje inštrument NIRO2X-2, pri katerem sta oddajni in sprejemni optični vodnik ločena (slika 3.4.2);
- za odbojni način, v katerem deluje inštrument OS30, pri katerem sta oddajni in sprejemni optični vodnik združena (slika 3.4.3).

## 3.5 Polarografična oksimetrija

### 3.5.1 Teorija polarografičnega merjenja kisika

Merjenje kisika s polarografično elektrokemično metodo ima zelo široko uporabnost, od velikih vzdržljivih senzorjev za industrijske aplikacije pri visokih temperaturah in tlakih, do biomedicinskih senzorjev za meritve v tkivih *in vivo* [57].

V mediju, v katerem se nahajajo elektroliti in je v njem raztopljen kisik, pride na paru elektrod, od katerih je merilna elektroda negativno polarizirana glede na referenčno elektrodo s približno -0,8 V, med drugim do naslednjih kemičnih reakcij [58, 59]:

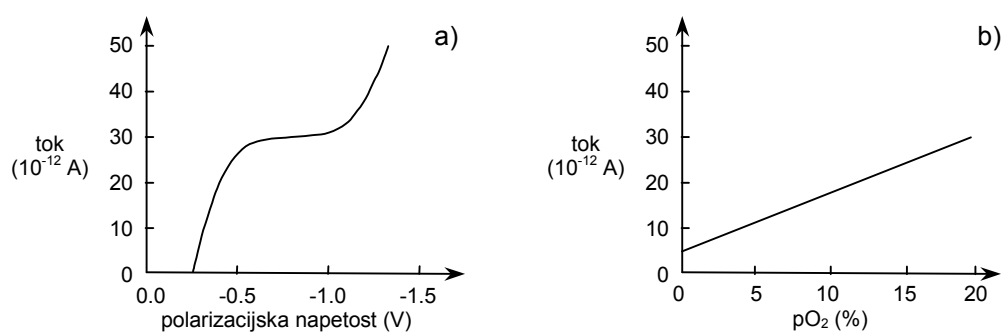
- katoda (negativno polarizirana merilna sonda; redukcija kisika)  

$$\text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + 4\text{e}^- \rightarrow 4\text{OH}^-;$$
- anoda (referenčna Ag/AgCl elektroda; oksidacija)  

$$4\text{Ag} + 4\text{Cl}^- \rightarrow 4\text{AgCl} + 4\text{e}^-.$$

Steče torej električni tok, ki je pri polarografičnih kisikovih sondah povezan s polarizacijsko napetostjo preko tako imenovane *karakteristične krivulje* (slika 3.5.1a), ki ima za napetosti pod približno -0,5 V značilno območje nasičenja, kjer polarizacijska napetost zelo malo vpliva na proizvedeni tok. V tem območju je električni tok odvisen od hitrosti difuzije molekularnega kisika proti katodi. Če negativno polarizacijsko napetost dvignemo nad približno -1,0 V, tok spet narašča, tokrat zaradi redukcije drugih elementov poleg kisika. Zato merilno kisikovo elektrodo uporabljamo polarizirano pri napetosti na sredini omenjenega "plato" območja (navadno -0,75 V), kjer je tok odvisen od difuzije kisika. V teh tako imenovanih *difuzijsko omejenih* pogojih, se vse kisikove molekule ob katodi takoj reducirajo in s tem ustvarjajo tik ob elektrodi koncentracijo kisika enako nič, s tem pa električni tok, ki je omejen s hitrostjo, s katero lahko kisikove molekule iz okolice difundirajo na območje koncentracije nič. Hitrost difuzije je odvisna od difuzijskega koeficienta za kisik in od koncentracije prisotnega kisika. Ta pa je proporcionalna parcialnemu tlaku kisika  $p\text{O}_2$  in temperaturi okolja. Pri konstantni temperaturi je torej električni tok, ki steče med elektrodama, sorazmeren  $p\text{O}_2$ . To

sorazmernost podaja pri določeni negativni polarizacijski napetosti tako imenovana *standardna krivulja* (slika 3.5.1b), ki je, tako kot *karakteristična krivulja* s slike 3.5.1a, lastna posamezni merilni sondi in jo moramo poznati, če želimo pravilno izvajati meritve  $pO_2$  s polarografično metodo. Standardna krivulja je pri večini sond linearna (premica). Vidimo lahko, da tudi pri  $pO_2 = 0$  teče majhen *temni tok*, ki je posledica uhajavih izolacijskih tokov in redukcije kisika, ki je absorbiran v material merilne elektrode.



**Slika 3.5.1:** Značilna karakteristična (a) in standardna (b) krivulja za polarografično  $pO_2$  sondo. Standardna krivulja je prikazana pri polarizacijski napetosti  $-0,75$  V.

Lastnosti posameznih merilnih sond se lahko med seboj zelo razlikujejo celo pri elektrodah istega tipa. Prav tako se lastnosti spreminjajo s starostjo sonde, zato je pred vsako meritvijo potrebna kalibracija, ki v bistvu pomeni določitev standardne krivulje s slike 3.5b, torej določitev povezave med izmerjenim električnim tokom in dejanskim parcialnim tlakom kisika za uporabljeno sondo. Ob predpostavki linearne povezave med veličinama je tako dovolj dvotočkovna kalibracija. Največkrat umerjamo pri vrednostih  $pO_2$  0% in 21%. Pri tlaku okolice 1 bar to pomeni 0,0 bara in 0,21 bara. Kalibracija poteka v posebni komori, napolnjeni s fiziološko raztopino, ki je segreti na temperaturo, pri kateri bo potekala meritev. Temperatura namreč vpliva na hitrost difuzije kisika. Merilna in referenčna elektroda sta potopljeni v raztopino, ki jo preprihavamo izmenično z zrakom (21% kisika) in s čistim dušikom (0% kisika) ter izmerimo vrednost pripadajočih električnih tokov.

Pri merjenju kisika v tumorskem tkivu imamo še posebej pri eksperimentalnih tumorskih modelih opravka z zelo nizkimi vrednostmi  $pO_2$ , zato je natančno merjenje zelo težavno. Ker je izmerjeni tok zelo majhen (velikostnega reda pA!) lahko meritve zelo moti inducirani tok zaradi zunanjih elektromagnetnih polj. Meritev bi zato morala potekati v čim manj elektromagnetno onesnaženem okolju oziroma v Faradayevi kletki. Pri vseh polarografičnih elektrodah naletimo na lezenje (drift), še posebno v okolju, bogatem z beljakovinami in hemoglobinom (tkiva), ker se te molekule prilepijo na površino merilne sonde in s tem spremenijo njeno aktivno površino ter s tem merilne lastnosti. Elektroda je zaščitena s selektivno prepustno membrano, ki prepreči neposreden stik med elektrodo in temi molekulami. S tem ukrepom je lezenje zmanjšano, ne pa odpravljeno [59]. Pri zelo nizkih vrednostih  $pO_2$ , na katere naletimo v zelo hipoksičnem okolju, kakršno je lahko tumorsko, merjenje še dodatno kvari poraba kisika na elektrodi, ki se ji ne moremo izogniti.

### 3.5.2 Izvedba meritve

Za merjenje parcialnega tlaka kisika v naših dveh tumorskih modelih smo uporabili inštrument Eppendorf Histogramph (Eppendorf, Hamburg, Nemčija), ki je zaradi številnih razlogov najbolj uveljavljen inštrument te vrste v svetu. Postal je nekakšen "zlati standard" za merjenje kisika v tkivih, ki ga uporabljajo tudi za ovrednotenje vseh novih metod za merjenje kisika v tkivu. Inštrument veliko uporabljajo v kliničnem in eksperimentalnem okolju, največ za merjenje  $pO_2$  v mišičnem in tumorskem tkivu [60 - 68].

Merilna sonda, kakršno smo uporabili pri naših poskusih, je imela naslednje tehnične lastnosti (po specifikacijah proizvajalca) [58]:

- merilna katoda: zlata žica debeline 17  $\mu\text{m}$  v steklenem izolacijskem ovoju vstavljena v jekleno iglo. Pokrita in zaščitena s teflonsko membrano;
- debelina celotne sonde (igle): 0.3 mm; priostrena konica za lažje prodiranje skozi tkivo;
- lezenje:  $< 5 \text{ \%}/\text{h}$ ;
- temperaturna odvisnost:  $< 2,4 \text{ \%}/^\circ\text{C}$ ;
- odzivni čas  $T_{90\%}(37^\circ\text{C})$ :  $< 0,5 \text{ s}$ .

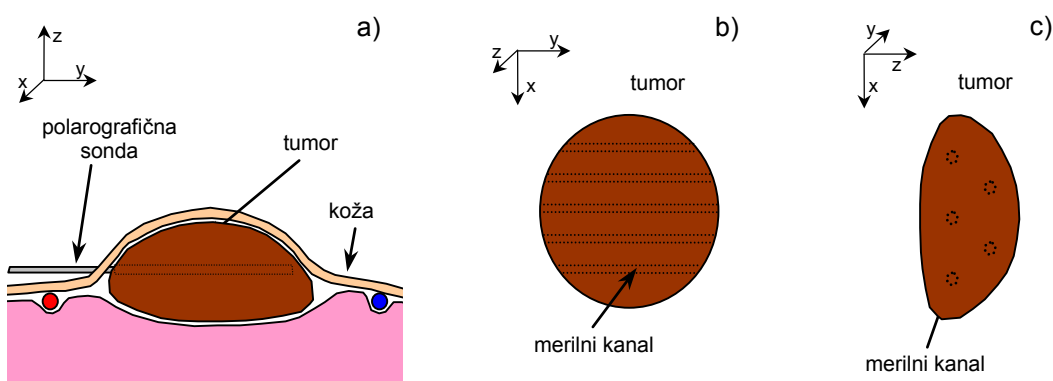
Po ustrezni kalibraciji pred vsako meritvijo je merilna sonda pritrjena na os koračnega motorja, ki pomika iglo skozi tkivo. Motor je skupaj s sondo nameščen na posebno gibljivo roko, s katero lahko konico sonde približamo merilnemu mestu. V površini kože nad tumorjem smo s tanko iglo naredili majhno odprtino, skozi katero smo sondo namestili v začetni položaj v tkivo. Po stabilizaciji razmer, ki je trajala nekaj minut, se začne merilni niz, med katerim koračni motor avtomatsko pomika sondo v tkivo in zajema merilne vrednosti v vsakem položaju. Časovni interval med posameznima merilnima položajema je bil 1,4 sekunde. Po končani meritvi v tumorju smo ponovno izvedli kalibracijo. Iz vrednosti, dobljenih med obema kalibracijama (pred in po meritvi), in preteklega časa med njima lahko vgrajeni algoritem oceni lezenje (drift) in popravi izmerjene vrednosti v tumorju.

V posameznem tumorju smo opravili meritve vzdolž več vzporednih merilnih "kanalov", ki jih v tkivo med premikanjem napravi igla merilne sonde, kot shematično prikazuje slika 3.5.2. Cilj takega večtočkovnega merjenja je dobiti čim več izmerjenih vrednosti iz celotnega tumorja, ker je za tumorje značilna velika lokalna intratumorska variabilnost vrednosti  $pO_2$ , zaradi katere le nekaj izmerjenih vrednosti navadno ne odraža resničnega stanja oksigenacije konkretnega tumorja v celoti.

Pomikanje merilne sonde skozi tkivo vsekakor pomeni lokalno travmo za tkivo, čeprav so dimenzije igle relativno majhne. Pride do različnih poškodb tkiva in lahko do pretrganja posameznih žilic. Tlak, s katerim konica sonde pritiska na tkivo med prodiranjem skozenj, močno vpliva na izmerjeno vrednost  $pO_2$ , zato Eppendorf Histogramph uporablja poseben protokol za pomikanje, s katerim močno zmanjša napako zaradi povečanega tlaka ob pritisku senzorja na tkivo. Bistvo tega patentiranega protokola, imenovanega "*pilgrim step*", je, da koračni motor po vsakem premiku naprej v tkivo vrne iglo malo nazaj. Dolžina obeh premikov je nastavljiva. Pri naših meritvah

je vsakemu premiku naprej za 0,7 mm sledil pomik nazaj za 0,3 mm. Na ta način je bila razdalja med posameznima merilnima mestoma znotraj enega merilnega kanala 0,4 mm.

Meritve  $pO_2$  so potekale na anesteziranih živalih štiri ure po končani elektroterapiji in so se začele 20 minut po začetku anestezije. Na posameznem tumorju smo, odvisno od oblike in velikosti, opravili meritve vzdolž štirih do osmih merilnih kanalov.



**Slika 3.5.2:** Merjenje  $pO_2$  v podkožnem tumorju. a) shematični prikaz namestitve merilne sonde v tumor; b,c) prikaz merilnih kanalov, ki jih ustvarja merilna sonda pri prodiranju skozi tkivo.

### *Eksperimentalne skupine živali*

B0.0/00	tumor LPB na miših C57Bl/6; kontrola (N=7)
B0.6/30	tumor LPB na miših C57Bl/6; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 30 min (N=7)
B0.6/60	tumor LPB na miših C57Bl/6; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 60 min (N=6)
W0.0/00	tumor Sa-1 na miših A/J; kontrola (N=10)
W0.6/30	tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 30 min (N=5)
W0.6/60	tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 60 min (N=7)
W0.9/60	tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,9 mA, trajanje 60 min (N=5)
W0.3/60	tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,3 mA, trajanje 60 min (N=4)

## **3.6 Merjenje prekrvljenosti z barvilom Patent modro**

### **3.6.1 Opis delovanja merilne metode**

Prekrvljenost tkiva lahko zelo preprosto vizualiziramo, če kri obarvamo s kontrastnim barvilom, ki skupaj s krvjo potuje po telesu in v kapilarah prehaja v medcelični prostor tkiva [69 - 77]. Barvili Evans modro in Patent modro-vijolično pogosto uporabljajo v ta namen. Barvilo Evans modro je pogosto omenjeno v študijah prekrvljenosti, predvsem kot indikator povečane kapilarne permeabilnosti, vendar je zaradi kancerogenosti njegova uporaba omejena na poskuse na živalih. Tako so ga na primer uporabili za



ocenjevanje reperfuzije transplantiranih organov pri psih, za določanje povečane vaskularne permeabilnosti z določanjem kapilarne ekstravazacije proteinov, na katere se vežejo molekule Evans modrega, permeabilnosti možganskega kapilarnega ožilja po transplantaciji pri podganah in podobno. Barvilo Patent modro-vijolično (PBV) pa je v osnovi barvilo, ki ga klinično uporabljajo v limfografiji, pri kateri z njim določajo kvaliteto limfnega ožilja, največkrat v povezavi z zdravljenjem limfnega ožilja in limfnih metastaz. Pri ocenjevanju primernosti kombinirane sistemske in lokalne kemoterapije tumorjev pri človeku so z barvilom PBV ocenjevali kvaliteto prekrvljenosti tumorjev pred terapijo, ker je dobra prekrvljenost bistvena za uspešen dotok kemoterapevtika v tumor. V različnih poskusih na psih so s tem barvilom določali lego in velikost območja v srčni mišici, v katerem je zaradi poslabšane prekrvljenosti povečana nevarnost za nastop infarkta.

V nobenem primeru *in vivo* metode barvanja tkiva niso samostojne diagnostične metode. Obarvanost tkiva z barvilom je zgolj pokazatelj makroskopske prekrvljenosti. Je zelo preprost pokazatelj, kadar nas zanima le to, ali se je prekrvljenost določenega tkiva zaradi nekega terapevtskega posega bistveno spremenila.

### 3.6.2 Izvedba poskusov

Poskuse smo opravili pri obeh tumorskih modelih; tumor Sa-1 na miših A/J in tumor LPB na miših C57Bl/6. V repno veno živali smo v dveh različnih časovnih intervalih (približno 4 ure in 24 ur) po elektroterapiji vbrizgali 0,2ml raztopine fiziološkega barvila Patent modro-vijolično (koncentracija 1,25%). Po dveh minutah, ko se je barvilo enakomerno porazdelilo po tkivih, smo živali evtanazirali. Tumor smo izrezali in ločili od kože ter ga prerezali na pol vzdolž najdaljšega premera. Dve osebi sta neodvisno ocenjevali delež obarvanosti prereza tumorja. Povprečje obeh ocen smo upoštevali kot merilni rezultat za posamezni tumor. Na ta način sicer dobimo le približno oceno prekrvljenosti tkiva, vendar se je pokazala očitna razlika med rezultati v kontrolnih skupinah in v skupinah, pri katerih smo izvedli elektroterapijo.

Opozoriti velja še na to, da z ocenjevanjem prekrvljenosti tumorjev iz deleža obarvane površine prereza nujno pridemo določeno napako tudi zato, ker površina prereza in prostornina tumorja nista linearno odvisni veličini. Volumska obarvanost pa odraža dejansko prekrvljenost. Ni vseeno, ali je obarvana notranjost ali rob prerezne površine. Če je ob predpostavki sferično simetrične obarvanosti pri tumorju okrogle oblike obarvano 50% površine na zunanjem robu prerezne površine, to pomeni, da je dejansko obarvano kar 65% prostornine tumorja. Če pa je obarvano 50% površine v sredini prerezne površine, predstavlja ta le 35% prostornine.

#### *Eksperimentalne skupine živali*

- B0.0/00 tumor LPB na miših C57Bl/6; kontrola (N=14);  
dve podskupini
- B0.6/60 tumor LPB na miših C57Bl/6; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 60 min (N=20);  
dve podskupini

- W0.0/00 tumor Sa-1 na miših A/J; kontrola (N=21);  
tri podskupine
- W0.6/60 tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 60 min (N=29)  
tri podskupine

### 3.7 Merjenje prekrvljenosti z rubidijem $^{86}\text{Rb}$

Vpliv DC-ET na prekrvljenost podkožnih tumorjev obeh tumorskih modelov smo ugotavljali še z eno invazivno metodo, ki za ovrednotenje zahteva odstranitev in analizo tkiva. Z uveljavljeno metodo *ekstrakcije rubidija* (angl. *rubidium extraction* ali *rubidium uptake technique*) lahko izmerimo tako imenovano *relativno prekrvitev tkiva RTP* (angl. *relative tissue perfusion*) z merjenjem vsebnosti radioaktivnega izotopa rubidija  $^{86}\text{Rb}$  v tkivu v določenem trenutku po sistemskem venoznem injeciranju raztopine rubidijevega klorida  $\text{RbCl}$  [78 - 84].

Originalno raztopino  $\text{RbCl}$  z začetno radioaktivnostjo 1 mCi/ml (Amersham PLC, Little Chalfont, Bucks., Velika Britanija) smo ustrezno razredčili s fiziološko raztopino, da smo dobili aktivnost 50  $\mu\text{Ci/ml}$ . Ob vnaprej določenih časovnih intervalih med in po elektroterapiji smo 0,1 ml te raztopine injicirali v repno veno poskusnih živali. Eno minuto po injkciji so bile živali evtanazirane. Eksperimentalno je bilo namreč dokazano, da koncentracija  $^{86}\text{Rb}$  izločenega v tkiva eno minuto po intravenozni injkciji že doseže fazo nasičenja. Za veljavnost metode je namreč potrebno, da se v trenutku odvzema vzorca nahajamo v tej fazi koncentracijskega nasičenja [81 - 83]. Takoj po evtanaziji živali smo odstranili celoten tumor, vzorec stegenske mišice iz leve zadnje noge (tumorji so rastle na desnem boku!) in rep ter jih shranili v že prej natančno stehtane steklene epruvete. Mišično tkivo je tako kot pri metodi NIRS služilo ugotavljanju morebitnega učinka DC-ET na tkiva, ki niso bila izpostavljena električnemu toku. Vse vzorce smo stehali na desetinko miligrama natančno. Radioaktivnost vzorcev tkiva smo izmerili v komori z gama števcem (Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana). Ker je študija potekala več dni, smo ob vsakem sklopu meritev izmerili tudi dejansko radioaktivnost treh vzorcev 0,1 ml injkcijske raztopine  $\text{RbCl}$ . Aktivost injecirane doze smo morali redno meriti, ker je razpolovna doba  $^{86}\text{Rb}$  relativno kratka (18,7 dni). Poleg naštetega smo izmerili tudi radioaktivnost v repu in naravno radioaktivnost okolice. Aktivnost v repu je merilo za kvaliteto injciranja. Meritve na miših, pri katerih je 10% ali več injciranega doze rubidija ostalo v repu, smo zavrnil kot neveljavne zaradi slabega injciranja.

Za izračun relativne prekrvljenosti tkiva *RPT* smo uporabili naslednjo enačbo:

$$RPT(\% / \text{g}) = 100 \times \frac{(\text{aktivnost}_{\text{VZOREC}} - \text{aktivnost}_{\text{OZADJE}}) / \text{teža}_{\text{VZOREC}}}{(\text{aktivnost}_{\text{DOZA}} - \text{aktivnost}_{\text{REP}} - \text{aktivnost}_{\text{OZADJE}})} \quad (3.1)$$

Iz enačbe sledi, da je *RPT* izražen kot delež celotne injecirane doze v vzorcu tkiva normiran na težo vzorca. Pri izračunu moramo odšteti radioaktivnost ozadja in radioaktivnost v repu. Večji del radioaktivnosti v repu je namreč posledica izliva

reztopine RbCl izven vene ob injeciranju. To pomeni, da ta del vbrizgane doze ni potoval s sistemskim obtokom po telesu in zato ni mogel prehajati v druga tkiva.

### *Eksperimentalne skupine živali*

B0.0/00	tumor LPB na miših C57Bl/6; kontrola (4 podskupine; N = 6,5,5,5)
B0.6/60	tumor LPB na miših C57Bl/6; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 60 min (5 podskupin; N=6,7,6,5,5)
W0.0/00	tumor Sa-1 na miših A/J; kontrola (4 podskupine; N=6,4,5,4)
W0.6/60	tumor Sa-1 na miših A/J; DC-ET, tok 0,6 mA, trajanje 60 min (6 podskupin; N=6,5,6,6,6,4)

## **3.8 Statistična obdelava rezultatov**

Statistično obdelavo rezultatov smo izvedli s programskim paketom SigmaStat 2.0. Ker v večjem številu primerov porazdelitev rezultatov znotraj eksperimentalnih skupin ni bila normalna (test Kolmogorov-Smirnov), smo pri ugotavljanju statistične pomembnosti razlik med skupinami uporabljali neparametrične teste. Kadar je šlo za primerjavo samo dveh skupin, je bil to Mann-Whitneyev test na vsoti rangov. Pri primerjavi več skupin z eno kontrolno skupino pa smo uporabljali test ANOVA na rangih z Dunnovim testom.



## 4 REZULTATI

### 4.1 Bližnje-infrardeča spektroskopija

#### 4.1.1 Merjenje z inštrumentom NIRO<sub>2</sub>X-2

##### *Splošne ugotovitve*

Izkušnje iz prejšnjih študij so pokazale, da specifična oblika in velikost merilnih objektov, torej podkožnih tumorjev pri miših, povzroča veliko težav pri izvajanju meritev z metodo NIRS. Idealno bi bilo, če bi lahko oddajno in sprejemno optodo pritrdili na del telesa, na katerem izvajamo meritve. Na ta način bi zagotovili relativno nepremičnost merilnega mesta, ki je v primeru, ko ne merimo optične dolžine poti, ključna za kakovostno meritev. Le tako lahko zagotovimo, da se fizična razdalja med optodama med poskusom ne bo spreminjala in bodo izmerjene spremembe v slabljenju svetlobe dejansko le posledica sprememb koncentracij kromoforov, kar želimo izmeriti. Pritrditev optod na tumor v našem primeru ni bila izvedljiva. Zato sta bili optodi pričvrščeni na dva neodvisna mikromanipulatorja in smo ju na tumor anestezirane živali le prislonili (slika 3.4.2). Optični stik med površino optode in kože smo izboljšali z nanosom prozornega gela. S tem smo zmanjšali izgube svetlobe zaradi razlik v refrakcijskih indeksih med tkivom, zrakom in optičnimi vlakni. Kot med optodama je bil pri tumorjih LPB med 60° in 110°, pri tumorjih Sa-1 pa med 45° in 80°. Razlog za v povprečju manjši kot pri Sa-1 je v bolj ploski obliki teh tumorjev v primerjavi s tumorji LPB. Razdalja med optodama je bila med približno 5 in 8 mm, odvisno od velikosti in oblike tumorjev.

Med merjenjem smo skušali zagotoviti čim boljše nepremičnost živali. Signal je nekoliko motilo že ritmično gibanje tumorja zaradi dihanja (tumor se nahaja na boku živali). Najnevarnejši premiki tumorja med meritvijo so bili posledica nenadnih trzajev,

do katerih je občasno prihajalo zaradi učinkov anestezije in zaradi prehodnega vzburjenja živali ob vklopu električnega toka. Zaradi težkih razmer merjenja je bilo nekaj meritev neveljavnih, vendar precej manj kot v prvih študijah. Tako smo kot neveljavne zavrnilo manj kot petino vseh meritev. Za izločanje posameznih meritev iz nadaljnje obravnave smo postavili naslednje kriterije. Stabilen izhodiščni signal je bil predpogoj za veljavnost meritve. Neveljavne so bile tiste meritve, pri katerih so se signali nenadno spreminjali zaradi neznanih vzrokov, najverjetneje zaradi "pokvarjenega" optičnega stika med optodama in tkivom. Nekaj meritev smo morali izločiti zaradi nenadzorovanih premikov tumorja. Zavrnilo smo tudi vse meritve, pri katerih v tumorju nismo dosegli stabilnih izhodiščnih razmer. Največkrat je bila ta nestabilnost povezana z nenehnim naraščanjem nivoja deoksigeniranega hemoglobina pri relativno stabilnem signalu oksigeniranega hemoglobina. Ta pojav je bil najverjetneje posledica delne venozne okluzije v območju tumorja pod optodo zaradi prevelikega pritiska optode na tumor.

V obravnavo smo vključili spremembe naslednjih veličin:

- oksigenirani hemoglobin HbO;
- deokseginirani hemoglobin HbR;
- celotni (totalni) hemoglobin HbT ( $\Delta\text{HbT} = \Delta\text{HbO} + \Delta\text{HbR}$ );
- diferencialni hemoglobin HbD ( $\Delta\text{HbD} = \Delta\text{HbO} - \Delta\text{HbR}$ ).

Metoda NIRS ne razlikuje med vensko in arterijsko krvjo, zato se vse te veličine nanašajo na skupno kri v tkivu, ki se nahaja pretežno v malih arterijah, arteriolah, kapilarah, venulah in malih venah. Parameter HbT je neposredno povezan z volumnom krvi v opazovanem tkivu, HbD pa je ob nepoznanju absolutnih vrednosti koncentracij (poudarimo ponovno: merimo samo *spremembe* koncentracij od neznanega izhodiščnega nivoja) še najbolj povezan z nasičenostjo hemoglobina s kisikom.

Za kvantitativno ovrednotenje rezultatov meritev, ki smo jih sprejeli za veljavne, in za primerjavo rezultatov med skupinami živali smo določili spremembe koncentracij med nekaterimi značilnimi časovnimi trenutki v procesu meritve, ki se je začela približno 20 minut pred začetkom DC-ET in končala približno 20 minut po koncu DC-ET. Referenčna časovna točka za njihov izračun ( $T_0 = 0$  min) je bil začetek terapije. Vrednosti sprememb koncentracij v vseh drugih časovnih točkah smo izračunali glede na to referenčno točko. Pri kontrolnih tumorjih smo referenčno točko ( $T_0 = 0$  min) postavili na začetek meritve ali pa na čas 10 minut po začetku, če je bila meritev dovolj dolga. Spremembe koncentracij glede na izhodiščni nivo ob  $t = T_0$  smo ovrednotili v naslednjih časovnih točkah:

- 10 min: 10 minut pred začetkom DC-ET;
- 10 min: 10 minut po začetku DC-ET (med terapijo)
- 30 min: 30 minut po začetku DC-ET (med terapijo)
- 60 min: 60 minut po začetku DC-ET (ob koncu terapije)
- 80 min: 80 minut po začetku DC-ET (20 minut ko koncu terapije)

### *Rezultati - tipični odziv na elektroterapijo*

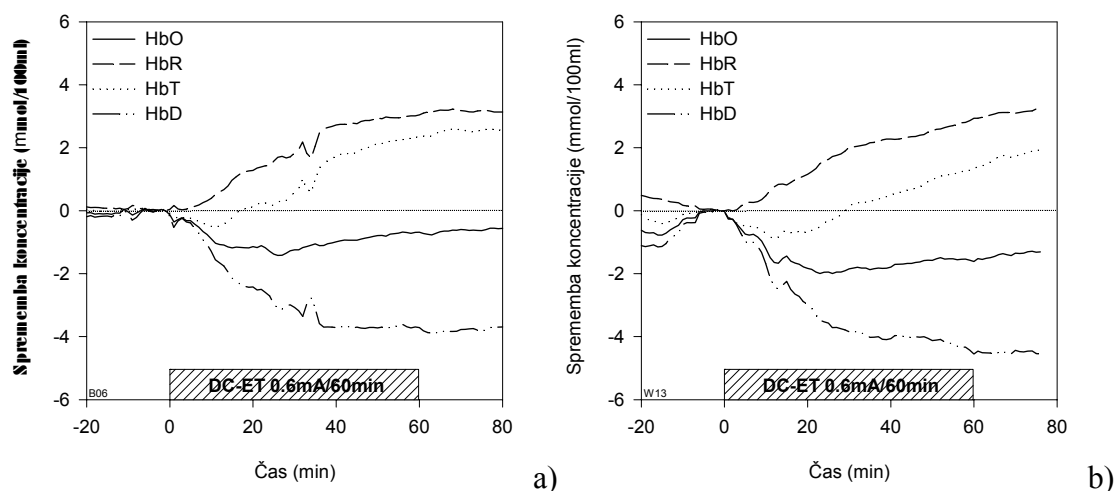
Najprej si bomo ogledali skupne elemente tipičnega odziva tumorja obeh modelov na enourno elektroterapijo s tokom amplitude 0,6 mA. Odziva predstavnikov obeh tumorskih modelov (skupini B0.6/60 in W0.6/60) sta prikazana na sliki 4.1.1, posamezni odzivi vseh tumorjev pa so zbrani v dodatkih A.1 (tumor LPB) in A.2 (tumor Sa-1). Signale smo zajemali s frekvenco 1 Hz, za prikaz poteka odziva pa smo jih zgladili s povprečevanjem znotraj enominutnega intervala s programskim paketom Matlab.

Vklop električnega toka je bil postopen, tako da smo končno amplitudo 0,6 mA dosegli v približno eni minuti. Kljub počasnemu naraščanju je bilo na začetku DC-ET opaziti prehodno vznurjenje živali, ki se je pokazalo kot vidno pospešeno in globlje dihanje, vendar je ta pojav po minuti izzvenel. Verjetno je s tem povezan tudi precej raznolik začetni odziv merjenih parametrov. Podobno smo tudi ob koncu DC-ET amplitudo toka postopno znižali na 0,0 mA.

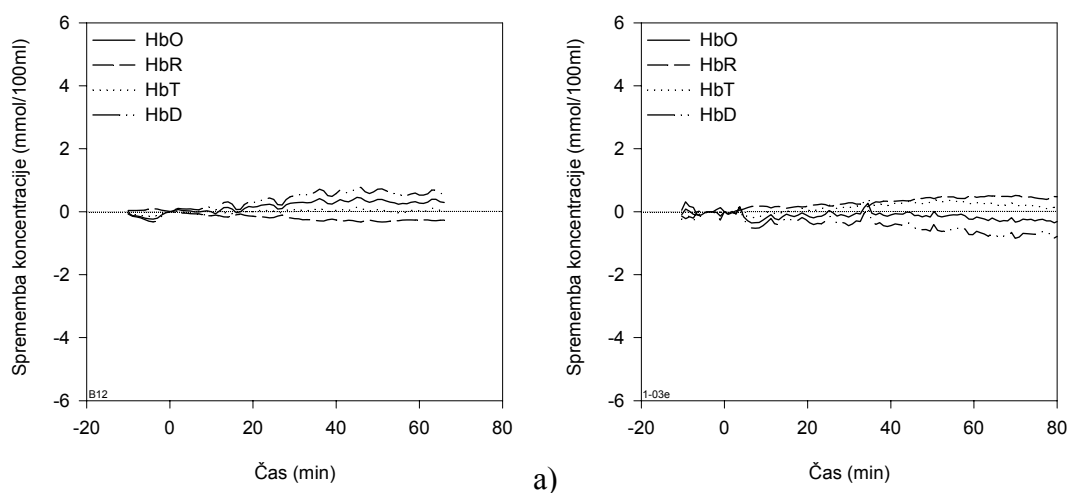
Po izzvenelem prehodnem pojavu opazimo, da se je nivo HbO opazno znižal do spodnjega najnižjega nivoja. Čas, potreben za to, se je gibal med približno 5 in 20 minutami. V večini primerov je temu znižanju sledila faza približno nespremenjenega HbO, nato pa postopno in počasi povečevanje. V večini primerov HbO do konca opazovanja ni presegel začetnega nivoja. Hkrati z začetnim padcem HbO je v vseh primerih začel naraščati HbR. Naraščanje se je proti koncu opazovanja v nekaterih primerih skoraj zaustavilo, v vsakem primeru pa je bila končna vrednost HbR vedno bistveno višja od začetnega nivoja. Ker je bil navadno padec HbO po vklopu DC-ET hitrejši kot naraščanje HbR, se je posledično v prvi fazi DC-ET tudi koncentracija HbT (skupni volumen krvi) zmanjšala, kasneje pa je naraščala in kmalu presegla začetni nivo. Ker je v večini primerov proti koncu terapije tudi HbO počasi naraščal, HbR pa je vedno naraščal, je bila vrednost HbT ob koncu opazovanja vedno nad začetnim nivojem. Oksigenacijski indeks HbD je vedno in brez izjeme v celotnem obdobju opazovanja po začetku DC-ET upadal. Izklop električnega toka ob koncu DC-ET skoraj nikoli ni izzval nobenih opaznih sprememb v siceršnjih težnjah po spreminjanju koncentracij kromoforov.

Pri tumorjih obeh kontrolnih skupin je bilo dogajanje brez posebnosti, kar kaže slika 4.1.2 s predstavnikoma obeh tumorskih modelov (skupini B0.0/00 in W0.0/00). Posamezni odzivi vseh tumorjev so zbrani v dodatkih A.1 (tumor LPB) in A.2 (tumor Sa-1). Nivoji vseh kromoforov so ostali ves čas opazovanja bolj ali manj nespremenjeni. V nekaterih primerih je sicer prišlo do manjših prehodnih sprememb ali celo do rahlega spreminjanja, tudi lezenja, koncentracij posameznih kromoforov, vendar te spremembe niso primerljive s tistimi v skupinah z DC-ET in jih pripisujemo normalnim naključnim spremembam in nenadzorovanim premikom živali med meritvijo (hitre spremembe) ter vplivom anestezije in telesne temperature (lezenje).

Poudariti moramo, da so bile kljub prej opisanim skupnim značilnostim v odzivih posameznih tumorjev na DC-ET precejšnje razlike. Te razlike so bile še posebno izrazite v amplitudah sprememb (predvsem HbO), pa tudi v časovni dinamiki nastanka sprememb. Glede na to smo vse tumorje skupin B0.6/60 in W0.6/60 glede na razsežnost sprememb vizualno in subjektivno razdelili na tri podskupine:



**Slika 4.1.1:** Primera tipičnih sprememb koncentracij kromoforov v tumorju med enurno elektroterapijo (DC-ET) s tokom 0,6 mA. a) skupina B0.6/60 (tumor LPB); b) skupina W0.6/60 (tumor Sa-1).



**Slika 4.1.2:** Primera tipičnih potekov koncentracij kromoforov v kontrolnem tumorju a) skupina B0.6/60 (tumor LPB); b) skupina W0.6/60 (tumor Sa-1).

	Število živali			
	B0.6/60 (LPB)		W0.6/60 (Sa-1)	
• tumorji z močnim in s tipičnim odzivom	12	(43%)	10	(48%)
• tumorji s šibkim in/ali z nekoliko netipičnim odzivom	6	(21%)	4	(19%)
• tumorji z zelo šibkim in/ali netipičnim odzivom	10	(36%)	7	(33%)
<b>VSI TUMORJI</b>	<b>28</b>	<b>(100%)</b>	<b>21</b>	<b>(100%)</b>

Deleži tumorjev obeh vrst v podskupinah so presenetljivo podobni. Na te podskupine so razdeljeni tudi odzivi posameznih tumorjev, ki so prikazani v dodatkih A.1 in A.2 (slike A1.1-41 in A2.1-32).



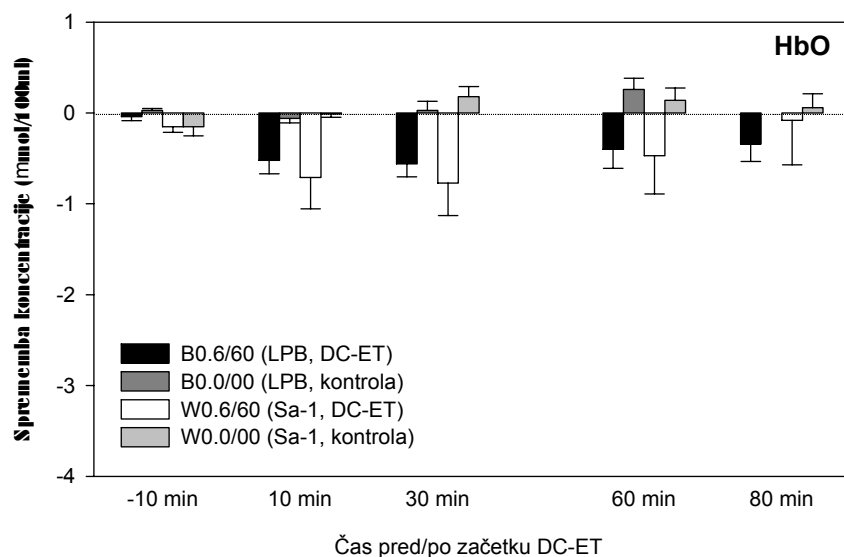
### *Rezultati - primerjava odzivov med skupinami*

V nadaljevanju si poglejmo rezultate v luči kvantitativnih primerjav odzivov med eksperimentalnimi skupinami, tako med kontrolno skupino in skupino DC-ET pri posameznem tumorskem modelu kot med odzivoma obeh tumorskih modelov na DC-ET. V skupinah B0.6/60 in W0.6/60 bomo tu upoštevali samo tumorje iz podskupin z močnim in tipičnim odzivom, čeprav do podobnih sklepov pridemo tudi ob upoštevanju vseh tumorjev, kar lahko vidimo na slikah v dodatku A.3.

Na slikah 4.1.3 - 6 in tabelah 4.1.1 - 4 so zbrani povprečni podatki o spremembah koncentracij HbO, HbR, HbT in HbD ob nekaterih značilnih časovnih trenutkih glede na začetek elektroterapije. Tudi na teh slikah lahko ugotovimo podobno kot na dveh tipičnih primerih s slike 4.1.1. Koncentracija HbO po začetku DC-ET najprej hitro pade na nižji nivo in se kasneje počasi spet dviga, vendar med opazovanjem v povprečju ne preseže več začetne vrednosti. Vidimo tudi, da je začetni padec nekoliko večji kasnejše naraščanje pa hitrejše pri tumorjih Sa-1 kot pri tumorjih LPB. Tudi naraščanje HbR je pri Sa-1 močnejše izraženo. Pri tumorjih LPB se zdi, kot da se proti koncu opazovanja HbR približuje neki zgornji meji, medtem ko pri Sa-1 tega "nasičenja" ni. Povsem podobno je pri koncentraciji HbT, kjer k hitrejšemu naraščanju HbT pri tumorjih Sa-1 prispeva tudi močnejše naraščanje HbO v teh tumorjih. Oksigenacijski indeks HbD upada pri obeh tumorskih modelih podobno, zopet pa je nekoliko očitnejše pri tumorjih Sa-1.

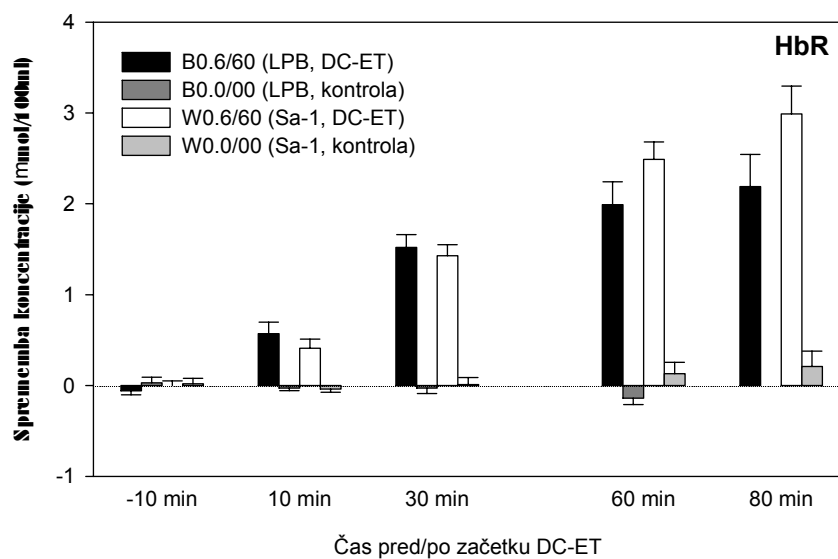
Sklenemo lahko, da se oba tumorska modela odzivata na DC-ET podobno, vendar je dinamika sprememb pri tumorjih Sa-1 nekoliko bolj izrazita. Na koncu navedimo za boljše predstavbo in primerjavo še "povprečne" časovne poteke koncentracij kromoforov v obeh tumorskih modelih za kontrolne tumorje in za tumorje, izpostavljene elektroterapiji (slike 4.1.7-8). Upoštewane so vrednosti iz tabel 4.1.1-4 z dodatnimi izračunanimi povprečnimi vrednostmi za čas 1, 2, 3, 5 in 15 minut po začetku DC-ET, ki smo jih dodali zato, ker je v prvih 15 minutah po začetku terapije časovna dinamika najbolj izrazita, kar lahko vidimo tudi na slikah odzivov posameznih tumorjev na DC-ET (slike v dodatkih A.1 in A.2).

Ker slike 4.1.3-6 in tabele 4.1.1-4 vsebujejo podatke le za tiste tumorje iz skupin B0.6/60 in W0.6/60, pri katerih je bil odziv velik, podajamo v dodatku A.3 še "povprečne" poteke koncentracij v teh dveh skupinah za vse tumorje, vključno s tumorji s šibkim ali netipičnim odzivom. Za primerjavo so dodani tudi poteki za mediane posameznih rezultatov (slike A3.1-16).

HbO ( $\mu\text{mol}/100\text{ml}$ )

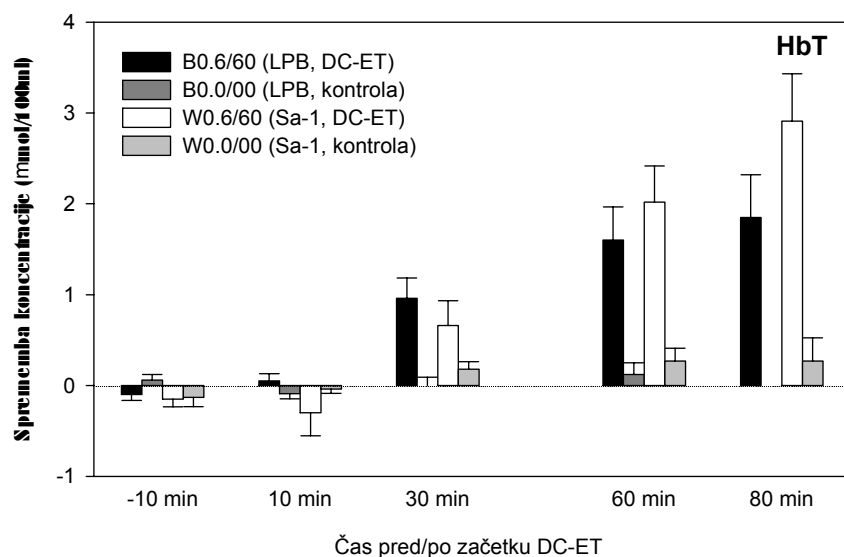
Čas	Skupina	N	povp.	SD	SE	Med.	MIN.	MAX	P
-10 min	B0.6/60	12	-0,04	0,16	0,05	-0,07	-0,25	0,29	0,242
	B0.0/00	6	0,03	0,05	0,02	0,02	-0,02	0,11	
	W0.6/60	10	-0,15	0,20	0,06	-0,11	-0,42	0,09	0,807
	W0.0/00	8	-0,15	0,29	0,10	-0,16	-0,61	0,38	
10 min	B0.6/60	12	-0,52	0,51	0,15	-0,57	-1,34	0,61	0,008
	B0.0/00	13	-0,06	0,18	0,05	-0,12	-0,27	0,27	
	W0.6/60	10	-0,71	1,09	0,34	-0,55	-3,48	0,55	0,037
	W0.0/00	11	-0,01	0,12	0,04	-0,01	-0,23	0,16	
30 min	B0.6/60	12	-0,56	0,49	0,14	-0,66	-1,28	0,46	0,016
	B0.0/00	13	0,03	0,35	0,10	-0,09	-0,43	0,63	
	W0.6/60	10	-0,77	1,13	0,36	-0,33	-3,48	0,32	0,037
	W0.0/00	11	0,18	0,37	0,11	0,10	-0,32	0,74	
60 min	B0.6/60	12	-0,40	0,73	0,21	-0,39	-1,88	0,90	0,038
	B0.0/00	13	0,26	0,44	0,12	0,35	-0,49	0,91	
	W0.6/60	10	-0,47	1,33	0,42	-0,17	-3,56	1,08	0,756
	W0.0/00	11	0,14	0,45	0,14	0,25	-0,48	0,84	
80 min	B0.6/60	12	-0,34	0,67	0,19	-0,25	-1,64	0,92	--
	B0.0/00	--	--	--	--	--	--	--	
	W0.6/60	10	-0,08	1,55	0,49	0,08	-3,57	1,65	--
	W0.0/00	6	0,06	0,37	0,15	-0,01	-0,33	0,57	

**Slika 4.1.3, Tabela 4.1.1:** Sprememba koncentracije oksigeniranega hemoglobina (HbO) v različnih intervalih pred (-10 min) in po začetku enourne DC-ET s tokom 0,6 mA. Vse vrednosti so navedene relativno glede na stanje ob začetku DC-ET (čas 0, vrednosti 0). Prikazan je odziv obeh tumorskih modelov (B: tumor LPB na miših C57Bl/6; W: tumor Sa-1 na miših A/J) in dogajanje v kontrolnih skupinah obeh modelov. Na sliki so prikazana povprečja in standardne napake. Tabela: N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost; P = statistična pomembnost razlike med skupino DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (Mann-Whitneyev test na vsoti rangov).



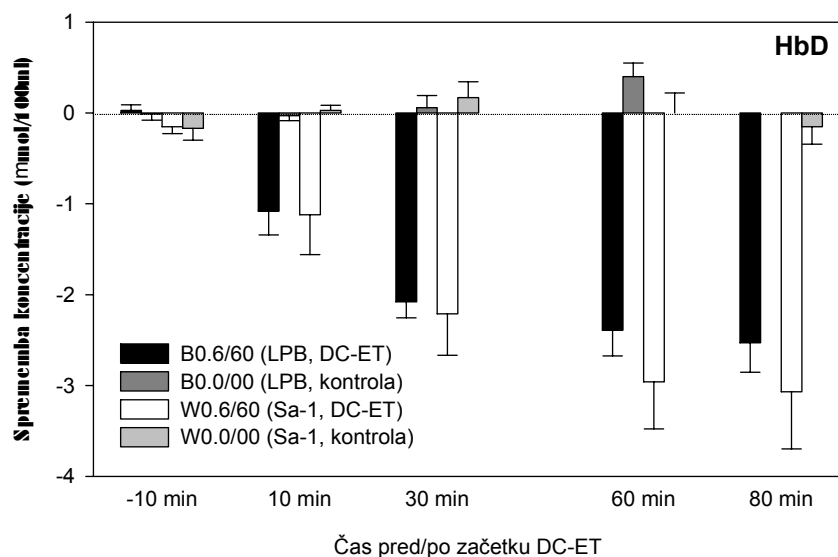
HbR (µmol/100ml)									
Čas	Skupina	N	povp.	SD	SE	Med.	MIN.	MAX	P
-10 min	B0.6/60	12	-0,06	0,15	0,04	-0,03	-0,36	0,12	0,374
	B0.0/00	6	0,03	0,15	0,06	0,01	-0,14	0,23	
	W0.6/60	10	0,00	0,16	0,05	-0,04	-0,23	0,36	0,591
	W0.0/00	8	0,02	0,16	0,06	1,20e-3	-0,15	0,28	
10 min	B0.6/60	12	0,57	0,44	0,13	0,65	-0,38	1,23	0,001
	B0.0/00	13	-0,03	0,09	0,03	-0,03	-0,16	0,17	<0,001
	W0.6/60	10	0,41	0,32	0,10	0,34	0,07	1,17	
	W0.0/00	11	-0,04	0,11	0,03	-0,06	-0,26	0,16	
30 min	B0.6/60	12	1,52	0,49	0,14	1,35	0,88	2,46	<0,001
	B0.0/00	13	-0,03	0,21	0,06	-0,02	-0,38	0,36	<0,001
	W0.6/60	10	1,43	0,38	0,12	1,30	1,00	2,01	
	W0.0/00	11	0,01	0,26	0,08	0,12	-0,49	0,28	
60 min	B0.6/60	12	1,99	0,87	0,25	1,73	0,60	3,06	<0,001
	B0.0/00	13	-0,14	0,25	0,07	-0,11	-0,72	0,24	<0,001
	W0.6/60	10	2,49	0,60	0,19	2,48	1,50	3,64	
	W0.0/00	11	0,13	0,41	0,12	0,31	-0,78	0,76	
80 min	B0.6/60	12	2,19	1,23	0,35	1,91	0,60	4,22	--
	B0.0/00	--	--	--	--	--	--	--	--
	W0.6/60	10	2,99	0,97	0,31	3,05	1,06	4,90	
	W0.0/00	6	0,21	0,41	0,17	0,11	-0,31	0,88	

**Slika 4.1.4, Tabela 4.1.2:** Sprememba koncentracije deoksigeniranega hemoglobina (HbR) v različnih intervalih pred (-10 min) in po začetku enourne DC-ET s tokom 0,6 mA. Vse vrednosti so navedene relativno glede na stanje ob začetku DC-ET (čas 0, vrednosti 0). Prikazan je odziv obeh tumorskih modelov (B: tumor LPB na miših C57Bl/6; W: tumor Sa-1 na miših A/J) in dogajanje v kontrolnih skupinah obeh modelov. Na sliki so prikazana povprečja in standardne napake. Tabela: N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost; P = statistična pomembnost razlike med skupino DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (Mann-Whitneyev test na vsoti rangov).

HbT ( $\mu\text{mol}/100\text{ml}$ )

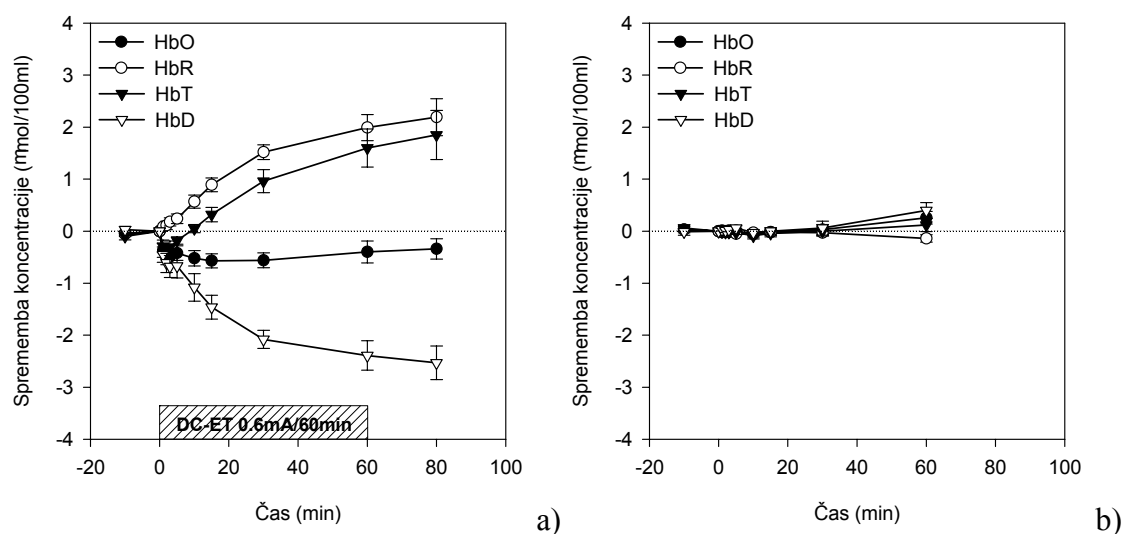
Čas	Skupina	N	povp.	SD	SE	Med.	MIN.	MAX	P
-10 min	B0.6/60	12	-0,10	0,23	0,07	-0,08	-0,48	0,36	0,122
	B0.0/00	6	0,06	0,15	0,06	0,03	-0,16	0,27	
	W0.6/60	10	-0,15	0,27	0,08	-0,14	-0,46	0,44	0,107
	W0.0/00	8	-0,13	0,29	0,10	-0,06	-0,76	0,25	
10 min	B0.6/60	12	0,05	0,28	0,08	0,02	-0,44	0,59	0,176
	B0.0/00	13	-0,09	0,20	0,06	-0,11	-0,42	0,34	
	W0.6/60	10	-0,30	0,80	0,25	-0,11	-2,31	0,77	0,168
	W0.0/00	11	-0,04	0,15	0,05	2,60e-3	-0,34	0,14	
30 min	B0.6/60	12	0,96	0,77	0,22	0,92	-0,01	2,66	0,002
	B0.0/00	13	0,00	0,33	0,09	0,04	-0,51	0,67	
	W0.6/60	10	0,66	0,87	0,27	0,84	-1,54	1,66	0,009
	W0.0/00	11	0,18	0,27	0,08	0,17	-0,11	0,86	
60 min	B0.6/60	12	1,60	1,27	0,37	1,69	-0,71	3,96	0,004
	B0.0/00	13	0,12	0,47	0,13	0,06	-0,65	0,92	
	W0.6/60	10	2,02	1,26	0,40	2,15	-0,71	3,67	0,005
	W0.0/00	11	0,27	0,47	0,14	0,28	-0,47	1,01	
80 min	B0.6/60	12	1,85	1,63	0,47	1,92	-0,87	5,14	--
	B0.0/00	--	--	--	--	--	--	--	--
	W0.6/60	10	2,91	1,65	0,52	2,83	-0,06	6,16	--
	W0.0/00	6	0,27	0,63	0,26	0,07	-0,28	1,45	

**Slika 4.1.5, Tabela 4.1.3:** Sprememba koncentracije skupnega hemoglobina (HbT) v različnih intervalih pred (-10 min) in po začetku enourne DC-ET s tokom 0,6 mA. Vse vrednosti so navedene relativno glede na stanje ob začetku DC-ET (čas 0, vrednosti 0). Prikazan je odziv obeh tumorskih modelov (B: tumor LPB na miših C57Bl/6; W: tumor Sa-1 na miših A/J) in dogajanje v kontrolnih skupinah obeh modelov. Na sliki so prikazana povprečja in standardne napake. Tabela: N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost; P = statistična pomembnost razlike med skupino DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (Mann-Whitneyev test na vsoti rangov).

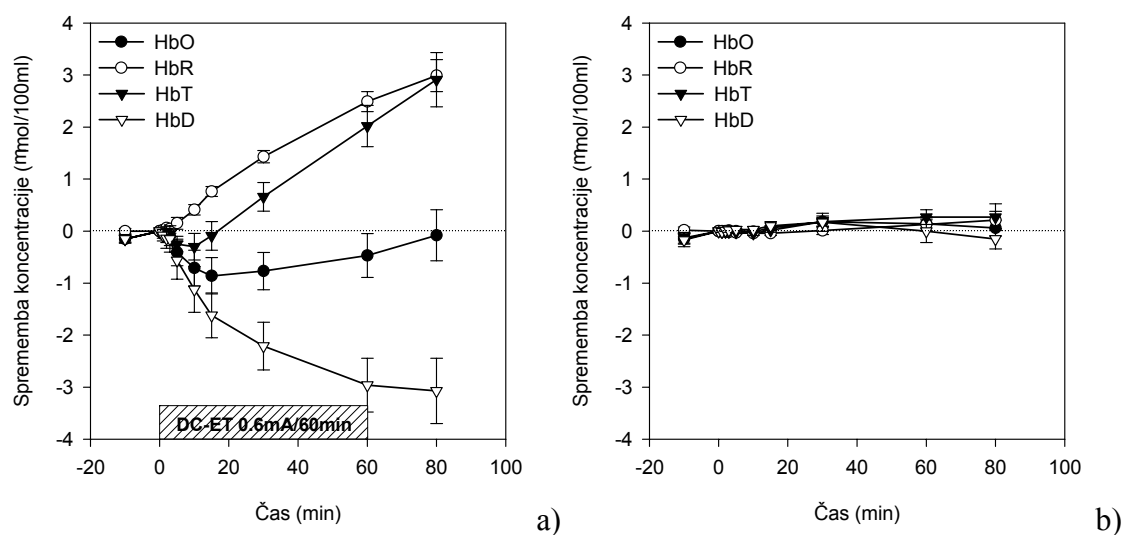
HbD ( $\mu\text{mol}/100\text{ml}$ )

Čas	Skupina	N	povp.	SD	SE	Med.	MIN.	MAX	P
-10 min	B0.6/60	12	0,03	0,21	0,06	-0,01	-0,32	0,31	0,743
	B0.0/00	6	-0,01	0,17	0,07	0,02	-0,21	0,21	
	W0.6/60	10	-0,15	0,24	0,08	-0,17	-0,43	0,30	
	W0.0/00	8	-0,17	0,37	0,13	-0,27	-0,60	0,50	
10 min	B0.6/60	12	-1,08	0,91	0,26	-1,07	-2,57	1,00	0,001
	B0.0/00	13	-0,03	0,20	0,05	-0,07	-0,43	0,30	
	W0.6/60	10	-1,12	1,39	0,44	-0,91	-4,65	0,32	
	W0.0/00	11	0,03	0,18	0,05	0,03	-0,33	0,25	
30 min	B0.6/60	12	-2,08	0,61	0,17	-1,94	-3,16	-1,45	<0,001
	B0.0/00	13	0,06	0,48	0,13	0,15	-0,80	0,81	
	W0.6/60	10	-2,21	1,45	0,46	-1,44	-5,42	-1,02	
	W0.0/00	11	0,17	0,58	0,17	0,11	-0,55	1,18	
60 min	B0.6/60	12	-2,39	0,98	0,28	-2,41	-3,69	-0,34	<0,001
	B0.0/00	13	0,40	0,54	0,15	0,60	-0,51	1,08	
	W0.6/60	10	-2,96	1,64	0,52	-2,80	-6,42	-1,13	
	W0.0/00	11	0,00	0,73	0,22	0,04	-0,82	1,59	
80 min	B0.6/60	12	-2,53	1,12	0,32	-2,61	-4,07	-0,68	--
	B0.0/00	--	--	--	--	--	--	--	
	W0.6/60	10	-3,07	1,99	0,63	-3,09	-7,08	0,17	
	W0.0/00	6	-0,15	0,47	0,19	-0,19	-0,76	0,41	

**Slika 4.1.6, Tabela 4.1.4:** Sprememba koncentracije diferencialnega hemoglobina (HbD) v različnih intervalih pred (-10 min) in po začetku enourne DC-ET s tokom 0,6 mA. Vse vrednosti so navedene relativno glede na stanje ob začetku DC-ET (čas 0, vrednosti 0). Prikazan je odziv obeh tumorskih modelov (B: tumor LPB na miših C57Bl/6; W: tumor Sa-1 na miših A/J) in dogajanje v kontrolnih skupinah obeh modelov. Na sliki so prikazana povprečja in standardne napake. Tabela: N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost; P = statistična pomembnost razlike med skupino DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (Mann-Whitneyev test na vsoti rangov).



**Slika 4.1.7:** Povprečni potek sprememb koncentracij kromoforov za tumor LPB v skupinah B0.6/60 (a) in B0.0/00 (b). Pri sliki a) so upoštevani samo tumorji z močnim in s tipičnim odzivom na DC-ET (tabele 4.1.1-4). Podane so povprečne vrednosti in standardne napake.



**Slika 4.1.8:** Povprečni potek sprememb koncentracij kromoforov za tumor Sa-1 v skupinah W0.6/60 (a) in W0.0/00 (b). Pri sliki a) so upoštevani samo tumorji z močnim in s tipičnim odzivom na DC-ET (tabele 4.1.1-4). Podane so povprečne vrednosti in standardne napake.

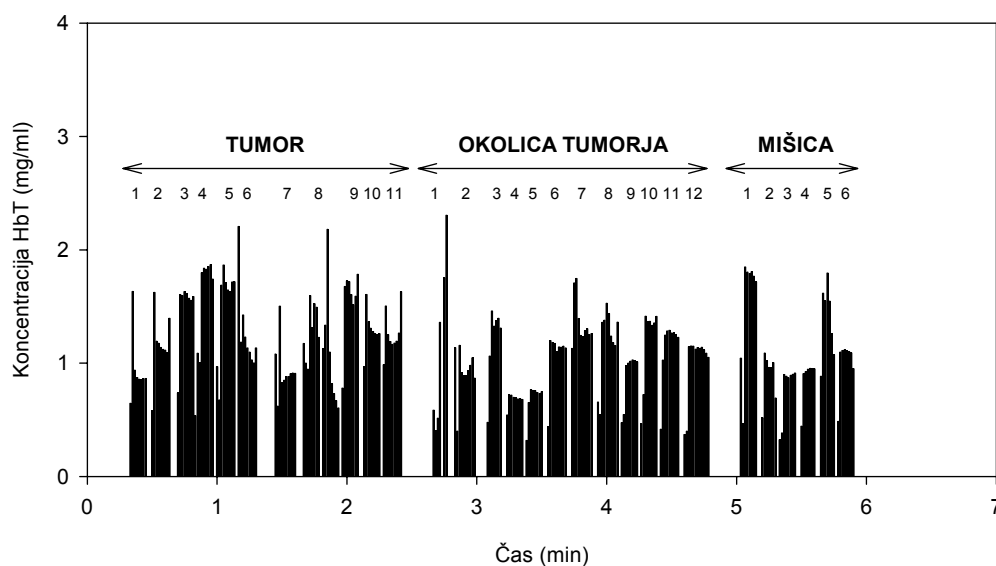
## 4.1.2 Merjenje z inštrumentom OS30

### Obdelava surovih rezultatov meritev

Kot je opisano v poglavju o materialih in metodah, smo z inštrumentom OS30 merili naslednje štiri veličine:

- absolutno koncentracijo oksigeniranega hemoglobina HbO;
- absolutno koncentracijo deokseginiranega hemoglobina HbR;
- absolutno koncentracijo celotnega (totalnega) hemoglobina HbT ( $HbT = HbO + HbR$ );
- nasičenost hemoglobina s kisikom Sat ( $Sat(\%) = 100 \times HbO/HbT$ ).

Merili smo štiri ure po končani elektroterapiji na treh različnih anatomskih lokacijah pri vsaki živali: na tumorju, v njegovi neposredni okolici in na stegenski mišici. Namen meritev v okolici tumorja je bilo ugotoviti vpliv elektroterapije na normalno tkivo, ki se je prav tako kot tumor med elektroterapijo nahajalo med elektrodama. Stegensko mišico pa smo izbrali kot primer normalnega tkiva, ki ni bilo neposredno izpostavljeno elektroterapiji s ciljem potrditve "lokalnosti" terapije. Na vsakem od treh vrst tkiva smo izvedli več meritev, vsaka je trajala 10 - 15 sekund in je tako dala 10 - 15 izmerjenih vrednosti. Primer take meritve je za koncentracijo skupnega hemoglobina HbT prikazana na sliki 4.1.9., podobne slike surovih podatkov dobimo tudi za parametre HbO, HbR in Sat.



**Slika 4.1.9:** Primer merilnega ciklusa na tumorju, njegovi okolici in stegenski mišici pri isti živali 4 ure po koncu DC-ET. Posamezen "stolpec" ustreza enemu merilnemu mestu in vsebuje približno 10 meritev. Oštevilčena so merilna mesta za vsako anatomsko lokacijo posebej.

Vsak "stolpec" na sliki 4.1.9 ustreza enemu merilnemu mestu na ustrezni anatomski lokaciji in vsebuje več izmerjenih vrednosti (za vsako sekundo eno). Iz vsakega "stolpca" smo odčitali *povprečno* vrednost in jo obravnavali kot merilni rezultat za pripadajoče merilno mesto. Pri tem povprečenju znotraj "stolpca" smo navadno izpustili

začetne in končne vrednosti in vse nenavadno visoke ali nizke vrednosti, ki so se močno razlikovale od drugih (na primer začetna in končna "špica" na drugi merilni lokaciji pri tumorju na sliki 4.1.9), ker so bile posledica nestabilnosti med nameščanjem in odmikanjem optičnega vodnika. Kadar je bila celotna meritev na nekem merilnem mestu nestabilna, smo tako meritev v celoti zavrgli, kot na primer meritev na prvem merilnem mestu v okolici tumorja na sliki 4.1.9.

Na ta način smo pri vsaki poskusni živali pridobili več rezultatov za vsako anatomsko mesto (7 do 14 za vsak tumor in za vsako okolico tumorja ter 5 do 8 za vsako mišico). Tako dobljene rezultate vseh živali določene eksperimentalne skupine (3 skupine za tumorski model LPB in 5 skupin za tumorski model Sa-1) smo za nadaljnjo obravnavo združili skupaj glede na anatomsko lokacijo (tumor, okolica, mišica) in glede na merjeni parameter (HbO, HbR, HbT, Sat).

### *Rezultati*

Vsi rezultati so v obliki tabel in različnih diagramov prikazani v dodatkih B.1 in B.2.

Kumulativni podatki za vsa merilna mesta vseh živali so po eksperimentalnih skupinah zbrani v tabelah B.1.1 (tumor), B.1.2 (okolica tumorja) in B.1.3 (mišica) v dodatku B.1.

Na slikah B.1.1 - 12 so rezultati za vsa merilna mesta vseh živali predstavljeni v obliki histogramov, in sicer za vse štiri merjene parametre (Sat, HbT, HbO in HbR) ter za tri tipe tkiv (tumor, okolica tumorja, mišica).

### *Stanje v tumorjih*

Za nas najbolj zanimiva je slika B.1.1 v dodatku B.1, ki prikazuje porazdelitev vrednosti nasičenosti hemoglobina s kisikom (Sat) v tumorjih za vse eksperimentalne skupine. Vidimo, da se z večanjem doze elektroterapije (povečevanje amplitude dovedenega električnega toka in trajanja terapije) sicer zvonasta razporeditev vse bolj nagiba in premika proti nižjim vrednostim Sat, kar pomeni zmanjševanje oksigenacije krvi v tumorju. Učinek je precej bolj izrazit pri tumorjih Sa-1 (skupine W) kot pri tumorjih LPB (skupine B). Polurna terapija s tokom 0,6 mA na tumorje LPB skoraj nima učinka, pri tumorjih Sa-1 pa je skoraj tolikšen kot pri enourni terapiji z enakim tokom. Povečanje amplitude toka na 0,9 mA pri tumorjih Sa-1 povzroči še očitnejšo deoksigenacijo v primerjavi s tokom 0,6 mA. Enourni terapija z najmanjšim tokom 0,3 mA pa zelo malo zniža vrednosti Sat. Do zelo podobnih sklepov pridemo po opazovanju slike B.1.3 (koncentracija oksigeniranega hemoglobina HbO), ki kaže, da se zaradi elektroterapije zmanjša HbO in da je zmanjšanje dozno odvisno. Hkrati z zmanjšanjem HbO opazimo povečanje koncentracij deoksigeniranega hemoglobina HbR, kar prikazuje slika B.1.4. Vse to pomeni, da se zaloga kisika v krvi v tumorjih po elektroterapiji zmanjša.



Na sliki B.1.2 (koncentracija skupnega hemoglobina HbT) vidimo, da se z naraščanjem doze elektroterapije nekoliko poveča delež višjih koncentracij, kar je posledica dejstva, da je HbO manj upadel, kot je HbR narastel. To pa pomeni, da se je po terapiji v tumorjih nabirala kri.

### *Stanje v okolici tumorjev*

Podobno sliko kot v tumorju dobimo o dogajanju v okolici tumorjev, slike B1.5 - 8. Poudarimo, da z okolico mislimo na normalno tkivo okoli tumorja, ki se je tako kot tumor nahajalo med obema elektrodama za DC-ET. Čeprav so rezultati tu istosmiselni kot pri tumorjih, torej zmanjševanje oksigenacije in povečevanje koncentracije skupnega hemoglobina z naraščanjem doze elektroterapije, pa je ta učinek mnogo manj izrazit kot pri tumorjih. Predvidevamo, da je to zato, ker je signal pri tumorju izviral pretežno iz tumorja in kože ter podkožja, ki ga pokriva, pri okoliškem tkivu pa iz kože, podkožja, mišic in organov v abdominalni votlini. Ker so bile elektrode nameščene v podkožje, pričakujemo učinek elektroterapije predvsem na nivoju kože in podkožja (tumorji rastejo v podkožju), ne pa tudi v globljih tkivih in organih. Menimo torej, da je bil delež zaradi elektroterapije prizadetih tkiv v signalu NIRS v okolici tumorja bistveno manjši kot v tumorjih.

### *Stanje v stegenski mišici*

Na slikah B.1.9 - 12 vidimo, da elektroterapija tumorjev ni izzvala nobenih pomembnih sprememb v parametrih prekrvitve in oksigenacije v stegenski mišici, ki ni bila neposredno izpostavljena električnemu toku. To potrjuje domnevo, da DC-ET deluje lokalno, predvsem na tkiva, ki se nahajajo med obema elektrodama.

### *Kumulativna predstavitev rezultatov*

Iste podatke kot na histogramih, smo kumulativno predstavili na slikah B.1.13 - 18 v dodatku B.1. Podatki za te slike so v tabelah B.1.1 - 3. Tudi te slike kažejo, da se oksigenacija v tumorjih zmanjša po elektroterapiji, da je sicer podoben učinek v okolici tumorjev veliko manj izrazit in da v stegenski mišici ni bilo opaziti nobenih razlik med eksperimentalnimi skupinami.

Slike B.1.19 - 21 in pripadajoče tabele (Dodatek B.1) povzemajo histograme za vrednosti Sat in HbO. Tu smo predstavili deleže vrednosti Sat in HbO do določene zgornje meje in zelo očitno je, da se z naraščanjem doze elektroterapije povečujeta deleža najnižjih vrednosti Sat in HbO v tumorjih.

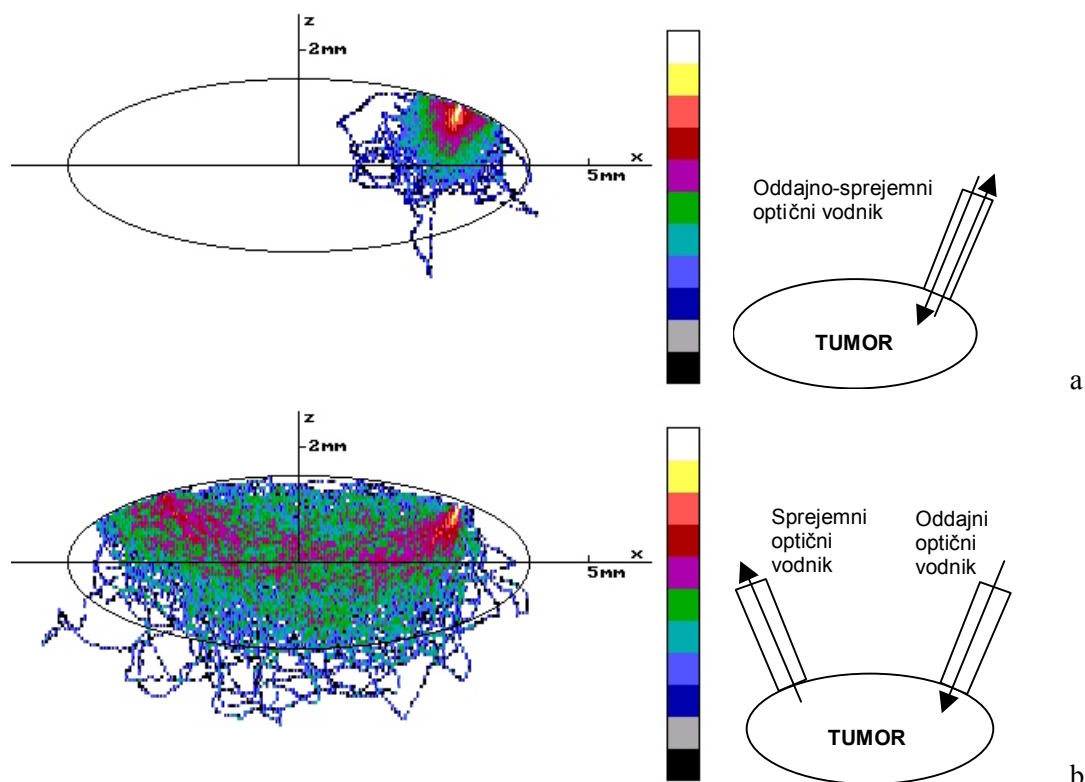
Medtem ko v dodatku B.1 obravnavamo izmerjene vrednosti vseh živali v neki eksperimentalni skupini skupaj, pa so slike in tabele v dodatku B.2 namenjene prikazu raztrosa povprečnih vrednosti in median, izračunanih za *vsako posamezno žival* iz določene eksperimentalne skupine.

### Razlike med tumorskima modeloma

Omenili smo že, da je odziv na elektroterapijo pri tumorjih LPB manjši kot pri tumorjih Sa-1. Poleg tega moramo opozoriti še na razlike med modeloma pri kontrolnih skupinah. Tako pri tumorjih kot mišicah obeh modelov opazimo, da so izhodiščne vrednosti Sat in HbO v kontrolnih skupinah višje pri tumorjih LPB kot pri tumorjih Sa-1. Tega ne opazimo pri meritvah v okolici tumorjev. Medtem ko bi lahko to razliko pri tumorjih pripisali fiziološkim razlikam med tumorskima linijama, ki zagotovo obstajajo, tako razlago težko sprejmemo za mišično tkivo. Menimo, da bi vsaj del teh razlik lahko bil posledica razlik v pigmentaciji kože pri miših C57Bl/6 (črne) in A/J (bele).

#### 4.1.3 Simulacija z metodo Monte Carlo

Na sliki 4.1.10 je grafično prikazana projekcija porazdelitev gostote interakcij (sipanj) na ravnino  $xz$  za odbojno in presvetlitveno merilno konfiguracijo optičnih vodnikov za vrednosti optičnih parametrov  $w = 0,994$ ,  $g = 0,97$ ,  $1/\mu_t = 25 \mu\text{m}$ . Rezultati za vse nabore vrednosti parametrov so zbrani v dodatku C. Izračunani deleži presvetljenega dela tumorja in deleži zaznanega signala, ki izvirajo zunaj tumorja, so za vse nabore vrednosti optičnih parametrov  $w$ ,  $g$  in  $1/\mu_t$  so zbrani v tabeli 4.1.5.



**Slika 4.1.10.:** Projekcija porazdelitev gostote sipanj fotonov za vrednosti parametrov  $w = 0,994$ ;  $g = 0,97$ ;  $1/\mu_t = 25 \mu\text{s}$ . Odbojni (a) in presvetlitveni (b) način delovanja. Barvna logaritemska skala je relativna. Gostota sipanj narašča po lestvici od spodaj navzgor.

OPTIČNI PARAMETRI			REZULTATI			
izbrani nabori vrednosti			(a) delež signala, ki izvira zunaj tumorja (%)		(b) presvetljeni delež tumorja (%)	
$w$	$g$	$s$ ( $\mu\text{m}$ )	odbojni način (1)	presvetlitveni način (2)	odbojni način (1)	presvetlitveni način (2)
0,994	0,93	60	2	13	5	60
0,994	0,94	60	2	13	5	77
0,994	0,95	60	3	16	5	72
0,994	0,96	60	6	16	5	57
0,994	0,97	60	5	19	4	58
0,995	0,95	60	4	21	5	68
0,996	0,95	60	5	22	5	69
0,997	0,95	60	5	24	5	72
0,998	0,95	60	6	27	4	67
0,998	0,97	25	3	16	5	56
0,998	0,97	35	6	26	5	60
0,998	0,97	45	9	23	4	62
0,998	0,97	60	13	36	4	60
MIN			2 %	13 %	4 %	56 %
MAX			13 %	36 %	5 %	77 %

**Tabela 4.1.5:** Rezultati simulacij z metodo Monte Carlo. Za različne nabore vrednosti optičnih parametrov  $w$  (albedo),  $g$  (koeficient anizotropije) in  $s=1/\mu_t$  (povprečna dolžina proste poti med zaporednima interakcijama med fotonom in tkivom) sta podana:

(a) *delež signala, ki izvira zunaj tumorja* (posledica potovanja dela zaznanih fotonov skozi tkiva, ki ležijo pod tumorjem); (b) *presvetljeni delež tumorja* (del tumorske mase, skozi katerega so potovali zaznani fotoni, izražen kot delež celotnega tumorja).

Rezultati so podani za *odbojni* (1) in *presvetlitveni* (2) način delovanja metode NIRS.

Kot lahko vidimo na sliki 4.1.10, je v presvetlitvenem načinu presvetljen mnogo večji del tumorja, kot v odbojnem načinu, kar je razumljivo. Hkrati v presvetlitvenem načinu večji del zaznanih fotonov potuje tudi po delu tkiv zunaj tumorja (pod tumorjem), ki tako prispevajo k delu zaznanega signala. V tabeli 4.1.5 ugotovimo, da za izbrane nabore vrednosti optičnih parametrov 2 do 13% signala za odbojni način in 13 do 36% signala za presvetlitveni način delovanja lahko izvira iz tkiv, ki niso tumorska. V presvetlitvenem načinu s svetlobo presvetlimo več kot polovico prostornine tumorja (56 do 77%), v odbojnem načinu pa le 5 %. Sklepamo, da ne glede na nabor vrednosti treh optičnih parametrov, ki so bistveni za simulacijo, večina optičnega signala, ki ga zaznamo, izvira iz tumorskega tkiva. Okolica tumorja le malo prispeva k signalu, ker le relativno majhen delež zaznanih fotonov prodre tudi zunaj tumorja (elipsoid na slikah).

## 4.2 Polarografična oksimetrija

Parcialni tlak kisika v tumorjih smo izmerili štiri ure po končani elektroterapiji. Vse veljavno izmerjene vrednosti  $pO_2$  v tumorjih posameznih eksperimentalnih skupin smo združili in predstavili v obliki histogramov, ki ponazarjajo delež vrednosti v določenem velikostnem razredu z resolucijo 2,5 mmHg. Te enote uporabljamo, ker so uveljavljene

v medicinskem okolju. Za tumorje LPB so histogrami na slikah 4.2.1(a-c), za tumorje Sa-1 pa na slikah 4.2.2(a-e). Kumulativni podatki za oba tumorska modela so zbrani v tabeli 4.2.1.

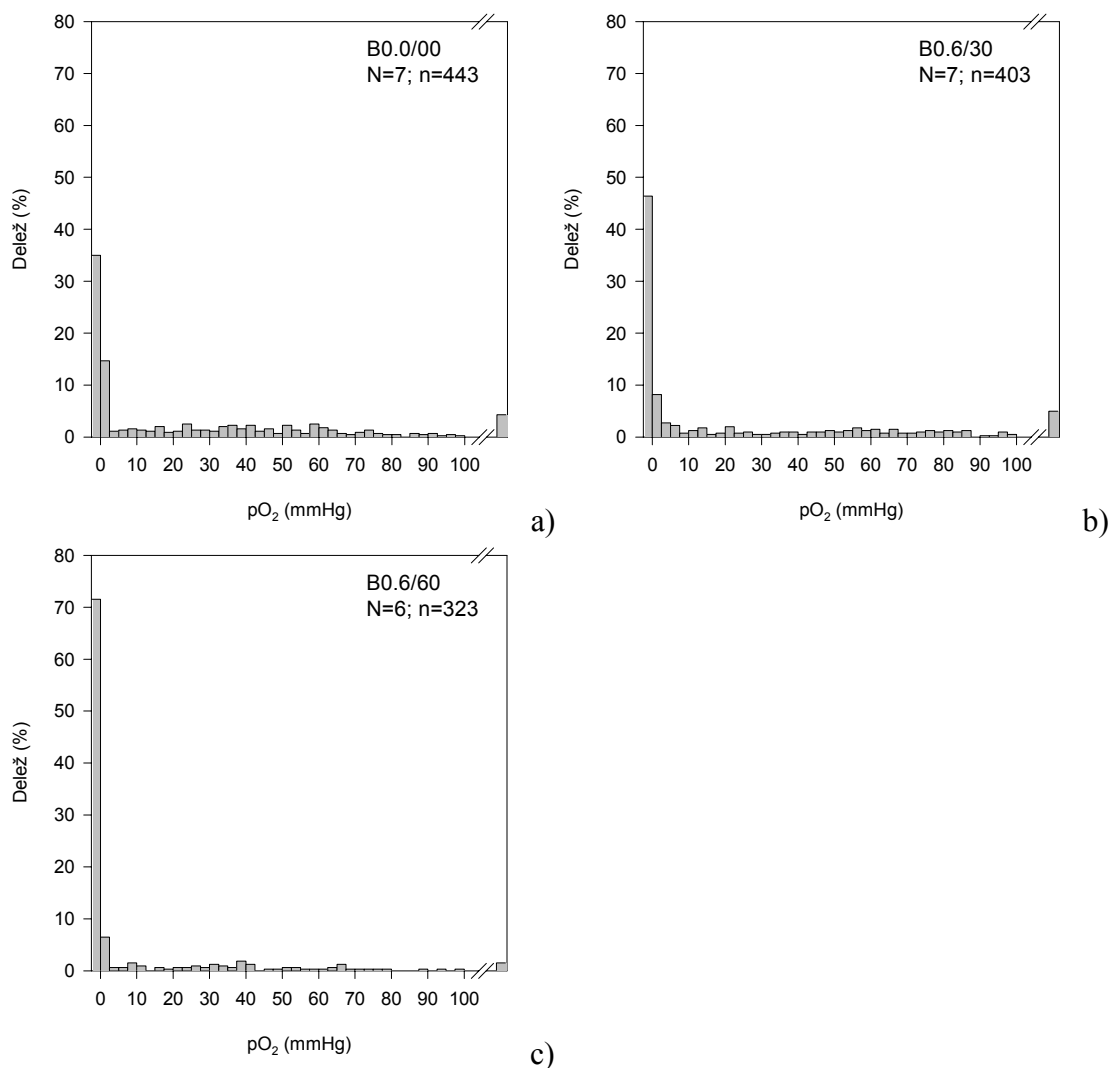
Na vseh histogramih takoj opazimo, da je porazdelitev izmerjenih vrednosti vse prej kot normalna. Velika večina izmerjenih vrednosti v vseh skupinah je pod mejo 2,5 mmHg. Precej izmerjenih vrednosti je bilo celo negativnih, vendar v območju med -1,2 in 0,0 mmHg. Te negativne vrednosti pO<sub>2</sub> so posledica neidealne kalibracije in predvsem posledica porabe kisika na merilni elektrodi, ki postane še posebno moteča pri najmanjših vrednostih pO<sub>2</sub>, s kakršnimi imamo pretežno opravka v eksperimentalnih tumorskih modelih. Poraba kisika na elektrodi torej lažno zmanjša dejansko vrednost pO<sub>2</sub>. Tej slabosti polarografske metode se ne moremo izogniti, izmerjene "rahlo negativne" vrednosti bi v resnici na histogramu pripadale razredu 0,0 - 2,5 mmHg, vendar smo jih narisali v samostojen razred -2,5 - 0,0 mmHg.

Kljub zelo nizkim vrednostim pO<sub>2</sub> že v izhodiščnih kontrolnih tumorjih lahko v histogramih obeh tumorskih modelov opazimo, da se z večanjem "doze" elektroterapije večja delež izmerjenih vrednosti v dveh najnižjih razredih do 2,5 mmHg, hkrati pa se manjša delež višjih vrednosti pO<sub>2</sub>, kar pomeni, da se oksigenacija zaradi DC-ET zmanjša. Vendar je težko primerjati odziv na DC-ET med posameznimi skupinami samo z opazovanjem histogramov na slikah 4.2.1 in 4.2.2. Zato smo izračunali delež izmerjenih vrednosti v vsaki skupini, ki so manjše od določene zgornje meje. Izbrane meje so 2,5, 5,0, 7,5 in 10,0 mmHg. Delež vrednosti pod 2,5 mmHg imenujejo v literaturi "hipoksični delež" HD (angl. *hypoxic fraction*), ker je bila dokazana korelacija med tem deležem in odzivnostjo tumorjev na radioterapijo. Večji kot je hipoksični delež v nekem tumorju, manjši učinek radioterapije lahko pričakujemo. Nekateri avtorji postavljajo mejo za hipoksični delež na 5,0 mmHg. Rezultati takega grupiranja vrednosti so prikazani na sliki 4.2.3 in v tabeli 4.2.2.

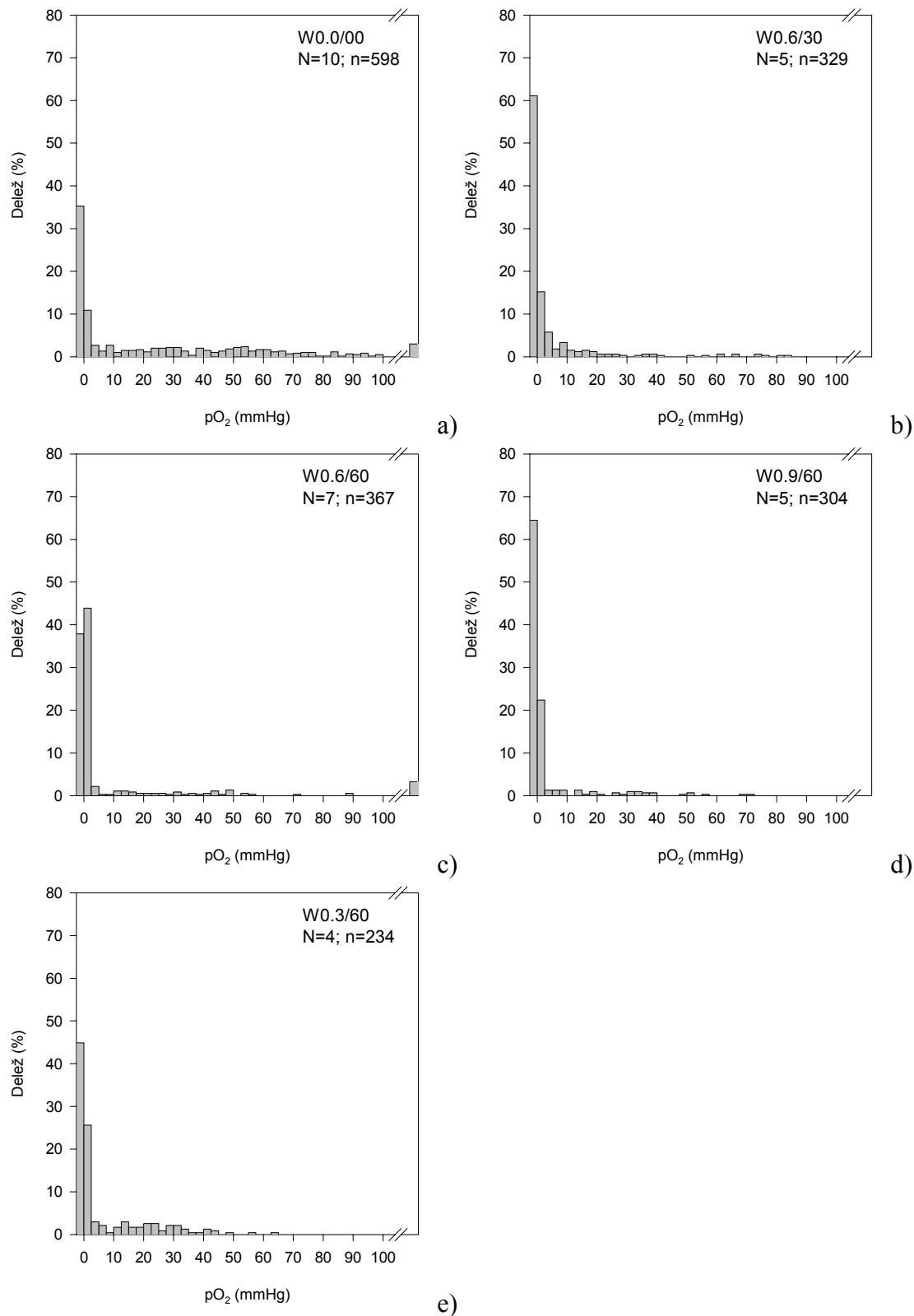
Mejna vrednost 2,5 mmHg oziroma hipoksični delež vrednosti pO<sub>2</sub> pod 2,5 mmHg HD<sub>2.5mmHg</sub> je očitno najbolj informativen (slika 4.2.3a). Vidimo lahko, da se HD<sub>2.5mmHg</sub> poveča po elektroterapiji v obeh tumorskih modelih in da je to povečanje dozno odvisno. Povečanje HD<sub>2.5mmHg</sub> pomeni zmanjšanje oksigenacije. Medtem ko je izhodiščni delež v kontrolnih skupinah obeh modelov zelo podoben (HD<sub>2.5mmHg</sub> približno 50%) in je povečanje po enourni elektroterapiji s tokom 0,6 mA pri eksperimentalnih skupinah B0.6/60 in W0.6/60 podobno (HD<sub>2.5mmHg</sub> približno 80%), pa samo polurna terapija z istim tokom pri tumorjih LPB skoraj nima učinka (skupina B0.6/30), medtem ko je pri tumorjih Sa-1 (skupina W0.6/30) skoraj enak tistemu po enourni terapiji. Povečanje amplitude toka še nekoliko zviša HD<sub>2.5mmHg</sub> pri tumorjih Sa-1 (skupina W0.9/60). Najmanjši učinek ima enurna terapija s tokom 0,3 mA (skupina W0.3/60). Tudi pri ostalih mejnih vrednostih (hipoksični deleži HD<sub>5.0mmHg</sub> HD<sub>7.5mmHg</sub> in HD<sub>10.0mmHg</sub>) dobimo podobne rezultate, vendar se razlike med skupinami W0.6/30, W0.6/60 in W0.9/60 pri tumorjih Sa-1 z dvigovanjem meje za HD nekoliko zabrišejo.

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P<0.05
B0.0/00	7	443	<b>24,8</b>	34,2	1,6	<b>3,5</b>	-1,2	202,9	
B0.6/30	7	403	<b>24,4</b>	36,9	1,8	<b>0,3</b>	-1,8	195,8	DA
B0.6/60	6	323	<b>9,6</b>	23,8	1,3	<b>-0,4</b>	-1,3	135,4	DA
W0.0/00	10	598	<b>24,9</b>	34,0	1,4	<b>7,2</b>	-1,2	223,2	
W0.6/30	5	329	<b>4,7</b>	13,9	0,8	<b>-0,3</b>	-1,0	83,2	DA
W0.6/60	7	367	<b>8,6</b>	25,4	1,3	<b>0,2</b>	-1,2	150,3	DA
W0.9/60	5	304	<b>3,2</b>	10,7	0,6	<b>-0,2</b>	-1,2	71,3	DA
W0.3/60	4	234	<b>6,6</b>	12,5	0,8	<b>0,2</b>	-1,1	62,8	DA

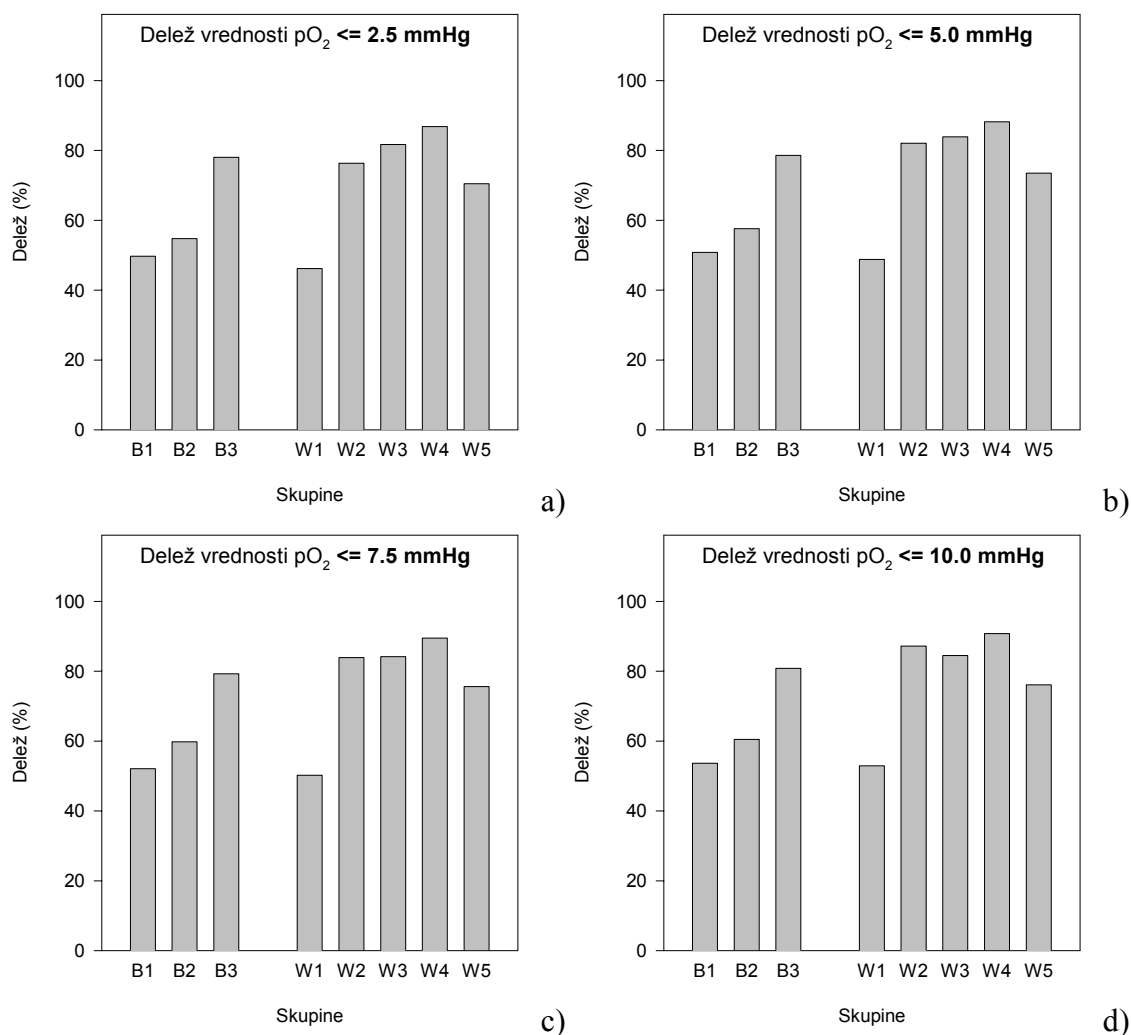
**Tabela 4.2.1:** Kumulativni rezultati, izračunani iz meritev pO<sub>2</sub>, v tumorjih obeh tumorskih modelov 4 ure po koncu DC-ET. N = število živali v skupini; n = skupno število izmerjenih vrednosti na vseh živalih; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost; P = statistična pomembnost razlik med skupinami z DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (ANOVA na rangih; Dunnov test).



**Slika 4.2.1(a-c):** Histogrami izmerjenih vrednosti pO<sub>2</sub> v tumorjih LPB na miših C57Bl/6 4 ure po DC-ET za vse tri eksperimentalne skupine. Kumulativni podatki so zbrani v tabeli 4.2.1.



**Slike 4.2.2(a-e):** Histogrami izmerjenih vrednosti  $pO_2$  v tumorjih Sa-1 na miših A/J 4 ure po DC-ET za vseh pet eksperimentalnih skupin. Kumulativni podatki so zbrani v tabeli 4.2.1.



Skupine: B1 = B0.0/00 (kontrola)  
 B2 = B0.6/30 (DC-ET 0.6mA/30min)  
 B3 = B0.6/60 (DC-ET 0.6mA/60min)

W1 = W0.0/00 (kontrola)  
 W2 = W0.6/30 (DC-ET 0.6mA/30min)  
 W3 = W0.6/60 (DC-ET 0.6mA/60min)  
 W4 = W0.9/60 (DC-ET 0.9mA/60min)  
 W5 = W0.3/60 (DC-ET 0.3mA/60min)

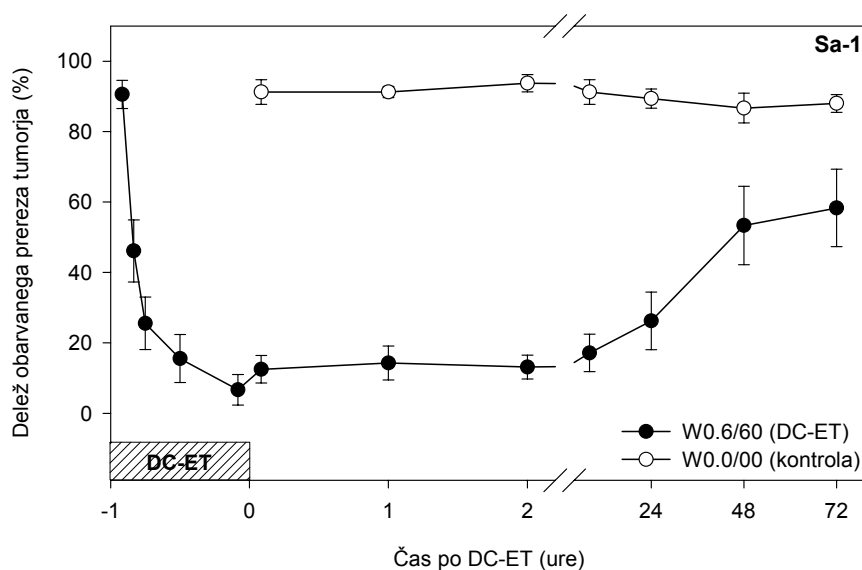
Skupina	N	n	Delež izmerjenih vrednosti $pO_2$ (%)			
			$\leq 2,5$ mmHg	$\leq 5,0$ mmHg	$\leq 7,5$ mmHg	$\leq 10,0$ mmHg
B0.0/00	7	443	49,7	50,8	52,1	53,7
B0.6/30	7	403	54,8	57,6	59,8	60,5
B0.6/60	6	323	78,0	78,6	79,3	80,8
W0.0/00	10	598	46,2	48,8	50,2	52,9
W0.6/30	5	329	76,3	82,1	83,9	87,2
W0.6/60	7	367	81,7	83,9	84,2	84,5
W0.9/60	5	304	86,8	88,2	89,5	90,8
W0.3/60	4	234	70,5	73,5	75,6	76,1

**Slike 4.2.3(a-d), Tabela 4.2.2:** Kumulativni deleži vrednosti  $pO_2$  do določene zgornje meje. Rezultati so izračunani iz meritev  $pO_2$  v tumorjih 4 ure po koncu DC-ET za oba tumorska modela (B = tumor LPB v miših C57Bl/6; W = tumor Sa-1 v miših A/J). N = število živali v skupini; n = skupno število izmerjenih vrednosti na vseh živalih.

### 4.3 Merjenje prekrvljenosti z barvilom Patent modro

#### Ozadje

Že v preteklosti smo dokazali, da dobimo z barvili Evans modro in Patent modro-vijolično praktično identične rezultate pri ocenjevanju prekrvljenosti tumorjev tako v kontrolni skupini kot pri tumorjih, na katerih smo izvedli elektroterapijo [46]. Zato in ker je barvni kontrast med obarvanim in neobarvanim delom tkiva boljši pri barvilu Patent modro-vijolično, smo se v predstavljeni študiji odločili za to barvilo. V prejšnji študiji smo ugotavljali, kako se prekrvljenost podkožnih tumorjev Sa-1 spreminja ob različnih časovnih trenutkih med in po enurni elektroterapiji. Rezultati te študije so na sliki 4.3.1 [46].



**Slika 4.3.1:** Spreminjanje obarvanosti tumorjev Sa-1 z barvilom PBV med in po enurni elektroterapiji s tokom amplitude 0.6 mA. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake [46].

S slike je jasno razvidno, da že med 15. in 30. minuto terapije obarvanost tumorskega tkiva močno pade in doseže najnižji nivo (približno 20%) v primerjavi z obarvanostjo kontrolnih tumorjev (približno 90%). Tako zmanjšanje prekrvljenosti je prisotno ves čas opazovanja (3 dni), vendar že drugi dan po terapiji opazimo ponovno izboljšanje prekrvitve. Opazimo tudi, da je variabilnost izmerjenih vrednosti pri tumorjih z elektroterapijo precej večja kot pri kontrolnih tumorjih. To kaže na občutne razlike v odzivih posameznih tumorjev na terapijo, kar ugotavljamo tudi z vsemi drugimi merilnimi metodami.

#### Novi rezultati

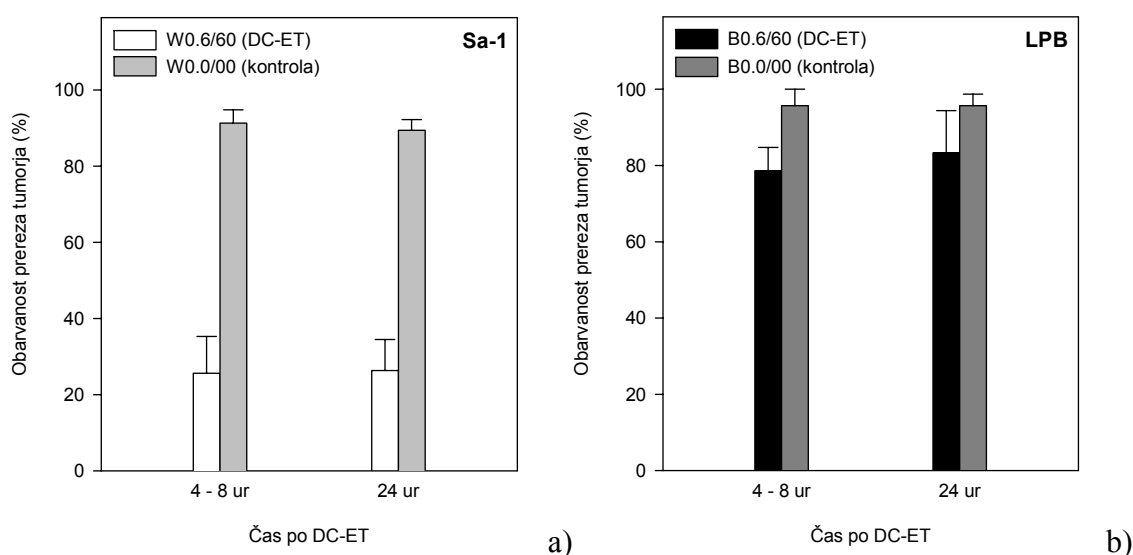
V novejši študiji vpliva DC-ET na prekrvljenost tumorjev z barvilom PBV so nas zanimale predvsem razlike v odzivih med dvema različnima tumorskima modeloma.



Na sliki 4.3.2 in v tabeli 4.3.1 je prikazano, kako se spremeni prekrvljenost (obarvanost) tumorjev obeh modelov v 4 do 8 urah po elektroterapiji in 24 ur po elektroterapiji. Tako pri tumorjih Sa-1 kot LPB je prišlo do zmanjšanja prekrvitve, ki se ni več spremenilo v prvih 24 urah po terapiji. Opazna je pomembna razlika med obema tumorskima linijama. Pri tumorjih Sa-1 pade obarvanost tkiva približno z 90% na 25%, pri tumorjih LPB pa samo s 95% na 80%. Sklepamo, da so s stališča pretoka krvi tumorji LPB manj odzivni na uporabljeno obliko elektroterapije kot tumorji Sa-1.

Primerjali smo odziva tumorjev Sa-1 različnih velikosti na elektroterapijo. Rezultati pri majhnih tumorjih (velikost približno 50 mm<sup>3</sup>) in pri velikih tumorjih (približno 150 mm<sup>3</sup>) so prikazani na sliki 4.3.3 in v tabeli 4.3.2. Ugotovimo lahko dvoje:

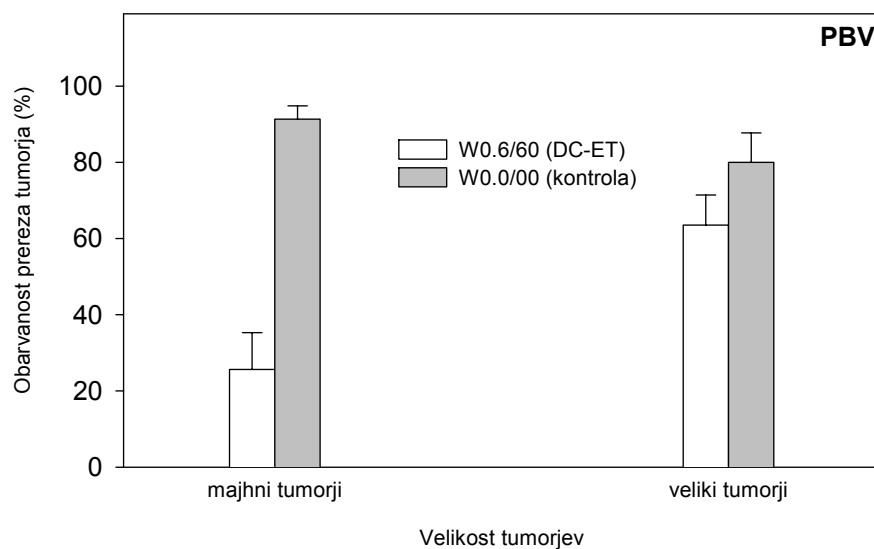
- odzivnost tumorjev na terapijo se z velikostjo zmanjša. Prekrvljenost po terapiji pri večjih tumorjih upade manj kot pri manjših;
- splošna prekrvljenost tumorjev (kontrola) z velikostjo tumorjev upada.



Obarvanost prereza tumorja (%)

Čas	Skupina	N	povp.	SD	SE	Med.	MIN.	MAX	P
4 - 8 h	W0.6/60	8	25,6	27,3	9,7	17,5	0,0	85,0	<0,001
	W0.0/00	8	91,3	9,9	3,5	95,0	70,0	100,0	
	B0.6/60	11	78,6	20,3	6,1	80,0	50,0	100,0	0,046
	B0.0/00	7	95,7	11,3	4,3	100,0	70,0	100,0	
24 h	W0.6/60	8	26,3	23,1	8,2	30,0	0,0	70,0	<0,001
	W0.0/00	8	89,4	7,8	2,8	90,0	75,0	100,0	
	B0.6/60	9	83,3	33,3	11,1	100,0	0,0	100,0	0,594
	B0.0/00	7	95,7	7,9	3,0	100,0	80,0	100,0	

**Slika 4.3.2, Tabela 4.3.1:** Obarvanost tumorjev Sa-1 (a) in LPB (b) v dveh različnih časovnih intervalih po elektroterapiji. Prikazani so podatki za tumorje v skupinah z DC-ET in za kontrolne tumorje. N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost; P = statistična pomembnost razlik med skupino z DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (Mann-Whitneyev test na vsoti rangov). Na sliki so prikazana povprečja in standardne napake.



Obarvanost prereza tumorja (%)

Skupina	N	vol. (mm <sup>3</sup> )	povp.	SD	SE	Med.	MIN.	MAX
W0.6/60	8	49 ± 7	25,6	27,3	9,7	17,5	0,0	85,0
W0.0/00	8	42 ± 4	91,3	9,9	3,5	95,0	70,0	100,0
W0.6/60	13	122 ± 16	63,5	28,5	7,9	60,0	20,0	95,0
W0.0/00	5	151 ± 13	80,0	17,3	7,7	90,0	50,0	90,0

**Slika 4.3.3, Tabela 4.3.2:** Primerjava obarvanosti tumorjev Sa-1 pri različnih začetnih velikostih tumorjev. Rrikazani so podatki za tumorje v skupinah z DC-ET in za kontrolne tumorje. N = število živali v skupini; vol. = velikost tumorjev (povp. ± SD); povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost. Na sliki so prikazana povprečja in standardne napake.

#### 4.4 Merjenje prekrvljenosti z rubidijem <sup>86</sup>Rb

##### Splošne ugotovitve

Na slikah 4.4.1-2 in v tabelah 4.4.1-2 so povzeti povprečni rezultati in mediane za oba tumorska modela. Pri obeh vidimo, da prekrvljenost v tumorjih, izražena z RPT (relativna prekrvljenost tkiva), že po 15 minutah elektroterapije pade na najnižji nivo, ki je za vsaj polovico nižji od izhodiščnega, ki ga podajajo kontrolni tumorji. Pri tumorjih Sa-1 ostane RPT tako znižan vsaj dva dneva, tretji dan pa ponovno zasledimo povečano prekrvljenost, saj celo preseže tisto pri kontrolnih tumorjih (slika 4.4.1). Podobno je pri tumorjih LPB, vendar je videti, da je ponovno povečanje prekrvljenosti v dneh po terapiji pri teh tumorskih modelih hitrejše (slika 4.4.2). Kontrolni tumorji obeh modelov med tridnevnom opazovanjem kažejo postopno zmanjševanje prekrvljenosti, kar je pričakovano, saj rastejo neovirano. Znano pa je, da prekrvljenost in oksigenacija v malignem tkivu upada z velikostjo tumorjev [20 - 25].

Prekrvljenost mišičnega tkiva v zadnji levi nogi poskusnih živali smo analizirali s ciljem ugotoviti, ali sicer lokalna uporaba DC-ET na tumorju povzroči pomembne spremembe tudi v tkivih, ki niso neposredno izpostavljena električnemu toku. Prekrvljenost mišic živali, katerih tumorji so bili izpostavljeni DC-ET, med opazovanjem ni bistveno razlikovala od prekrvljenosti mišice kontrolnih živali. Prekrvljenost mišic v nobeni skupini ni upadala v dneh po terapiji. Oboje je pričakovan rezultat. Vse povedano velja za oba tumorska modela (sliki 4.4.1,2).

Pri tumorjih Sa-1 opazimo, da je prekrvljenost tumorjev 24 ur po terapiji precej boljša kot takoj po terapiji ali 48 ur po terapiji. Nepričakovan rezultat je posledica majhnega števila živali v tej skupini (N=4) in nesrečnega naključja, da pri kar treh od štirih tumorjev tudi makroskopsko ni bilo videti bistvenega učinka terapije. Po terapiji so rastli naprej enako hitro kot kontrolni tumorji. Veliko razpršenost v učinku DC-ET na posamezne tumorje pa je pojav, ki smo ga opazili prav pri vseh študijah učinka DC-ET na rast podkožnih tumorjev. Najverjetnejše razloge za to bomo navedli v poglavju *Razprava*.

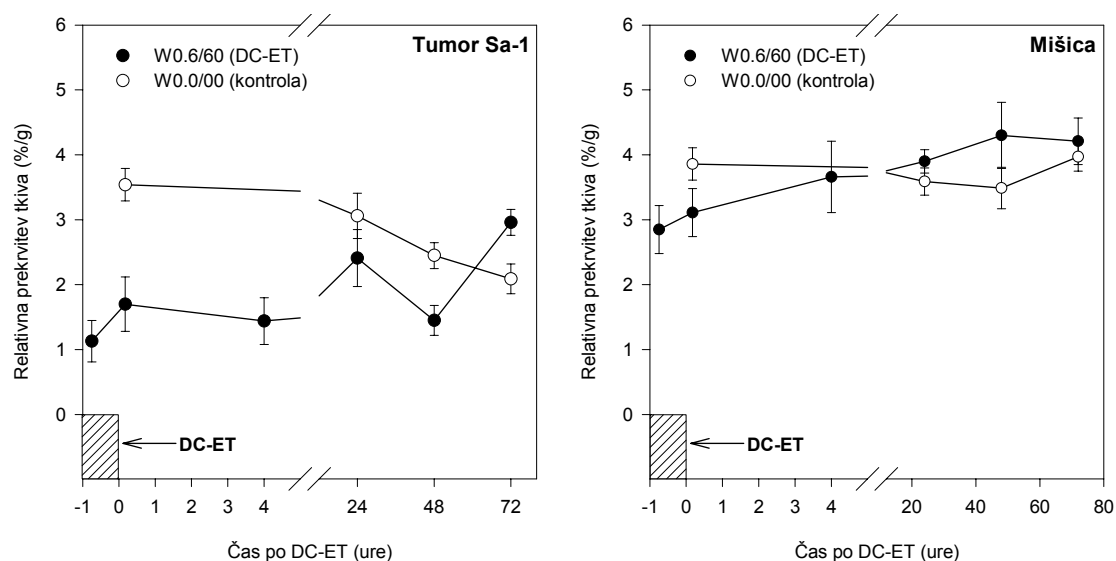
Prekrvljenost, ki smo jo izmerili na tumorjih in mišicah pri živalih C57Bl/6 (slika 4.4.2), je bila absolutno gledano precej nižja kot pri živalih A/J (slika 4.4.1). Menimo, da je to posledica dejstva, da smo pri poskusih na miših C57Bl/6 uporabljali precej starejšo raztopino rubidija. Absolutna radioaktivnost rubidija je bila zato zmanjšana in prispevek naravnega radioaktivnosti ozadja k izmerjenim vrednostim je bil bistveno večji kot pri poskusih na živalih A/J. Pri obeh tumorskih modelih je prekrvljenost kontrolnih tumorjev na začetku opazovanja zelo podobna prekrvljenosti mišic (RPT približno 3,5 %/g pri živalih A/J in približno 2,0 %/g pri živalih C57Bl/6). Zato smo za lažjo medsebojno primerjavo odziva obeh tumorskih modelov na DC-ET izrazili prekrvljenost tumorjev določene podskupine kot delež prekrvljenosti kontrolnih tumorjev v istem času po elektroterapiji:

$$RTP_{DC-ET \text{ ali KONTROLA}} (\%) = 100 \times \frac{RTP_{DC-ET \text{ ali KONTROLA}} (\% / g)}{RTP_{KONTROLA} (\% / g)}. \quad (4.1)$$

Pri tem smo za časovne trenutke 15 minut po začetku DC-ET ter 10 minut in 4 ure po koncu DC-ET upoštevali za normiranje rezultata vrednost iste kontrolne skupine (10 min), saj se v štirih urah prekrvljenost kontrolnih tumorjev zanesljivo ni mogla bistveno spremeniti.

Tako obdelani rezultati so v tabeli 4.4.3a,b, kjer je po enačbi 4.1 izračunano razmerje povprečnih vrednosti in median iz tabel 4.4.1 in 4.4.2 za oba tumorska modela. Po teh podatkih sklepamo:

- da je zaradi DC-ET prekrvljenost tumorjev Sa-1 nekoliko bolj zmanjšana (na približno 40% začetne vrednosti) kot pri tumorjih LPB (na približno 60% začetne vrednosti);
- da je učinek pri tumorjih Sa-1 nekoliko dolgotrajnejši kot pri tumorjih LPB, saj je prekrvljenost 48 ur po DC-ET pri Sa-1 približno 55%, pri LPB pa 90% vrednosti v kontrolnih tumorjih.



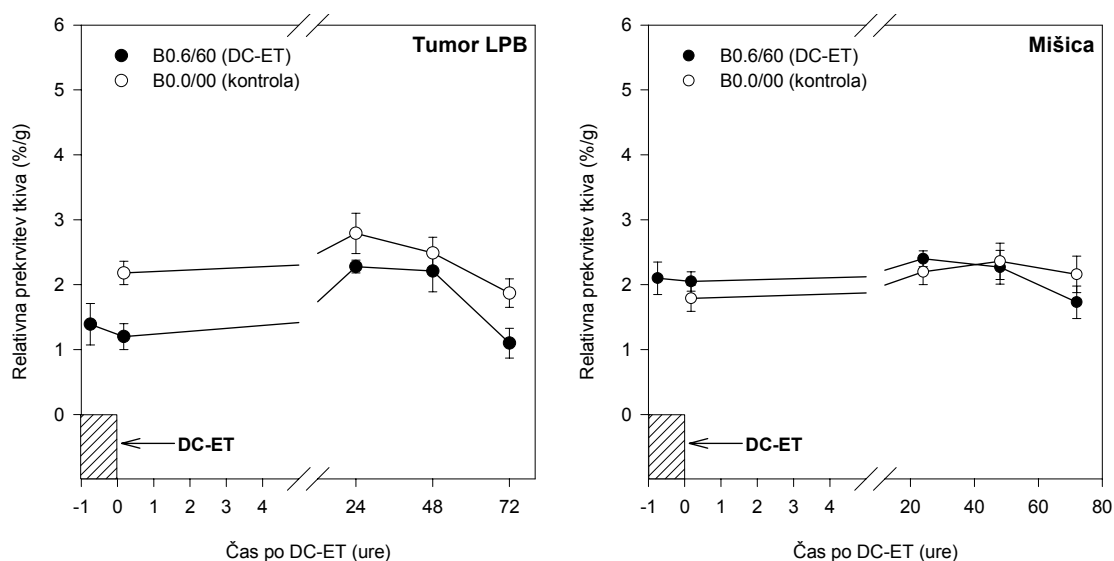
Tumor Sa-1: relativna prekrvljenost tkiva (%/g)

Čas	Skupina	N	povp.	SD	SE	Med.	MIN.	MAX	P
-45 min	W0.6/60	6	1,13	0,78	0,32	1,19	0,19	2,10	0,002
	W0.0/00	--	--	--	--	--	--	--	
10 min	W0.6/60	5	1,70	0,95	0,42	1,32	0,81	2,82	0,004
	W0.0/00	6	3,54	0,62	0,25	3,52	2,83	4,29	
4 h	W0.6/60	6	1,44	0,88	0,36	1,27	0,48	3,07	0,009
	W0.0/00	--	--	--	--	--	--	--	
24 h	W0.6/60	6	2,41	1,07	0,44	2,49	0,98	3,48	0,476
	W0.0/00	4	3,06	0,69	0,35	3,00	2,30	3,94	
48 h	W0.6/60	6	1,45	0,57	0,23	1,29	1,01	2,56	0,052
	W0.0/00	5	2,45	0,45	0,20	2,37	2,01	3,17	
72 h	W0.6/60	4	2,96	0,40	0,20	2,80	2,68	3,56	0,029
	W0.0/00	4	2,09	0,45	0,23	2,12	1,59	2,55	

Mišica: relativna prekrvljenost tkiva (%/g)

Čas	Skupina	N	povp.	SD	SE	Med.	MIN.	MAX	P
-45 min	W0.6/60	6	2,85	0,90	0,37	2,84	1,78	4,05	0,065
	W0.0/00	--	--	--	--	--	--	--	
10 min	W0.6/60	5	3,11	0,82	0,37	3,22	2,19	4,23	0,177
	W0.0/00	6	3,86	0,60	0,25	3,89	2,89	4,70	
4 h	W0.6/60	6	3,66	1,35	0,55	3,12	2,33	5,91	0,485
	W0.0/00	--	--	--	--	--	--	--	
24 h	W0.6/60	6	3,90	0,44	0,18	3,79	3,40	4,71	0,257
	W0.0/00	4	3,59	0,41	0,21	3,49	3,26	4,14	
48 h	W0.6/60	6	4,30	1,24	0,51	3,86	3,33	6,67	0,329
	W0.0/00	5	3,49	0,71	0,32	3,60	2,84	4,55	
72 h	W0.6/60	4	4,21	0,72	0,36	4,25	3,38	4,97	0,886
	W0.0/00	4	3,97	0,43	0,22	4,05	3,39	4,37	

**Slika 4.4.1, Tabela 4.4.1:** Študija vpliva DC-ET na prekrvljenost tumorjev Sa-1 in stegenske mišice na miših A/J z metodo merjenja vsebnosti radioaktivnega  $^{86}\text{Rb}$  v tkivu. Na slikah so povprečja in standardne napake. Tabela: N = št. živali v skupini; povp. = povprečna vred.; SD = st. deviacija; SE = st. napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost; P = statistična pomembnost razlik med skupino z DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (Mann-Whitneyev test na vsoti rangov).



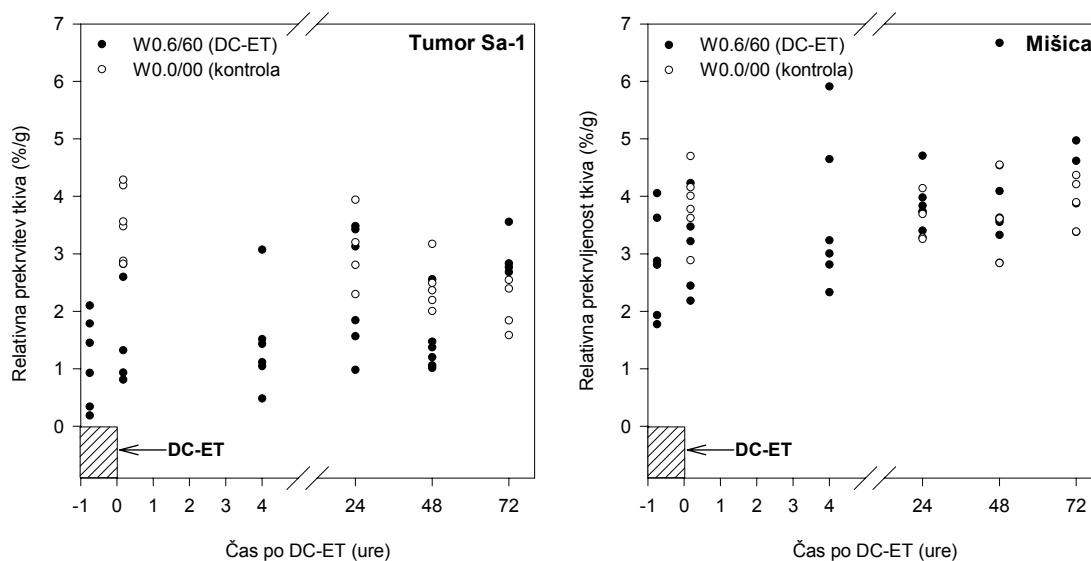
Tumor LPB: relativna prekrvljenost tkiva (%/g)

Čas	Skupina	N	povp.	SD	SE	Med.	MIN.	MAX	P
-45 min	B0.6/60	6	1,39	0,78	0,32	1,42	0,30	2,36	0,093
	B0.0/00	--	--	--	--	--	--	--	
10 min	B0.6/60	7	1,20	0,54	0,20	1,41	0,40	1,82	0,005
	B0.0/00	6	2,18	0,44	0,18	2,16	1,61	2,77	
24 h	B0.6/60	6	2,28	0,24	0,10	2,31	1,93	2,60	0,247
	B0.0/00	5	2,79	0,69	0,31	2,84	1,86	3,55	
48 h	B0.6/60	6	2,21	0,77	0,32	2,23	1,13	3,20	0,537
	B0.0/00	5	2,49	0,53	0,24	2,39	2,03	3,29	
72 h	B0.6/60	5	1,10	0,52	0,23	1,08	0,43	1,75	0,032
	B0.0/00	5	1,87	0,48	0,22	1,89	1,14	2,48	

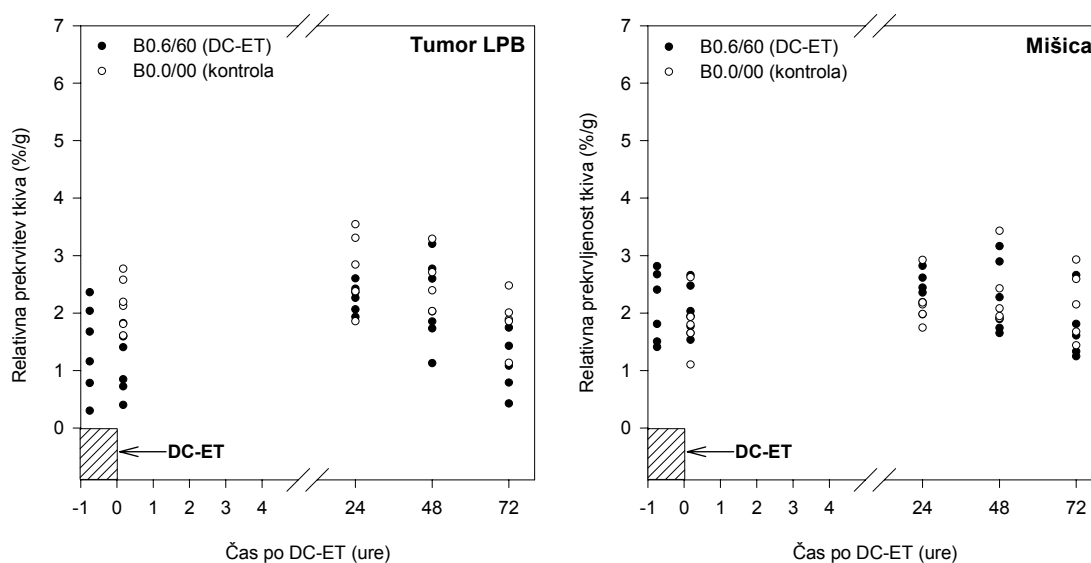
Mišica: relativna prekrvljenost tkiva (%/g)

Čas	Skupina	N	povp.	SD	SE	Med.	MIN.	MAX	P
-45 min	B0.6/60	6	2,10	0,61	0,25	2,11	1,41	2,82	0,485
	B0.0/00	--	--	--	--	--	--	--	
10 min	B0.6/60	7	2,05	0,39	0,15	1,95	1,54	2,66	0,234
	B0.0/00	6	1,79	0,49	0,20	1,73	1,11	2,62	
24 h	B0.6/60	6	2,40	0,30	0,12	2,40	1,98	2,82	0,329
	B0.0/00	5	2,20	0,44	0,20	2,15	1,75	2,92	
48 h	B0.6/60	6	2,27	0,63	0,26	2,09	1,65	3,17	0,537
	B0.0/00	5	2,36	0,63	0,28	2,08	1,91	3,43	
72 h	B0.6/60	5	1,73	0,56	0,25	1,61	1,25	2,66	0,310
	B0.0/00	5	2,16	0,62	0,28	2,15	1,44	2,93	

**Slika 4.4.2, Tabela 4.4.2:** Študija vpliva DC-ET na prekrvljenost tumorjev LPB in stegenske mišice na miših C57Bl/6 z metodo merjenja vsebnosti radioaktivnega izotopa rubidija  $^{86}\text{Rb}$  v tkivu. Na slikah so povprečja in standardne napake. Tabela: N = št. živali v skupini; povp. = povprečna vred.; SD = st. deviacija; SE = st. napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost; P = statistična pomembnost razlik med skupino z DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (Mann-Whitneyev test na vsoti rangov).



**Slika 4.4.3:** Študija vpliva DC-ET na prekrvljenost tumorjev Sa-1 in stegenske mišice na miših A/J z metodo merjenja vsebnosti radioaktivnega izotopa rubidija  $^{86}\text{Rb}$  v tkivu. Prikazana je razpršenost vrednosti izmerjenih na posameznih živalih.



**Slika 4.4.4:** Študija vpliva DC-ET na prekrvljenost tumorjev LPB in stegenske mišice na miših C57Bl/6 z metodo merjenja vsebnosti radioaktivnega izotopa rubidija  $^{86}\text{Rb}$  v tkivu. Prikazana je razpršenost vrednosti izmerjenih na posameznih živalih.

Tumor Sa-1		a)	
Čas	Skupina	% povp.	% med.
-45 min	W0.6/60	32	34
	W0.0/00	--	--
10 min	W0.6/60	45	38
	W0.0/00	100	100
4 h	W0.6/60	41	36
	W0.0/00	--	--
24 h	W0.6/60	79	83
	W0.0/00	100	100
48 h	W0.6/60	59	54
	W0.0/00	100	100
72 h	W0.6/60	142	132
	W0.0/00	100	100

Tumor LPB		b)	
Čas	Skupina	% povp.	% med.
-45 min	B0.6/60	64	66
	B0.0/00	--	--
10 min	B0.6/60	55	65
	B0.0/00	100	100
4 h	B0.6/60	--	--
	B0.0/00	--	--
24 h	B0.6/60	82	81
	B0.0/00	100	100
48 h	B0.6/60	89	93
	B0.0/00	100	100
72 h	B0.6/60	59	57
	B0.0/00	100	100

**Tabela 4.4.3:** Relativna prekrvljenost tumorjev, na katerih je bila izvedena DC-ET izražena kot delež prekrvljenosti kontrolnih tumorjev v ustreznih skupinah. a) tumorji Sa-1; b) tumorji LPB. V predzadnjem stolpcu obeh tabel so izražena razmerja povprečnih vrednosti iz tabel 4.4.1,2, v zadnjem stolpcu pa razmerja median iz teh dveh tabel.





## 5 RAZPRAVA

### 5.1 Bližnje-infrardeča spektroskopija

#### 5.1.1 Merjenje z inštrumentom NIRO<sub>2</sub>X-2

Študij vpliva elektroterapije s šibkim enosmernim električnim tokom (DC-ET) je nedvomno pokazala, da DC-ET pomembno vpliva na prekrvitev in s tem posledično tudi na oksigenacijo podkožnih čvrstih tumorjev v primeru dveh različnih tumorskih modelov, v tem primeru fibrosarkoma LPB na miših C57Bl/6 in fibrosarkoma Sa-1 na miših A/J.

DC-ET očitno oslabi ali celo prekine dotok sveže krvi v tumor. To sklepamo predvsem zaradi relativno hitrega padca koncentracije HbO po začetku terapije. Padeč HbO je hitrejši in izrazitejši kot hkratno naraščanje HbR v začetni fazi elektroterapije, zato se tu zmanjša tudi koncentracija skupnega hemoglobina HbT, kar pomeni, da se volumen krvi v tkivu prehodno zmanjša. Logično je, da je ob dotoku sveže krvi prizadet tudi odtok venozne krvi, kar postane očitno v kasnejši fazi, ko HbO že doseže najnižji nivo, medtem ko HbR in s tem tudi HbT še narašča. Še kasneje, navadno proti koncu elektroterapije in še kasneje, k naraščanju HbT prispeva tudi počasno naraščanje HbO. Zdi se, da je odtok venozne krvi bolj prizadet kot dotok sveže krvi. S tem bi lahko razložili, zakaj koncentraciji HbR in HbT naraščata skozi celotno opazovanje. Kri verjetno z zmanjšanim pretokom še pronica v tumorsko tkivo, odtekati pa ne more, ker je odtok bolj prizadet. Zato se kri nabira v tumorskem ožilju. S tem pritisk na stene ožilja narašča in po določenem času verjetno pride do izliva krvi iz žil v tumor. Sodimo, da se to zgodi, ko začne naraščati tudi HbO. Takšen potek dogodkov podpira dejstvo, da smo v izrezanih tumorjih, na katerih je bila izvedena DC-ET, zelo pogosto opazili makroskopska področja izlitja krvi, ki jih v kontrolnih tumorjih skorajda ni bilo. V tumorjih Sa-1 je bil ta pojav izrazitejši kot v tumorjih LPB. Hkrati velja poudariti, da je

bilo tudi naraščanje HbT v tumorjih Sa-1 močnejše kot v tumorjih LPB in da ob koncu opazovanja še ni bilo videti, da bi se ta težnja zaustavila, medtem ko se je naraščanje HbT v tumorjih LPB proti koncu opazovanja že bistveno upočasnilo.

Enosmerni električni tok povzroči ob elektrodah burne kemične reakcije - elektrolizo. Najbolj očitna posledica je dokazano velika sprememba pH v tkivu ob elektrodah [8]. Zaradi tega pride do poškodb podkožnega tkiva v neposredni okolici elektrod, kar je vidno tudi makroskopsko. Spomnimo se, da se elektrode pri naši obliki DC-ET nahajajo na dveh nasprotnih straneh tumorja, približno 5 mm stran od roba tumorja. Sklepamo, da pride na mestu vstavitve elektrod zaradi elektrolize do poškodb in okluzije žil, ki napajajo tumor. Ugotovili smo, da se odzivi posameznih tumorjev na DC-ET lahko medsebojno močno razlikujejo, predvsem v amplitudi sprememb koncentracij kromoforov, pa tudi v časovni dinamiki teh sprememb. Vemo tudi, da je hitrost rasti tumorjev obeh tumorskih modelov v dneh po terapiji veliko bolj heterogena kot pri kontrolnih tumorjih. Vedno imamo opravka s tumorji, od takih, ki se po terapiji za več dni močno zmanjšajo, do tistih, ki rastejo neovirano naprej, kot da terapije sploh ne bi bilo. Podobno raznolikost odzivov ugotovimo v rezultatih študije z metodo NIRS. Zato sklepamo, da je za učinkovitost ali neučinkovitost DC-ET bistvena namestitve elektrod v podkožju glede na ožilje, ki napaja tumor. Na to pa vplivata tako vstavljanje elektrod v podkožje kot splošno znana morfološka variabilnost med posameznimi tumorji in med njihovimi ožilji.

Na variabilnost rezultatov metode NIRS gotovo vplivajo tudi dejavniki uporabe metode same. Naštejmo najpomembnejše:

- Zaradi majhne razdalje med sprejemno in oddajno optodo, v našem primeru med 5 in 10 mm, postane pomembna napaka pri določanju te razdalje.
- Kvaliteta optičnega stika med optodama in površino kože se lahko spreminja med meritvijo zaradi nenadzorovanih premikov merilnega mesta.
- Pomen kota med sprejemno in oddajno optodo narašča z manjšanjem razdalje med njima, saj vpliva na dolžino povprečne optične poti fotonov in s tem na volumen tkiva, ki ga dejansko zajamemo z meritvijo.
- Neznani prispevek okoliških tkiv k izmerjenemu signalu. Ta problem je znova povezan z majhnostjo merilnega objekta in ga obravnavamo v poglavju o simulaciji transporta svetlobe v tumorskem elipsoidu.

Ugotovili smo, da kljub podobnemu odzivu tumorjev LPB in Sa-1 na DC-ET obstajajo določene razlike med tumorskima modeloma. Pri tumorjih LPB v večini primerov koncentraciji HbR in HbT proti koncu elektroterapije vedno počasneje naraščata, medtem ko pri večini tumorjev Sa-1 še naprej naraščata z nezmanjšano hitrostjo. Pri tumorjih LPB je tudi manj izrazito naraščanje HbO po začetnem zmanjšanju kot pri tumorjih Sa-1.

### 5.1.2 Merjenje z inštrumentom OS30

Že v opisu materialov in metod smo omenili, da nas je pri inštrumentu OS30 zanimala primerjava z drugimi metodami, predvsem pa z rezultati klasične oblike bližnje-infrardeče spektroskopije.

Ugotovili smo, da se rezultati OS30 zelo dobro ujemajo z rezultati drugih metod in jih smiselno dopolnjujejo. Medtem ko smo z inštrumentom NIRO<sub>2</sub>X-2 ugotovili, da se prekrvitev in oksigenacija tumorjev zmanjšata že med elektroterapijo, nam rezultati OS30 kažejo, da je stanje prekrvitve tudi 4 ure po terapiji še močno zmanjšano. Pokazala se je tudi dozna odvisnost tega zmanjšanja od amplitude in trajanja dovedenega električnega toka. To smo pokazali že v eni od prejšnjih študij na tumorjih Sa-1 in sicer z inštrumentom NIRO<sub>2</sub>X-2. Tako kot NIRO<sub>2</sub>X-2 tudi OS30 pokaže povečano koncentracijo skupnega hemoglobina v tumorjih po terapiji. Dejansko se torej v tumorjih zaradi terapije nabira kri. Ob dokazano zmanjšanem pretoku krvi skozi tumor je edina možna razlaga za povečano količino krvi to, da je ob prizadetem napajalnem ožilju tumorja nekoliko bolj prizadeta venska stran, zaradi česar kri zastaja v območju tumorja. Tudi makroskopsko smo v večini tumorjev Sa-1, ki so bili izpostavljeni elektroterapiji, opazili izlito kri, kar potrjuje to teorijo.

Z obema napravama za NIRS smo ugotovili, da se tumorji LPB nekoliko manj odzovejo na enako obliko elektroterapijo kot tumorji Sa-1. Razlike med obema tumorskima modeloma pa so se pri inštrumentu OS30 pokazale tudi v kontrolnih skupinah. Tumorji LPB naj bi bili že v osnovi bolje preskrbljeni s kisikom kot tumorji Sa-1, saj je nasičenost hemoglobina s kisikom (Sat) višja kot pri Sa-1. Do tega rezultata smo skeptični, ker se je podobna razlika pokazala tudi med vrednostmi Sat v stegenski mišici enega in drugega modela, za kar težje najdemo razlago, čeprav je seveda možno, da obstajajo določene razlike med dvema vrstama miši. Pri vsem tem pa ni bilo razlike med vrednostmi Sat v normalnem tkivu v neposredni okolici tumorja.

Ker tudi proizvajalec inštrumenta OS30 poudarja, da je potrebno numerični algoritem inštrumenta posebej prilagoditi za vsako vrsto uporabe (različna tkiva), je povsem mogoče, da so nepričakovane razlike med živalmi kontrolnih skupin posledica različnih lastnosti kože pri črnih miših C57Bl/6 in belih miših A/J, predvsem pigmentacije.

### 5.1.3 Simulacija z metodo Monte Carlo

Na podlagi rezultatov modeliranja transporta svetlobe v tkivu z metodo Monte Carlo sklepamo, da večina signala, ki ga z metodo NIRS zaznamo na podkožnih tumorjih velikosti in oblike, s kakršno smo imeli opravka pri naših poskusih, izvira iz tumorskega tkiva (in kože, ki ga pokriva). Tkiva, ki ležijo globlje od tumorja, verjetno ne prispevajo bistveno k zaznanemu signalu. Da bi to lahko z gotovostjo trdili, bi morali simulacijo izvesti ob upoštevanju dejanskih vrednosti optičnih parametrov za uporabljene tumorje, ki jih ne poznamo. Upravičeno pričakujemo, da so dejanske vrednosti teh parametrov znotraj območij vrednosti, ki smo jih uporabili pri simulacijah v tem delu, ker so bile za meje izbrane ekstremne vrednosti za podobna tkiva iz dostopne literature. Zanesljivost

simulacij bi lahko v manjši meri povečali tudi s tem, da bi namesto elipsoida uporabili realnejšo obliko tumorja in če bi v modelu upoštevali različne optične lastnosti posameznih delov tkiva (segmentacija tkiva). Način merjenja, ki smo ga uporabili pri inštrumentu OS30, je smiseln, saj rezultati simulacije kažejo, da v odbojnem načinu delovanja, ko sta oddajni in sprejemni optični vodnik združena (kot pri OS30), presvetlimo le manjši del tumorja (približno 5% celotne tumorske prostornine. Za podatek o oksigenaciji celotnega tumorja je torej boljše opraviti meritev na več mestih, kar smo pri naših poskusih tudi storili.

## 5.2 Polarografična oksimetrija

V študiji vpliva elektroterapije DC-ET na oksigenacijo tumorjev smo ugotovili, da se delež najnižjih vrednosti  $pO_2$  po terapiji poveča. Razliko v primerjavi s kontrolnimi tumorji zaznamo pri obeh tumorskih modelih, čeprav so tumorji obeh linij že v izhodišču (obe kontrolni skupini brez elektroterapije) zelo hipoksični. Približno 50% vseh izmerjenih vrednosti (hipoksični delež) pri obeh modelih je nižjih od 2.5 mmHg. Ta delež po enourni terapiji s tokom 0.6 mA pri obeh modelih naraste na približno 80%. Kljub zelo podobnim učinkom terapije pri teh parametrih elektroterapije (trajanje in tok) se pokaže, da je odzivnost pri tumorjih Sa-1 večja kot pri LPB, saj polurna terapija s tokom 0.6 mA pri tumorjih LPB izzove precej manjše povečanje hipoksičnega deleža kot pri Sa-1.

Oksigenacija tumorjev po elektroterapiji je slabša kot pred terapijo. Zmanjšanje je dozno odvisno od elektroterapije, torej od trajanja in amplitude uporabljenega toka. Do zmanjšanja prisotnosti kisika v tkivu lahko pride zaradi povečanja porabe kisika ob njegovem nespremenjenem dotoku ali zaradi zmanjšanja dotoka kisika v tkivo ob nespremenjeni porabi. Če se zmanjša ali celo zaustavi pretok krvi skozi tumorsko tkivo, zanesljivo upade parcialni tlak kisika v tkivu. Dodatno pomanjkanje kisika v že tako ali tako hipoksičnem okolju pa zaviralno učinkuje na rast tumorjev, saj kljub pretežno glikolitičnem metabolizmu vedno več tumorskih celic ostaja brez kritične količine kisika za preživetje in razmnoževanje.

## 5.3 Merjenje prekrvljenosti z barvilom Patent modro

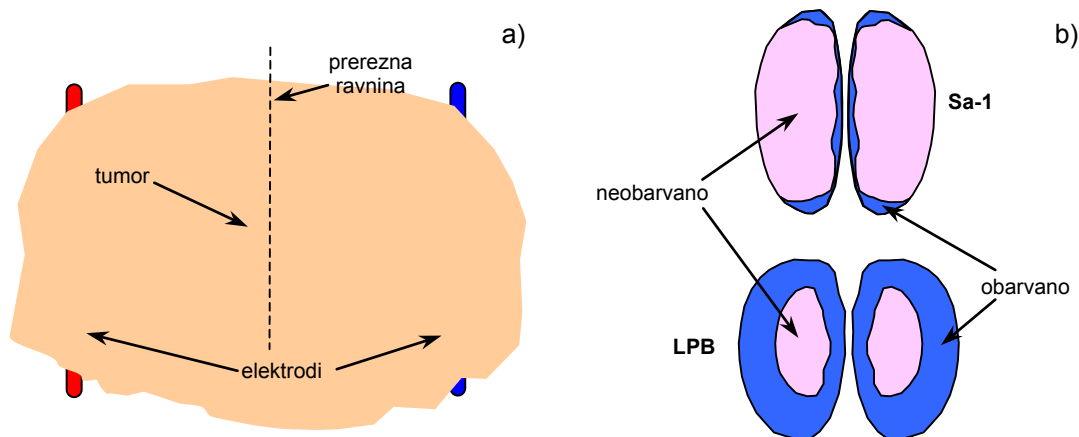
Študija z barvilom Patent modro-vijolično je nesporno pokazala, da z električnim tokom začasno poslabšamo in v posameznih primerih celo zaustavimo pretok krvi skozi tumor. S tem ne zavremo le dotok kisika v tumor, temveč tudi dotok vseh ostalih snovi in odtok razkrojnikov tumorskega tkiva. To zanesljivo zaviralno deluje na rast tumorskih celic. Zmanjšanje prekrvljenosti je bilo pomembno bolj očitno pri tumorjih Sa-1, čeprav smo ga pokazali tudi pri tumorjih LPB.

Že v prejšnji študiji z barvilom PBV, ko smo raziskovali časovni potek spreminjanja prekrvljenosti tumorjev Sa-1 po DC-ET, smo opazili, da se začne območje neobarvanosti tumorskega tkiva največkrat širiti s tiste strani tumorja, ki je bila bližje

katodi (negativni elektrodi). Pojav je bil še posebno očiten v časovnih trenutkih 5 do 30 minut po začetku elektroterapije. Sklepamo lahko, da je poslabšana prekrvljenost vsaj delno, če ne v celoti, posledica poškodb žil oziroma žilne okluzije na mestu, kjer so vstavljene elektrode, torej zunaj tumorja, in da do okluzije pride prej na katodni strani. Temu v prid govori tudi dejstvo, da so bile poškodbe kože zaradi enosmernega toka večje pri katodi kot pri anodi.

Tudi pri novejši študiji smo ugotovili, da je poškodba kože nad elektrodo navadno večja na katodni strani. Pri tem preseneča dejstvo, da so poškodbe večje pri živalih C57Bl/6 kot pri A/J, medtem ko je učinek DC-ET na prekrvitev tumorjev pomembno večji pri tumorjih Sa-1 na miših A/J. Medtem ko so področja razbarvanosti (odsotnosti barvila PBV) pri tumorjih Sa-1 največkrat razporejena po celem tumorju, je pri tumorjih LPB največkrat neobarvan samo centralni del tumorja, ki je obkrožen s plastjo obarvanega tkiva (slika 5.3.1). Vse to govori v prid hipotezi, da se ožiljenost obeh tumorskih modelov razlikuje. Možno je, da so tumorji LPB napajani iz več žil, oziroma da je razporeditev napajalnih žil okoli tumorja bistveno drugačna kot pri tumorjih Sa-1, tako da je ob elektroterapiji prizadet manjši del napajalnih žil pri tumorjih LPB. Neovirana rast teh tumorjev je bistveno počasnejša kot pri tumorjih Sa-1, zato lahko sklepamo, da ima povprečni tumor LPB več časa za izgradnjo kvalitetnejše lastne neovaskulature in morda tudi za rekrutiranje več napajalnih žil iz normalnega tkiva kot povprečni tumor Sa-1.

V tumorskem tkivu in v neposredni bližini tumorjev smo po DC-ET pogosto opazili nekaj izlite krvi, ki se je tam očitno nabrala zaradi poškodb manj odpornega tumorskega ožilja, saj podobnega pojava ni bilo v normalnem okoliškem tkivu in skoraj nikoli v kontrolnih tumorjih. Pojav je bil bolj izrazit pri tumorjih Sa-1 kot pri LPB, kar znova kaže na razliko v ožilju obeh tumorskih linij.



**Slika 5.3.1:** Tipična razporeditev obarvanih in neobarvanih območij na prerezu podkožnih tumorjev Sa-1 in LPB, ki so bili izpostavljeni elektroterapiji.

## 5.4 Merjenje prekrvljenosti z rubidijem $^{86}\text{Rb}$

Rezultati študije prekrvljenosti tumorjev z merjenjem ekstrakcije rubidija  $^{86}\text{Rb}$  v tkivu je nedvoumno pokazala, da se zaradi lokalne elektroterapije značilno zmanjša pretok krvi skozi tumor pri obeh tumorskih modelih (tumor Sa-1 na miših A/J in tumor LPB na miših C57Bl/6). Do največjega zmanjšanja prekrvljenosti pride v povprečju že po prvih 15 minutah sicer eno uro trajajoče terapije. Za tem prekrvljenost kljub nadaljevanju terapije ne upada več, verjetno pa vpliva trajanje terapije na to, koliko časa bo trajalo, da se pretok znova obnovi.

Zmanjšanje pretoka je nekoliko bolj izrazito pri tumorjih Sa-1. Pri teh se zmanjša na manj kot polovico prvotnega pretoka (približno 40% pretoka v kontrolnih tumorjih), medtem ko pri tumorjih LPB pretok upade na približno 60% pretoka v kontrolnih tumorjih. Prekrvljenost tumorjev Sa-1 ostane tako zmanjšana vsaj dva dneva po terapiji, ko začne znova naraščati, pri tumorjih LPB pa je to "okrevanje" pretoka krvi skozi tumor nekoliko hitrejše. Učinek terapije je pri posameznih tumorjih lahko zelo različen, od praktično popolne zaustavitve pretoka, do skoraj nobenega učinka. Največje zmanjšanje relativne prekrvitve tkiva RPT v posameznih tumorjih smo izmerili v tumorjih Sa-1, najmanjši učinek v posameznem tumorju pa na tumorjih LPB. Vse to kaže, da so kljub podobnemu odzivu obeh tumorskih linij tumorji Sa-1 bolj dovzetni za elektroterapijo.

Izmerjene vrednosti relativne prekrvitve tkiva RPT v tumorjih so primerljive z vrednostmi v eksperimentalnih tumorskih modelih drugih avtorjev [81, 82, 84]. Z metodo  $^{86}\text{Rb}$  nismo ugotovili sistemskih učinkov lokalne terapije na prekrvljenost tkiv, ki niso neposredno izpostavljena električnemu toku.

## 5.5 Sinteza

Dokazali smo, da elektroterapija s šibkim enosmernim tokom povzroči lokalno zmanjšanje prekrvljenosti in oksigenacije čvrstih podkožnih tumorjev. Glavni mehanizem zaviranja rasti tumorjev v naših tumorskih modelih je okluzija pretoka krvi v tumorju, do katere pride najverjetneje na mestu, kjer so vstavljene elektrode. Na to kažejo vsi rezultati, ki smo jih dobili z različnimi merilnimi metodami.

Z merilnimi metodami, ki smo jih uporabili pri našem delu, zajemamo podatke na različnih fizioloških mestih v prenosu kisika (ter hranilnih snovi) do celic. Obe invazivni metodi, barvanje tkiva z barvilom patent modro in merjenje prekrvljenosti z radioaktivnim rubidijem, neposredno pokazeta, da se zaradi terapije močno zmanjša pretok krvi skozi tumorsko tkivo, ker pri obeh ocenjujemo, koliko markerja (molekul barvila ali radioaktivnih ionov  $^{86}\text{Rb}$ ) pride v tkivo, to pa je sorazmerno pretoku krvi, ki je rezervoar za oba markerja. Z metodo NIRS ne merimo neposredno pretoka krvi, ampak količino oksigeniranega in deoksigeniranega hemoglobina v krvi. Iz časovnega spreminjanja koncentracij obeh lahko sklepamo tudi na pretok krvi (prekrvljenost) in na

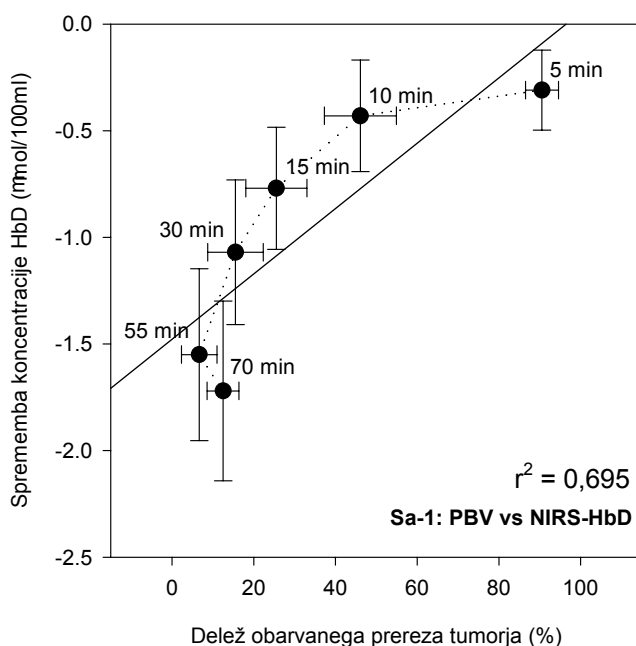
relativno preskrbo tkiva s kisikom. S polarografičnim merjenjem  $pO_2$  pa ugotavljamo, koliko kisika je dejansko na voljo celicam v tkivu za celični metabolizem.

Rezultati, ki smo jih dobili z različnimi merilnimi metodami, kažejo v isto smer, se medsebojno podpirajo in, kar je morda najpomembnejše, se dopolnjujejo in skupaj dajejo popolnejšo sliko o dogajanju v tumorjih med in po elektroterapiji. S klasično obliko metode NIRS z inštrumentom NIRO<sub>2</sub>X-2 smo ugotovili, da kmalu po začetku terapije v tumorjih upade koncentracija oksigeniranega hemoglobina HbO ob hkratnem naraščanju deoksigeniranega hemoglobina. Povečana deoksigenacija hemoglobina v krvi kaže na zmanjšanje pretoka krvi (prekrvljenosti). Podobno dinamiko zmanjševanja prekrvljenosti med elektroterapijo smo odkrili z metodama barvanja tkiva in z radioaktivnim rubidijem. Na slikah 5.5.1a in 5.5.1b je prikazana korelacija med zmanjševanjem obarvanosti tumorjev z barvilom PBV in upadanjem koncentracije diferencialnega hemoglobina HbD pri tumorjih Sa-1 v linearnem in logaritemskem merilu.

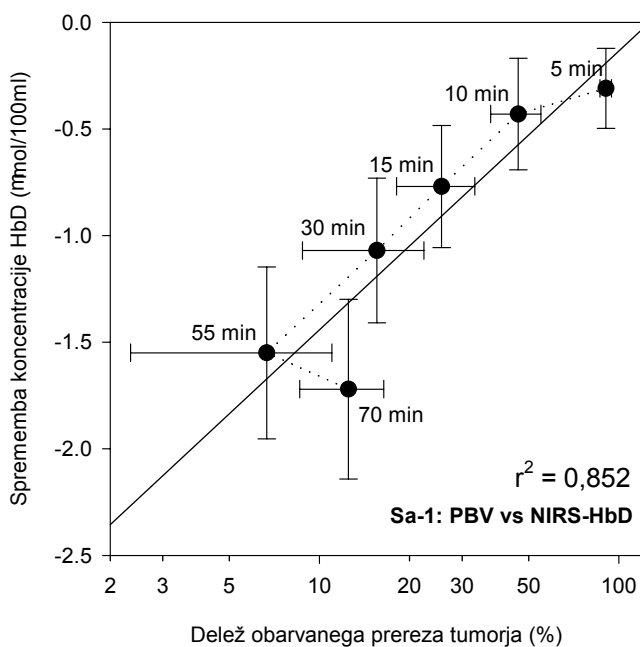
Z metodo barvanja tkiva in z radioaktivnim rubidijem smo pokazali, da je učinek zmanjšane prekrvljenosti viden še tudi vsaj dva dneva po elektroterapiji. Na sliki 5.5.2 so zbrani povprečni rezultati obeh metod na tumorjih Sa-1 ob različnih časovnih trenutkih med in po enourni elektroterapiji. Vidimo lahko, da se razen v točki 24 ur po terapiji rezultati obeh metod dobro ujemajo.

Zmanjšan pretok krvi skozi tkivo nujno povzroči slabšo preskrbo tkiva s kisikom. S polarografično metodo merjenja parcialnega tlaka kisika smo dokazali, da se kljub že sicer zelo slabi oksigenaciji naših dveh tumorskih modelov po terapiji ta še dodatno poslabša ter da je učinek elektroterapije na prekrvljenost in oksigenacijo odvisen od amplitude toka in trajanja terapije. To kažejo rezultati polarografične oksimetrije, z njimi pa se ujemajo rezultati metode NIRS z inštrumentom OS30. Že v preteklosti smo za tumorje Sa-1 isto pokazali tudi z inštrumentom NIRO<sub>2</sub>X-2 [46]. Na slikah 5.5.3 - 5 je prikazana korelacija med rezultati polarografičnega merjenja  $pO_2$  in rezultati inštrumenta OS30 na tumorjih Sa-1 in LPB pri različnih "dozah" elektroterapije. Zaradi večjega števila skupin pri tumorjih Sa-1 je ujemanje pri teh bolj očitno kot pri tumorjih LPB. Na sliki 5.5.6 je podana korelacija med spremembo koncentracije diferencialnega hemoglobina HbD ob koncu elektroterapije (izmerjeno z inštrumentom za NIRS NIRO<sub>2</sub>X-2) in nasičenostjo hemoglobina s kisikom 4 ure po elektroterapiji (izmerjeno z inštrumentom za NIRS OS30) za tumorje Sa-1 pri različnih "dozah" elektroterapije.

Časovna zavora v rasti tumorjev po elektroterapiji pri obeh tumorskih modelih se ujema s trajanjem zmanjšane prekrvljenosti po elektroterapiji (metoda barvanja tkiva in rubidij), zato sklepamo, da je vpliv elektroterapije na prekrvljenost tumorjev verjetno prevladujoči mehanizem protitumorskega učinka elektroterapije s šibkim enosmernim električnim tokom pri uporabljenih tumorskih modelih.

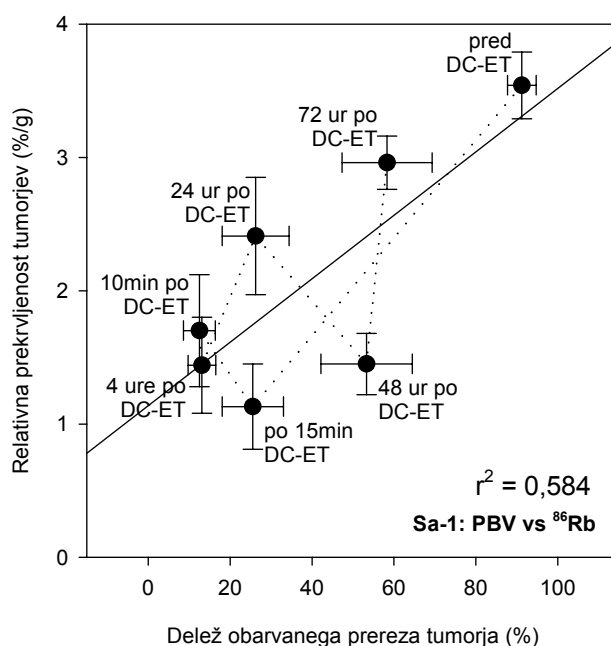


**Slika 5.5.1a:** Korelacija med upadanjem obarvanosti tumorskega tkiva z barvilom PBV in zmanjševanjem koncentracije diferencialnega hemoglobina HbD (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) med enourno elektroterapijo s tokom 0,6 mA. Tumor Sa-1 na miših A/J (skupina W0.6/60). Os x: LINEARNO MERILO.

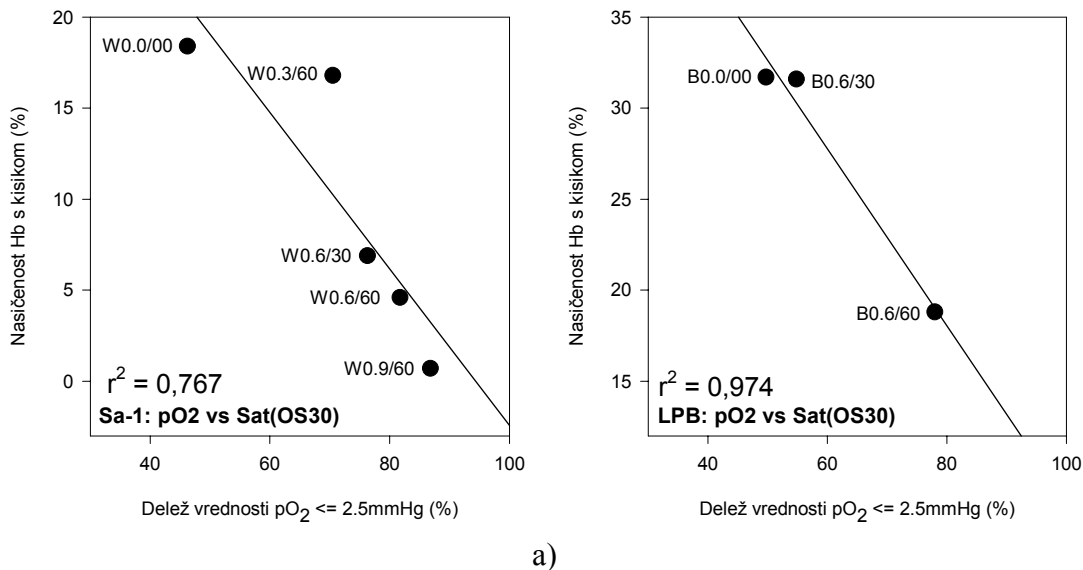


**Slika 5.5.1b:** Korelacija med upadanjem obarvanosti tumorskega tkiva z barvilom PBV in zmanjševanjem koncentracije diferencialnega hemoglobina HbD (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) med enourno elektroterapijo s tokom 0,6 mA. Tumor Sa-1 na miših A/J (skupina W0.6/60). Os x: LOGARITEMSKO MERILO

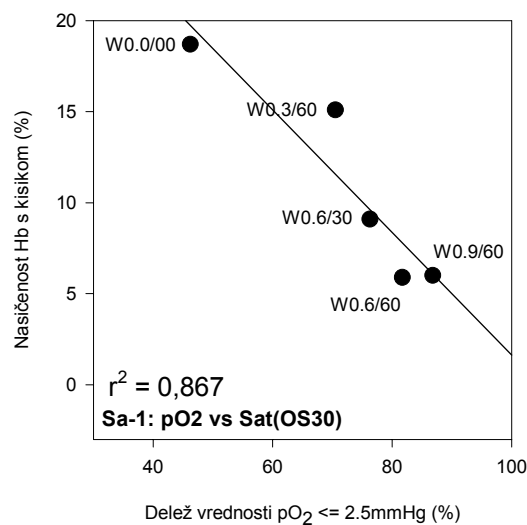




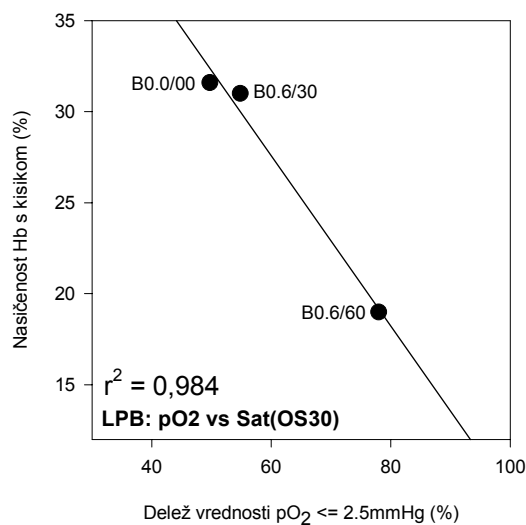
**Slika 5.5.2:** Korelacija med obarvanostjo tumorskega tkiva z barvilom PBV in vsebnostjo radioaktivnega rubidija ob različnih časovnih intervalih med in po elektroterapiji s tokom 0,6 mA. Tumor Sa-1 na miših A/J (skupina W0.6/60).



**Slika 5.5.3:** Korelacija med deležem vrednosti  $p\text{O}_2$  pod 2,5 mmHg in vrednostjo nasičenosti hemoglobina s kisikom (MEDIANE) pri različnih "dozah" elektroterapije za tumorje Sa-1 (a) in za tumorje LPB (b).

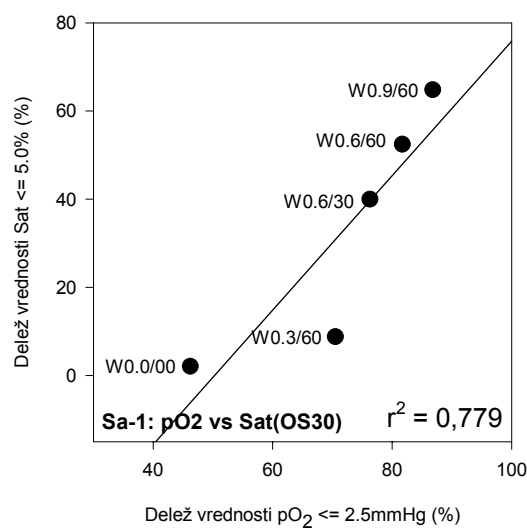


a)

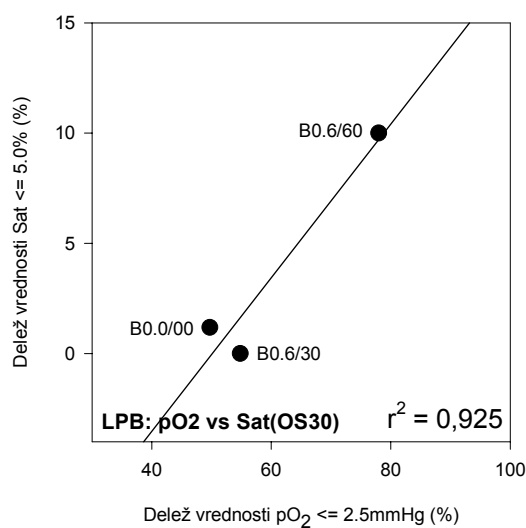


b)

**Slika 5.5.4:** Korelacija med deležem vrednosti  $pO_2$  pod 2,5 mmHg in vrednostjo nasičenosti hemoglobina s kisikom (POVPREČJA) pri različnih "dozah" elektroterapije za tumorje Sa-1 (a) in za tumorje LPB (b).

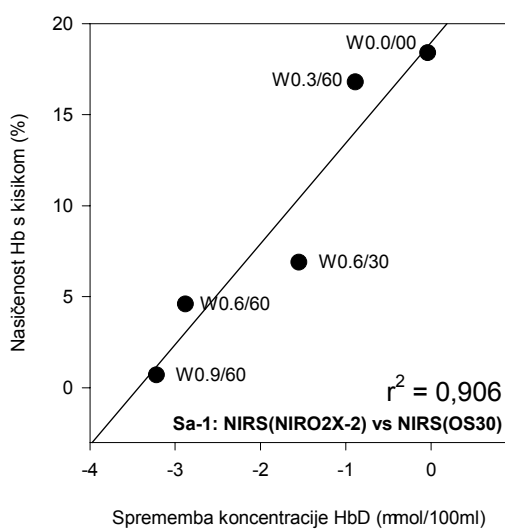


a)

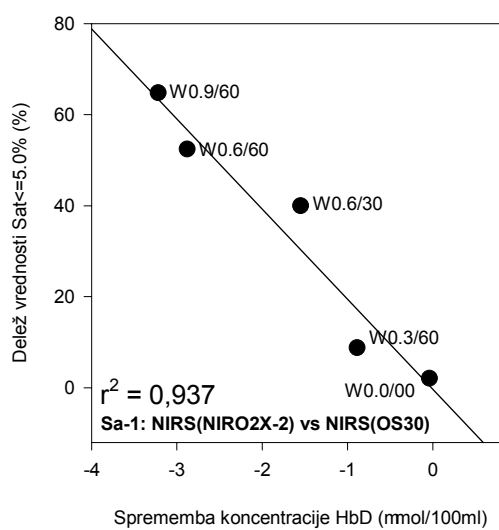


b)

**Slika 5.5.5:** Korelacija med deležem vrednosti  $pO_2$  pod 2,5 mmHg in deležem vrednosti nasičenosti hemoglobina s kisikom pod 5% pri različnih "dozah" elektroterapije za tumorje Sa-1 (a) in za tumorje LPB (b).



a)



b)

**Slika 5.5.6:** Korelacija med spremembo koncentracije HbD ob koncu elektroterapije (povprečne vrednosti; inštrument za NIRS NIRO<sub>2</sub>X-2) in a) nasičenostjo hemoglobina s kisikom Sat 4 ure po koncu elektroterapije (mediane; inštrument za NIRS OS30) oziroma b) deležem vrednosti Sat pod mejo 5,0% (inštrument OS30). Podatki so za tumorje Sa-1 pri različnih "dozah" elektroterapije.



## 6 SKLEP

Ob končani študiji vpliva elektroterapije z enosmernim električnim tokom na parametre prekrvitve in oksigenacije podkožnih tumorjev lahko zanesljivo sklenemo, da elektrotarepija pomembno zmanjša pretok krvi skozi tumor (prekrvitev) v obeh uporabljenih tumorskih modelih. Ta učinek je prisoten, čeprav se elektrode, s katerimi dovajamo električni tok, nahajajo v podkožju na razdalji najmanj 5 mm od roba tumorja. Enosmerni tok povzroči elektrolizo v tkivu, ki jo spremlja vrsta kemičnih reakcij. Najočitnejša posledica elektrolize je gotovo velika sprememba vrednosti pH tik ob elektrodah, ki povzroči lokalne poškodbe tkiva v neposredni okolici elektrod, torej v normalnem tkivu. Čvrsti podkožni tumorji naših modelov se napajajo s krvjo preko žil v podkožju. Kjer se te žile nahajajo dovolj blizu elektrod, zanesljivo pride do njihovih poškodb in s tem do zmanjšanja ali celo popolne prekinitve pretoka krvi. To velja tako za žile dovodnice (arterije) kot odvodnice (vene). Razsežnost zmanjšanja prekrvitve, ki smo jo dokazali v tumorjih med in po elektroterapiji z metodo NIRS, z barvanjem tumorskega tkiva z barvilom Patent modro-vijolično in z merjenjem vsebnosti radioaktivnega rubidija v tumorju, je odvisna od stopnje prizadetosti napajalnega ožilja; to pomeni od prizadetosti posameznih žil in verjetno predvsem od deleža žil, ki se nahajajo v neposredni bližini elektrod proti skupnemu številu žil, ki napajajo določen tumor.

Z vsemi uporabljenimi merilnimi metodami smo dobili rezultate, ki se medsebojno podpirajo in dopolnjujejo.

Zmanjšanje pretoka krvi zanesljivo vodi k zmanjšanju dotoka kisika in hranilnih snovi v tumor. Da se oksigenacija tumorjev po terapiji poslabša, smo pokazali z metodo NIRS in s polarografičnim merjenjem parcialnega tlaka kisika v tumorjih, čeprav so naši tumorji zelo hipoksični že pred elektroterapijo, kar kažejo vrednosti  $pO_2$  v kontrolnih tumorjih obeh modelov.

Spremembe v prekrvitvi tumorjev nastopijo pri uporabljeni obliki elektroterapije (tok amplitude 0.6 mA) že kmalu po začetku terapije. V povprečju že po približno 15 minutah pretok krvi pade na najnižji nivo, kar kažejo rezultati metode NIRS (inštrument NIRO2X-2) in rezultati barvanja tkiva z barvilom PBV. Šele po nekaj dnevih pride do ponovne delne vzpostavitve pretoka krvi, kar kažejo rezultati merjenja vsebnosti radioaktivnega rubidija in barvanja tumorskega tkiva z barvilom PBV.

Tako amplituda električnega toka kot trajanje terapije sta pomembna za protitumorski učinek elektroterapije. Spremembe v prekrvitvi in oksigenaciji po elektroterapiji so večje pri tumorjih Sa-1 kot pri tumorjih LPB.

Z metodo NIRS lahko nedvoumno pokažemo tako razlike med odzivi parametrov prekrvitve pri različnih "dozah" elektroterapije kot tudi razlike med obema tumorskima modeloma. Ker je NIRS neinvazivna metoda in omogoča spremljanje dinamičnih sprememb skozi daljše časovno obdobje, dobimo s to metodo več podatkov, kot s katerokoli od uporabljenih invazivnih metod. Območje zajemanja signala je bilo v našem primeru pretežno v tumorju, le manjši del signala je izviral iz tkiv v okolici tumorja, kar smo potrdili s simulacijo transporta svetlobe v tumorjih z metodo Monte Carlo. To pomeni, da lahko metodo NIRS uporabljamo tudi za meritve na objektih manjših dimenzij (premer približno 1 cm), če zagotovimo primerno namestitev optičnih vodnikov.

Elektroterapija, kakršno smo uporabili v naši študiji, lahko rabi kot modifikator lokalnega pretoka krvi in s tem oksigenacije v podkožnih tumorjih.

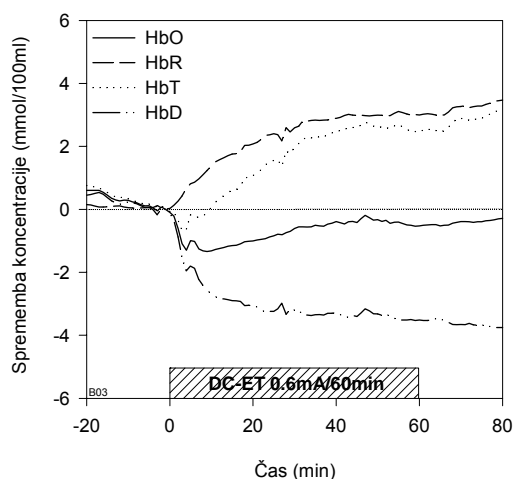
# DODATEK A.1

*Metoda **NIRS** (inštrument **NIRO<sub>2</sub>X-2**)  
Tumor **LPB** na miših **C57Bl/6**  
**Posamezni časovni odzivi***

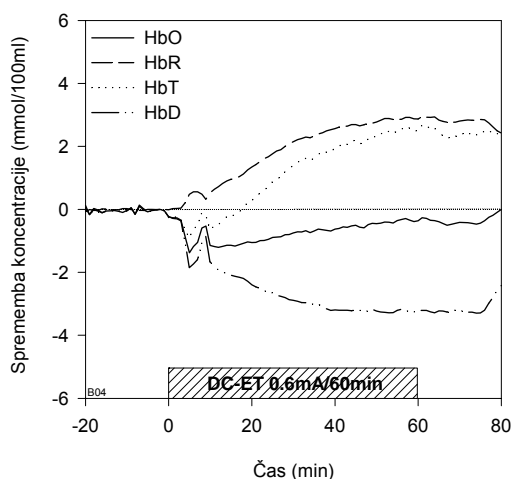
Tu so predstavljeni posamezni odzivi tumorjev LPB na miših C57Bl/6, ki so združeni glede na razsežnost odziva na elektroterapijo:

- tumorji z močnim in tipičnim odzivom (velik učinek DC-ET);
- tumorji s šibkim in/ali z nekoliko netipičnim odzivom (majhen učinek DC-ET);
- tumorji z zelo šibkim in/ali netipičnim odzivom (brez učinka DC-ET);
- kontrolni tumorji.

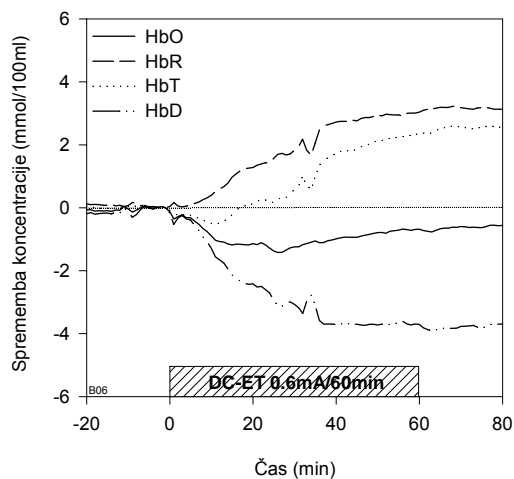
**B0.6/60 (tumor LPB/miš C57Bl/6, DC-ET) - velik učinek**



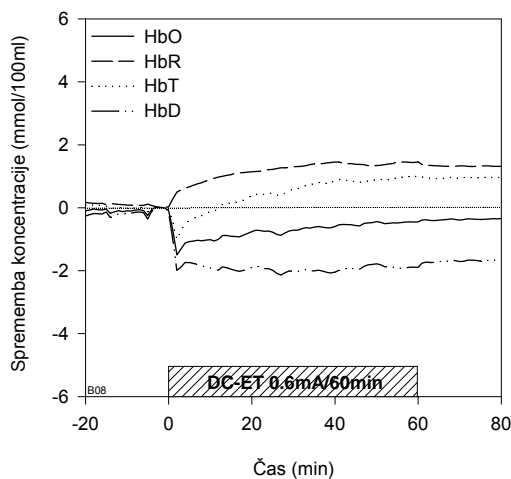
01



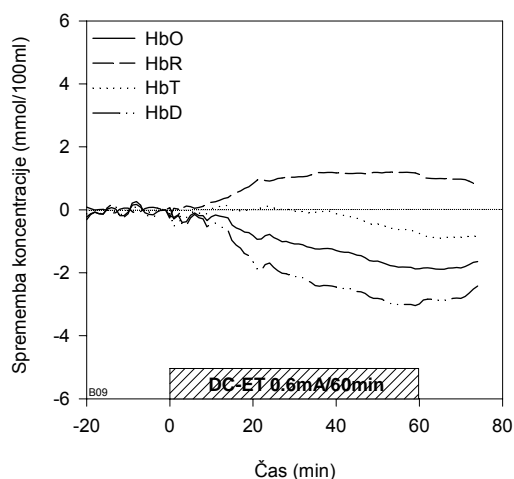
02



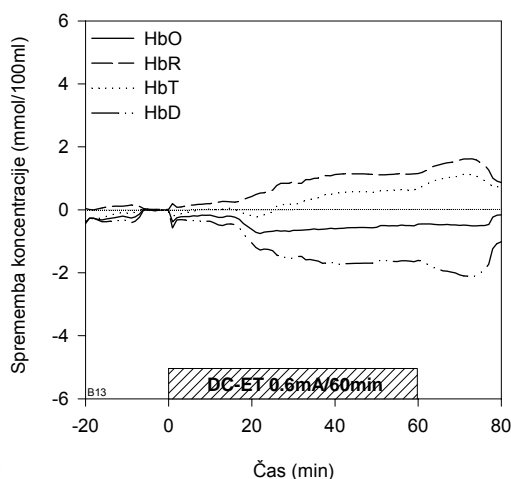
03



04



05

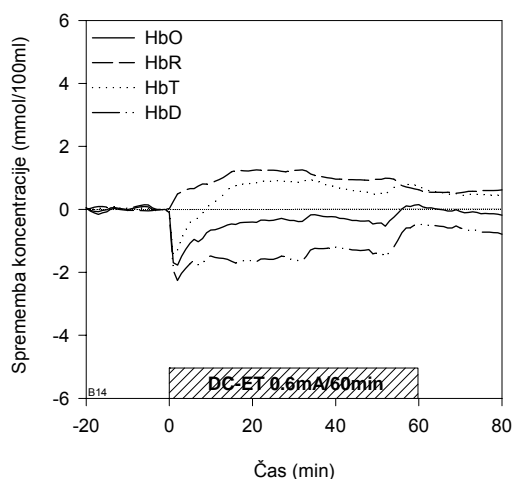


06

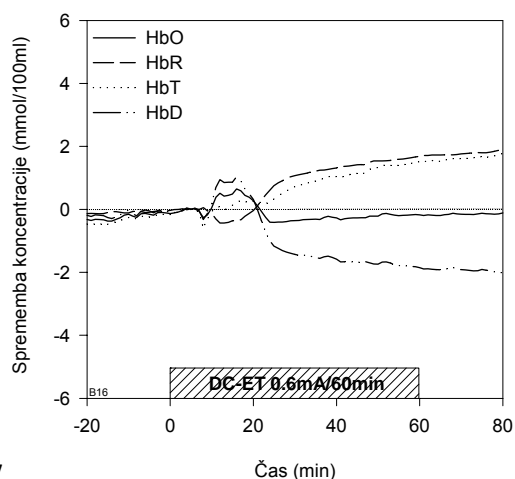
**Slika A.1.(1-6):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv tumorjev LPB na miših C57Bl/6 na enourno elektroterapijo - eksperimentalna skupina B0.6/60. Spremembe koncentrij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina. Prikazani so rezultati tumorjev s tipičnim in močnim ozivom.



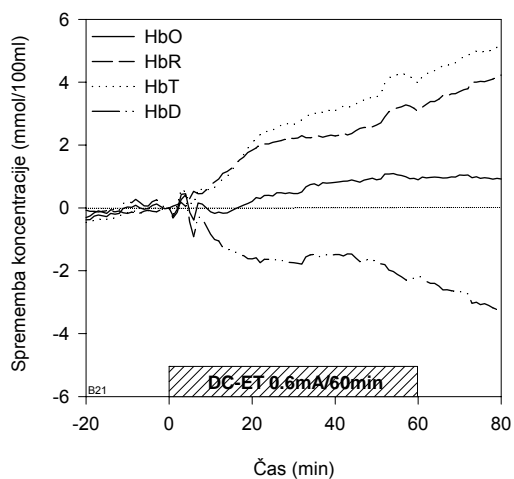
*B0.6/60 (tumor LPB/miš C57Bl/6, DC-ET) - velik učinek*



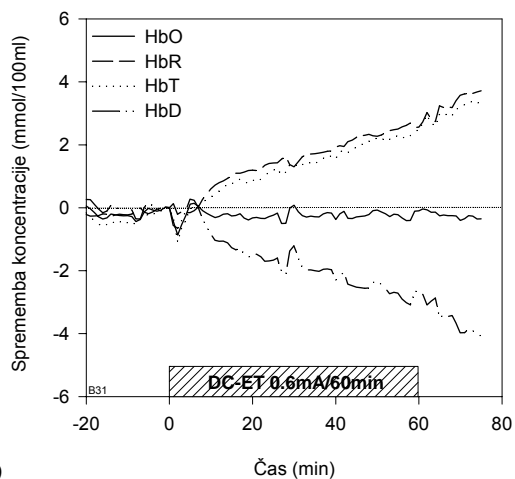
07



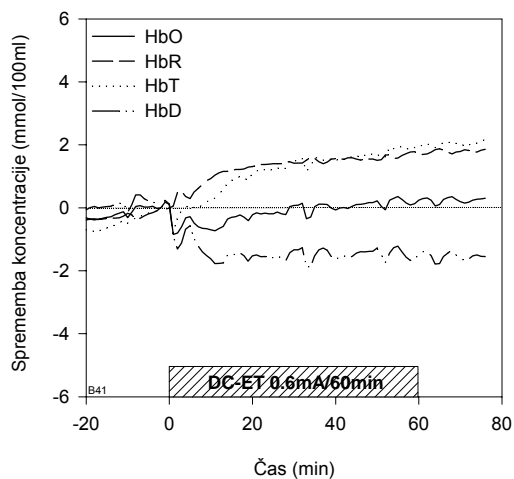
08



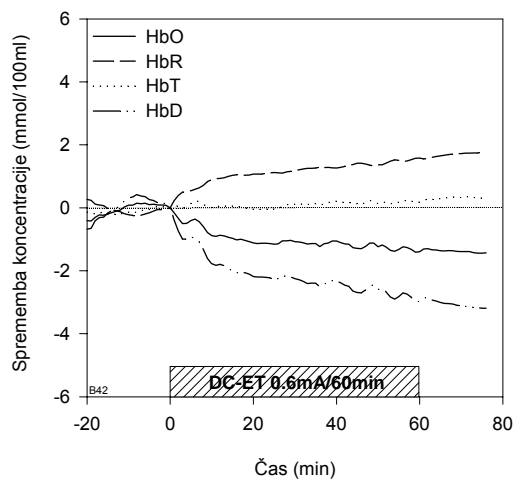
09



10



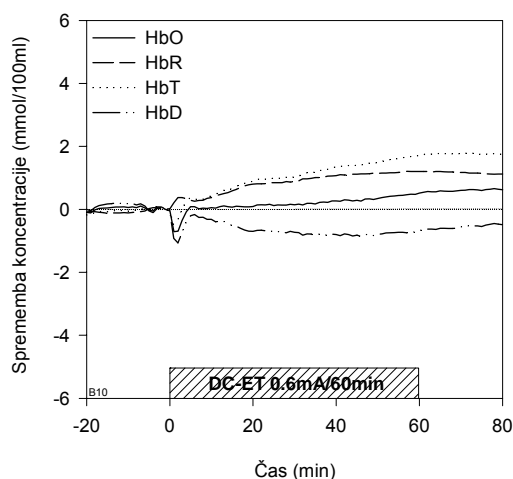
11



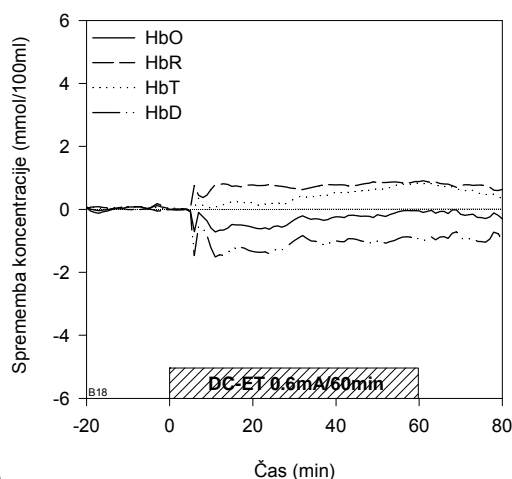
12

**Slike A.1.(7-12):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv tumorjev LPB na miših C57Bl/6 na enurno elektroterapijo - eksperimentalna skupina B0.6/60. Spremembe koncentracij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina. Prikazani so rezultati tumorjev s tipičnim in močnim odzivom.

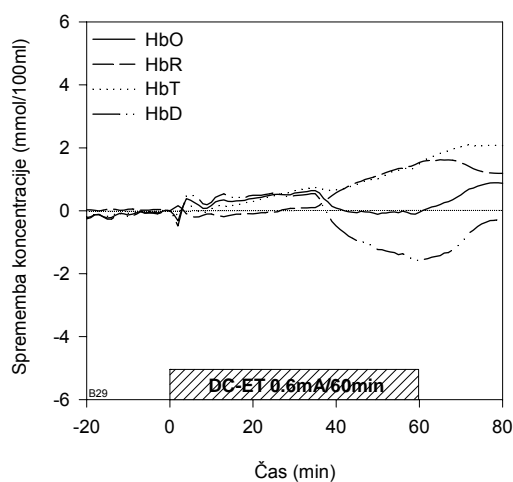
*B0.6/60 (tumor LPB/miš C57Bl/6, DC-ET) - majhen učinek*



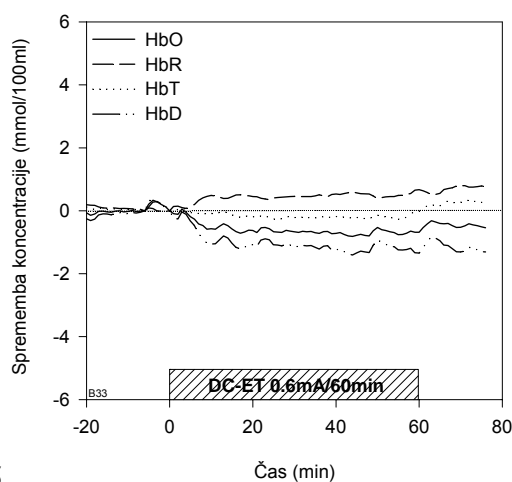
13



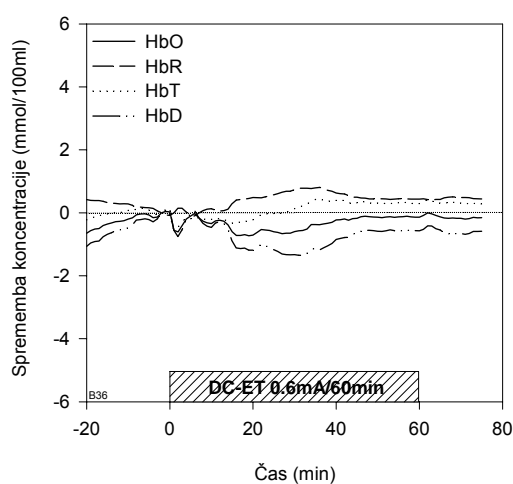
14



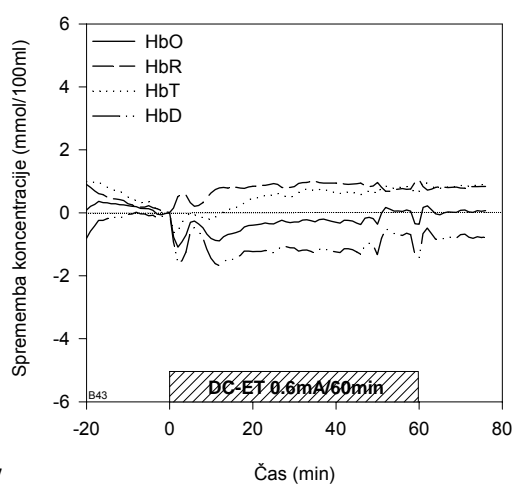
15



16



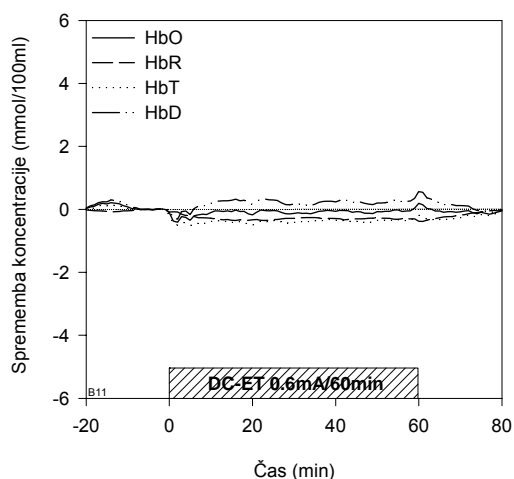
17



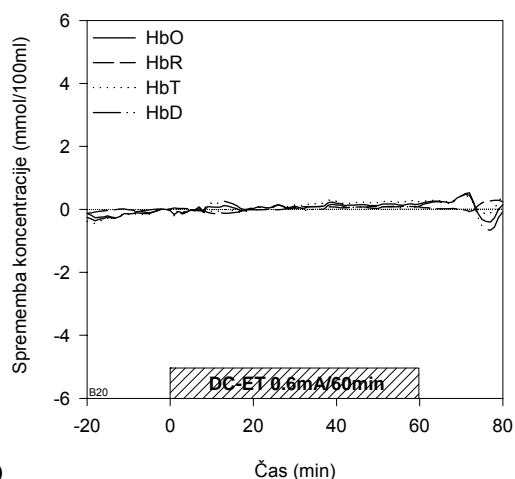
18

**Slika A.1.(13-18):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv tumorjev LPB na miših C57Bl/6 na enourno elektroterapijo - eksperimentalna skupina B0.6/60. Spremembe koncentrij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina. Prikazani so rezultati tumorjev s šibkim in/ali netipičnim odzivom.

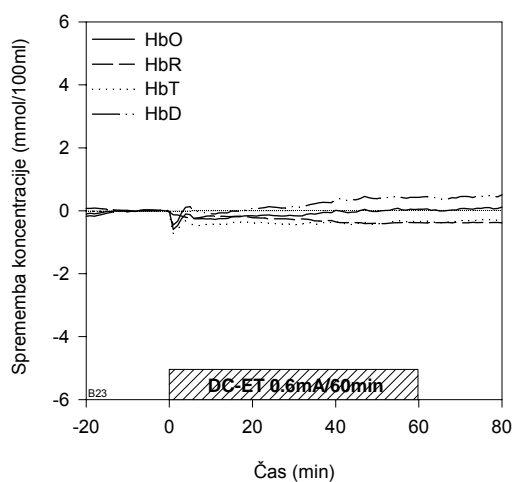
*B0.6/60 (tumor LPB/miš C57Bl/6, DC-ET) - brez učinka*



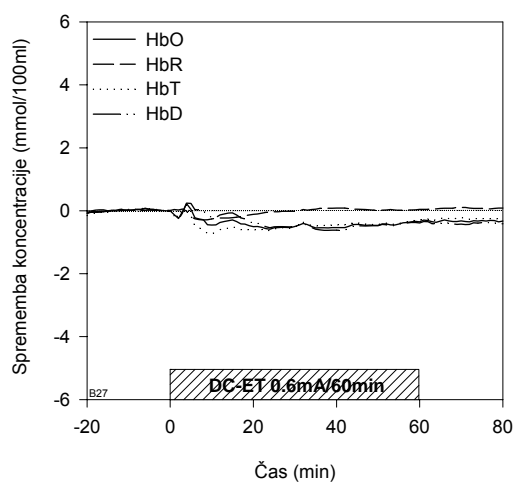
19



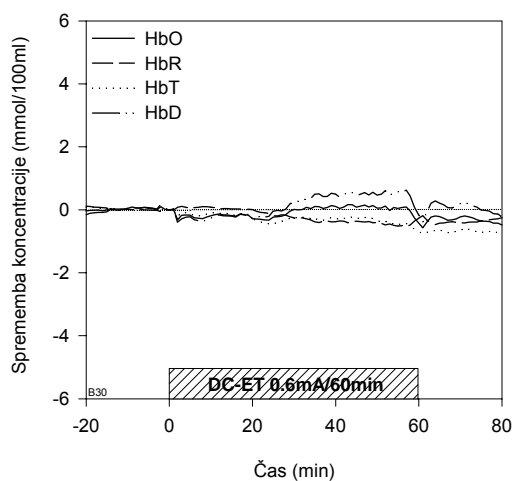
20



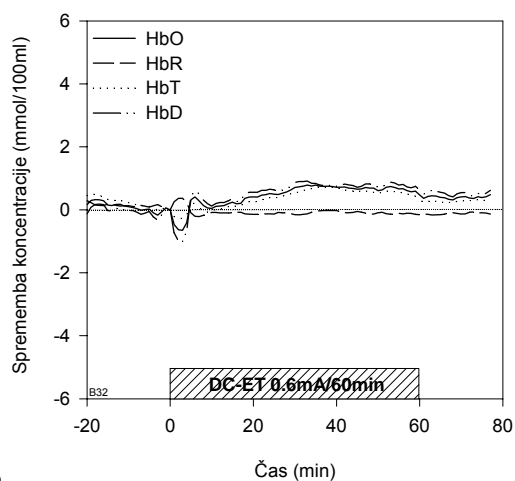
21



22



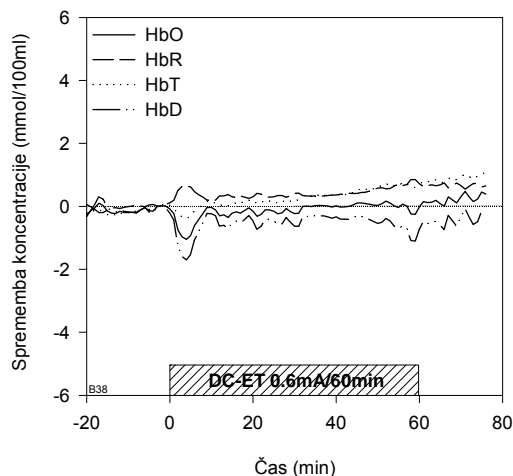
23



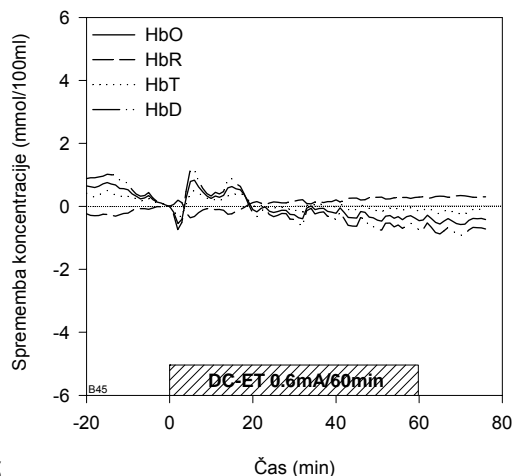
24

**Slike A.1.(19-24):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv tumorjev LPB na miših C57Bl/6 na enurno elektroterapijo - eksperimentalna skupina B0.6/60. Spremembe koncentracij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina. Prikazani so rezultati tumorjev z zelo šibkim in/ali netipičnim odzivom.

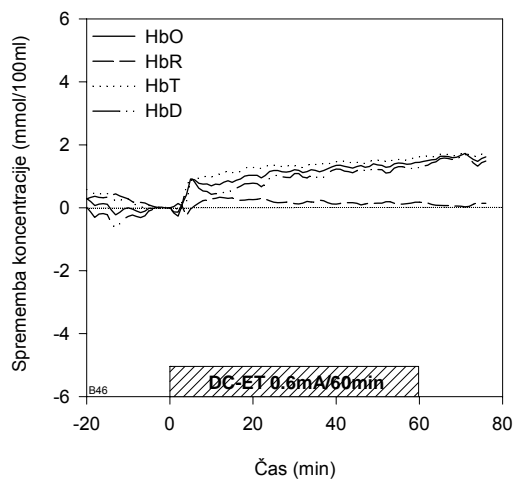
## B0.6/60 (tumor LPB/miš C57Bl/6, DC-ET) - brez učinka



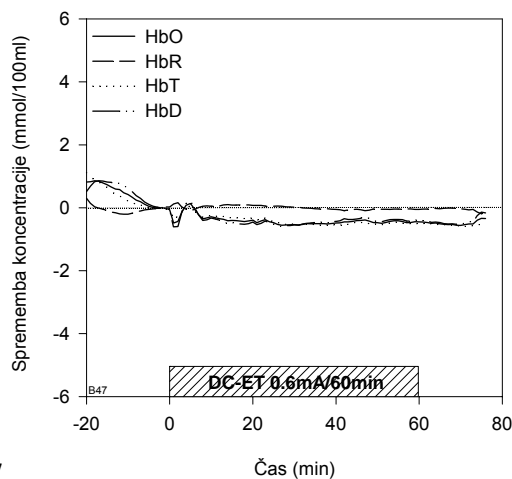
25



26



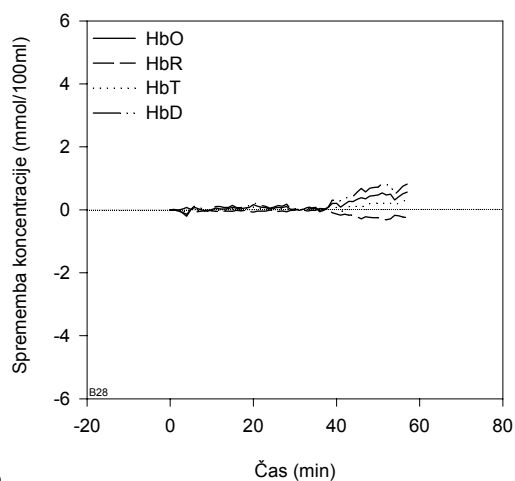
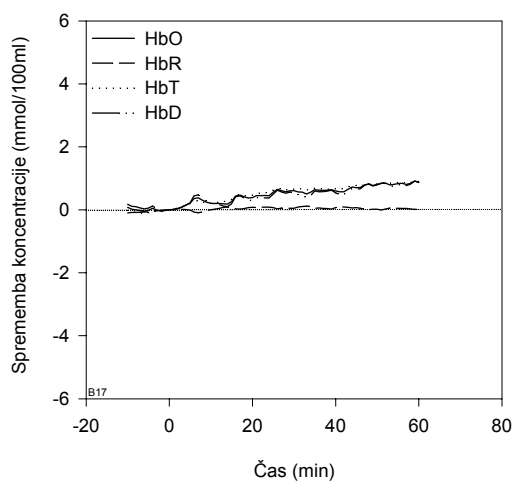
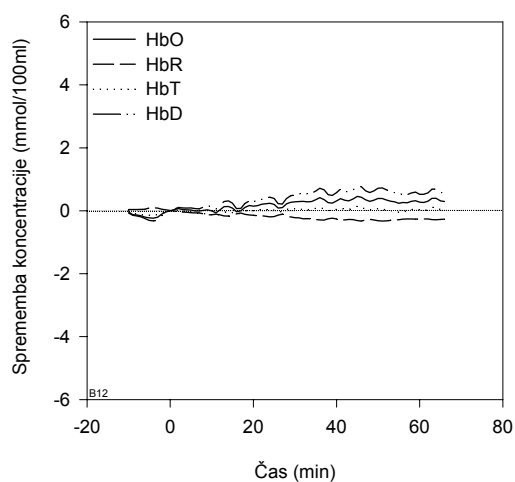
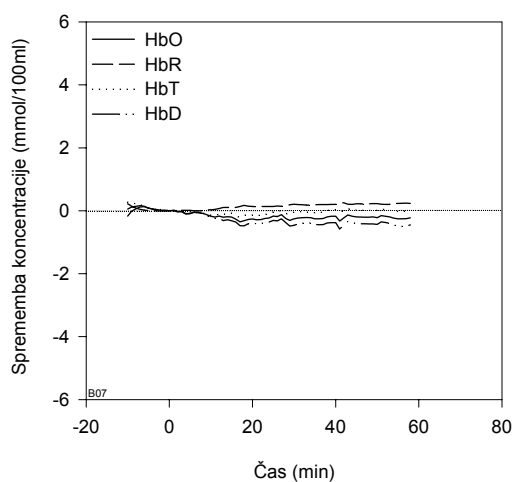
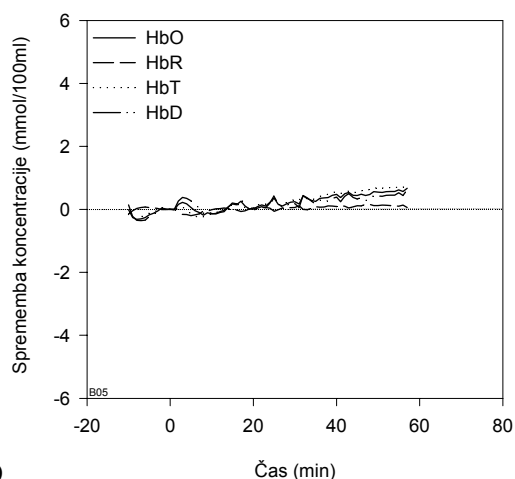
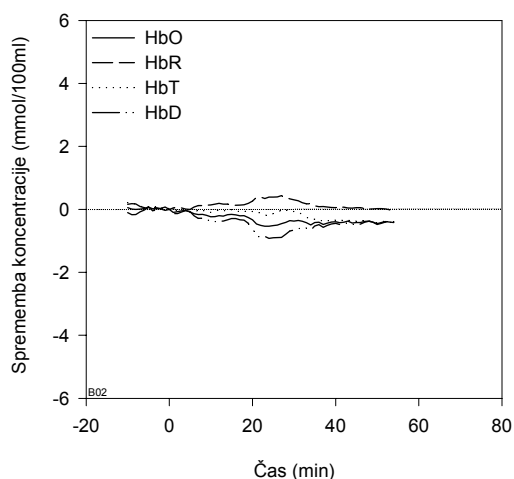
27



28

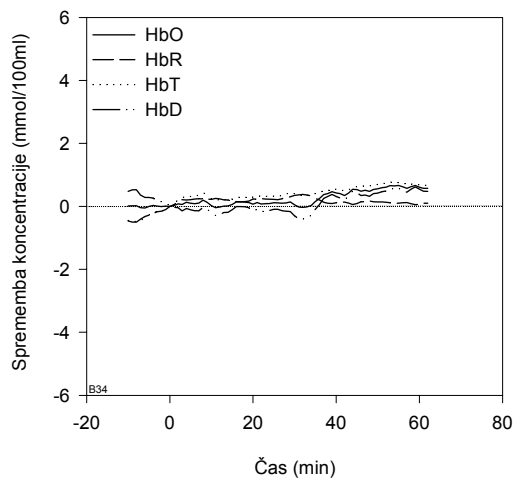
**Slika A.1.(25-28):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv tumorjev LPB na miših C57Bl/6 na enourno elektroterapijo - eksperimentalna skupina B0.6/60. Spremembe koncentracij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina. Prikazani so rezultati tumorjev z zelo šibkim in/ali netipičnim odzivom.

*B0.0/00 (tumor LPB/miš C57Bl/6, kontrola)*

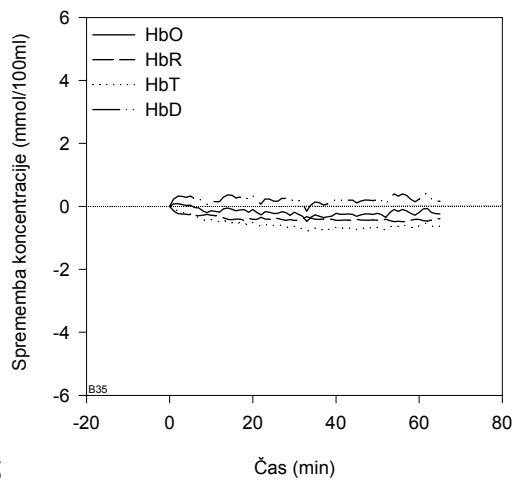


**Slike A.1.(29-34):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv kontrolnih tumorjev LPB na miših C57Bl/6 - eksperimentalna skupina B0.0/00. Spremembe koncentracij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina.

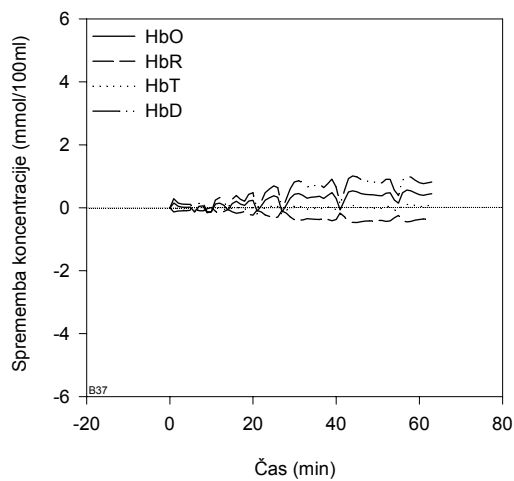
## B0.0/00 (tumor LPB/miš C57Bl/6, kontrola)



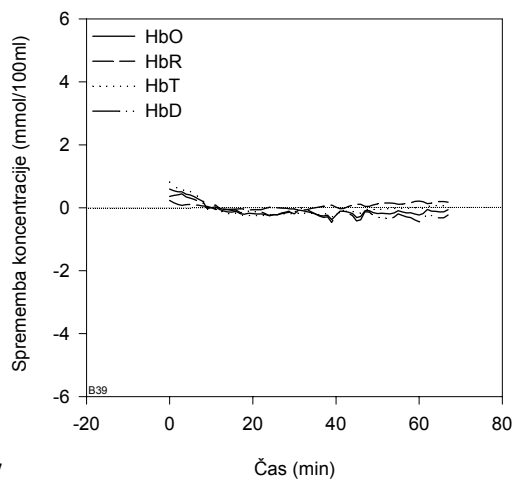
35



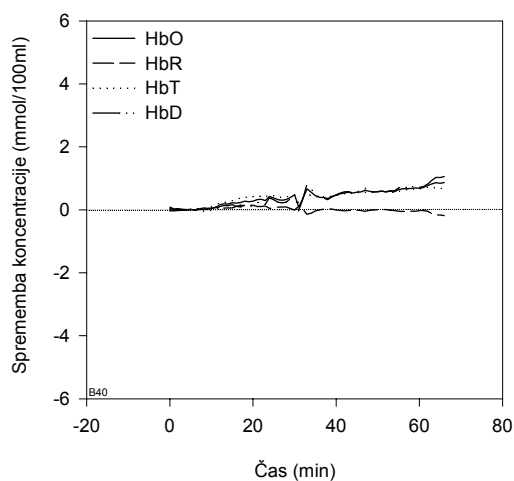
36



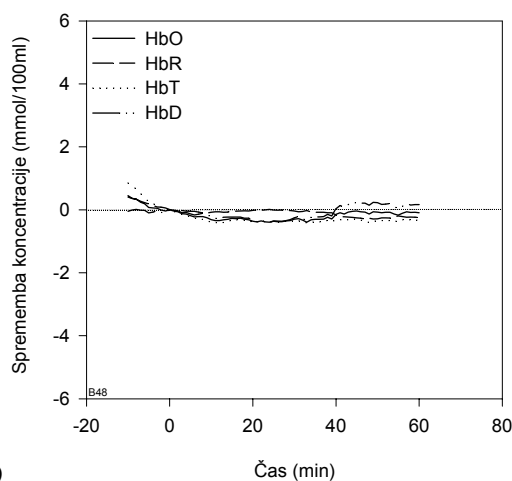
37



38

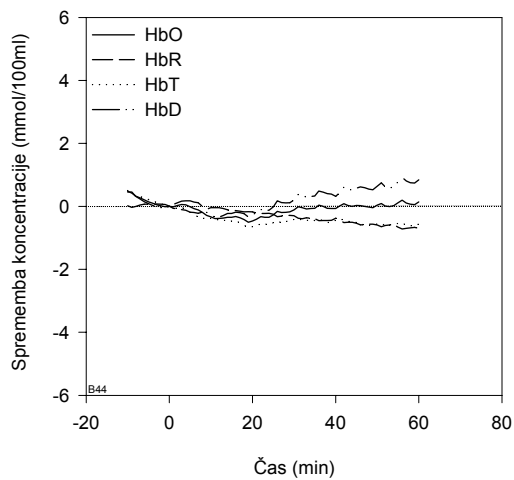


39



40

**Slika A.1.(35-40):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv kontrolnih tumorjev LPB na miših C57Bl/6 - eksperimentalna skupina B0.0/00. Spremembe koncentrij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina.

*B0.0/00 (tumor LPB/miš C57Bl/6, kontrola)*

41

**Slike A.1.(41):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv kontrolnih tumorjev LPB na miših C57Bl/6 - eksperimentalna skupina B0.0/00. Spremembe koncentracij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina.





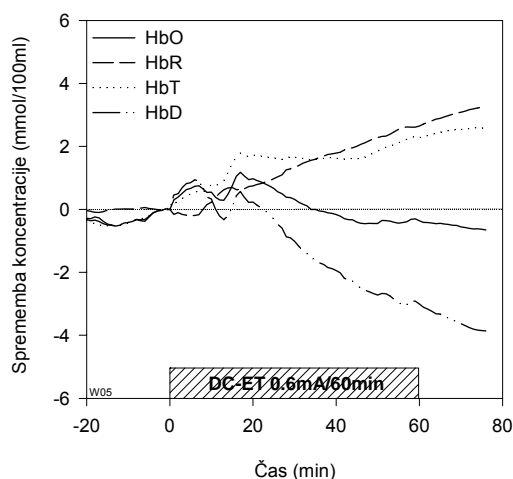
## DODATEK A.2

*Metoda NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2)*  
*Tumor Sa-1 na miših A/J*  
*Posamezni časovni odzivi*

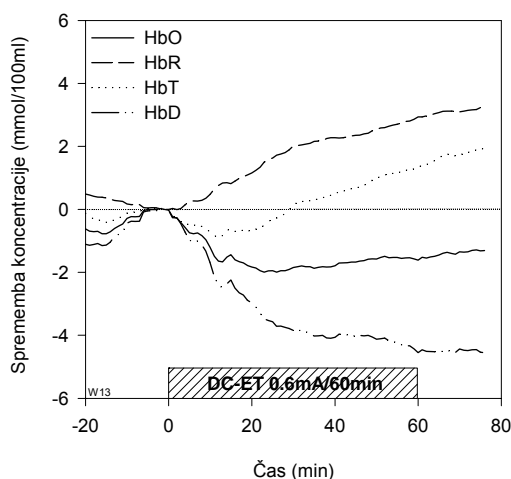
Tu so predstavljeni posamezni odzivi tumorjev Sa-1 na miših A/J, ki so združeni glede na razsežnost odziva na elektroterapijo:

- tumorji z močnim in tipičnim odzivom (velik učinek DC-ET);
- tumorji s šibkim in/ali z nekoliko netipičnim odzivom (majhen učinek DC-ET);
- tumorji z zelo šibkim in/ali netipičnim odzivom (brez učinka DC-ET);
- kontrolni tumorji.

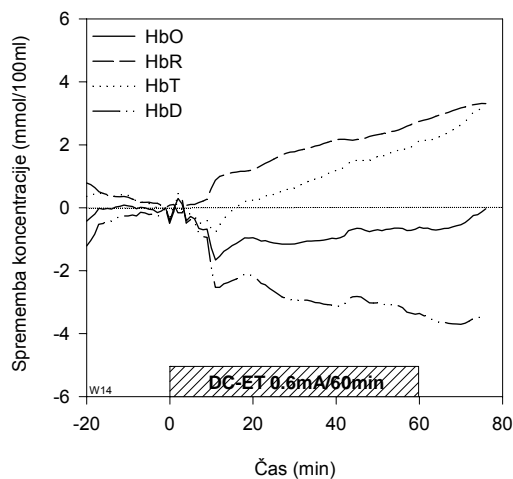
## W0.6/60 (tumor Sa-1/miš A/J, DC-ET) - velik učinek



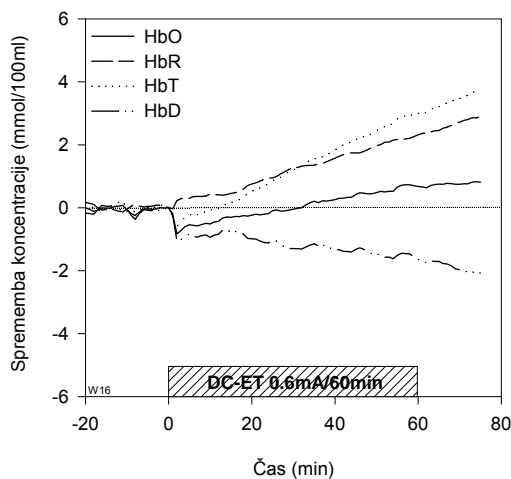
01



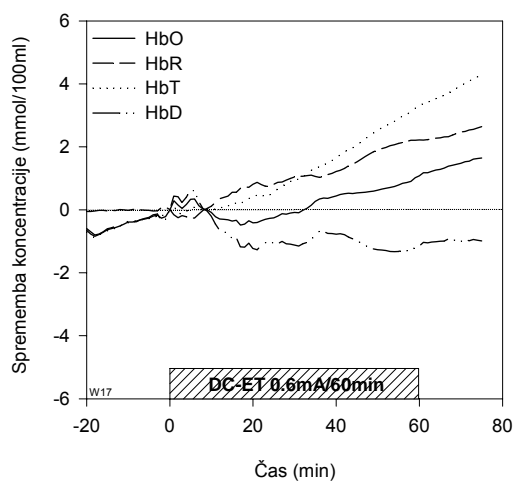
02



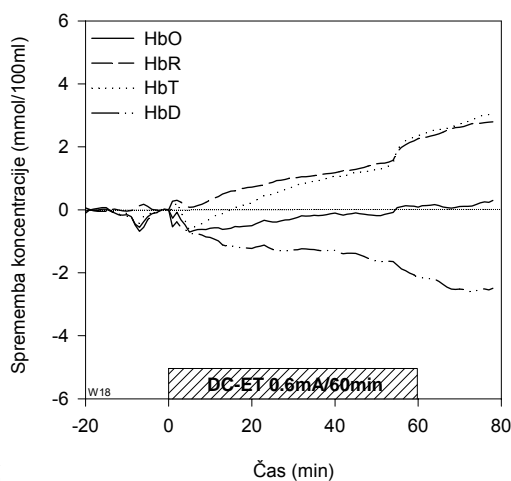
03



04



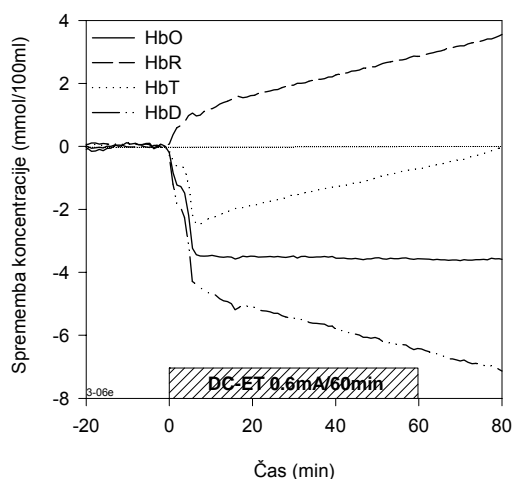
05



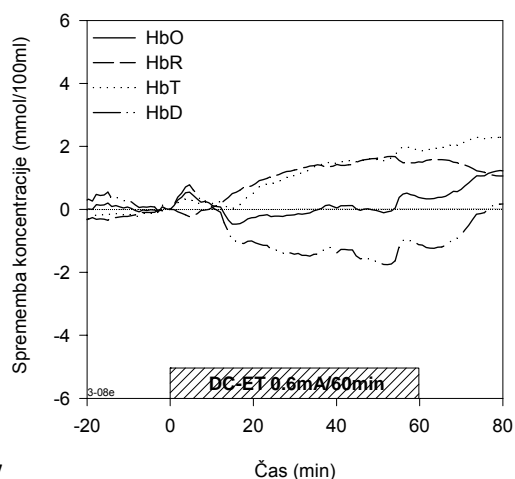
06

**Slika A.2.(1-6):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv tumorjev Sa-1 na miših A/J na enourno elektroterapijo - eksperimentalna skupina W0.6/60. Spremembe koncentracij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina. Prikazani so rezultati tumorjev s tipičnim in močnim ozivom.

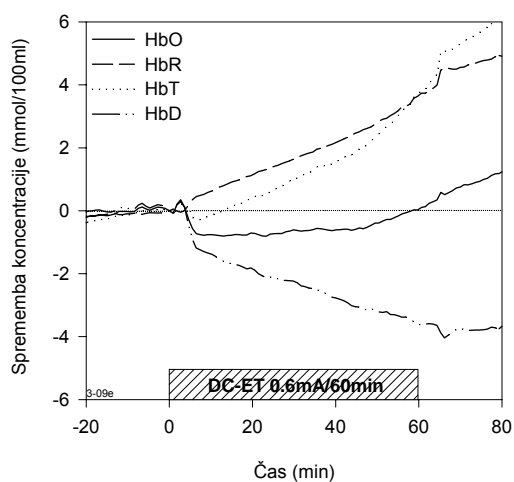
W0.6/60 (tumor Sa-1/miš A/J, DC-ET) - velik učinek



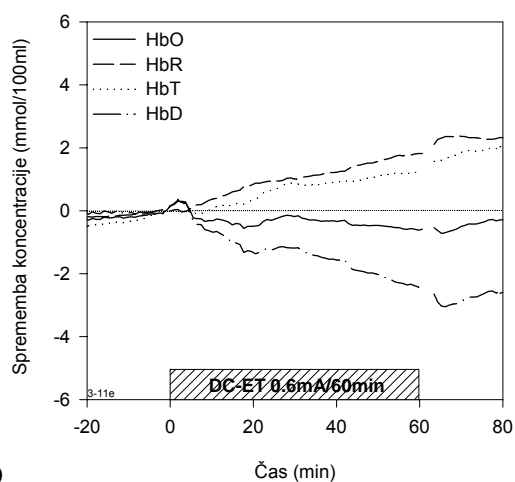
07



08



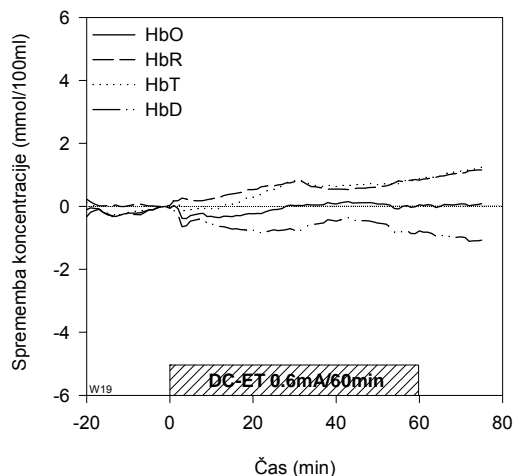
09



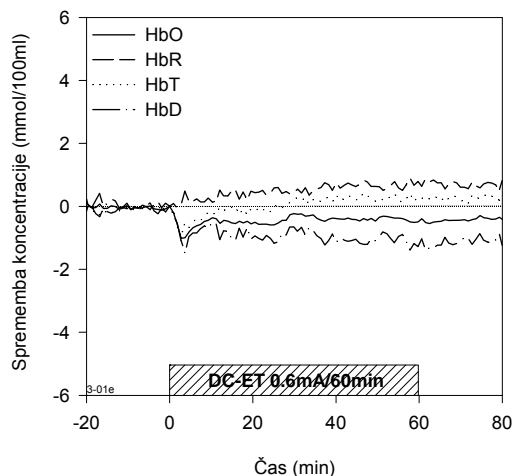
10

**Slike A.2.(7-10):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv tumorjev Sa-1 na miših A/J na enourno elektroterapijo - eksperimentalna skupina W0.6/60. Spremembe koncentrij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina. Prikazani so rezultati tumorjev s tipičnim in močnim ozivom.

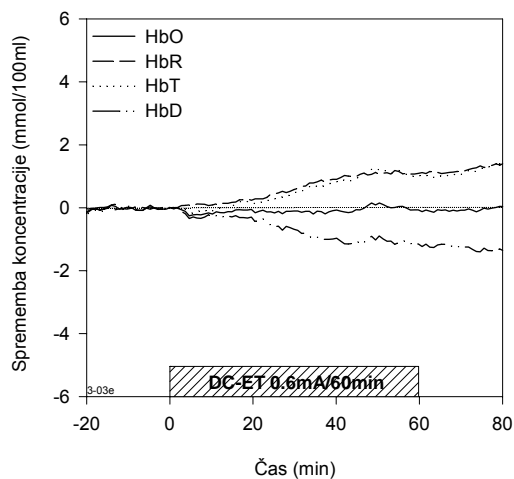
W0.6/60 (tumor Sa-1/miš A/J, DC-ET) - majhen učinek



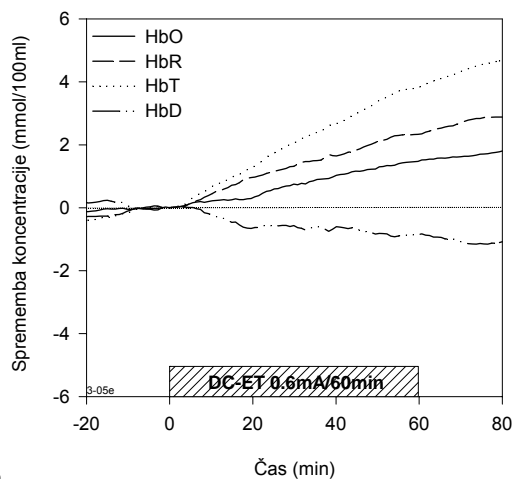
11



12



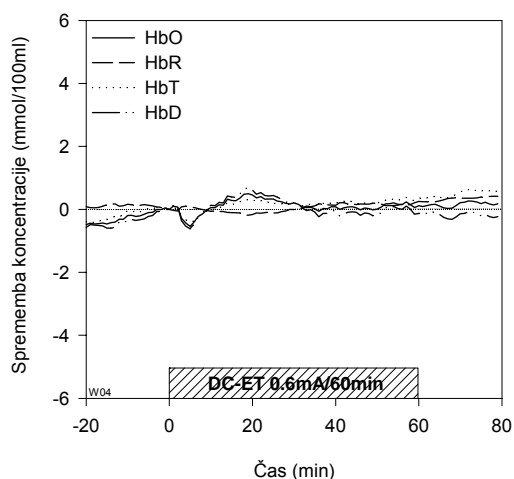
13



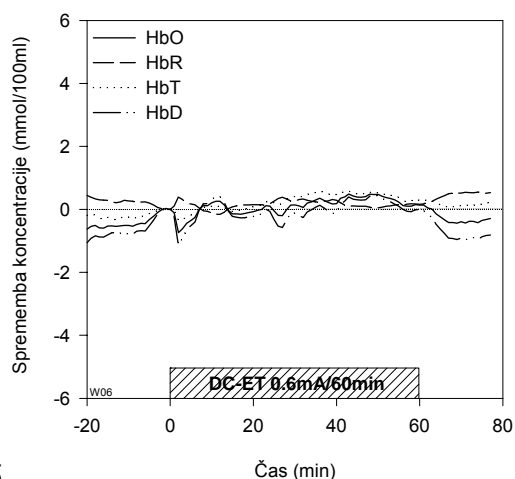
14

**Slike A.2.(11-14):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv tumorjev Sa-1 na miših A/J na enourno elektroterapijo - eksperimentalna skupina W0.6/60. Spremembe koncentrij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina. Prikazani so rezultati tumorjev s šibkim in/ali netipičnim ozivom.

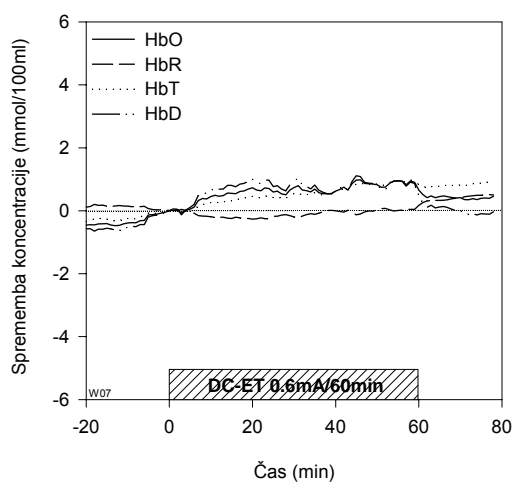
W0.6/60 (tumor Sa-1/miš A/J, DC-ET) - brez učinka



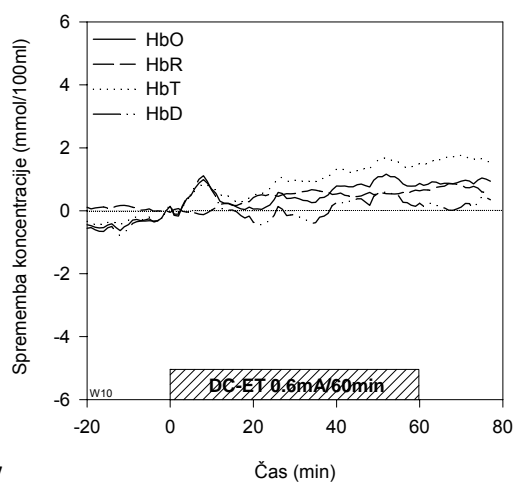
15



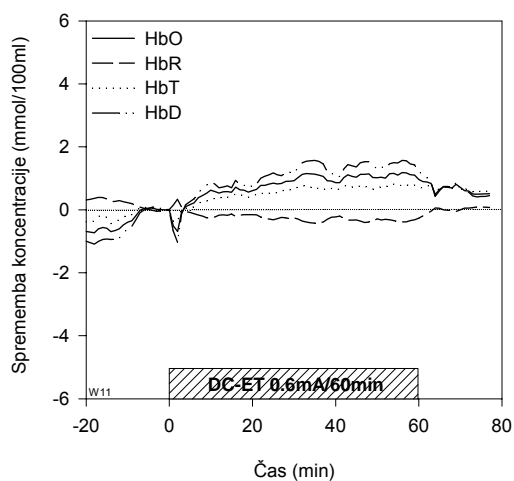
16



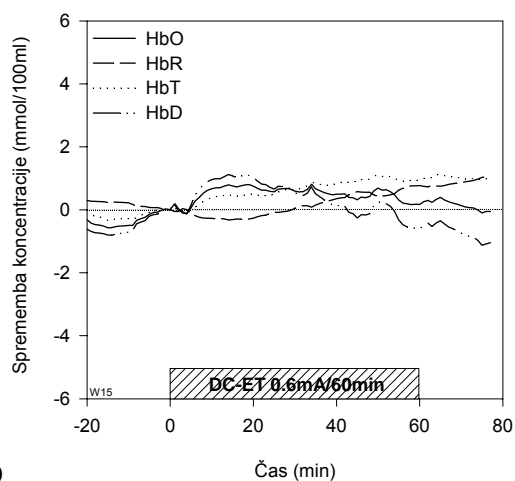
17



18



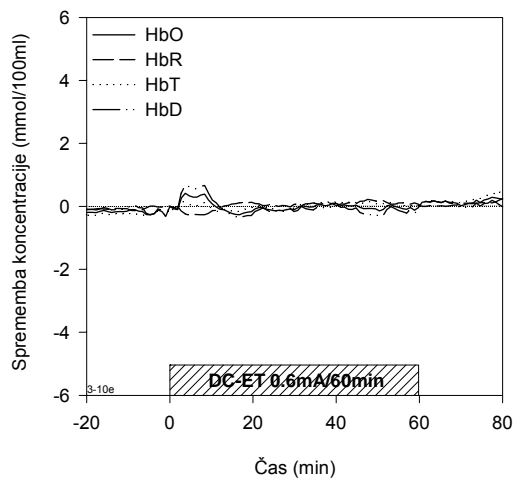
19



20

**Slike A.2.(15-20):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv tumorjev Sa-1 na miših A/J na enourno elektroterapijo - eksperimentalna skupina W0.6/60. Spremembe koncentracij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina. Prikazani so rezultati tumorjev z zelo šibkim in/ali netipičnim ozivom.

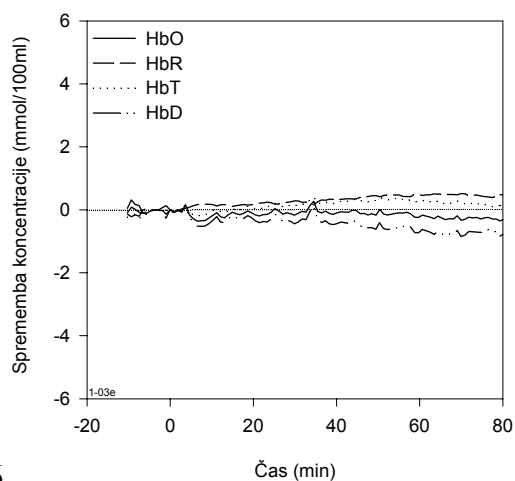
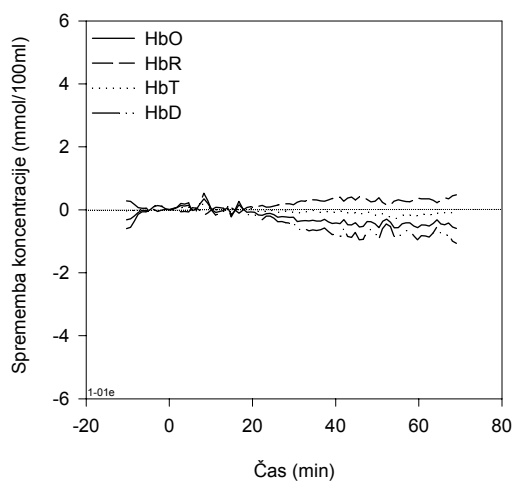
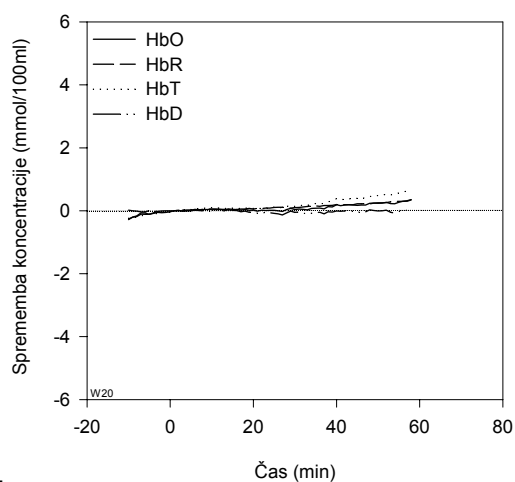
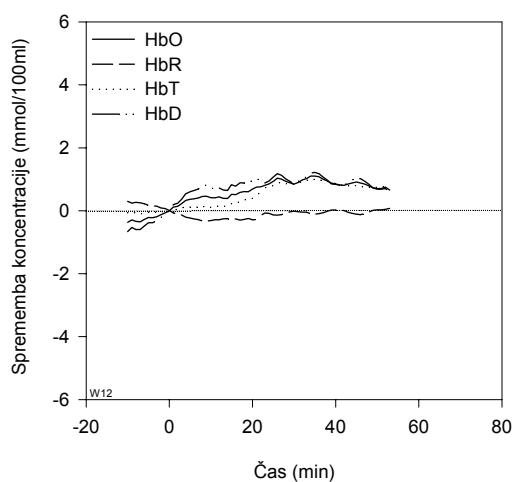
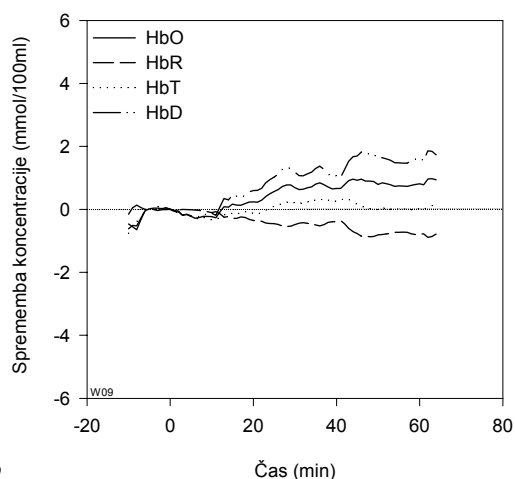
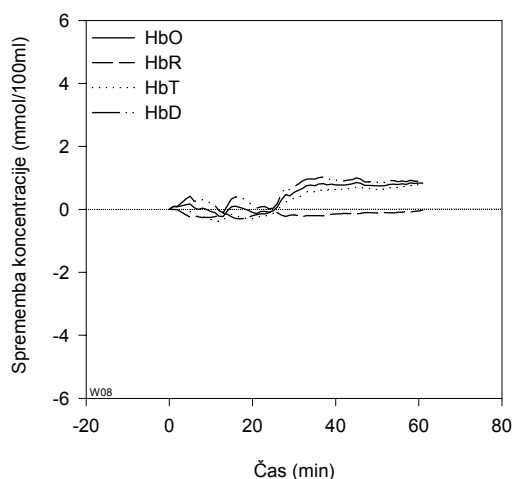
## W0.6/60 (tumor Sa-1/miš A/J, DC-ET) - brez učinka



21

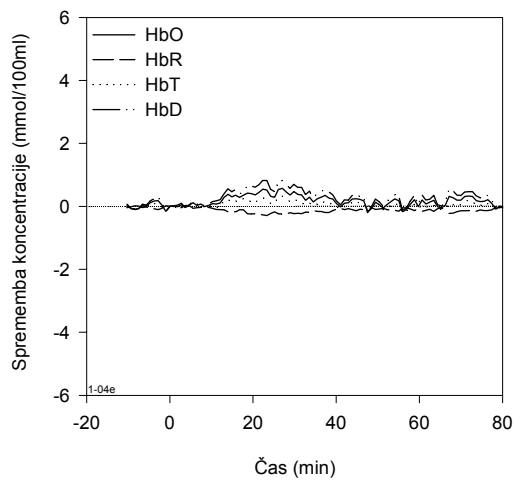
**Slika A.2.(21):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv tumorjev Sa-1 na miših A/J na enourno elektroterapijo - eksperimentalna skupina W0.6/60. Spremembe koncentracij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina. Prikazani so rezultati tumorjev z zelo šibkim in/ali netipičnim ozivom.

## W0.0/00 (tumor Sa-1/miš A/J, kontrola)

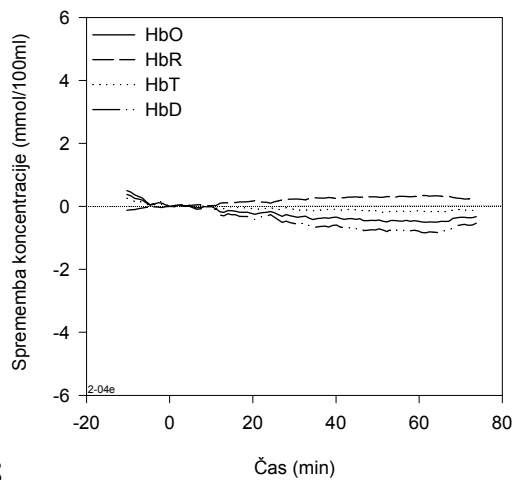


**Slike A.2.(22-27):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv kontrolnih tumorjev Sa-1 na miših A/J - eksperimentalna skupina W0.0/00. Spremembe koncentracij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina.

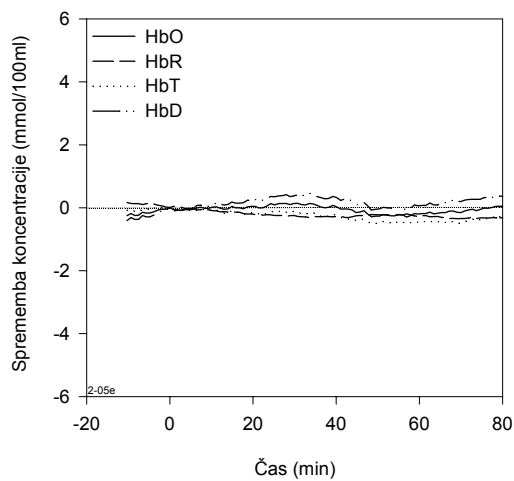
## W0.0/00 (tumor Sa-1/miš A/J, kontrola)



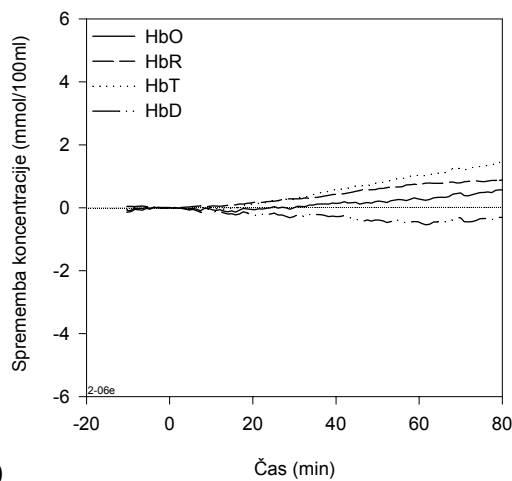
28



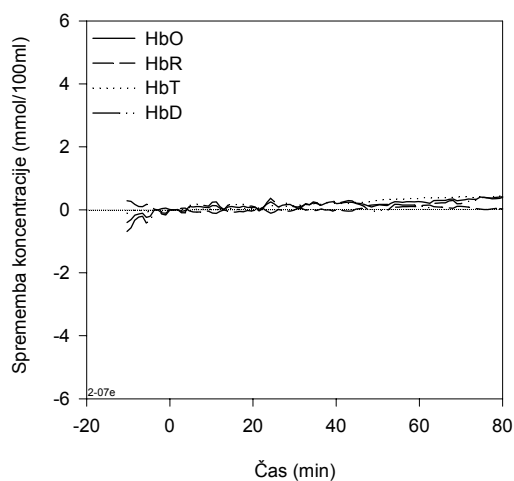
29



30



31



32

**Slike A.2.(28-32):** Rezultati, izmerjeni na posameznih tumorjih z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2). Prikazan je odziv kontrolnih tumorjev Sa-1 na miših A/J - eksperimentalna skupina W0.0/00. Spremembe koncentracij oksigeniranega (HbO), deoksigeniranega (HbR), skupnega (HbT) in diferencialnega (HbD) hemoglobina.



## DODATEK A.3

*Metoda **NIRS** (inštrument **NIRO<sub>2</sub>X-2**)*

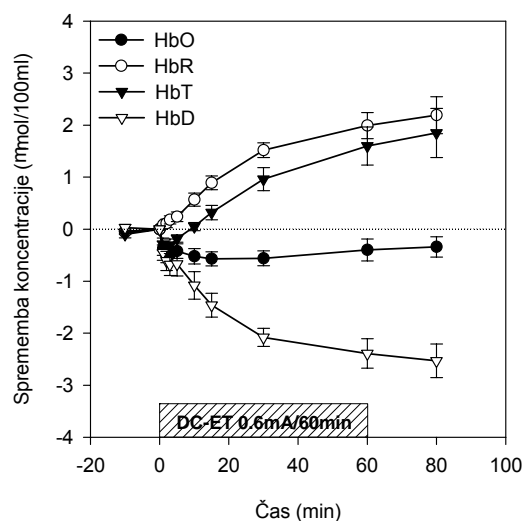
*Tumor **LPB** na miših **C57Bl/6***

*Tumor **Sa-1** na miših **A/J***

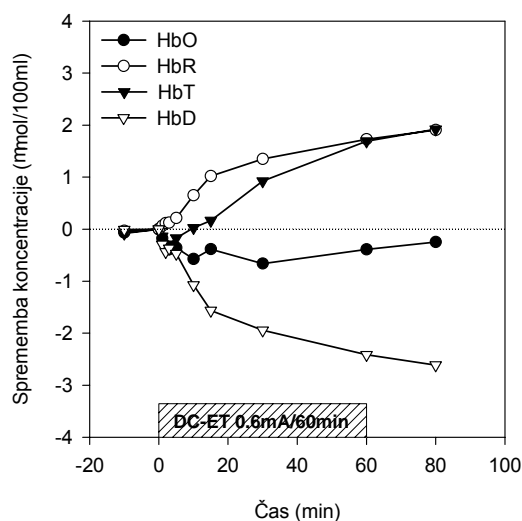
***Srednji časovni odzivi***

Tu so predstavljeni srednji odzivi tumorjev obeh tumorskih linij na elektroterapijo. Rekonstrukcija srednjih odzivov (**povprečja** in **mediane**) je predstavljena za:

1. tumorje z močnim in tipičnim odzivom;
2. tumorje s šibkim in/ali z nekoliko netipičnim odzivom + za vse tumorje pod 1.;
3. tumorje z zelo šibkim in/ali netipičnim odzivom + za vse tumorje pod 2.;
4. kontrolne tumorje.

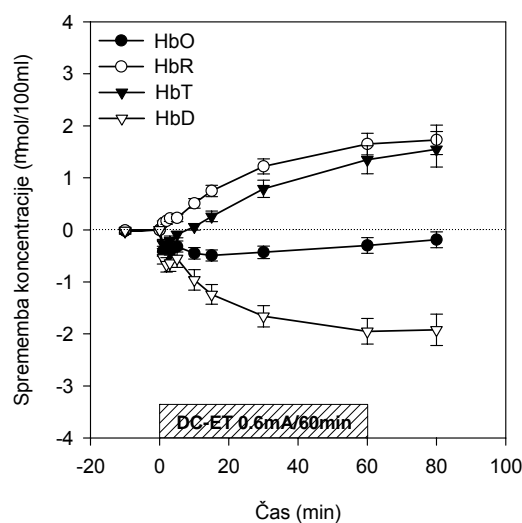


01

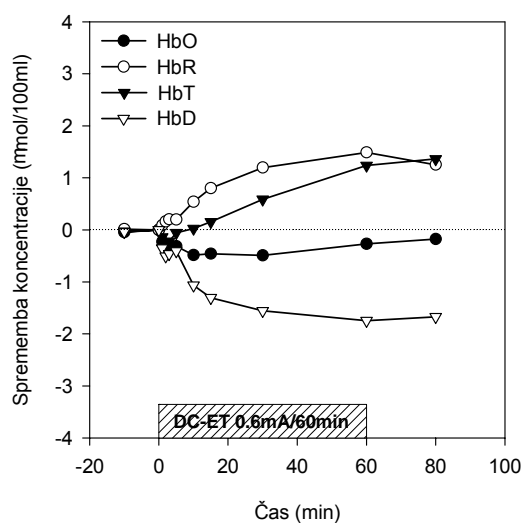


02

**Slika A.3.(1,2):** Rekonstrukcija časovnih potekov sprememb koncentracij kromoforov HbO, HbR, HbT in HbD med DC-ET za tumorje LPB na miših C57Bl/6 (skupina B0.6/60). Izmerjeno z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) Na levi so povprečja s standardno napako, na desni mediane. Skupni rezultati za tumorje z močnim in tipičnim odzivom na DC-ET.

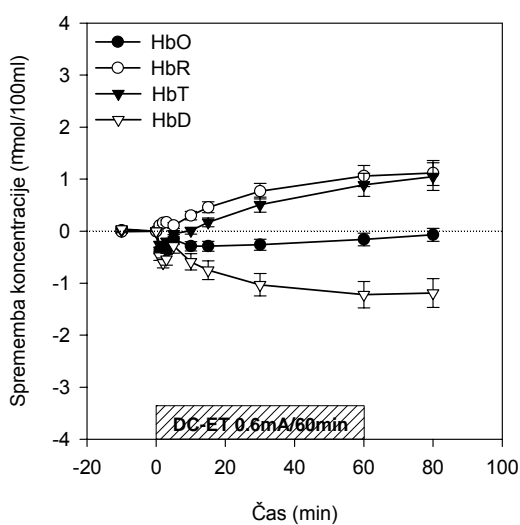


03

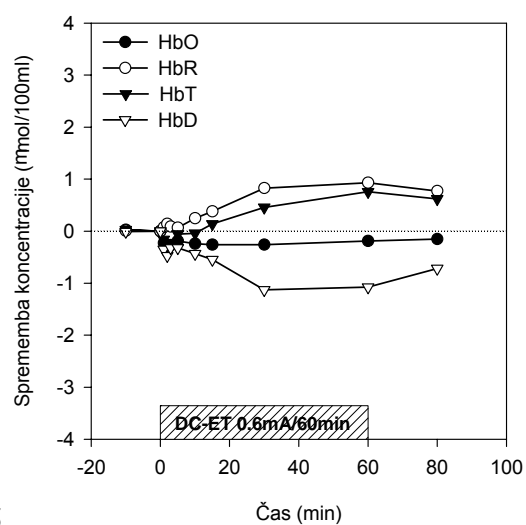


04

**Slika A.3.(3,4):** Rekonstrukcija časovnih potekov sprememb koncentracij kromoforov HbO, HbR, HbT in HbD med DC-ET za tumorje LPB na miših C57Bl/6 (skupina B0.6/60). Izmerjeno z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) Na levi so povprečja s standardno napako, na desni mediane. Skupni rezultati za tumorje z močnim in tipičnim odzivom na DC-ET iz slik A3.(1,2) ter za tumorje s šibkim in/ali netipičnim odzivom.

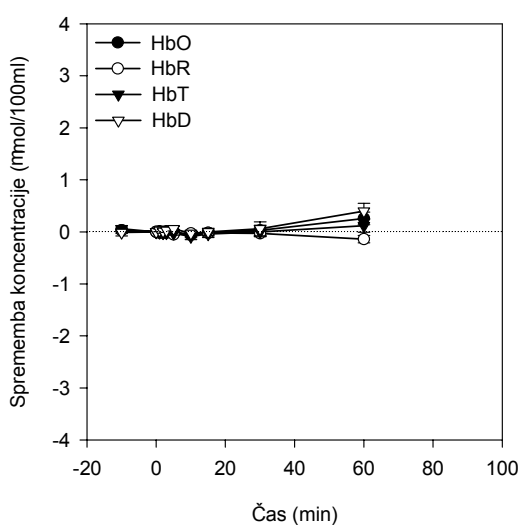


05

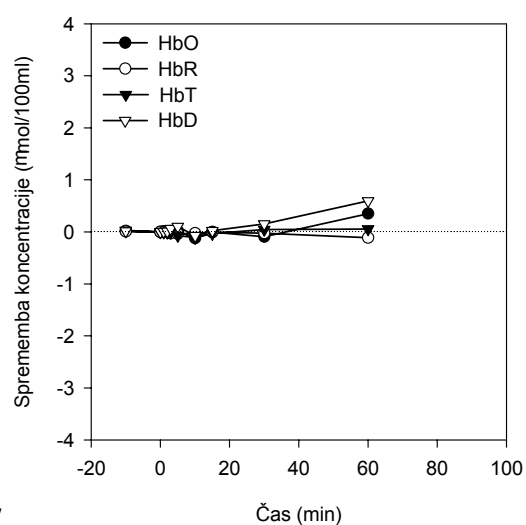


06

**Slike A.3.(5,6):** Rekonstrukcija časovnih potekov sprememb koncentracij kromoforov HbO, HbR, HbT in HbD med DC-ET za tumorje LPB na miših C57Bl/6 (skupina B0.6/60). Izmerjeno z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) Na levi so povprečja s standardno napako, na desni mediane. Skupni rezultati za vse tumorje vključno s tistimi brez odziva na DC-ET.

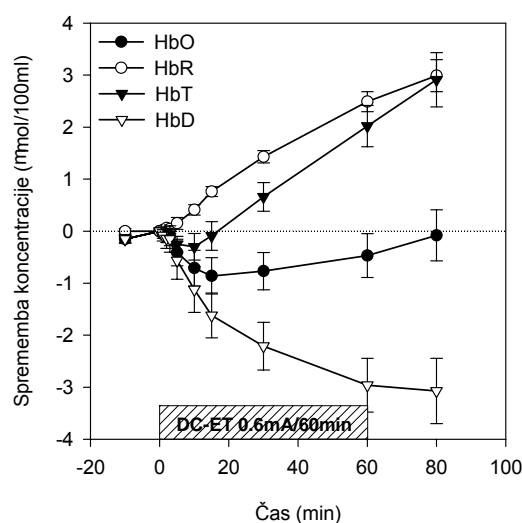


07

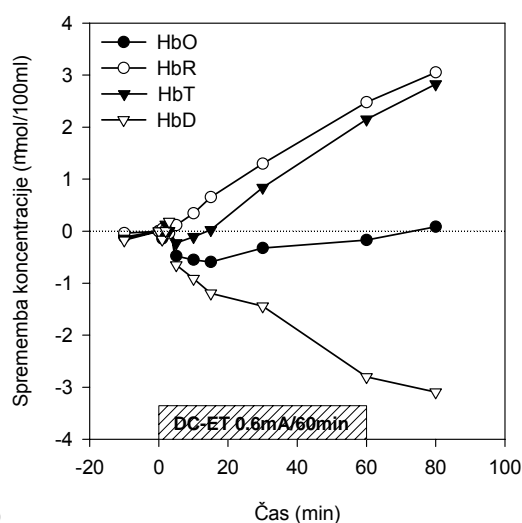


08

**Slike A.3.(7,8):** Rekonstrukcija časovnih potekov sprememb koncentracij kromoforov HbO, HbR, HbT in HbD med DC-ET za kontrolne tumorje LPB na miših C57Bl/6 (skupina B0.0/00). Izmerjeno z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) Na levi so povprečja s standardno napako, na desni mediane. Skupni rezultati za vse kontrolne tumorje.

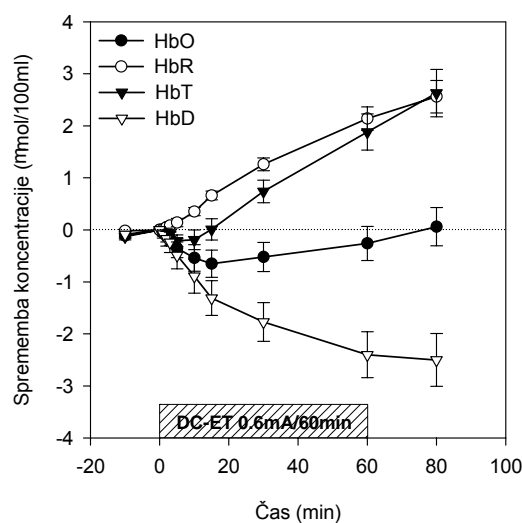


09

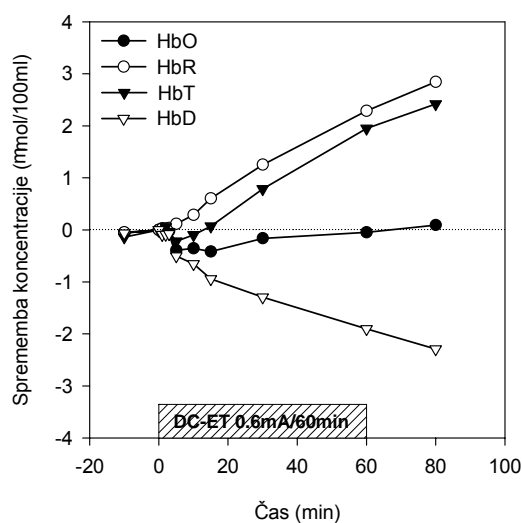


10

**Slika A.3.(9,10):** Rekonstrukcija časovnih potekov sprememb koncentracij kromoforov HbO, HbR, HbT in HbD med DC-ET za tumorje Sa-1 na miših A/J (skupina W0.6/60). Izmerjeno z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) Na levi so povprečja s standardno napako, na desni mediane. Skupni rezultati za tumorje z močnim in tipičnim odzivom na DC-ET.

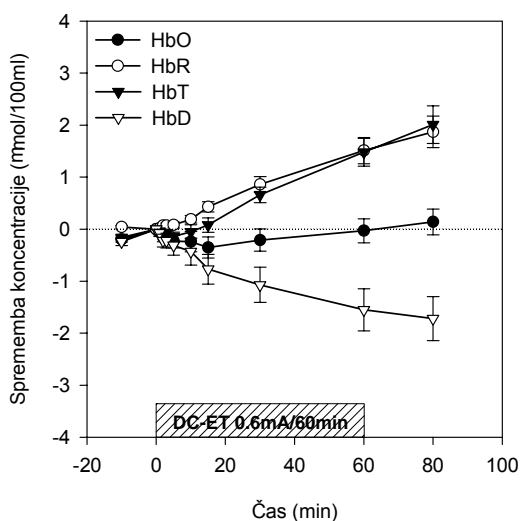


11

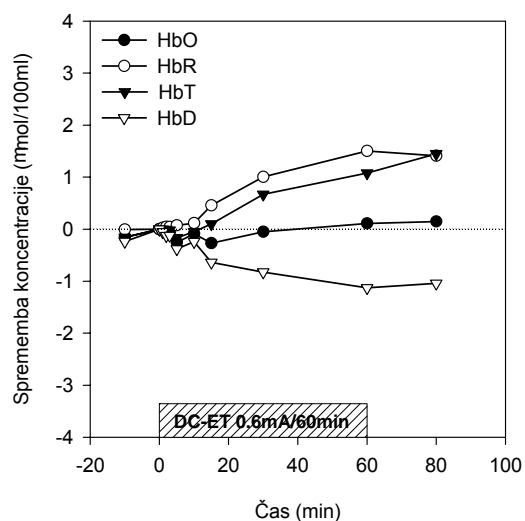


12

**Slika A.3.(11,12):** Rekonstrukcija časovnih potekov sprememb koncentracij kromoforov HbO, HbR, HbT in HbD med DC-ET za tumorje Sa-1 na miših A/J (skupina W0.6/60). Izmerjeno z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) Na levi so povprečja s standardno napako, na desni mediane. Skupni rezultati za tumorje z močnim in tipičnim odzivom na DC-ET iz slik A3.(9,10) ter za tumorje s šibkim in/ali netipičnim odzivom.

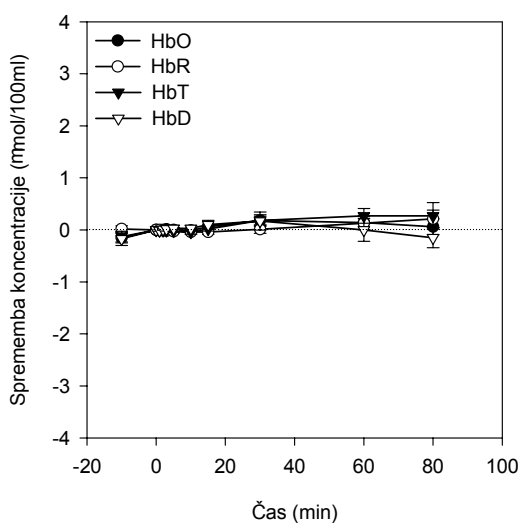


13

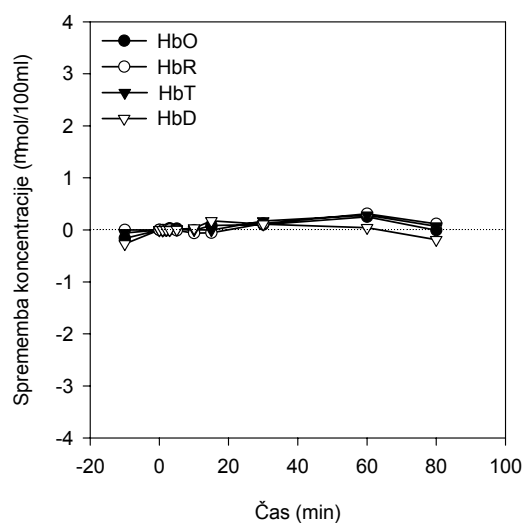


14

**Slike A.3.(13,14):** Rekonstrukcija časovnih potekov sprememb koncentracij kromoforov HbO, HbR, HbT in HbD med DC-ET za tumorje Sa-1 na miših A/J (skupina W0.6/60). Izmerjeno z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) Na levi so povprečja s standardno napako, na desni mediane. Skupni rezultati za vse tumorje vključno s tistimi brez odziva na DC-ET.



15



16

**Slike A.3.(15,16):** Rekonstrukcija časovnih potekov sprememb koncentracij kromoforov HbO, HbR, HbT in HbD med DC-ET za kontrolne tumorje Sa-1 na miših A/J (skupina W0.0/00). Izmerjeno z metodo NIRS (inštrument NIRO<sub>2</sub>X-2) Na levi so povprečja s standardno napako, na desni mediane. Skupni rezultati za vse kontrolne tumorje.



# DODATEK B.1

*Metoda **NIRS** (inštrument **OS30**)*

*Tumor **LPB** na miših **C57Bl/6***

*Tumor **Sa-1** na miših **A/J***

***Histogrami***

***Kumulativne** predstavitve*

Tu so zbrani rezultati za **tumor**, **okolico tumorja** in **mišico** v vseh eksperimentalnih skupinah obeh tumorskih modelov. Upoštevani so posamezne meritve na vseh živalih. Rezultati so predstavljeni kot:

- histogramska porazdelitev vseh izmerjenih vrednosti za veličine **Sat**, **HbT**, **HbO** in **HbR**;
- različne kumulativne predstavitve.

## TUMOR

TUMOR: nasičenost hemoglobina s kisikom Sat(%)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P<0.05
B0.0/00	8	85	<b>31,6</b>	6,7	0,7	<b>31,7</b>	0,0	47,1	
B0.6/30	7	75	<b>31,0</b>	6,3	0,7	<b>31,6</b>	12,5	45,4	NE
B0.6/60	6	60	<b>19,0</b>	10,6	1,4	<b>18,8</b>	0,0	43,0	DA
W0.0/00	10	96	<b>18,7</b>	8,0	0,8	<b>18,4</b>	0,0	16,5	
W0.6/30	5	55	<b>9,1</b>	8,5	1,1	<b>6,9</b>	0,0	29,7	DA
W0.6/60	7	61	<b>5,9</b>	6,2	0,8	<b>4,6</b>	0,0	26,6	DA
W0.9/60	6	54	<b>6,0</b>	9,4	1,3	<b>0,7</b>	0,0	39,8	DA
W0.3/60	4	34	<b>15,1</b>	5,9	1,0	<b>16,8</b>	0,0	25,1	NE

TUMOR: koncentracija skupnega hemoglobina HbT(mg/ml)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	85	<b>1,25</b>	0,98	0,11	<b>1,07</b>	0,46	9,48	
B0.6/30	7	75	<b>1,35</b>	0,39	0,05	<b>1,33</b>	0,67	2,78	DA
B0.6/60	6	60	<b>1,78</b>	1,40	0,18	<b>1,37</b>	0,66	7,11	DA
W0.0/00	10	96	<b>1,13</b>	0,32	0,03	<b>1,10</b>	0,51	2,08	
W0.6/30	5	55	<b>1,40</b>	0,45	0,06	<b>1,32</b>	0,58	3,50	DA
W0.6/60	7	61	<b>1,35</b>	0,49	0,06	<b>1,25</b>	0,59	3,09	DA
W0.9/60	6	54	<b>2,36</b>	1,83	0,25	<b>1,63</b>	0,70	8,94	DA
W0.3/60	4	34	<b>1,22</b>	0,27	0,05	<b>1,21</b>	0,76	1,94	NE

TUMOR: koncentracija oksigeniranega hemoglobina HbO(mg/ml)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	85	<b>0,36</b>	0,14	0,01	<b>0,34</b>	0,00	0,80	
B0.6/30	7	75	<b>0,43</b>	0,18	0,02	<b>0,40</b>	0,16	1,12	NE
B0.6/60	6	60	<b>0,34</b>	0,43	0,06	<b>0,22</b>	0,00	2,71	DA
W0.0/00	10	96	<b>0,22</b>	0,13	0,01	<b>0,19</b>	0,00	0,76	
W0.6/30	5	55	<b>0,12</b>	0,11	0,01	<b>0,11</b>	0,00	0,36	DA
W0.6/60	7	61	<b>0,08</b>	0,10	0,01	<b>0,05</b>	0,00	0,42	DA
W0.9/60	6	54	<b>0,11</b>	0,22	0,03	<b>0,01</b>	0,00	1,07	DA
W0.3/60	4	34	<b>0,18</b>	0,09	0,01	<b>0,18</b>	0,00	0,40	NE

TUMOR: koncentracija deoksigeniranega hemoglobina HbR(mg/ml)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	85	<b>0,89</b>	0,99	0,11	<b>0,73</b>	0,36	9,48	
B0.6/30	7	75	<b>0,93</b>	0,25	0,03	<b>0,94</b>	0,50	1,72	DA
B0.6/60	6	60	<b>1,44</b>	1,13	0,15	<b>1,17</b>	0,51	6,74	DA
W0.0/00	10	96	<b>0,91</b>	0,25	0,03	<b>0,90</b>	0,44	1,57	
W0.6/30	5	55	<b>1,28</b>	0,48	0,06	<b>1,19</b>	0,43	3,50	DA
W0.6/60	7	61	<b>1,27</b>	0,49	0,06	<b>1,18</b>	0,56	3,09	DA
W0.9/60	6	54	<b>2,25</b>	1,86	0,25	<b>1,51</b>	0,60	8,94	DA
W0.3/60	4	34	<b>1,04</b>	0,24	0,04	<b>1,00</b>	0,62	1,67	NE

**Tabela B.1.1:** Kumulativni rezultati, izračunani iz meritev na tumorjih 4 ure po koncu DC-ET (Metoda NIRS, inštrument OS 30). N = število živali v skupini; n = skupno število merilnih mest na vseh živalih; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost, P = statistična pomembnost razlik med skupinami DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (ANOVA na rangih; Dunnov test).



## OKOLICA TUMORJA

OKOLICA TUMORJA: nasičenost hemoglobina s kisikom Sat(%)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	73	<b>18,6</b>	9,0	1,1	<b>17,3</b>	1,5	44,1	
B0.6/30	7	75	<b>18,5</b>	6,9	0,8	<b>17,1</b>	6,1	38,6	NE
B0.6/60	6	55	<b>19,3</b>	8,6	1,2	<b>19,4</b>	0,0	40,2	NE
W0.0/00	10	70	<b>17,1</b>	6,9	0,8	<b>17,2</b>	3,5	37,1	
W0.6/30	5	58	<b>14,5</b>	9,5	1,2	<b>14,6</b>	0,0	35,1	NE
W0.6/60	7	50	<b>10,3</b>	7,1	1,0	<b>10,8</b>	0,0	24,4	DA
W0.9/60	6	41	<b>14,5</b>	12,5	1,9	<b>12,8</b>	0,0	51,7	NE
W0.3/60	4	31	<b>14,7</b>	6,2	1,1	<b>15,5</b>	3,5	26,0	NE

OKOLICA TUMORJA: koncentracija skupnega hemoglobina HbT(mg/ml)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	73	<b>1,00</b>	0,24	0,03	<b>0,99</b>	0,57	1,95	
B0.6/30	7	75	<b>0,98</b>	0,23	0,03	<b>0,92</b>	0,59	1,63	NE
B0.6/60	6	55	<b>1,22</b>	0,35	0,05	<b>1,17</b>	0,66	2,56	DA
W0.0/00	10	70	<b>1,04</b>	0,24	0,03	<b>1,02</b>	0,64	1,68	
W0.6/30	5	58	<b>1,23</b>	0,48	0,06	<b>1,15</b>	0,45	3,15	NE
W0.6/60	7	50	<b>1,15</b>	0,33	0,05	<b>1,11</b>	0,44	2,11	NE
W0.9/60	6	41	<b>1,44</b>	0,56	0,09	<b>1,29</b>	0,68	3,05	DA
W0.3/60	4	31	<b>0,96</b>	0,20	0,04	<b>0,98</b>	0,68	1,36	NE

OKOLICA TUMORJA: koncentracija oksigeniranega hemoglobina HbO(mg/ml)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	73	<b>0,19</b>	0,12	0,01	<b>0,18</b>	0,01	0,86	
B0.6/30	7	75	<b>0,18</b>	0,08	0,01	<b>0,19</b>	0,04	0,42	NE
B0.6/60	6	55	<b>0,23</b>	0,11	0,01	<b>0,21</b>	0,00	0,51	DA
W0.0/00	10	70	<b>0,18</b>	0,09	0,01	<b>0,18</b>	0,03	0,37	
W0.6/30	5	58	<b>0,18</b>	0,13	0,02	<b>0,17</b>	0,00	0,54	NE
W0.6/60	7	50	<b>0,12</b>	0,10	0,01	<b>0,13</b>	0,00	0,46	DA
W0.9/60	6	41	<b>0,23</b>	0,28	0,04	<b>0,16</b>	0,00	1,20	NE
W0.3/60	4	31	<b>0,14</b>	0,06	0,01	<b>0,15</b>	0,03	0,28	NE

OKOLICA TUMORJA: koncentracija deoksigeniranega hemoglobina HbR(mg/ml)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	73	<b>0,81</b>	0,19	0,02	<b>0,79</b>	0,42	1,23	
B0.6/30	7	75	<b>0,80</b>	0,20	0,02	<b>0,76</b>	0,45	1,35	NE
B0.6/60	6	55	<b>0,99</b>	0,33	0,04	<b>0,92</b>	0,50	2,23	DA
W0.0/00	10	70	<b>0,86</b>	0,20	0,02	<b>0,82</b>	0,51	1,46	
W0.6/30	5	58	<b>1,05</b>	0,47	0,06	<b>0,95</b>	0,39	3,15	DA
W0.6/60	7	50	<b>1,04</b>	0,32	0,05	<b>1,04</b>	0,41	2,07	DA
W0.9/60	6	41	<b>1,21</b>	0,42	0,07	<b>1,19</b>	0,54	2,04	DA
W0.3/60	4	31	<b>0,82</b>	0,18	0,03	<b>0,79</b>	0,51	1,26	NE

**Tabela B.1.2:** Kumulativni rezultati, izračunani iz meritev v neposredni okolici tumorjev 4 ure po koncu DC-ET (Metoda NIRS, inštrument OS 30). N = število živali v skupini; n = skupno število merilnih mest na vseh živalih; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost, P = statistična pomembnost razlik med skupinami DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (ANOVA na rangih; Dunnov test).

## MIŠICA

MIŠICA: nasičenost hemoglobina s kisikom Sat(%)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	47	<b>33,1</b>	10,6	1,5	<b>31,8</b>	10,1	53,7	
B0.6/30	7	46	<b>32,7</b>	9,4	1,4	<b>32,5</b>	9,5	50,3	NE
B0.6/60	6	35	<b>37,3</b>	12,2	2,1	<b>37,8</b>	14,7	62,5	NE
W0.0/00	10	55	<b>17,2</b>	6,8	0,9	<b>16,5</b>	6,0	34,7	
W0.6/30	5	31	<b>16,9</b>	9,0	1,6	<b>15,7</b>	3,9	39,7	NE
W0.6/60	7	41	<b>19,6</b>	8,0	1,2	<b>19,8</b>	6,1	40,5	NE
W0.9/60	6	31	<b>19,4</b>	7,4	1,3	<b>17,8</b>	7,6	39,0	NE
W0.3/60	4	21	<b>18,9</b>	8,8	1,9	<b>17,2</b>	1,7	38,4	NE

MIŠICA: koncentracija skupnega hemoglobna HbT(mg/ml)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	47	<b>1,13</b>	0,29	0,04	<b>1,11</b>	0,68	2,12	
B0.6/30	7	46	<b>1,12</b>	0,28	0,04	<b>1,08</b>	0,65	1,78	NE
B0.6/60	6	35	<b>1,37</b>	0,51	0,09	<b>1,18</b>	0,86	3,00	DA
W0.0/00	10	55	<b>1,24</b>	0,42	0,06	<b>1,07</b>	0,71	2,25	
W0.6/30	5	31	<b>1,35</b>	0,35	0,06	<b>1,32</b>	0,82	2,25	NE
W0.6/60	7	41	<b>1,29</b>	0,39	0,06	<b>1,20</b>	0,74	2,18	NE
W0.9/60	6	31	<b>1,25</b>	0,47	0,08	<b>1,15</b>	0,69	2,62	NE
W0.3/60	4	21	<b>1,13</b>	0,23	0,05	<b>1,11</b>	0,78	1,54	NE

MIŠICA: koncentracija oksigeniranega hemoglobna HbO(mg/ml)

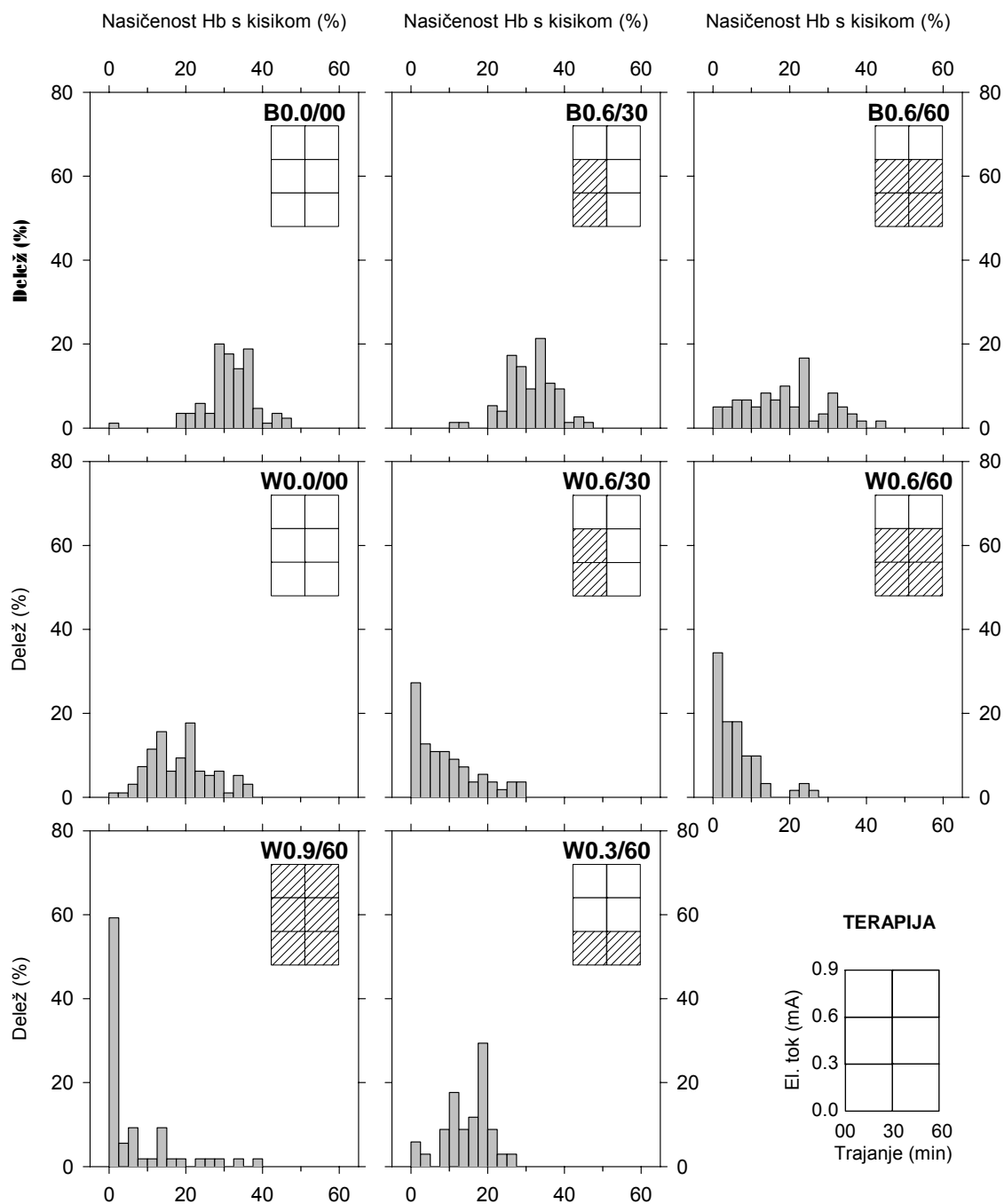
Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	47	<b>0,39</b>	0,21	0,03	<b>0,33</b>	0,11	1,12	
B0.6/30	7	46	<b>0,39</b>	0,18	0,03	<b>0,35</b>	0,07	0,83	NE
B0.6/60	6	35	<b>0,56</b>	0,40	0,07	<b>0,42</b>	0,13	1,81	NE
W0.0/00	10	55	<b>0,23</b>	0,14	0,02	<b>0,17</b>	0,05	0,62	
W0.6/30	5	31	<b>0,24</b>	0,16	0,03	<b>0,18</b>	0,05	0,61	NE
W0.6/60	7	41	<b>0,27</b>	0,17	0,03	<b>0,25</b>	0,08	0,88	NE
W0.9/60	6	31	<b>0,25</b>	0,16	0,03	<b>0,18</b>	0,09	0,71	NE
W0.3/60	4	21	<b>0,21</b>	0,12	0,03	<b>0,18</b>	0,03	0,59	NE

MIŠICA: koncentracija deoksigeniranega hemoglobna HbR(mg/ml)

Skupina	N	n	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX	P
B0.0/00	8	47	<b>0,74</b>	0,16	0,02	<b>0,73</b>	0,39	1,13	
B0.6/30	7	46	<b>0,74</b>	0,13	0,02	<b>0,71</b>	0,48	1,04	NE
B0.6/60	6	35	<b>0,81</b>	0,15	0,03	<b>0,77</b>	0,60	1,22	NE
W0.0/00	10	55	<b>1,02</b>	0,32	0,04	<b>0,88</b>	0,61	1,82	
W0.6/30	5	31	<b>1,11</b>	0,27	0,05	<b>1,11</b>	0,75	1,88	NE
W0.6/60	7	41	<b>1,03</b>	0,28	0,04	<b>0,99</b>	0,65	1,81	NE
W0.9/60	6	31	<b>1,00</b>	0,35	0,06	<b>0,92</b>	0,51	1,99	NE
W0.3/60	4	21	<b>0,92</b>	0,23	0,05	<b>0,93</b>	0,54	1,49	NE

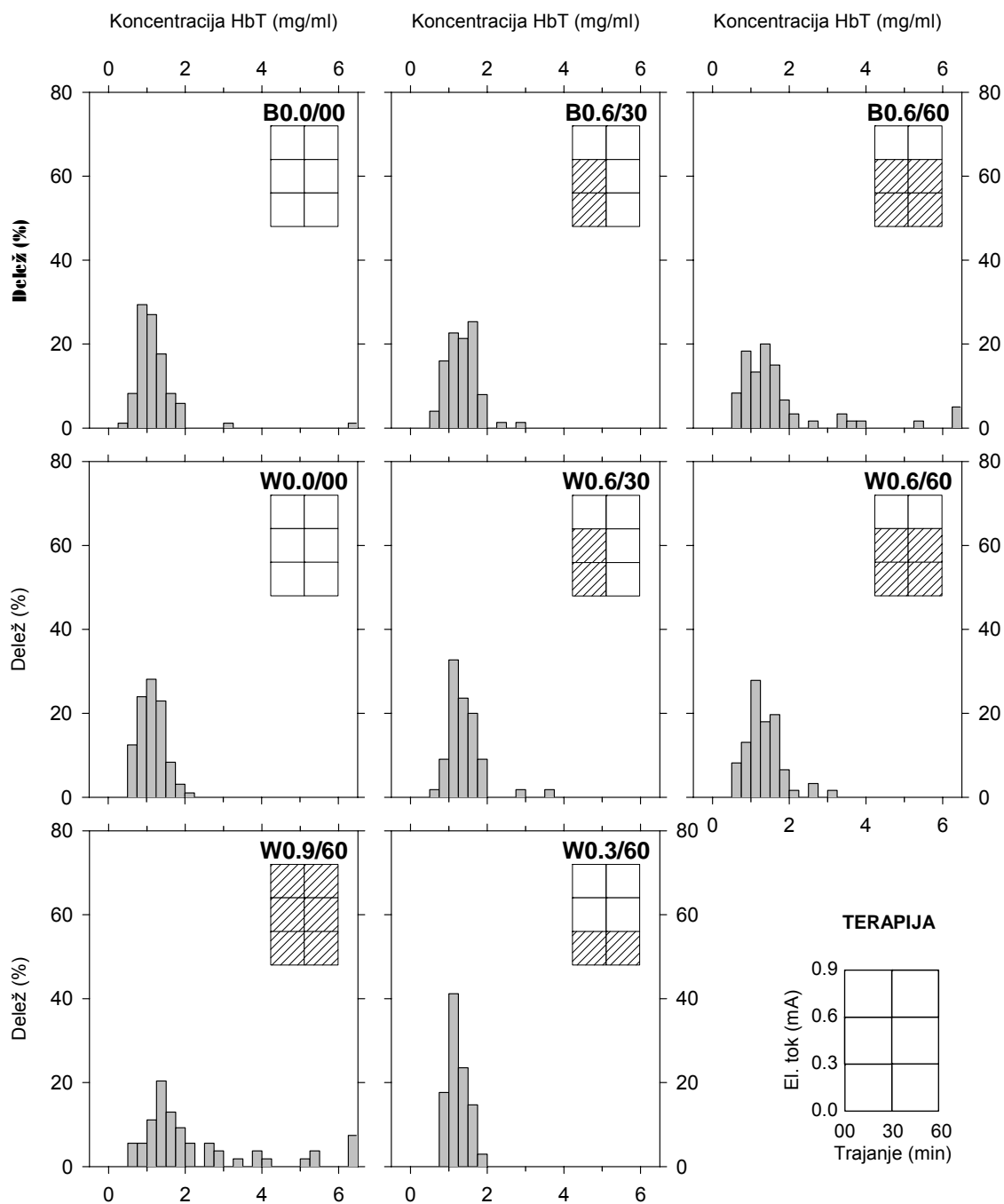
**Tabela B.1.3:** Kumulativni rezultati, izračunani iz meritev na stegenski mišici 4 ure po koncu DC-ET na tumorju (Metoda NIRS, inštrument OS 30). N = število živali v skupini; n = skupno število merilnih mest na vseh živalih; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost, P = statistična pomembnost razlik med skupinami DC-ET in pripadajočo kontrolno skupino (ANOVA na rangih; Dunnov test).

## TUMOR - Sat



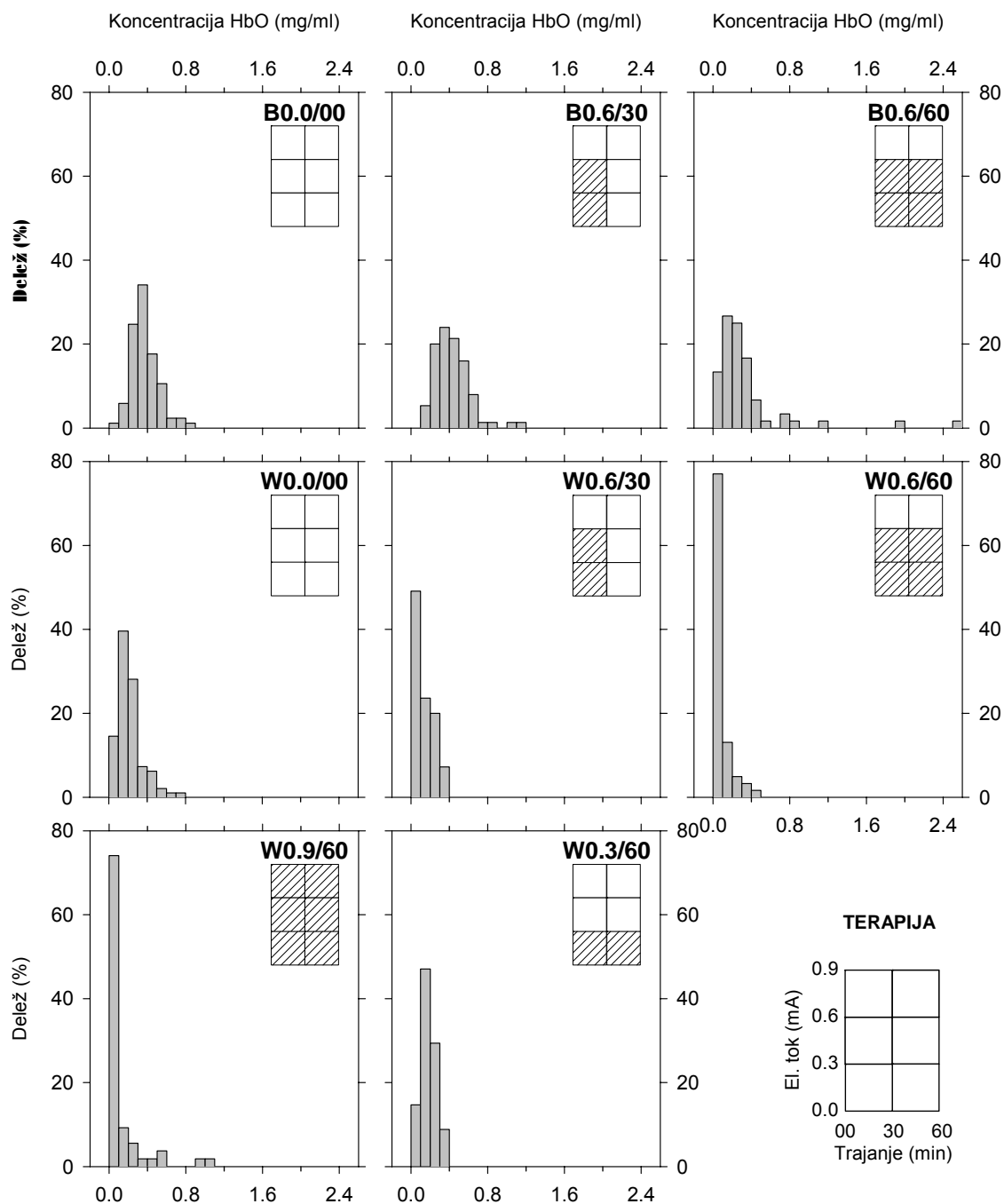
**Slika B.1.1:** Nasičenost hemoglobina s kisikom (Sat) v tumorju 4 ure po koncu DC-ET. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.1.

## TUMOR - HbT



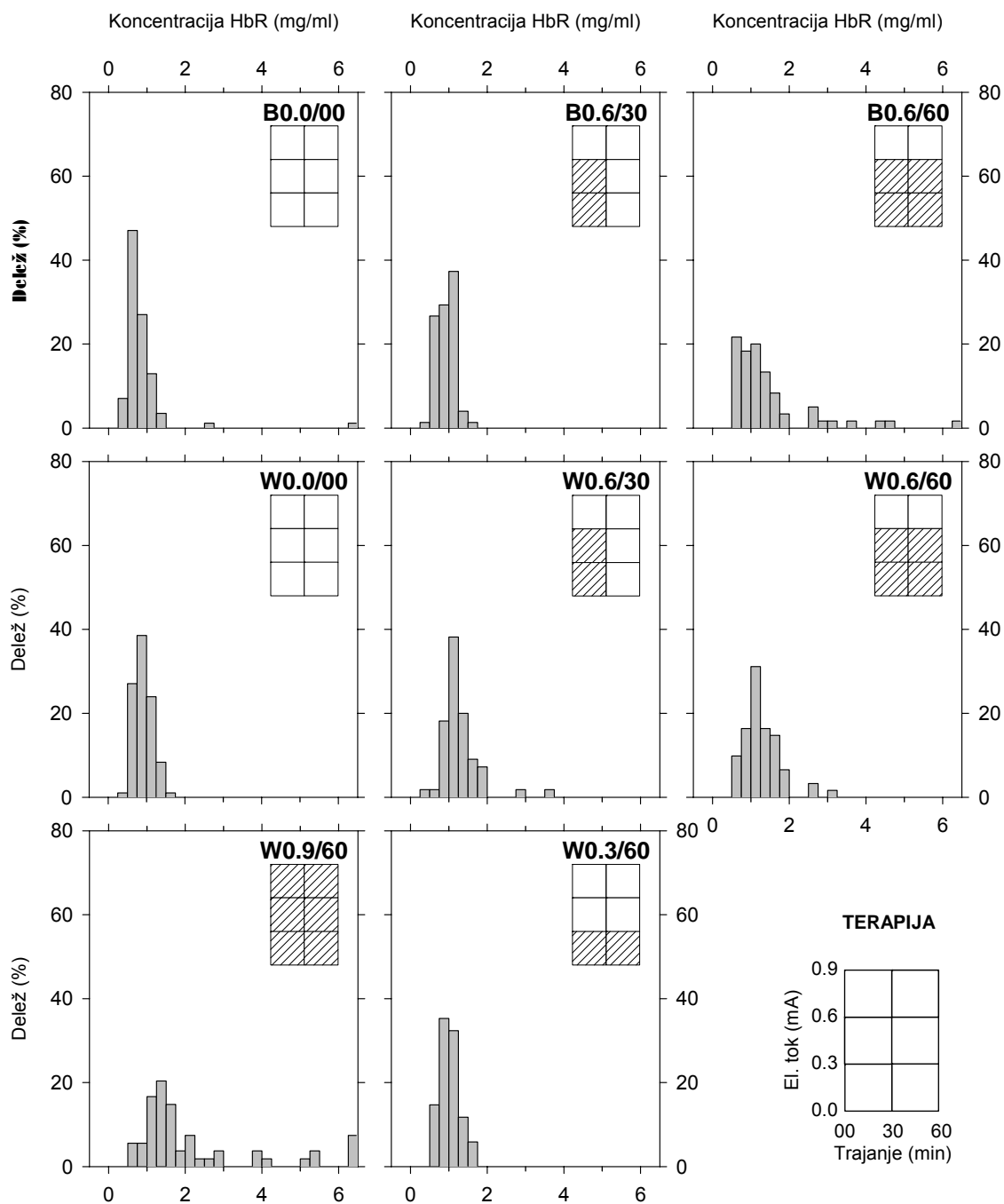
**Slika B.1.2:** Koncentracija skupnega hemoglobina (HbT) v tumorju 4 ure po koncu DC-ET. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.1.

## TUMOR - HbO



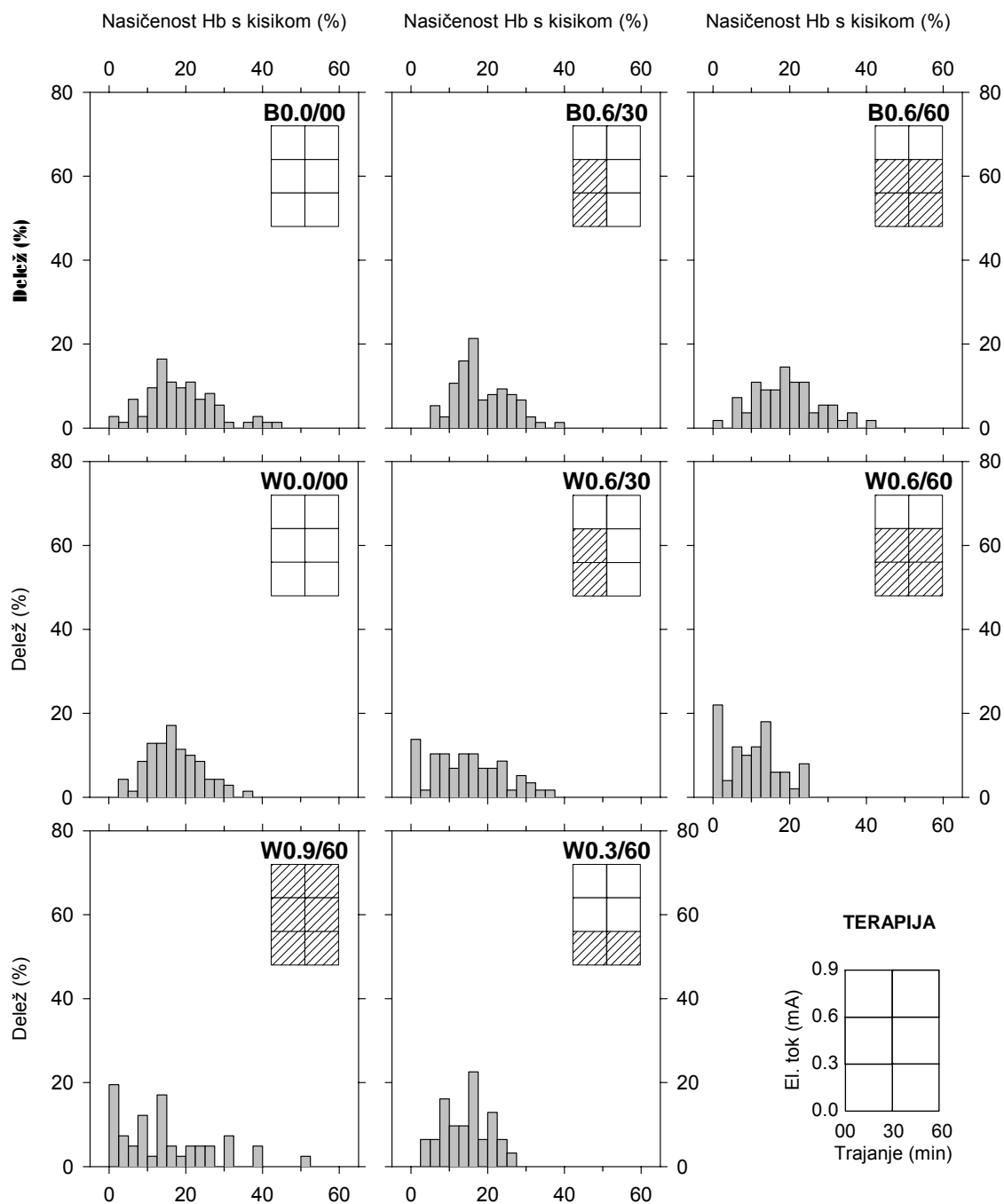
**Slika B.1.3:** Koncentracija oksigeniranega hemoglobina (HbO) v tumorju 4 ure po koncu DC-ET. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.1.

## TUMOR - HbR



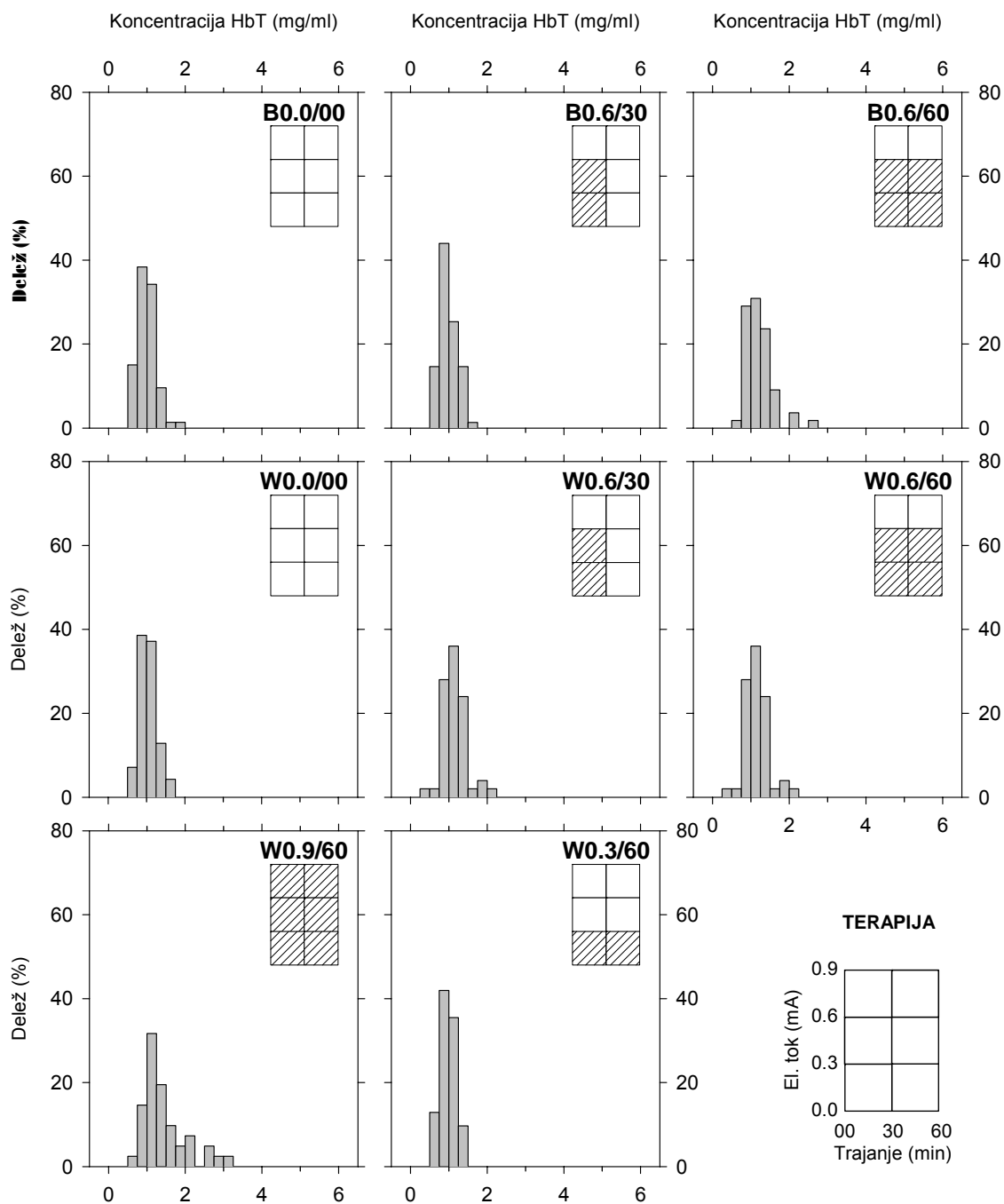
**Slika B.1.4:** Koncentracija deoksigeniranega hemoglobina (HbR) v tumorju 4 ure po koncu DC-ET. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči številčni kumulativni podatki so zbrani v tabeli B.1.

## OKOLICA TUMORJA - Sat



**Slika B.1.5:** Nasičenost hemoglobina s kisikom (Sat) v neposredni okolici tumorja 4 ure po koncu DC-ET. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.2.

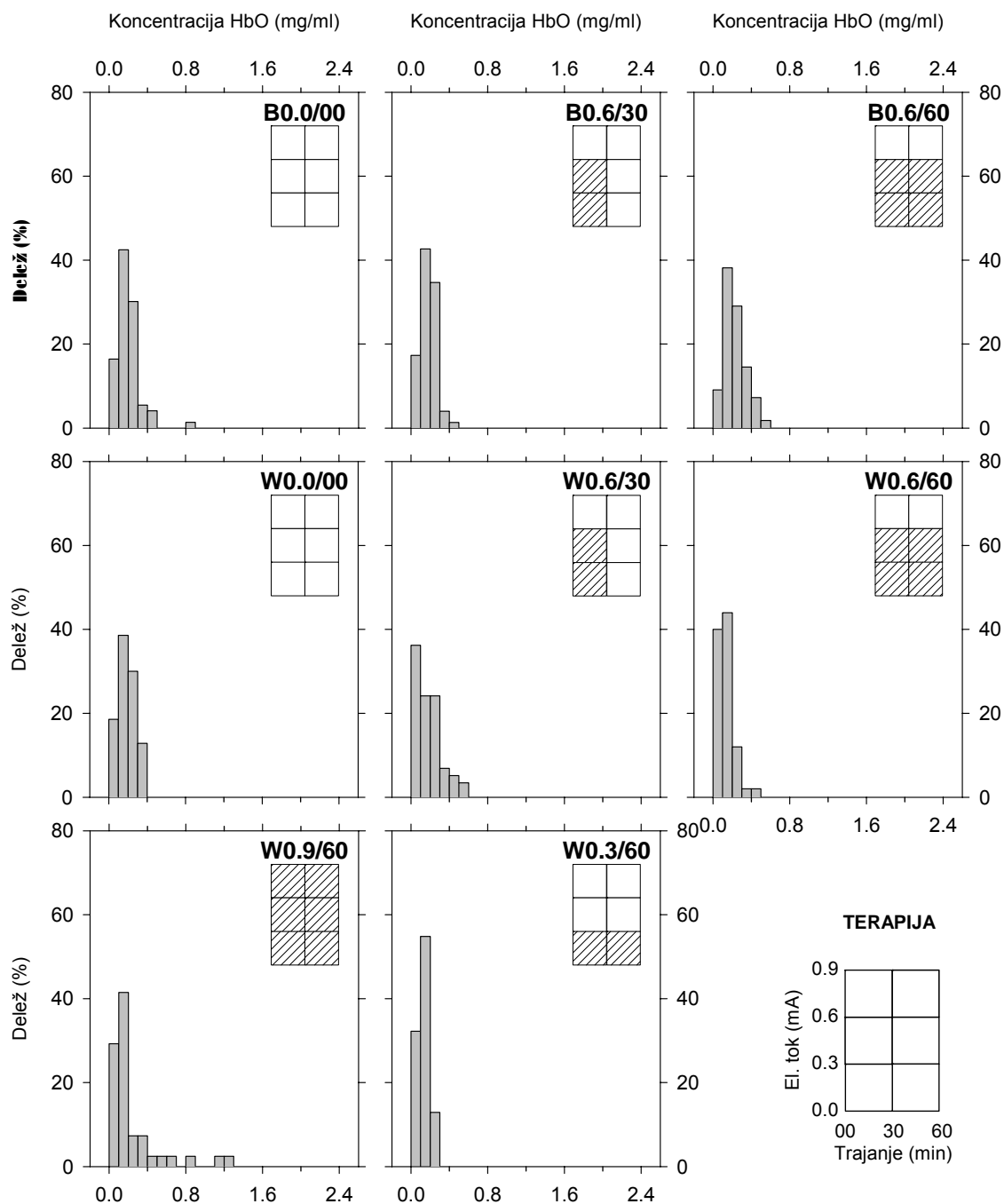
## OKOLICA TUMORJA - HbT



**Slika B.1.6:** Koncentracija skupnega hemoglobina (HbT) v neposredni okolici tumorja 4 ure po koncu DC-ET. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.2.

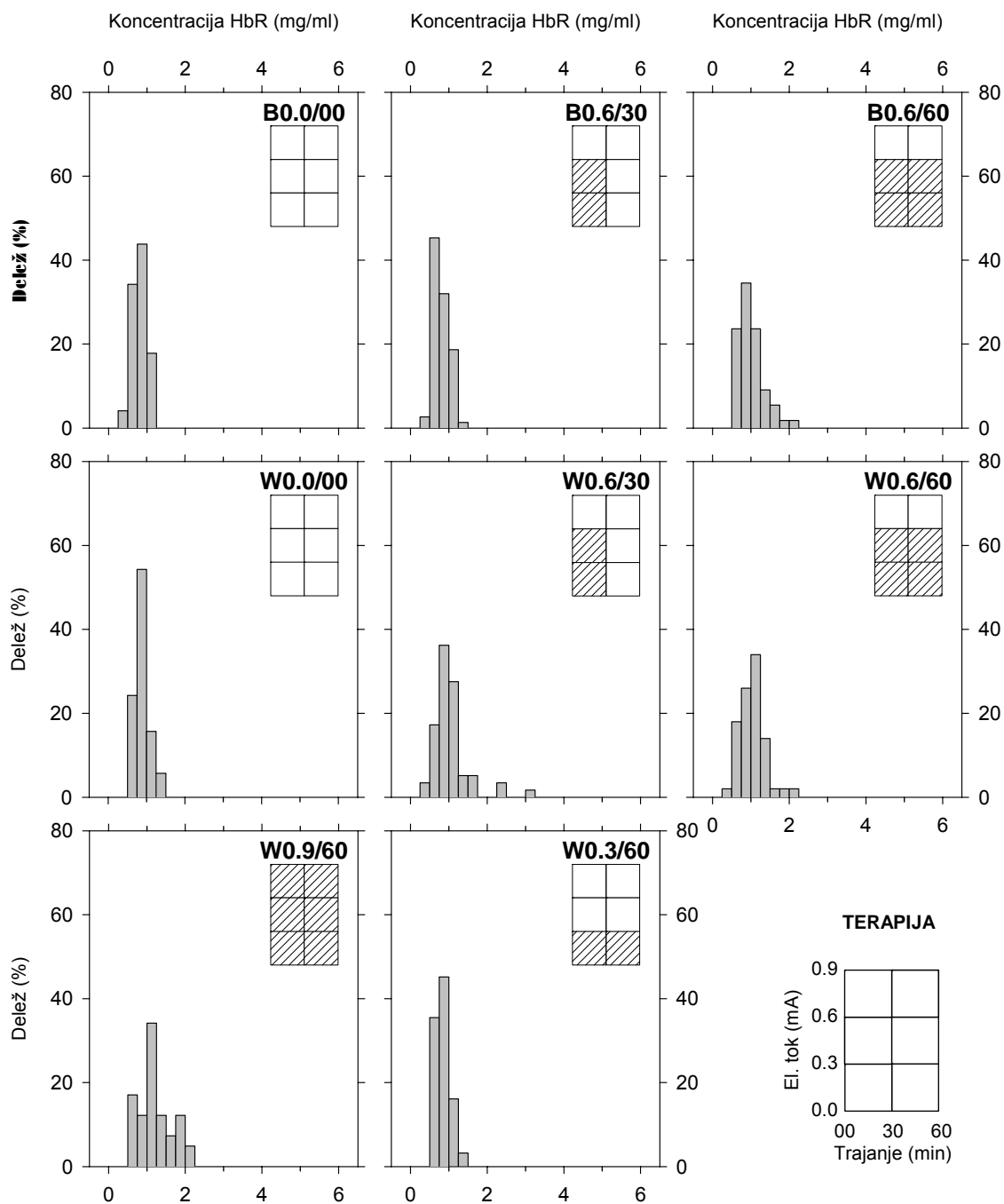


## OKOLICA TUMORJA - HbO



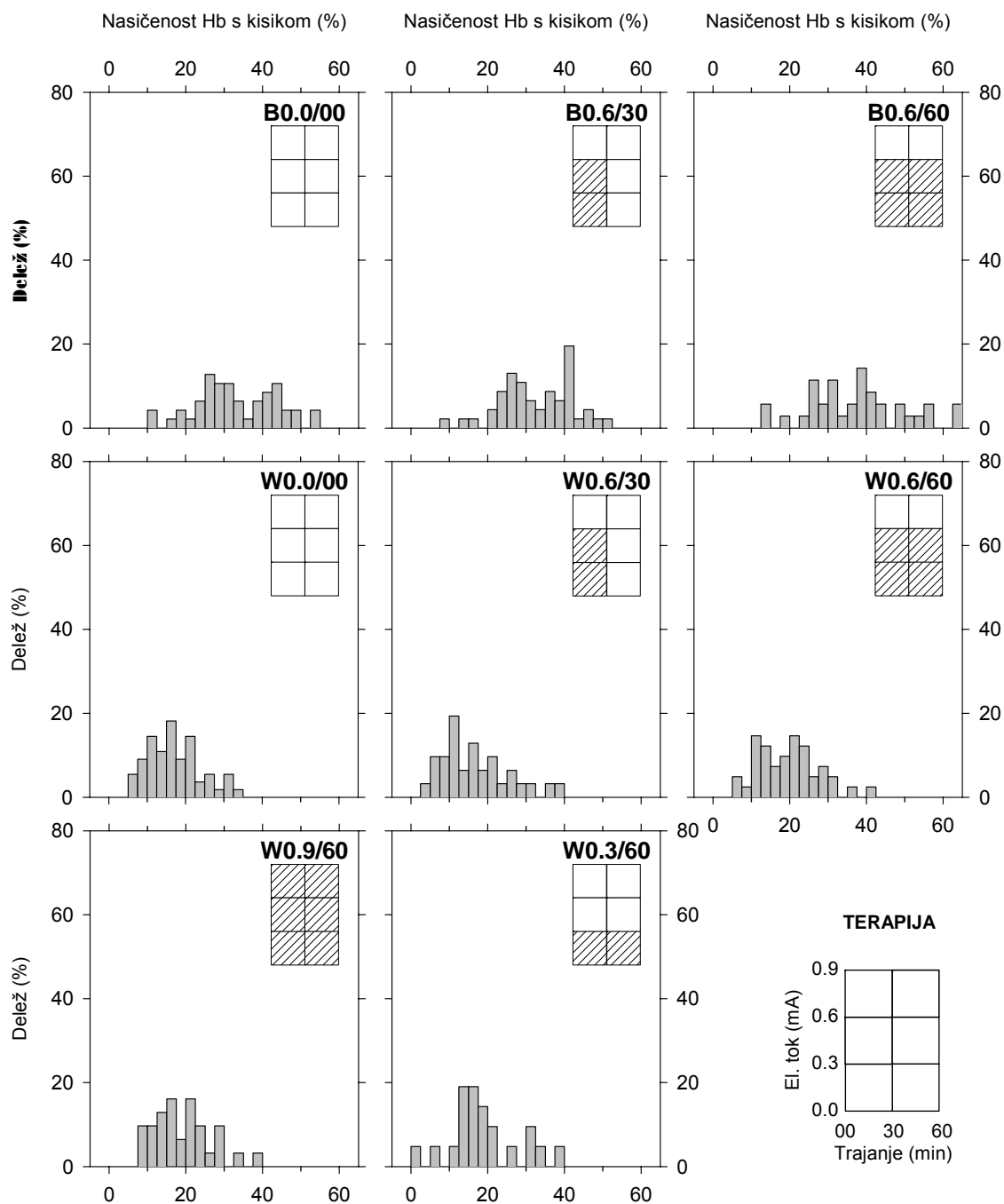
**Slika B.1.7:** Koncentracija oksigeniranega hemoglobina (HbO) v neposredni okolici tumorja 4 ure po koncu DC-ET. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.2.

## OKOLICA TUMORJA - HbR



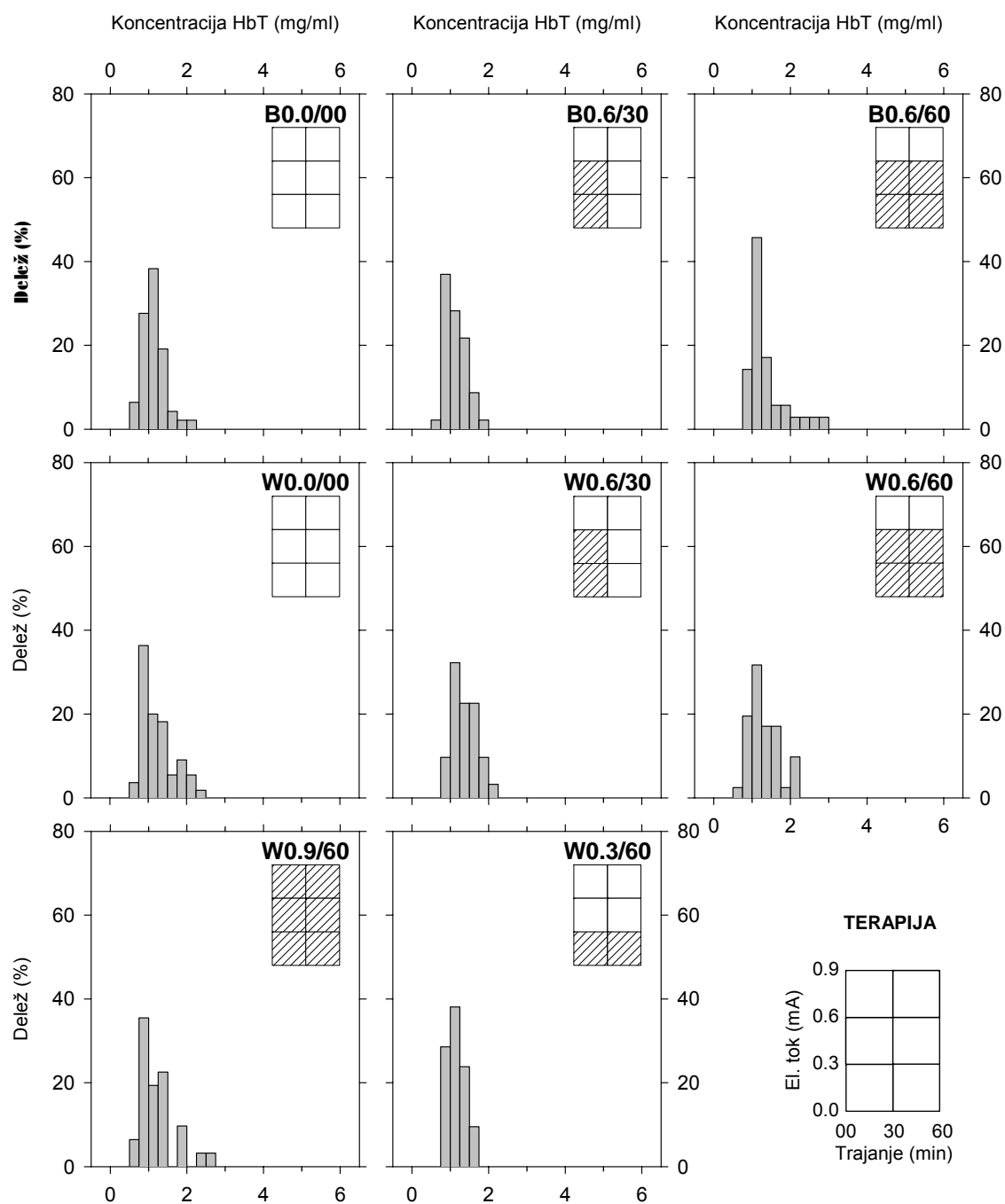
**Slika B.1.8:** Koncentracija deoksigeniranega hemoglobina (HbR) v neposredni okolici tumorja 4 ure po koncu DC-ET. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.2.

## MIŠICA - Sat



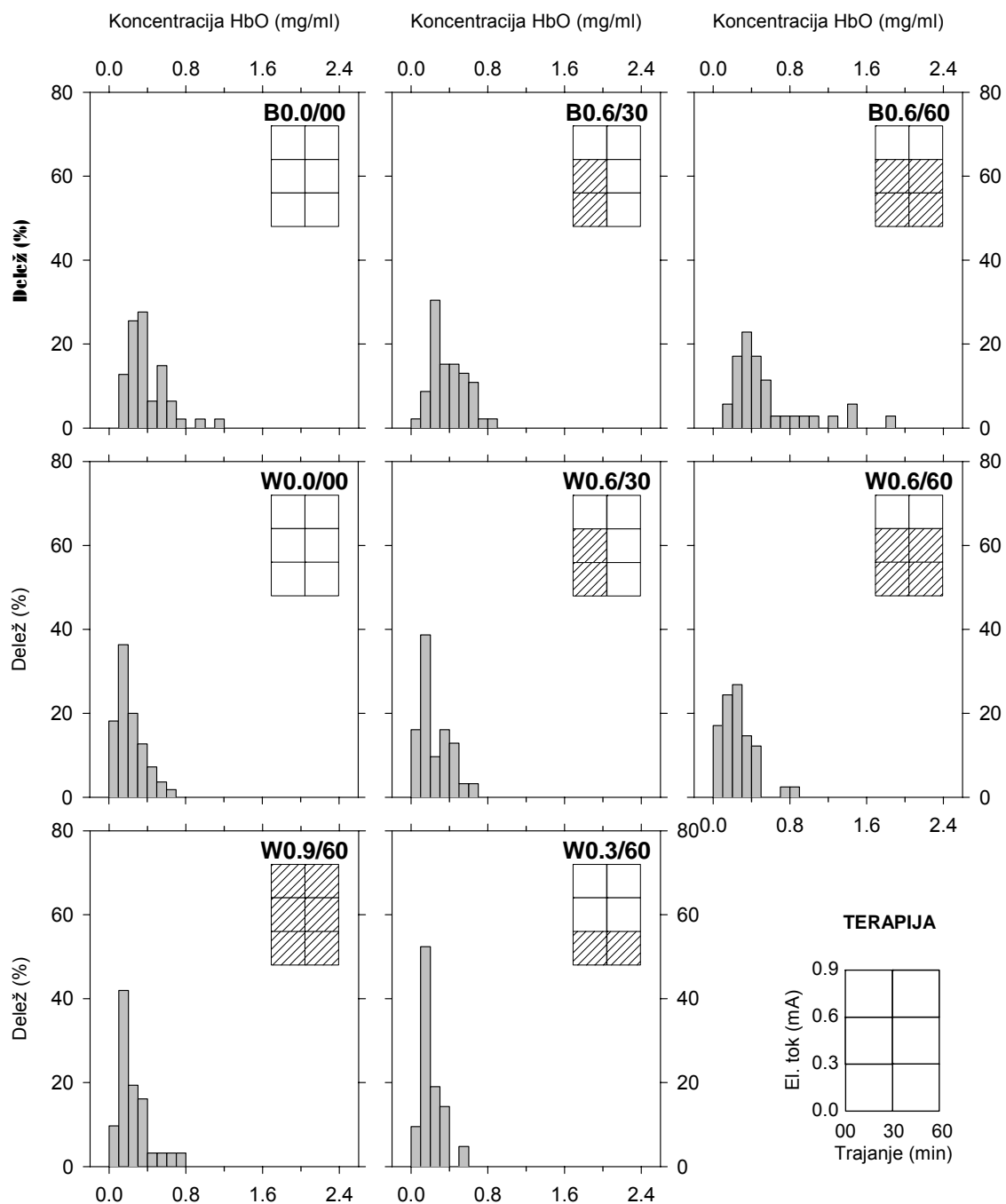
**Slika B.1.9:** Nasičenost hemoglobina s kisikom (Sat) v stegenski mišici 4 ure po koncu DC-ET na tumorju. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.3.

## MIŠICA - HbT



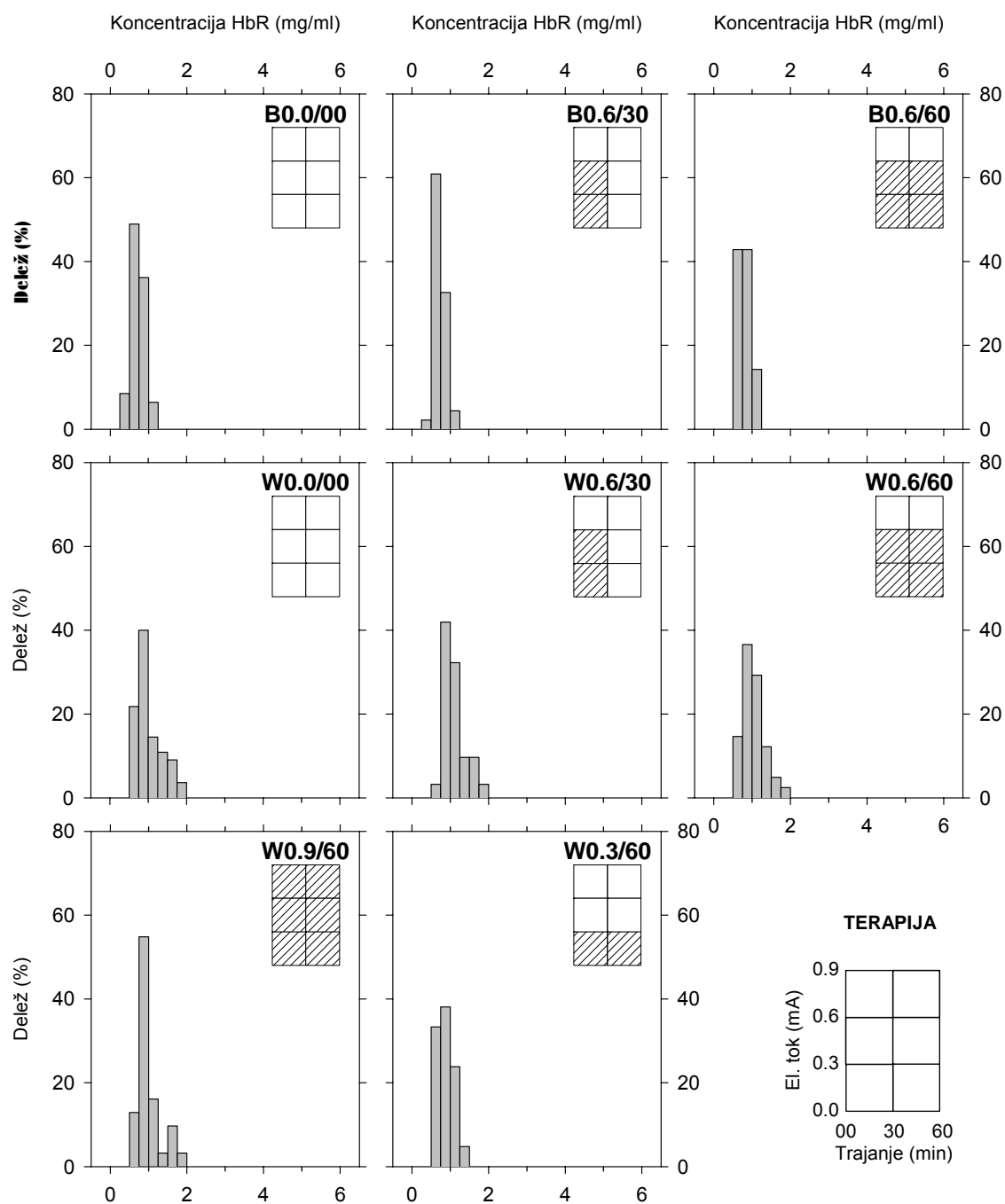
**Slika B.1.10:** Koncentracija skupnega hemoglobina (HbT) v stegenski mišici 4 ure po koncu DC-ET na tumorju. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.3.

## MIŠICA - HbO



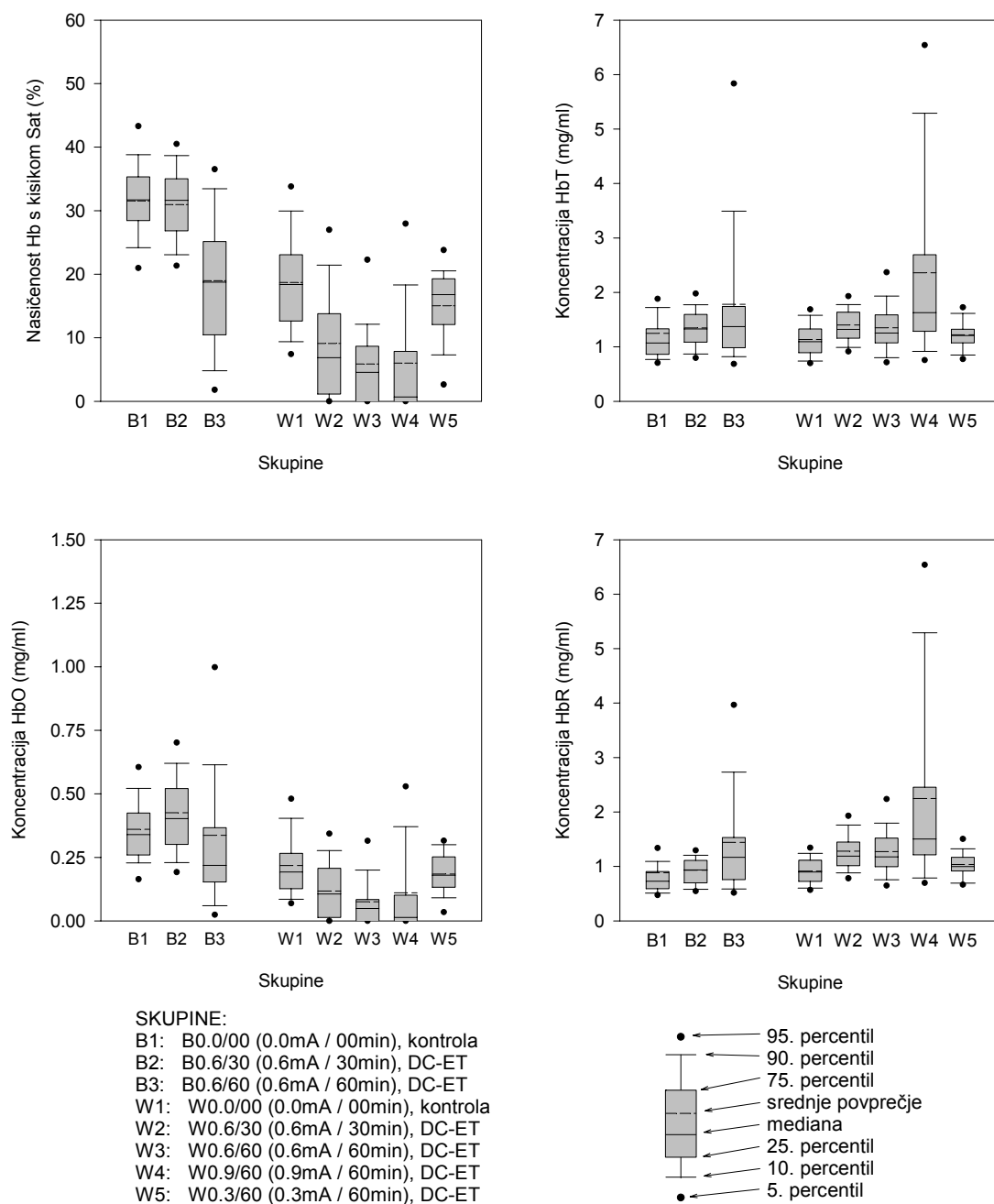
**Slika B.1.11:** Koncentracija oksigeniranega hemoglobina (HbO) v stegenski mišici 4 ure po koncu DC-ET na tumorju. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.3.

## MIŠICA - HbR



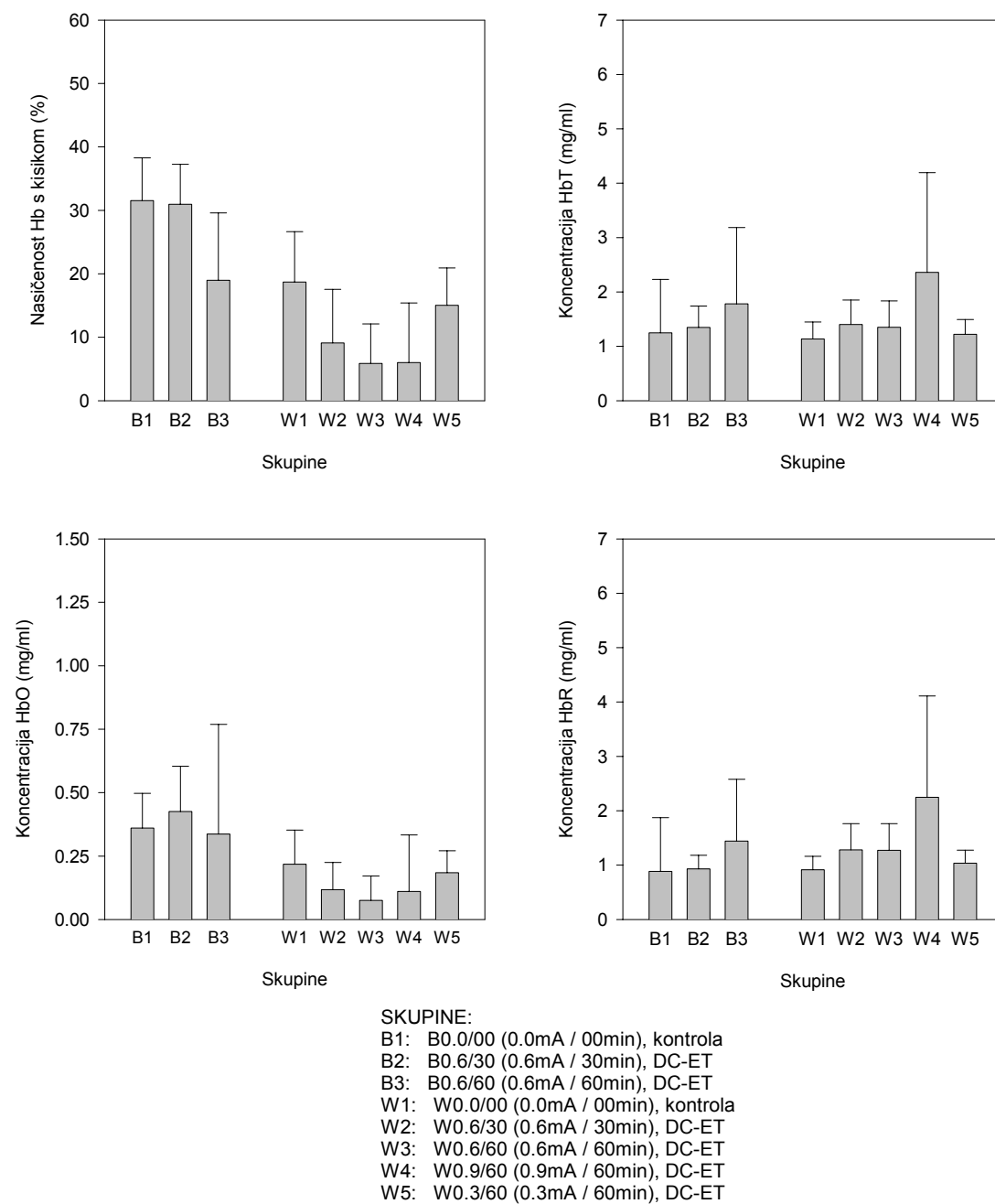
**Slika B.1.12:** Koncentracija deoksigeniranega hemoglobina (HbR) v stegenski mišici 4 ure po koncu DC-ET na tumorju. Prikazani so histogrami za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). "Doza" terapije (amplituda električnega toka in trajanje) je podana grafično. V histogramih so združene vse posamezne izmerjene vrednosti vseh živali v skupini. Pripadajoči kumulativni številčni podatki so zbrani v tabeli B.3.

## TUMOR



**Slika B.1.13:** Prikaz kumulativnih rezultatov, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) iz tabele B.1 za tumor 4 ure po koncu DC-ET. Prikazane so vrednosti nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J).

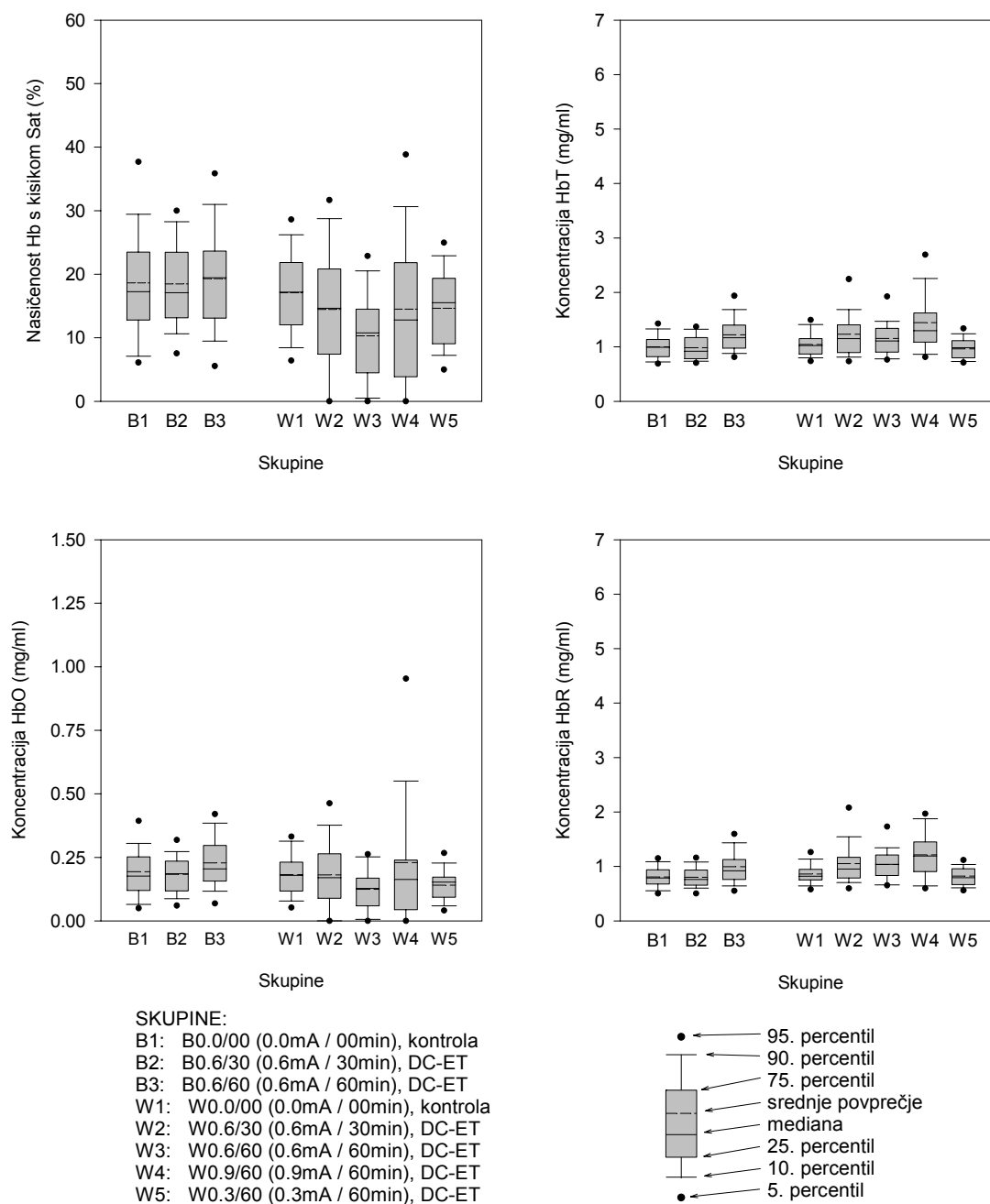
## TUMOR



**Slika B.1.14:** Prikaz rezultatov, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) iz tabele B.1 za tumor 4 ure po koncu DC-ET. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne deviacije nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J).

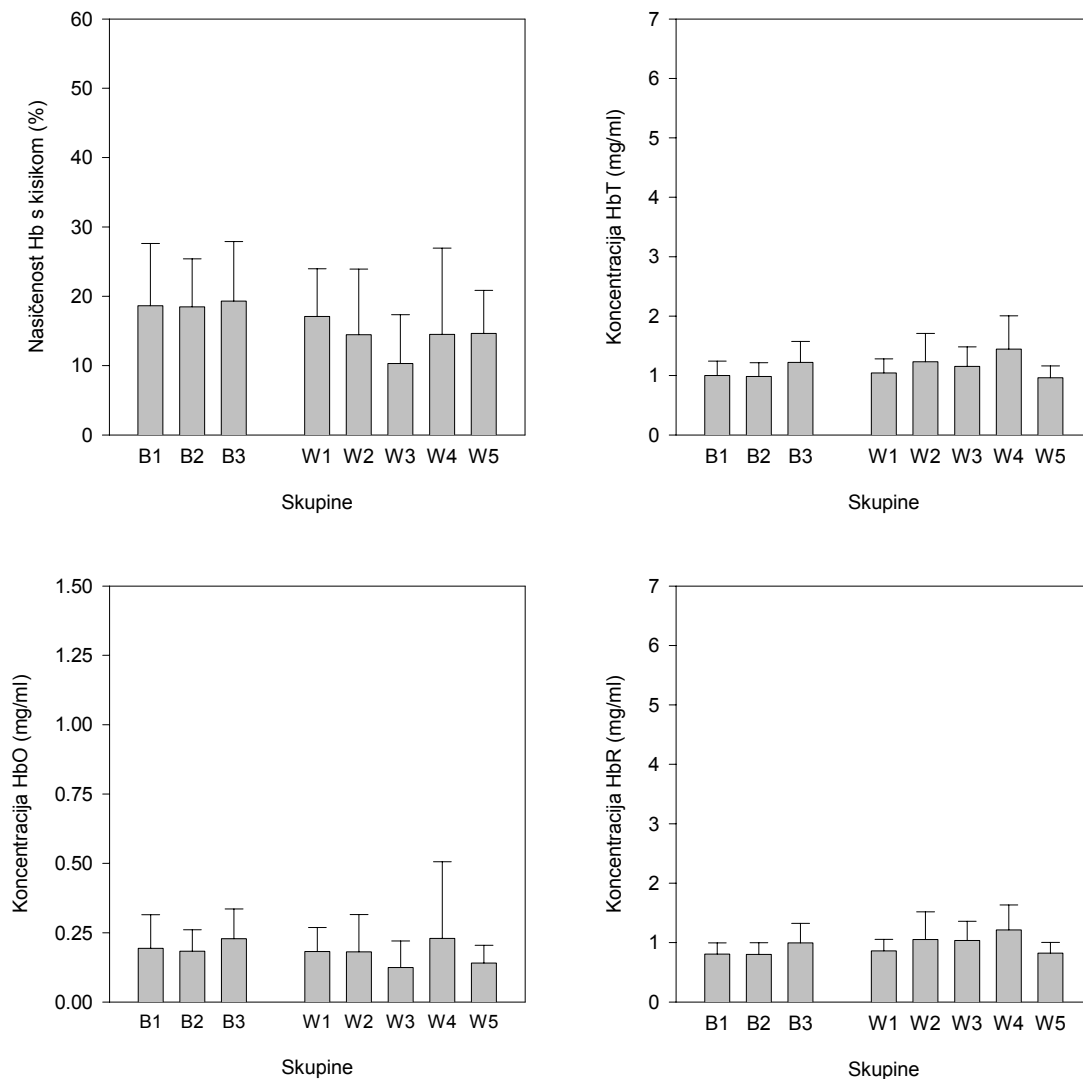


## OKOLICA TUMORJA



**Slika B.1.15:** Prikaz kumulativnih rezultatov, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) iz tabele B.2 za neposredno okolico tumorja 4 ure po koncu DC-ET. Prikazane so vrednosti nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J).

## OKOLICA TUMORJA

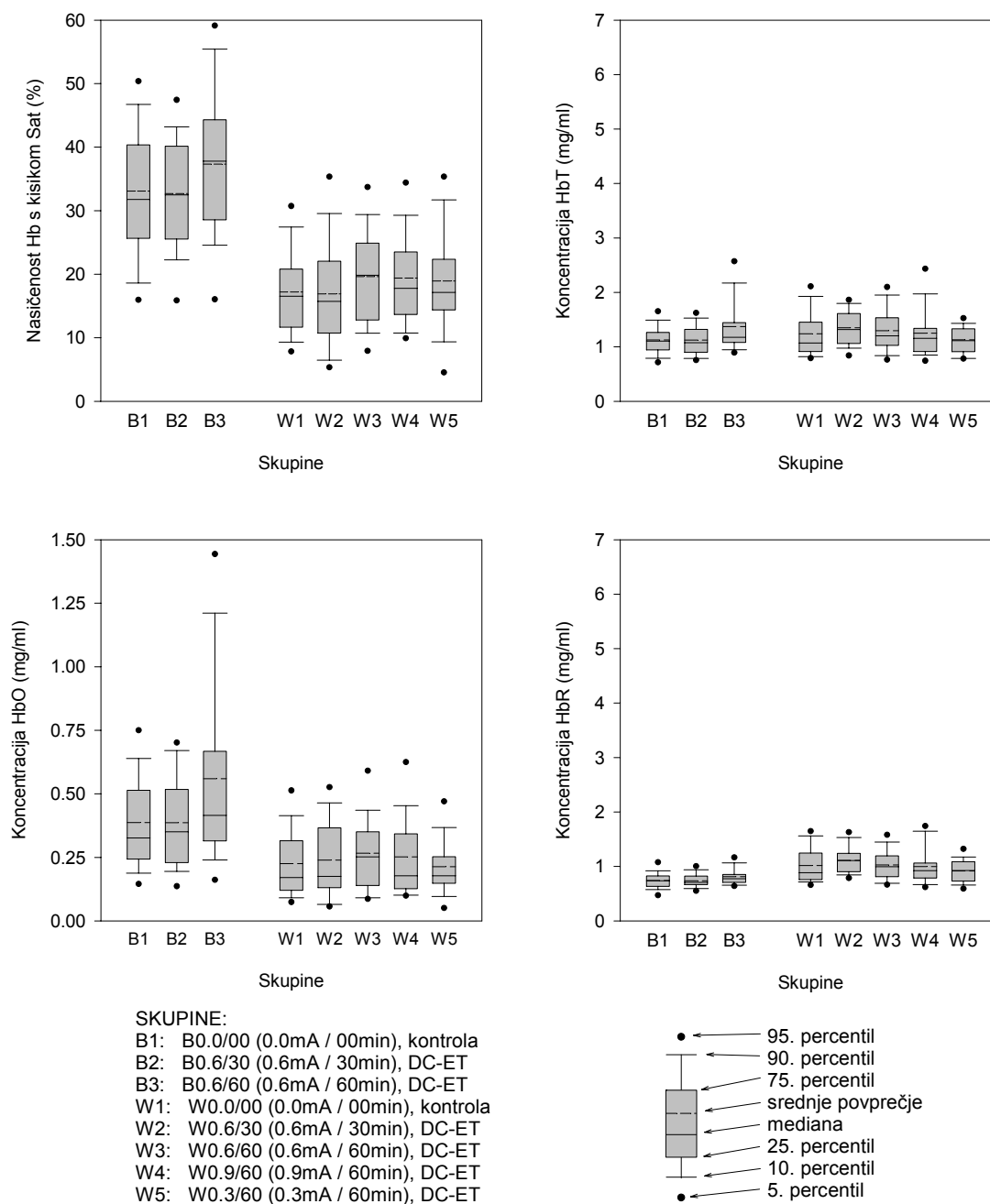


## SKUPINE:

- B1: B0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola  
 B2: B0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET  
 B3: B0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET  
 W1: W0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola  
 W2: W0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET  
 W3: W0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET  
 W4: W0.9/60 (0.9mA / 60min), DC-ET  
 W5: W0.3/60 (0.3mA / 60min), DC-ET

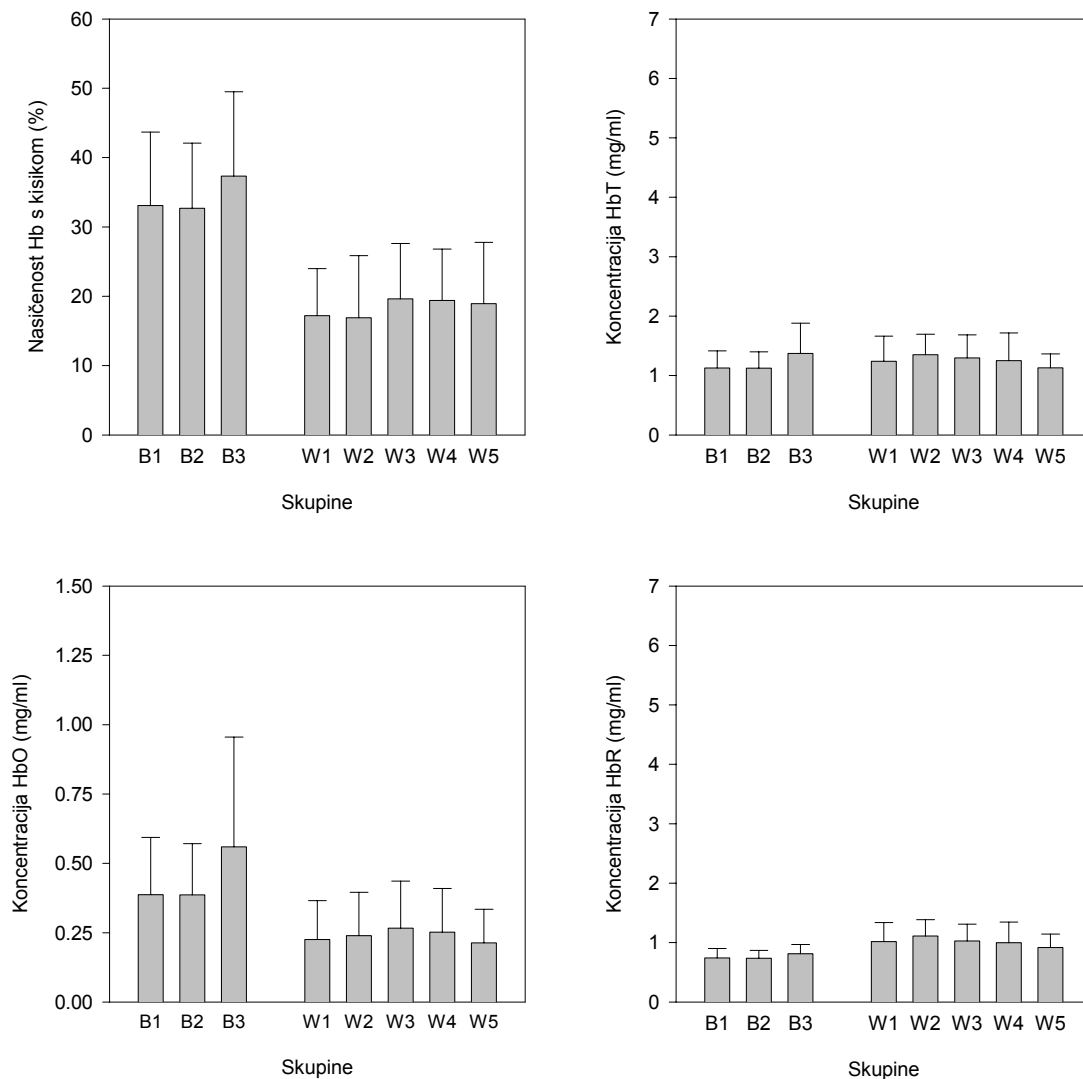
**Slika B.1.16:** Prikaz rezultatov, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) iz tabele B.2 za neposredno okolico tumorja 4 ure po koncu DC-ET. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne deviacije nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J).

## MIŠICA



**Slika B.1.17:** Prikaz kumulativnih rezultatov, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) iz tabele B.3 za stegensko mišico 4 ure po koncu DC-ET na tumorju. Prikaza so vrednosti nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J).

## MIŠICA

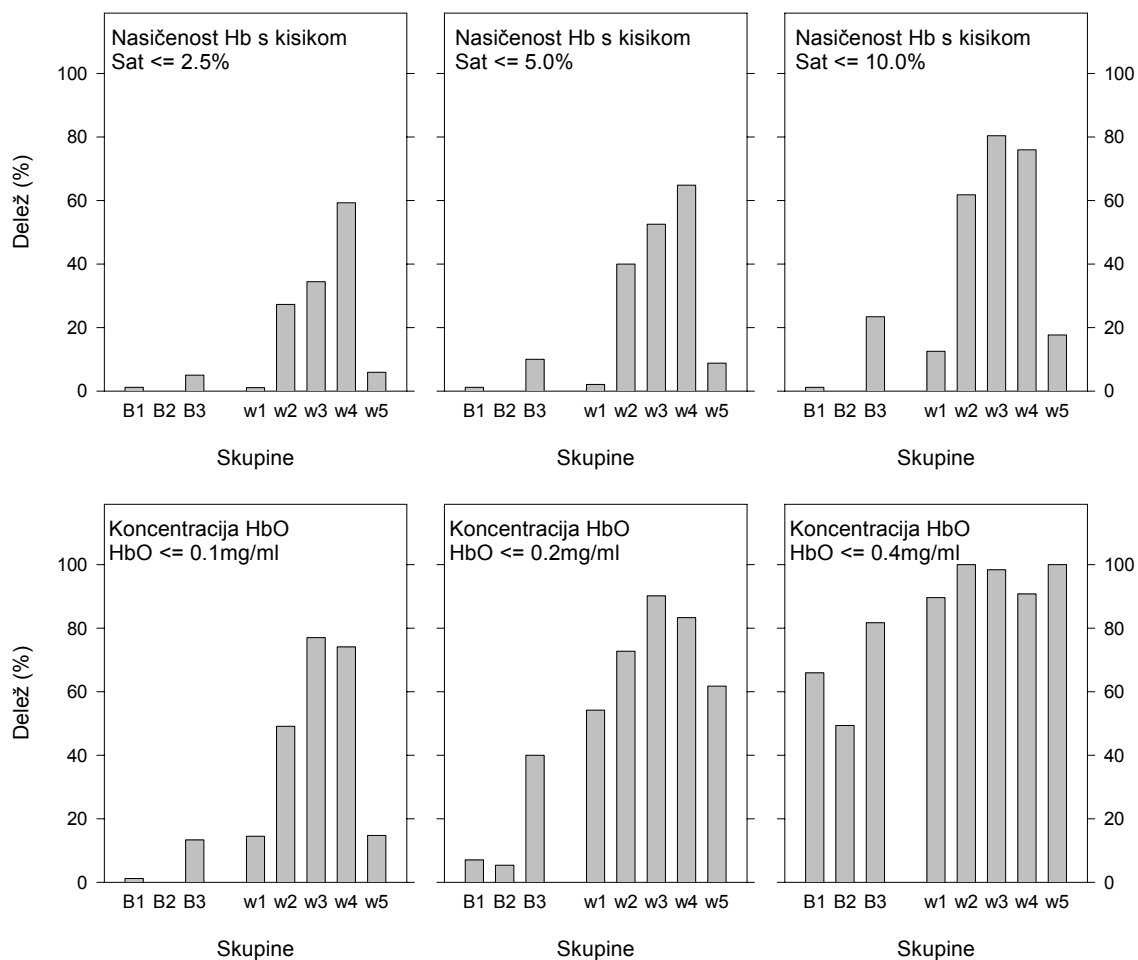


## SKUPINE:

- B1: B0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola  
 B2: B0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET  
 B3: B0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET  
 W1: W0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola  
 W2: W0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET  
 W3: W0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET  
 W4: W0.9/60 (0.9mA / 60min), DC-ET  
 W5: W0.3/60 (0.3mA / 60min), DC-ET

**Slika B.1.18:** Prikaz kumulativnih rezultatov, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) iz tabele B.3 za stegensko mišico 4 ure po koncu DC-ET na tumorju. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne deviacije nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J).

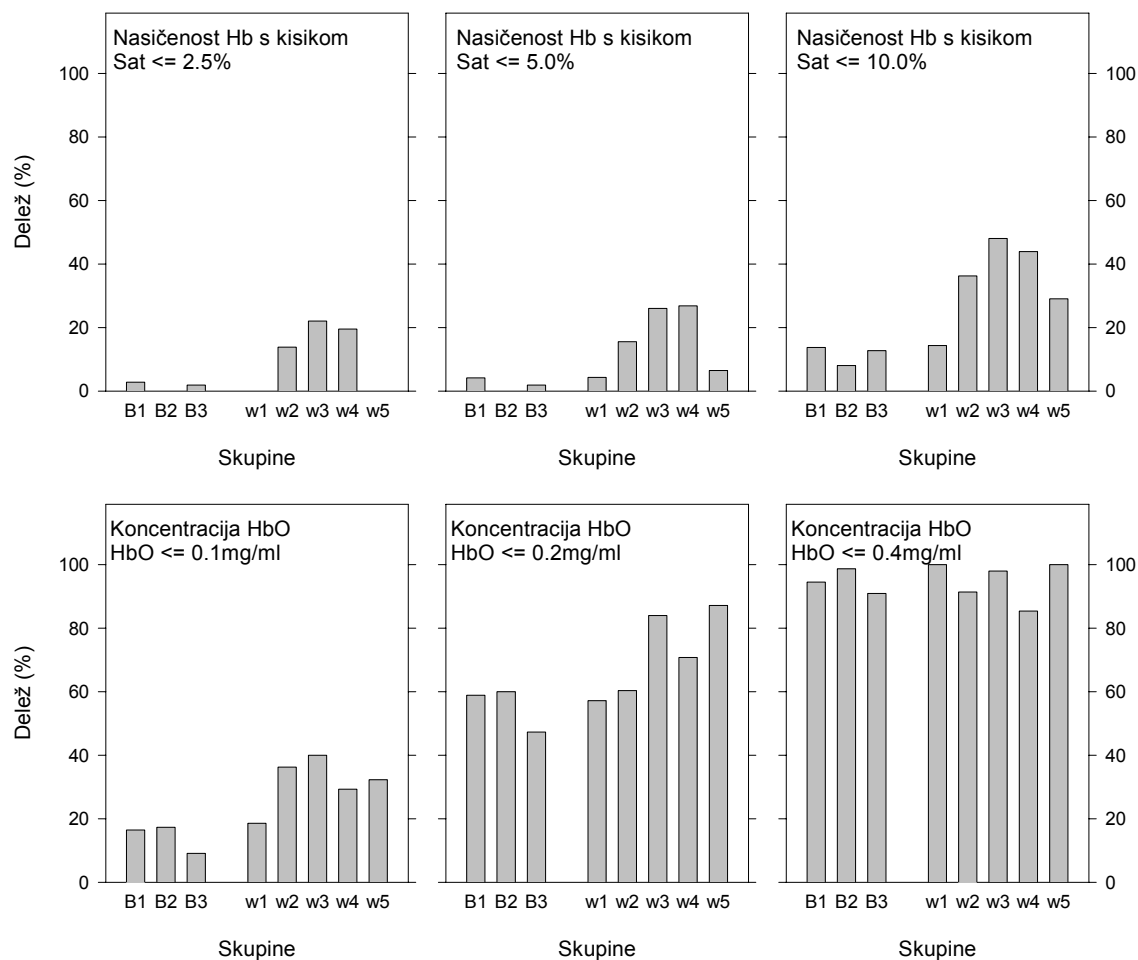
## TUMOR



Skupina	N	n	Sat: delež vrednosti (%)			HbO: delež vrednosti (%)		
			≤ 2,5 %	≤ 5,0 %	≤ 10,0 %	≤ 0,1 mg/ml	≤ 0,2 mg/ml	≤ 0,4 mg/ml
B1 = B0.0/00	8	85	1,18	1,18	1,18	1,18	7,06	65,88
B2 = B0.6/30	7	75	0,00	0,00	0,00	0,00	5,33	49,33
B3 = B0.6/60	6	60	5,00	10,00	23,34	13,33	40,00	81,67
W1 = W0.0/00	10	96	1,04	2,08	12,50	14,48	54,17	89,58
W2 = W0.6/30	5	55	27,27	40,00	61,82	49,09	72,73	100,00
W3 = W0.6/60	7	61	34,43	52,46	80,33	77,05	90,16	98,36
W4 = W0.9/60	6	54	59,26	64,82	75,93	74,07	83,33	90,74
W5 = W0.3/60	4	34	5,88	8,82	17,64	14,71	61,76	100,00

**Slika B.1.19, Tabela B.1.4:** Kumulativni deleži vrednosti nasičenosti hemoglobina s kisikom (Sat) in koncentracije oksigeniranega hemoglobina (HbO) do določene zgornje meje. Prikazane so vrednosti za tumor 4 ure po koncu DC-ET za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). N = število živali v skupini; n = skupno število merilnih mest na vseh živalih.

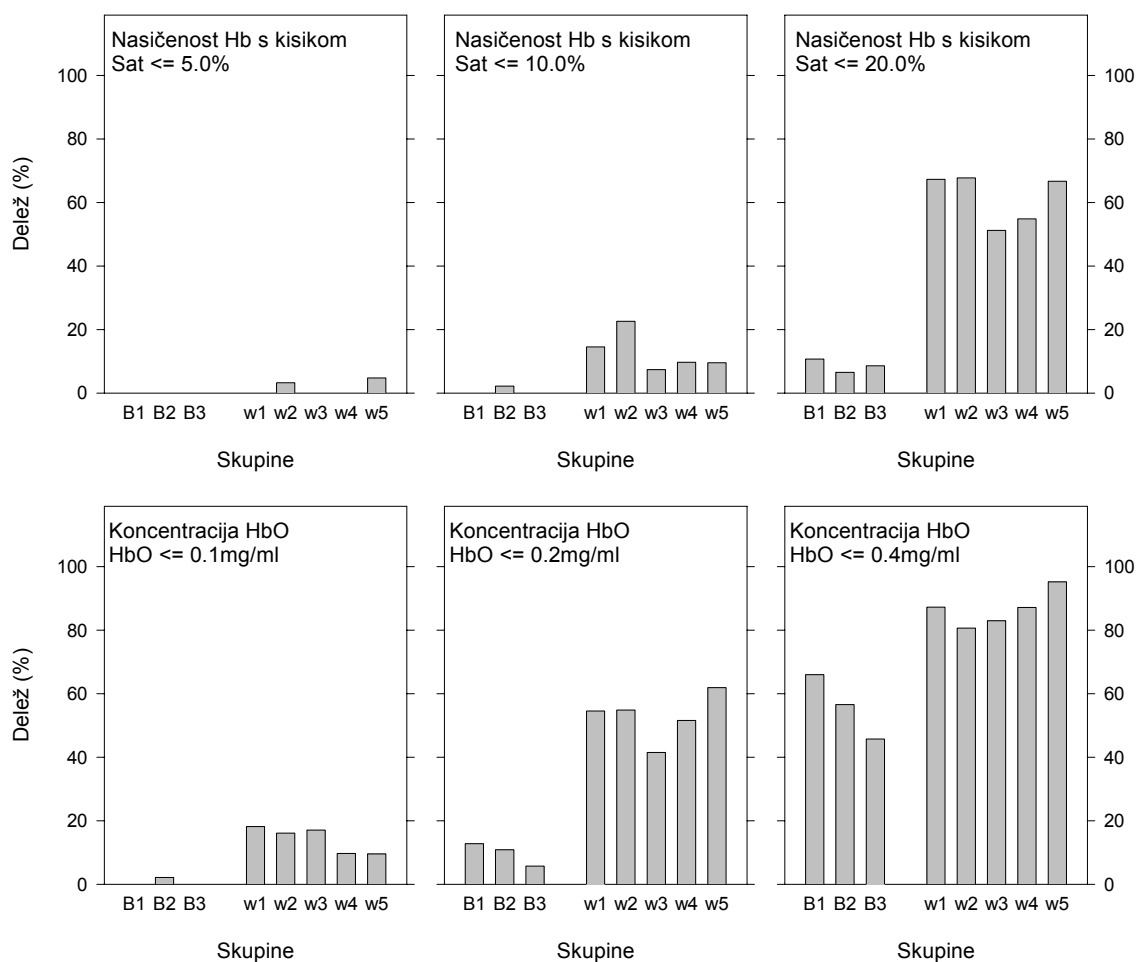
## OKOLICA TUMORJA



Skupina	N	n	Sat: delež vrednosti (%)			HbO: delež vrednosti (%)		
			<= 2,5 %	<= 5,0 %	<= 10,0 %	<= 0,1 mg/ml	<= 0,2 mg/ml	<= 0,4 mg/ml
B1 = B0.0/00	8	73	2,74	4,11	13,70	16,44	58,90	94,52
B2 = B0.6/30	7	75	0,00	0,00	8,00	17,33	60,00	98,67
B3 = B0.6/60	6	55	1,82	1,82	12,73	9,09	47,27	90,91
W1 = W0.0/00	10	70	0,00	4,29	14,29	18,57	57,14	100,00
W2 = W0.6/30	5	58	13,79	15,52	36,21	36,21	60,34	91,38
W3 = W0.6/60	7	50	22,00	26,00	48,00	40,00	84,00	98,00
W4 = W0.9/60	6	41	19,51	26,83	43,90	29,27	70,73	85,37
W5 = W0.3/60	4	31	0,00	6,45	29,03	32,26	87,10	100,00

**Slika B.1.20, Tabela B.1.5:** Kumulativni deleži vrednosti nasičenosti hemoglobina s kisikom (Sat) in koncentracije oksigeniranega hemoglobina (HbO) do določene zgornje meje. Prikazane so vrednosti za neposredno okolico tumorja 4 ure po koncu DC-ET za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). N = število živali v skupini; n = skupno število merilnih mest na vseh živalih.

## MIŠICA



Skupina	N	n	Sat: delež vrednosti (%)			HbO: delež vrednosti (%)		
			$\leq 5,0$ %	$\leq 10,0$ %	$\leq 20,0$ %	$\leq 0,1$ mg/ml	$\leq 0,2$ mg/ml	$\leq 0,4$ mg/ml
B1 = B0.0/00	8	47	0,00	0,00	10,64	0,00	12,77	65,96
B2 = B0.6/30	7	46	0,00	2,17	6,52	2,17	10,87	56,52
B3 = B0.6/60	6	35	0,00	0,00	8,57	0,00	5,71	45,71
W1 = W0.0/00	10	55	0,00	14,55	67,27	18,18	54,55	87,27
W2 = W0.6/30	5	31	3,23	22,58	67,74	16,13	54,84	80,65
W3 = W0.6/60	7	41	0,00	7,32	51,22	17,07	41,46	82,93
W4 = W0.9/60	6	31	0,00	9,68	54,84	9,68	51,61	87,10
W5 = W0.3/60	4	21	4,76	9,52	66,67	9,52	61,90	95,24

**Slika B.1.21, Tabela B.1.6:** Kumulativni deleži vrednosti nasičenosti hemoglobina s kisikom (Sat) in koncentracije oksigeniranega hemoglobina (HbO) do določene zgornje meje. Prikazane so vrednosti za stegensko mišico 4 ure po koncu DC-ET na tumorju za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). N = število živali v skupini; n = skupno število merilnih mest na vseh živalih.





## DODATEK B.2

*Metoda **NIRS** (inštrument **OS30**)*

*Tumor **LPB** na miših **C57Bl/6***

*Tumor **Sa-1** na miših **A/J***

***Raztros** srednjih vrednosti posameznih živali*

Tu so zbrane srednje vrednosti za **posamezne** živali; rezultati za **tumor**, **okolico tumorja** in **mišico** v vseh eksperimentalnih skupinah obeh tumorskih modelov. Izračunana so **povprečja** in **mediane** meritev na posamezni živali. Rezultati so predstavljeni kot raztrosi (scattergram) po eksperimentalnih skupinah.

TUMOR: nasičenost hemoglobina s kisikom Sat(%)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>31,6</b>	2,7	1,0	<b>32,7</b>	26,8	34,4
B0.6/30	7	<b>31,2</b>	4,6	1,7	<b>31,1</b>	25,5	38,7
B0.6/60	6	<b>18,4</b>	8,5	3,5	<b>19,3</b>	6,3	28,8
W0.0/00	10	<b>19,0</b>	3,9	1,2	<b>18,1</b>	12,7	23,7
W0.6/30	5	<b>9,1</b>	6,6	3,0	<b>9,1</b>	0,0	18,5
W0.6/60	7	<b>6,1</b>	5,7	2,1	<b>5,5</b>	0,0	17,2
W0.9/60	6	<b>6,1</b>	6,1	2,5	<b>4,3</b>	0,0	16,4
W0.3/60	4	<b>15,1</b>	2,3	1,2	<b>14,2</b>	13,5	18,6

TUMOR: koncentracija skupnega hemoglobina HbT(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>1,25</b>	0,23	0,08	<b>1,25</b>	0,98	1,72
B0.6/30	7	<b>1,32</b>	0,27	0,10	<b>1,29</b>	0,93	1,70
B0.6/60	6	<b>1,84</b>	1,36	0,56	<b>1,42</b>	0,85	4,57
W0.0/00	10	<b>1,13</b>	0,19	0,06	<b>1,12</b>	0,88	1,50
W0.6/30	5	<b>1,42</b>	0,29	0,13	<b>1,36</b>	1,19	1,91
W0.6/60	7	<b>1,35</b>	0,28	0,11	<b>1,26</b>	1,00	1,81
W0.9/60	6	<b>2,26</b>	1,74	0,71	<b>1,68</b>	0,94	5,70
W0.3/60	4	<b>1,21</b>	0,17	0,09	<b>1,24</b>	0,97	1,38

TUMOR: koncentracija oksigeniranega hemoglobina HbO(mg/ml)

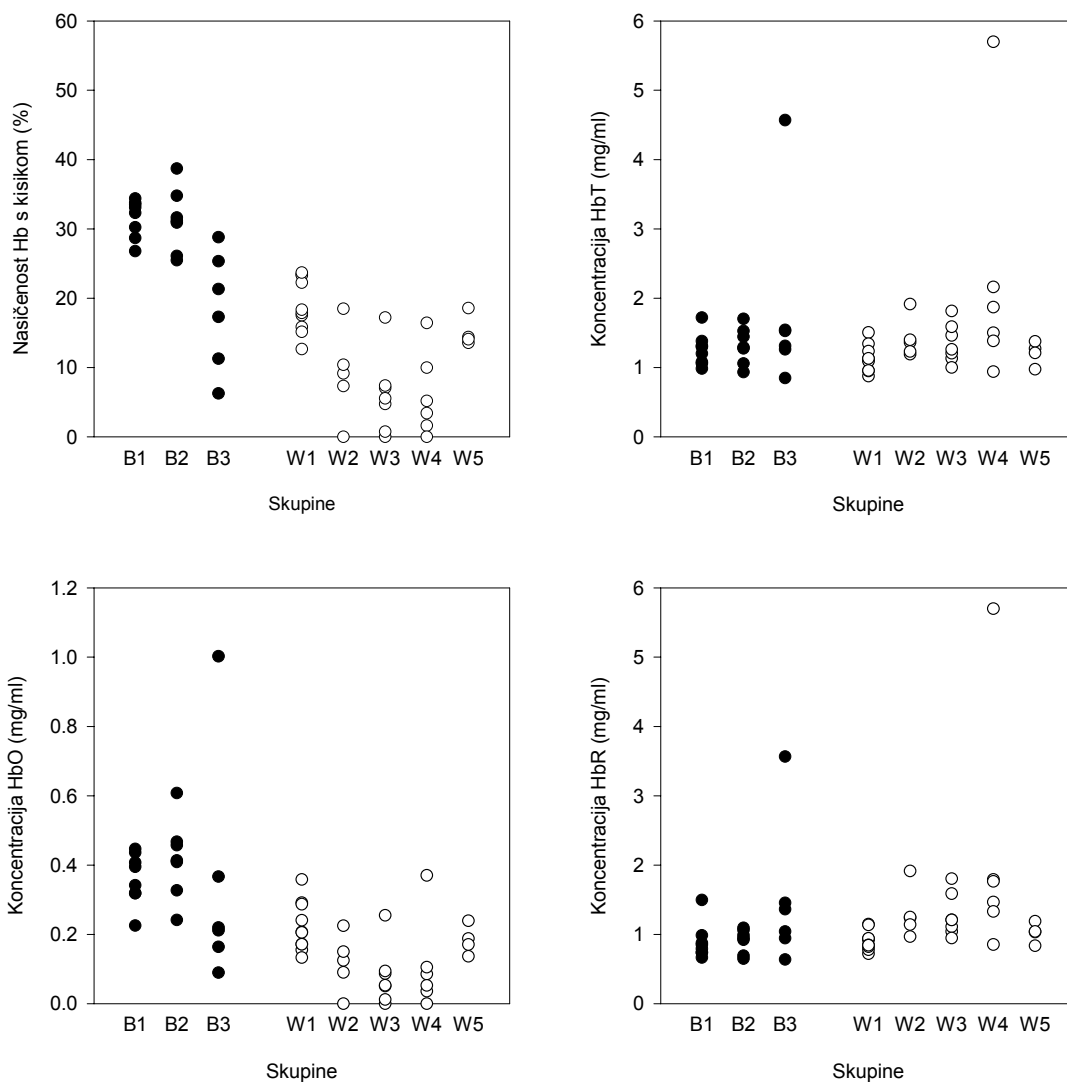
Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,36</b>	0,07	0,03	<b>0,37</b>	0,23	0,45
B0.6/30	7	<b>0,42</b>	0,12	0,04	<b>0,41</b>	0,24	0,61
B0.6/60	6	<b>0,34</b>	0,34	0,14	<b>0,22</b>	0,09	1,00
W0.0/00	10	<b>0,22</b>	0,07	0,02	<b>0,21</b>	0,13	0,36
W0.6/30	5	<b>0,12</b>	0,08	0,04	<b>0,12</b>	0,00	0,23
W0.6/60	7	<b>0,08</b>	0,09	0,03	<b>0,05</b>	0,00	0,26
W0.9/60	6	<b>0,11</b>	0,13	0,06	<b>0,07</b>	0,00	0,37
W0.3/60	4	<b>0,18</b>	0,04	0,02	<b>0,18</b>	0,14	0,24

TUMOR: koncentracija deoksigeniranega hemoglobina HbR(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,89</b>	0,26	0,09	<b>0,82</b>	0,67	1,50
B0.6/30	7	<b>0,91</b>	0,17	0,07	<b>0,95</b>	0,65	1,09
B0.6/60	6	<b>1,50</b>	1,05	0,43	<b>1,20</b>	0,64	3,57
W0.0/00	10	<b>0,91</b>	0,14	0,04	<b>0,88</b>	0,72	1,15
W0.6/30	5	<b>1,30</b>	0,36	0,16	<b>1,24</b>	0,97	1,91
W0.6/60	7	<b>1,27</b>	0,31	0,12	<b>1,21</b>	0,95	1,80
W0.9/60	6	<b>2,15</b>	1,77	0,72	<b>1,61</b>	0,85	5,70
W0.3/60	4	<b>1,02</b>	0,14	0,07	<b>1,04</b>	0,84	1,19

**Tabela B.2.1:** Kumulativni rezultati, izračunani iz **povprečnih vrednosti** meritev na tumorjih posameznih živali 4 ure po koncu DC-ET (Metoda NIRS, inštrument OS 30). N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost.

## TUMOR (povprečja)



## SKUPINE:

- B1: B0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola
- B2: B0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET
- B3: B0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET
- W1: W0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola
- W2: W0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET
- W3: W0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET
- W4: W0.9/60 (0.9mA / 60min), DC-ET
- W5: W0.3/60 (0.3mA / 60min), DC-ET

**Slika B.2.1:** Prikaz raztrosa povprečij rezultatov za posamezne živali, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) za tumor 4 ure po koncu DC-ET. Prikazane so vrednosti nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). Kumulativni rezultati so v tabeli B.7.

TUMOR: nasičenost hemoglobina s kisikom Sat(%)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>32,1</b>	2,3	0,8	<b>32,0</b>	29,6	35,1
B0.6/30	7	<b>31,9</b>	4,4	1,7	<b>31,7</b>	26,3	38,7
B0.6/60	6	<b>17,7</b>	10,1	4,1	<b>18,3</b>	3,6	32,1
W0.0/00	10	<b>18,8</b>	5,9	1,9	<b>19,1</b>	10,6	27,7
W0.6/30	5	<b>9,3</b>	7,8	3,5	<b>9,2</b>	0,0	21,3
W0.6/60	7	<b>5,6</b>	5,9	2,2	<b>4,5</b>	0,0	17,4
W0.9/60	6	<b>4,7</b>	6,3	2,6	<b>1,4</b>	0,0	14,7
W0.3/60	4	<b>15,9</b>	2,3	1,1	<b>15,4</b>	13,7	19,0

TUMOR: koncentracija skupnega hemoglobina HbT(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>1,1</b>	0,19	0,07	<b>1,11</b>	0,84	1,33
B0.6/30	7	<b>1,28</b>	0,26	0,10	<b>1,23</b>	0,91	1,60
B0.6/60	6	<b>1,74</b>	1,08	0,44	<b>1,47</b>	0,82	3,87
W0.0/00	10	<b>1,13</b>	0,21	0,07	<b>1,06</b>	0,88	1,57
W0.6/30	5	<b>1,37</b>	0,24	0,11	<b>1,34</b>	1,16	1,77
W0.6/60	7	<b>1,25</b>	0,23	0,09	<b>1,23</b>	0,98	1,59
W0.9/60	6	<b>2,10</b>	1,63	0,67	<b>1,52</b>	0,85	5,33
W0.3/60	4	<b>1,16</b>	0,17	0,09	<b>1,21</b>	0,92	1,32

TUMOR: koncentracija oksigeniranega hemoglobina HbO(mg/ml)

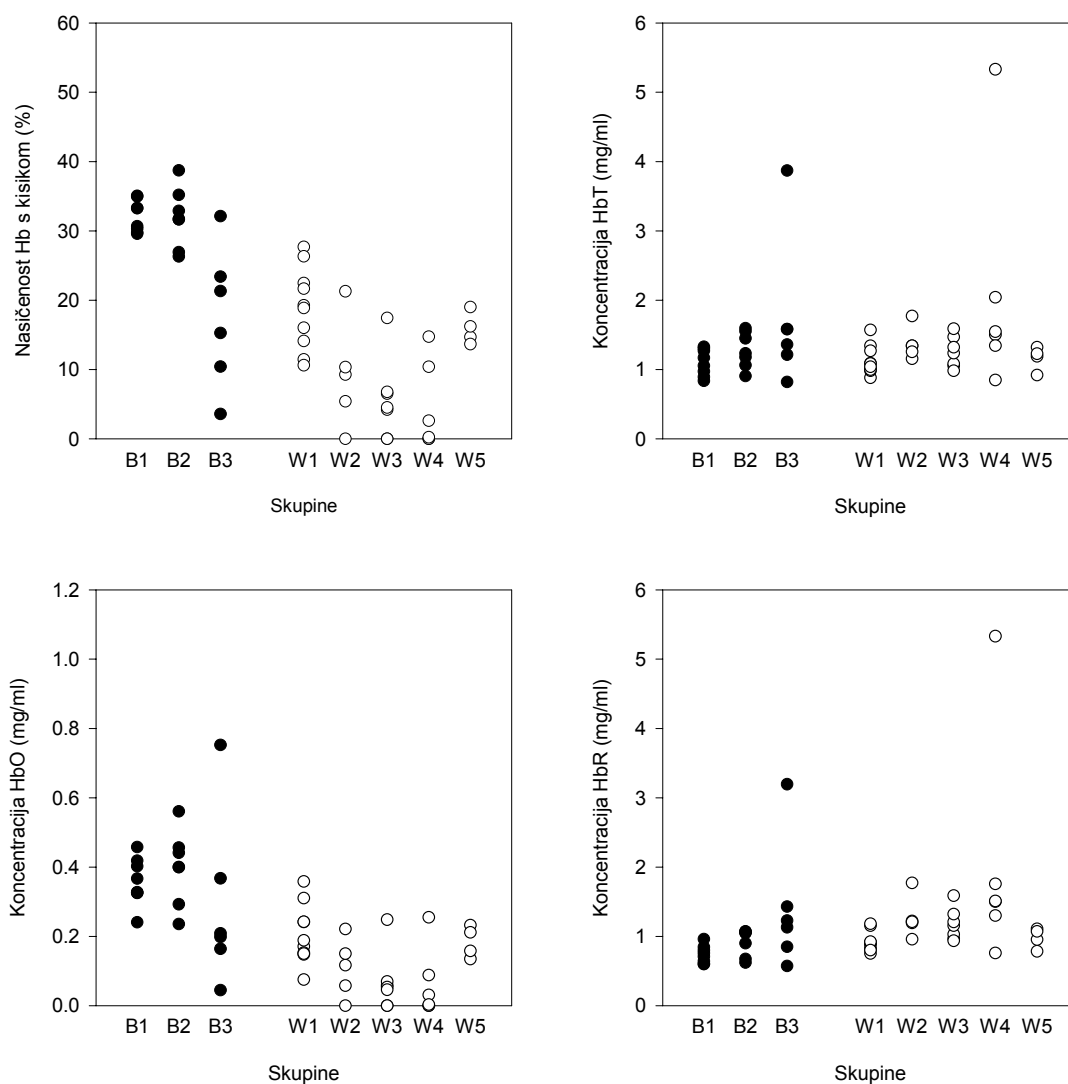
Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,36</b>	0,07	0,02	<b>0,35</b>	0,24	0,46
B0.6/30	7	<b>0,40</b>	0,11	0,04	<b>0,40</b>	0,24	0,56
B0.6/60	6	<b>0,29</b>	0,25	0,10	<b>0,20</b>	0,05	0,75
W0.0/00	10	<b>0,20</b>	0,09	0,03	<b>0,18</b>	0,08	0,36
W0.6/30	5	<b>0,11</b>	0,09	0,04	<b>0,12</b>	0,00	0,22
W0.6/60	7	<b>0,07</b>	0,08	0,03	<b>0,05</b>	0,00	0,25
W0.9/60	6	<b>0,06</b>	0,10	0,04	<b>0,02</b>	0,00	0,26
W0.3/60	4	<b>0,18</b>	0,05	0,02	<b>0,19</b>	0,14	0,23

TUMOR: koncentracija deoksigeniranega hemoglobina HbR(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,74</b>	0,13	0,05	<b>0,73</b>	0,60	0,96
B0.6/30	7	<b>0,92</b>	0,20	0,07	<b>1,05</b>	0,62	1,07
B0.6/60	6	<b>1,40</b>	0,93	0,38	<b>1,18</b>	0,57	3,19
W0.0/00	10	<b>0,91</b>	0,15	0,05	<b>0,89</b>	0,75	1,18
W0.6/30	5	<b>1,27</b>	0,30	0,13	<b>1,21</b>	0,96	1,77
W0.6/60	7	<b>1,17</b>	0,23	0,09	<b>1,16</b>	0,94	1,59
W0.9/60	6	<b>2,03</b>	1,65	0,68	<b>1,51</b>	0,76	5,33
W0.3/60	4	<b>0,98</b>	0,15	0,07	<b>1,01</b>	0,78	1,11

**Tabela B.2.2:** Kumulativni rezultati, izračunani iz **median** meritev na tumorjih posameznih živali 4 ure po koncu DC-ET (Metoda NIRS, inštrument OS 30). N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost.

## TUMOR (mediane)



## SKUPINE:

- B1: B0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola
- B2: B0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET
- B3: B0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET
- W1: W0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola
- W2: W0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET
- W3: W0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET
- W4: W0.9/60 (0.9mA / 60min), DC-ET
- W5: W0.3/60 (0.3mA / 60min), DC-ET

**Slika B.2.2:** Prikaz raztrosa median rezultatov za posamezne živali, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) za tumor 4 ure po koncu DC-ET. Prikazane so vrednosti nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). Kumulativni rezultati so v tabeli B.8.

OKOLICA TUMORJA: nasičenost hemoglobina s kisikom Sat(%)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>18,3</b>	4,4	1,6	<b>18,2</b>	12,9	27,4
B0.6/30	7	<b>18,4</b>	1,9	0,7	<b>18,0</b>	15,5	21,0
B0.6/60	6	<b>19,1</b>	4,4	1,8	<b>20,6</b>	12,4	23,7
W0.0/00	10	<b>17,3</b>	4,5	1,4	<b>16,6</b>	11,3	25,7
W0.6/30	5	<b>14,6</b>	5,6	2,5	<b>14,5</b>	6,8	21,8
W0.6/60	7	<b>10,1</b>	5,6	2,1	<b>9,2</b>	3,5	17,9
W0.9/60	6	<b>13,4</b>	8,3	3,4	<b>13,5</b>	3,4	27,4
W0.3/60	4	<b>14,6</b>	1,7	0,9	<b>15,3</b>	12,1	15,8

OKOLICA TUMORJA: koncentracija skupnega hemoglobina HbT(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>1,00</b>	0,08	0,03	<b>0,98</b>	0,90	1,12
B0.6/30	7	<b>0,98</b>	0,11	0,04	<b>0,98</b>	0,80	1,10
B0.6/60	6	<b>1,23</b>	0,15	0,06	<b>1,19</b>	1,05	1,41
W0.0/00	10	<b>1,03</b>	0,06	0,02	<b>1,00</b>	0,97	1,15
W0.6/30	5	<b>1,22</b>	0,19	0,08	<b>1,14</b>	1,03	1,47
W0.6/60	7	<b>1,11</b>	0,24	0,09	<b>1,09</b>	0,78	1,47
W0.9/60	6	<b>1,42</b>	0,23	0,09	<b>1,45</b>	1,07	1,71
W0.3/60	4	<b>0,96</b>	0,03	0,02	<b>0,96</b>	0,94	1,01

OKOLICA TUMORJA: koncentracija oksigeniranega hemoglobina HbO(mg/ml)

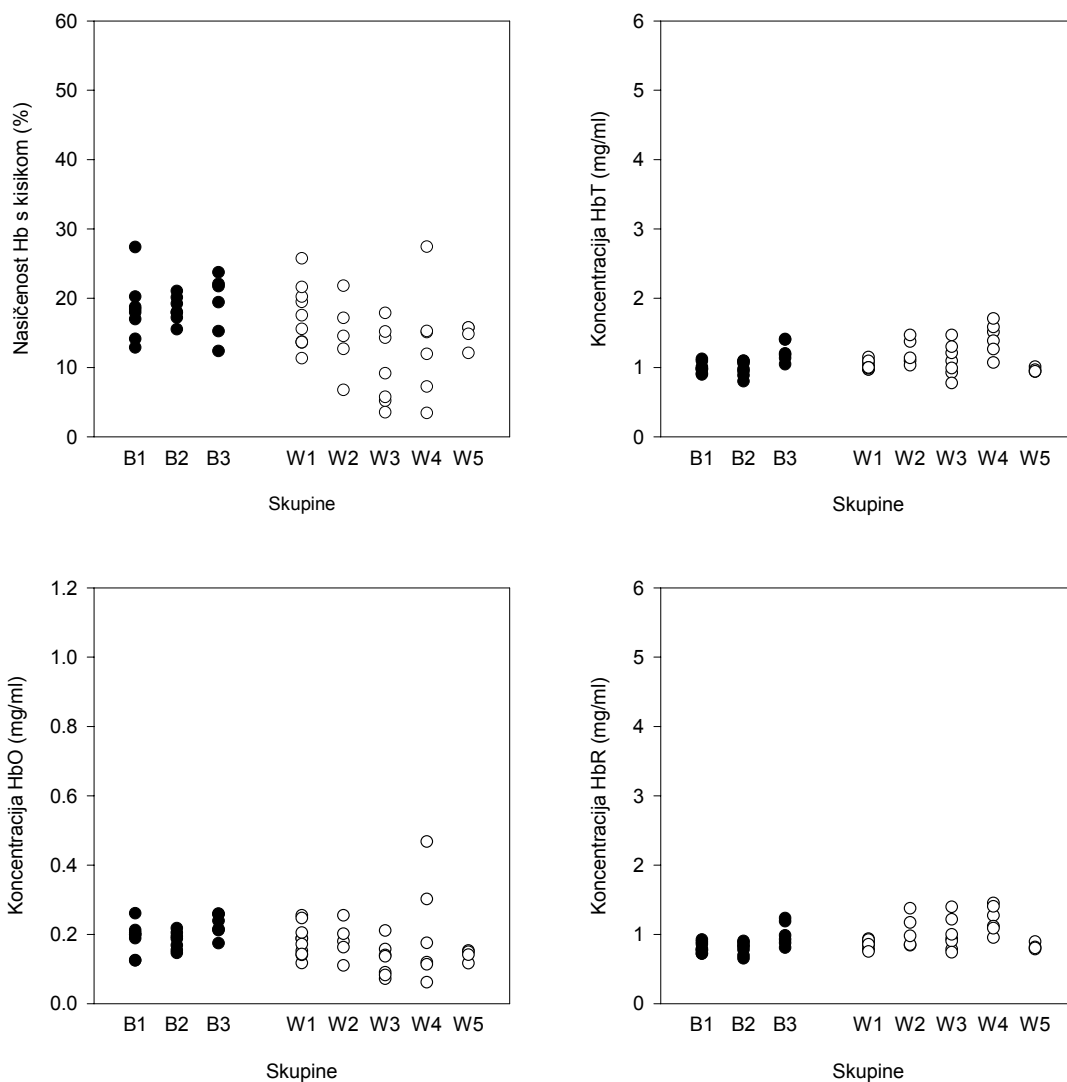
Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,19</b>	0,05	0,02	<b>0,20</b>	0,12	0,26
B0.6/30	7	<b>0,18</b>	0,03	0,01	<b>0,19</b>	0,15	0,22
B0.6/60	6	<b>0,23</b>	0,03	0,01	<b>0,23</b>	0,17	0,26
W0.0/00	10	<b>0,18</b>	0,05	0,01	<b>0,18</b>	0,12	0,26
W0.6/30	5	<b>0,18</b>	0,05	0,02	<b>0,18</b>	0,11	0,25
W0.6/60	7	<b>0,13</b>	0,05	0,02	<b>0,14</b>	0,07	0,21
W0.9/60	6	<b>0,21</b>	0,15	0,06	<b>0,15</b>	0,06	0,47
W0.3/60	4	<b>0,14</b>	0,02	0,01	<b>0,15</b>	0,12	0,15

OKOLICA TUMORJA: koncentracija deoksigeniranega hemoglobina HbR(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,81</b>	0,08	0,03	<b>0,78</b>	0,72	0,92
B0.6/30	7	<b>0,80</b>	0,09	0,04	<b>0,82</b>	0,65	0,91
B0.6/60	6	<b>1,00</b>	0,17	0,07	<b>0,96</b>	0,81	1,23
W0.0/00	10	<b>0,85</b>	0,06	0,02	<b>0,86</b>	0,75	0,94
W0.6/30	5	<b>1,04</b>	0,23	0,10	<b>0,98</b>	0,84	1,38
W0.6/60	7	<b>1,00</b>	0,24	0,09	<b>0,94</b>	0,74	1,40
W0.9/60	6	<b>1,21</b>	0,20	0,08	<b>1,19</b>	0,95	1,45
W0.3/60	4	<b>0,82</b>	0,05	0,02	<b>0,81</b>	0,79	0,89

**Tabela B.2.3:** Kumulativni rezultati, izračunani iz **povprečnih vrednosti** meritev v neposredni okolici tumorjev posameznih živali 4 ure po koncu DC-ET (Metoda NIRS, inštrument OS 30). N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost.

## OKOLICA TUMORJA (povprečja)



## SKUPINE:

- B1: B0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola
- B2: B0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET
- B3: B0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET
- W1: W0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola
- W2: W0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET
- W3: W0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET
- W4: W0.9/60 (0.9mA / 60min), DC-ET
- W5: W0.3/60 (0.3mA / 60min), DC-ET

**Slika B.2.3:** Prikaz raztrosa **povprečij** rezultatov za posamezne živali, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) za neposredno okolico tumorja 4 ure po koncu DC-ET. Prikazane so vrednosti nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). Kumulativni rezultati so v tabeli B.9.

OKOLICA TUMORJA: nasičenost hemoglobina s kisikom Sat(%)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>18,0</b>	4,5	1,6	<b>16,9</b>	13,2	27,7
B0.6/30	7	<b>17,5</b>	2,3	0,9	<b>17,3</b>	14,1	21,1
B0.6/60	6	<b>18,5</b>	3,7	1,5	<b>19,6</b>	12,0	23,1
W0.0/00	10	<b>17,0</b>	4,8	1,5	<b>16,0</b>	10,5	27,0
W0.6/30	5	<b>12,8</b>	7,3	3,3	<b>14,8</b>	1,2	20,9
W0.6/60	7	<b>9,1</b>	6,6	2,5	<b>6,7</b>	2,1	19,6
W0.9/60	6	<b>11,1</b>	9,5	3,9	<b>10,7</b>	1,3	27,5
W0.3/60	4	<b>15,5</b>	1,6	0,8	<b>15,8</b>	13,3	17,2

OKOLICA TUMORJA: koncentracija skupnega hemoglobina HbT(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,96</b>	0,09	0,03	<b>1,00</b>	0,82	1,06
B0.6/30	7	<b>0,96</b>	0,15	0,06	<b>0,94</b>	0,80	1,15
B0.6/60	6	<b>1,16</b>	0,17	0,07	<b>1,10</b>	0,98	1,43
W0.0/00	10	<b>1,00</b>	0,07	0,02	<b>1,01</b>	0,88	1,11
W0.6/30	5	<b>1,17</b>	0,16	0,07	<b>1,21</b>	0,99	1,38
W0.6/60	7	<b>1,09</b>	0,21	0,08	<b>1,09</b>	0,81	1,42
W0.9/60	6	<b>1,29</b>	0,13	0,05	<b>1,32</b>	1,07	1,45
W0.3/60	4	<b>0,96</b>	0,10	0,05	<b>0,98</b>	0,83	1,05

OKOLICA TUMORJA: koncentracija oksigeniranega hemoglobina HbO(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,18</b>	0,06	0,02	<b>0,18</b>	0,12	0,28
B0.6/30	7	<b>0,17</b>	0,03	0,01	<b>0,19</b>	0,13	0,20
B0.6/60	6	<b>0,20</b>	0,03	0,01	<b>0,21</b>	0,15	0,23
W0.0/00	10	<b>0,18</b>	0,05	0,02	<b>0,16</b>	0,11	0,27
W0.6/30	5	<b>0,15</b>	0,07	0,03	<b>0,17</b>	0,04	0,21
W0.6/60	7	<b>0,10</b>	0,06	0,02	<b>0,09</b>	0,04	0,19
W0.9/60	6	<b>0,15</b>	0,13	0,05	<b>0,14</b>	0,02	0,39
W0.3/60	4	<b>0,15</b>	0,02	0,01	<b>0,15</b>	0,12	0,17

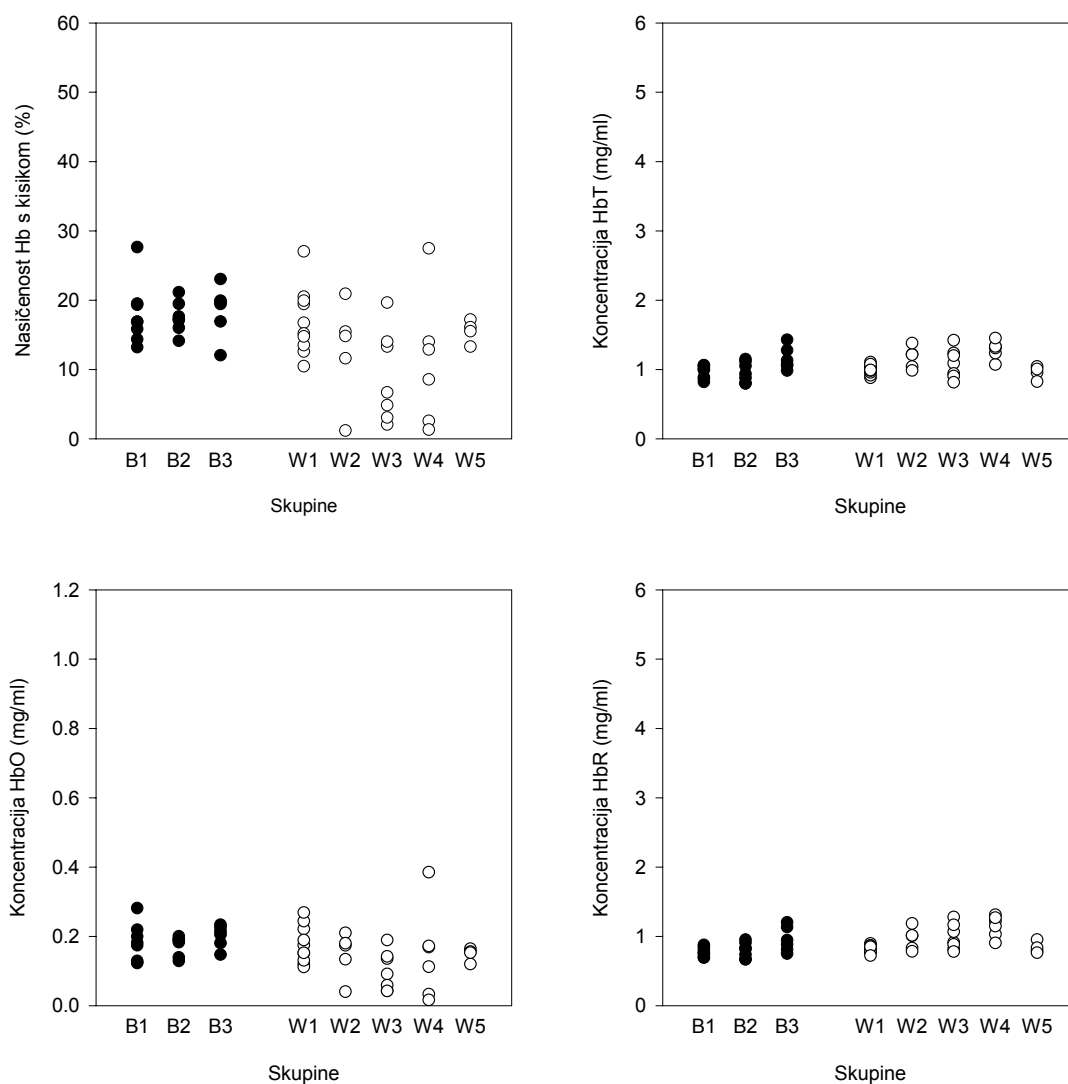
OKOLICA TUMORJA: koncentracija deoksigeniranega hemoglobina HbR(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,78</b>	0,07	0,03	<b>0,77</b>	0,69	0,88
B0.6/30	7	<b>0,80</b>	0,11	0,04	<b>0,82</b>	0,67	0,95
B0.6/60	6	<b>0,95</b>	0,18	0,07	<b>0,91</b>	0,75	1,20
W0.0/00	10	<b>0,82</b>	0,06	0,02	<b>0,84</b>	0,72	0,90
W0.6/30	5	<b>0,96</b>	0,16	0,07	<b>1,01</b>	0,78	1,19
W0.6/60	7	<b>0,99</b>	0,19	0,07	<b>0,91</b>	0,78	1,28
W0.9/60	6	<b>1,15</b>	0,15	0,06	<b>1,18</b>	0,91	1,31
W0.3/60	4	<b>0,84</b>	0,08	0,04	<b>0,81</b>	0,77	0,95

**Tabela B.2.4:** Kumulativni rezultati, izračunani iz **median** meritev v neposredni okolici tumorjev posameznih živali 4 ure po koncu DC-ET (Metoda NIRS, inštrument OS 30). N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost.



## OKOLICA TUMORJA (mediane)



## SKUPINE:

- B1: B0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola  
 B2: B0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET  
 B3: B0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET  
 W1: W0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola  
 W2: W0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET  
 W3: W0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET  
 W4: W0.9/60 (0.9mA / 60min), DC-ET  
 W5: W0.3/60 (0.3mA / 60min), DC-ET

**Slika B.2.4:** Prikaz raztrosa **median** rezultatov za posamezne živali, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) za neposredno okolico tumorja 4 ure po koncu DC-ET. Prikazane so vrednosti nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). Kumulativni rezultati so v tabeli B.10.

MIŠICA: nasičenost hemoglobina s kisikom Sat(%)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>32,8</b>	8,5	3,0	<b>33,2</b>	20,7	47,3
B0.6/30	7	<b>32,3</b>	7,3	2,8	<b>33,2</b>	18,4	39,6
B0.6/60	6	<b>37,9</b>	11,1	4,5	<b>37,7</b>	21,9	55,9
W0.0/00	10	<b>17,2</b>	4,1	1,3	<b>17,8</b>	11,0	22,8
W0.6/30	5	<b>17,1</b>	7,5	3,4	<b>13,4</b>	11,9	29,9
W0.6/60	7	<b>19,7</b>	4,4	1,7	<b>18,9</b>	12,9	24,4
W0.9/60	6	<b>19,5</b>	5,6	2,3	<b>18,1</b>	14,4	29,5
W0.3/60	4	<b>19,3</b>	6,3	3,1	<b>19,3</b>	11,7	27,0

MIŠICA: koncentracija skupnega hemoglobna HbT(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>1,13</b>	0,08	0,03	<b>1,12</b>	1,04	1,22
B0.6/30	7	<b>1,12</b>	0,13	0,05	<b>1,18</b>	0,92	1,24
B0.6/60	6	<b>1,39</b>	0,40	0,17	<b>1,23</b>	1,09	2,15
W0.0/00	10	<b>1,25</b>	0,20	0,06	<b>1,23</b>	0,95	1,49
W0.6/30	5	<b>1,35</b>	0,13	0,06	<b>1,35</b>	1,22	1,55
W0.6/60	7	<b>1,30</b>	0,20	0,07	<b>1,32</b>	1,02	1,55
W0.9/60	6	<b>1,24</b>	0,19	0,08	<b>1,25</b>	0,98	1,48
W0.3/60	4	<b>1,13</b>	0,15	0,08	<b>1,12</b>	0,96	1,30

MIŠICA: koncentracija oksigeniranega hemoglobna HbO(mg/ml)

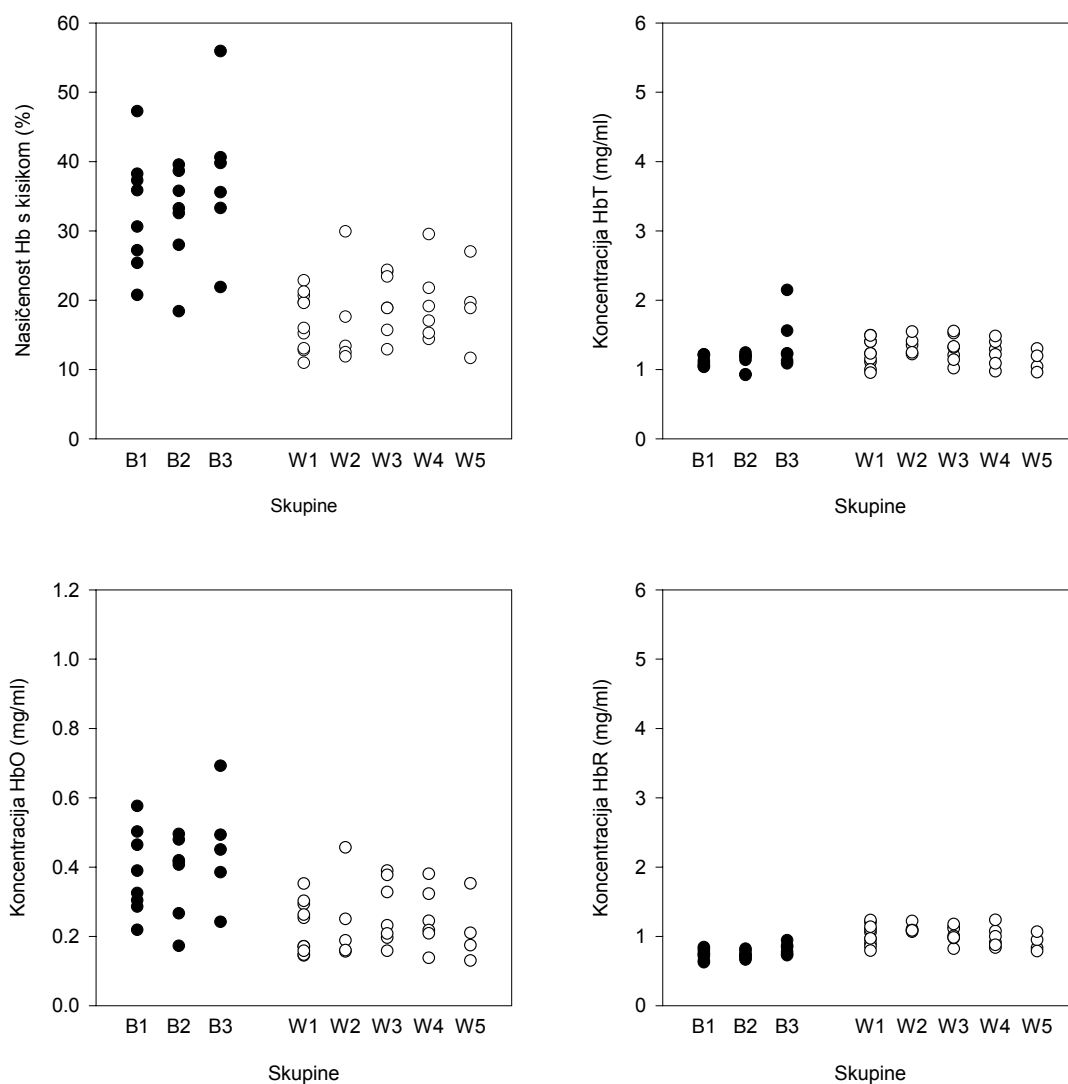
Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,38</b>	0,12	0,04	<b>0,36</b>	0,22	0,58
B0.6/30	7	<b>0,38</b>	0,12	0,04	<b>0,42</b>	0,17	0,50
B0.6/60	6	<b>0,58</b>	0,34	0,14	<b>0,47</b>	0,24	1,20
W0.0/00	10	<b>0,23</b>	0,08	0,02	<b>0,21</b>	0,15	0,35
W0.6/30	5	<b>0,24</b>	0,13	0,06	<b>0,19</b>	0,16	0,46
W0.6/60	7	<b>0,27</b>	0,09	0,04	<b>0,23</b>	0,16	0,39
W0.9/60	6	<b>0,25</b>	0,09	0,04	<b>0,23</b>	0,14	0,38
W0.3/60	4	<b>0,22</b>	0,10	0,05	<b>0,19</b>	0,13	0,35

MIŠICA: koncentracija deoksigeniranega hemoglobna HbR(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,74</b>	0,08	0,03	<b>0,74</b>	0,63	0,85
B0.6/30	7	<b>0,74</b>	0,06	0,02	<b>0,72</b>	0,66	0,82
B0.6/60	6	<b>0,82</b>	0,08	0,03	<b>0,81</b>	0,73	0,94
W0.0/00	10	<b>1,02</b>	0,15	0,05	<b>1,01</b>	0,79	1,23
W0.6/30	5	<b>1,11</b>	0,06	0,03	<b>1,09</b>	1,07	1,22
W0.6/60	7	<b>1,03</b>	0,12	0,05	<b>1,00</b>	0,82	1,18
W0.9/60	6	<b>0,99</b>	0,15	0,06	<b>0,96</b>	0,84	1,24
W0.3/60	4	<b>0,91</b>	0,13	0,06	<b>0,89</b>	0,79	1,07

**Tabela B.2.5:** Kumulativni rezultati, izračunani iz **povprečnih vrednosti** meritev na stegenski mišici posameznih živali 4 ure po koncu DC-ET na tumorju (Metoda NIRS, inštrument OS 30). N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost.

## MIŠICA (povprečja)



## SKUPINE:

- B1: B0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola  
 B2: B0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET  
 B3: B0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET  
 W1: W0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola  
 W2: W0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET  
 W3: W0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET  
 W4: W0.9/60 (0.9mA / 60min), DC-ET  
 W5: W0.3/60 (0.3mA / 60min), DC-ET

**Slika B.2.5:** Prikaz raztrosa **povprečij** rezultatov za posamezne živali, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) za stegensko mišico 4 ure po koncu DC-ET na tumorju. Prikazane so vrednosti nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). Kumulativni rezultati so v tabeli B.11.

MIŠICA: nasičenost hemoglobina s kisikom Sat(%)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>32,4</b>	9,0	3,2	<b>32,7</b>	18,1	46,2
B0.6/30	7	<b>32,7</b>	7,9	3,0	<b>35,0</b>	18,4	40,5
B0.6/60	6	<b>37,4</b>	10,9	4,5	<b>36,8</b>	22,0	55,5
W0.0/00	10	<b>16,7</b>	4,2	1,3	<b>17,5</b>	10,3	23,3
W0.6/30	5	<b>16,4</b>	7,6	3,4	<b>12,3</b>	11,7	29,6
W0.6/60	7	<b>20,2</b>	5,3	2,0	<b>18,4</b>	12,4	28,5
W0.9/60	6	<b>19,7</b>	5,8	2,4	<b>18,8</b>	13,6	29,6
W0.3/60	4	<b>18,1</b>	6,5	3,3	<b>16,8</b>	11,8	27,0

MIŠICA: koncentracija skupnega hemoglobna HbT(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>1,08</b>	0,08	0,03	<b>1,08</b>	0,94	1,19
B0.6/30	7	<b>1,08</b>	0,16	0,06	<b>1,14</b>	0,84	1,27
B0.6/60	6	<b>1,33</b>	0,42	0,17	<b>1,15</b>	1,06	2,17
W0.0/00	10	<b>1,11</b>	0,22	0,07	<b>1,06</b>	0,83	1,44
W0.6/30	5	<b>1,28</b>	0,20	0,09	<b>1,31</b>	1,06	1,55
W0.6/60	7	<b>1,21</b>	0,21	0,08	<b>1,24</b>	0,90	1,48
W0.9/60	6	<b>1,14</b>	0,16	0,07	<b>1,15</b>	0,94	1,32
W0.3/60	4	<b>1,11</b>	0,24	0,12	<b>1,15</b>	0,79	1,37

MIŠICA: koncentracija oksigeniranega hemoglobna HbO(mg/ml)

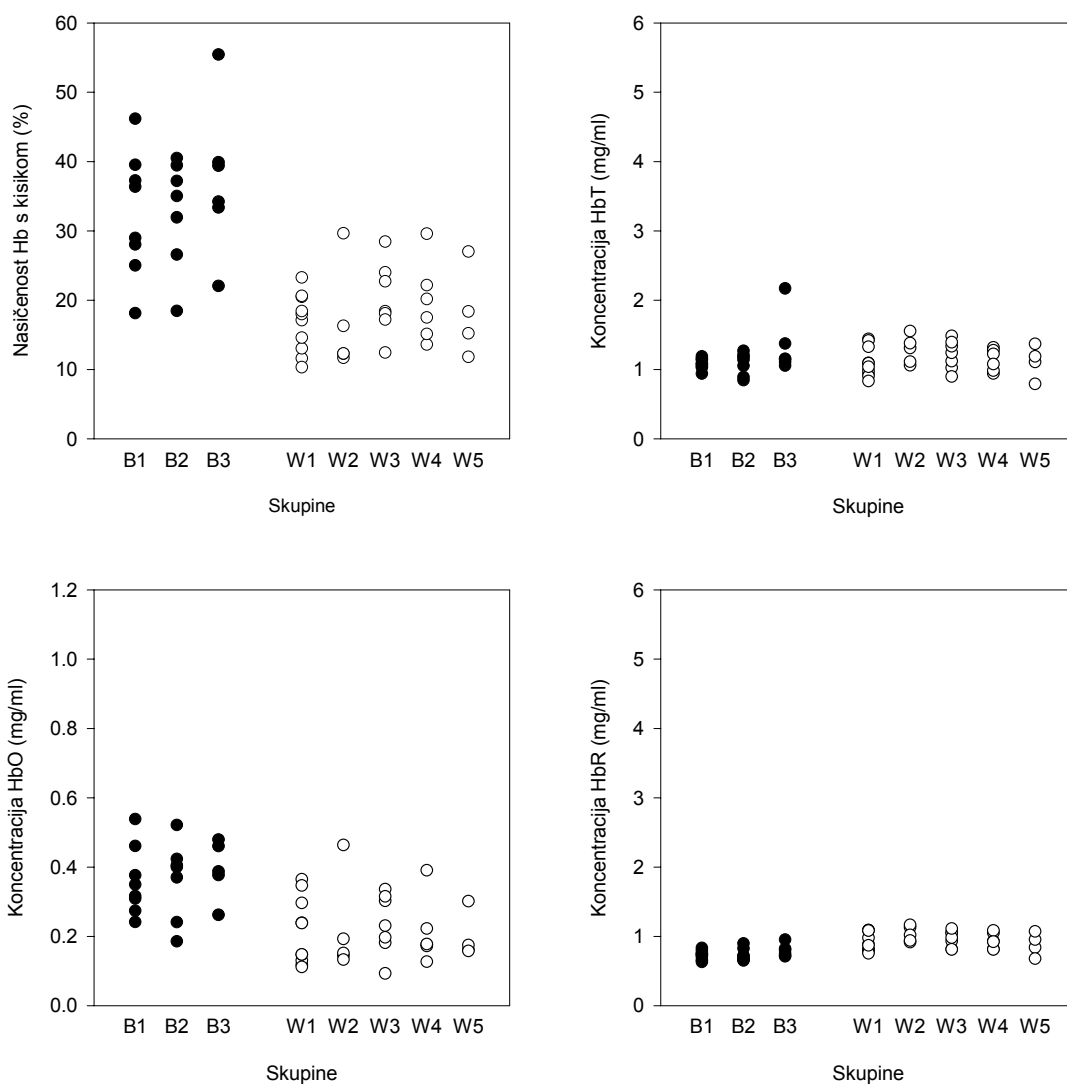
Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,36</b>	0,10	0,04	<b>0,33</b>	0,24	0,54
B0.6/30	7	<b>0,36</b>	0,11	0,04	<b>0,40</b>	0,19	0,52
B0.6/60	6	<b>0,53</b>	0,34	0,14	<b>0,42</b>	0,26	1,21
W0.0/00	10	<b>0,21</b>	0,10	0,03	<b>0,19</b>	0,11	0,36
W0.6/30	5	<b>0,22</b>	0,14	0,06	<b>0,15</b>	0,13	0,46
W0.6/60	7	<b>0,24</b>	0,09	0,03	<b>0,23</b>	0,09	0,34
W0.9/60	6	<b>0,21</b>	0,09	0,04	<b>0,18</b>	0,13	0,39
W0.3/60	4	<b>0,20</b>	0,07	0,03	<b>0,17</b>	0,16	0,30

MIŠICA: koncentracija deoksigeniranega hemoglobna HbR(mg/ml)

Skupina	N	povp.	SD	SE	med.	MIN	MAX
B0.0/00	8	<b>0,73</b>	0,07	0,02	<b>0,74</b>	0,63	0,83
B0.6/30	7	<b>0,73</b>	0,09	0,04	<b>0,72</b>	0,65	0,90
B0.6/60	6	<b>0,79</b>	0,09	0,04	<b>0,77</b>	0,71	0,95
W0.0/00	10	<b>0,91</b>	0,13	0,04	<b>0,88</b>	0,75	1,09
W0.6/30	5	<b>1,03</b>	0,11	0,05	<b>1,02</b>	0,92	1,16
W0.6/60	7	<b>0,97</b>	0,12	0,05	<b>0,98</b>	0,81	1,11
W0.9/60	6	<b>0,93</b>	0,12	0,05	<b>0,93</b>	0,81	1,08
W0.3/60	4	<b>0,88</b>	0,17	0,08	<b>0,90</b>	0,68	1,07

**Tabela B.2.6:** Kumulativni rezultati, izračunani iz **median** meritev na stegenski mišici posameznih živali 4 ure po koncu DC-ET na tumorju (Metoda NIRS, inštrument OS 30). N = število živali v skupini; povp. = povprečna vrednost; SD = standardna deviacija; SE = standardna napaka povprečja; med. = mediana; MIN = najmanjša izmerjena vrednost; MAX = največja izmerjena vrednost.

## MIŠICA (mediane)



## SKUPINE:

- B1: B0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola
- B2: B0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET
- B3: B0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET
- W1: W0.0/00 (0.0mA / 00min), kontrola
- W2: W0.6/30 (0.6mA / 30min), DC-ET
- W3: W0.6/60 (0.6mA / 60min), DC-ET
- W4: W0.9/60 (0.9mA / 60min), DC-ET
- W5: W0.3/60 (0.3mA / 60min), DC-ET

**Slika B.2.6:** Prikaz raztrosa median rezultatov za posamezne živali, dobljenih z metodo NIRS (inštrument OS 30) za stegensko mišico 4 ure po koncu DC-ET na tumorju. Prikazane so vrednosti nasičenosti Hb s kisikom (Sat) in koncentracije skupnega (HbT), oksigeniranega (HbO) in deoksigeniranega (HbR) hemoglobina za vse eksperimentalne skupine obeh tumorskih modelov (B = fibrosarkom LPB v miših C57Bl/6; W = fibrosarkom Sa-1 v miših A/J). Kumulativni rezultati so v tabeli B.12.

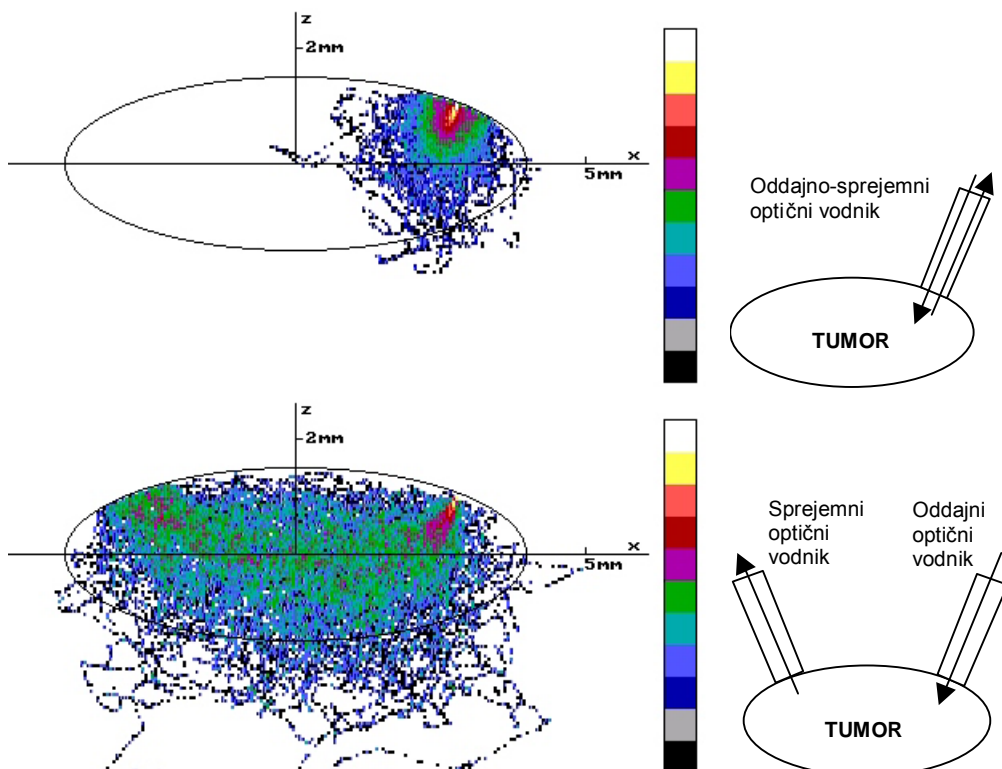


# DODATEK C

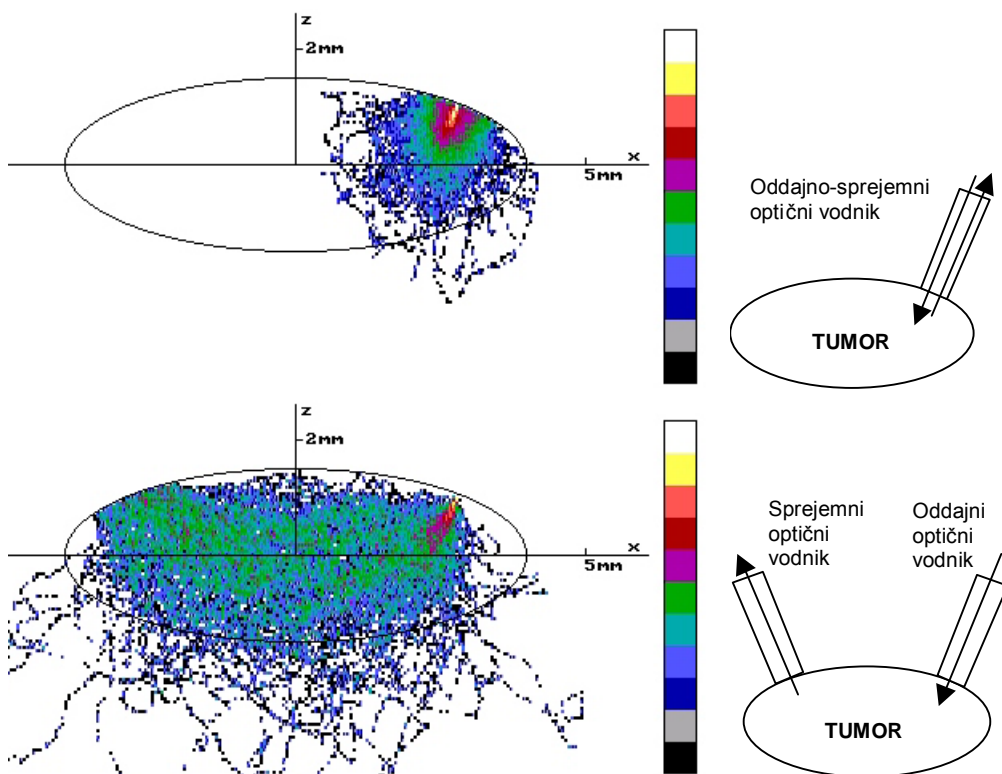
## *Metoda Monte Carlo (simulacija)*

### *Odbojni in presvetlitveni način delovanja metode NIRS*

Rezultati simulacije Monte Carlo za različne kombinacije vrednosti optičnih parametrov. Za vsako trojico parametrov (albedo, povprečni kosinus fazne funkcije in koeficient sipanja  $\mu_s$ ) podajamo rezultat simulacije za odbojni način (združeni oddajna in sprejemna optoda) in presvetlitveni način (ločeni oddajna in sprejemna optoda). Barvna lestvica na vsaki sliki je logaritmično enakomerna. Svetejša barva pomeni večjo gostoto sipalnih dogodkov na volumsko enoto. Pri vsaki sliki so podane vrednosti optičnih parametrov.

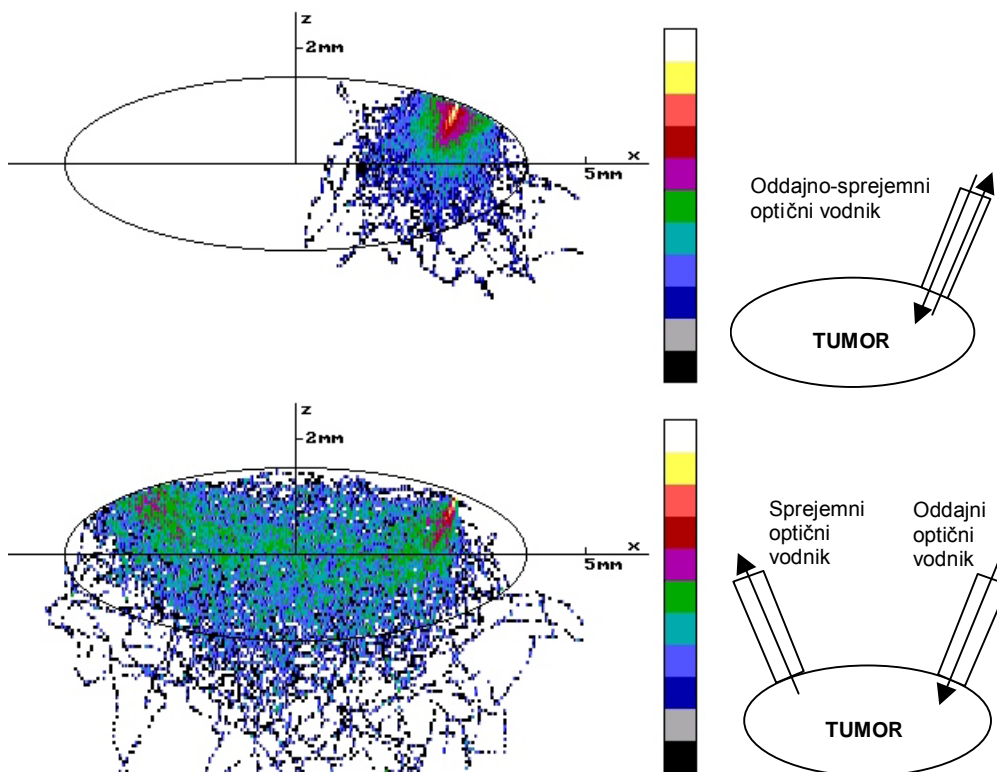


Slika C.1:  $w = 0,994$ ;  $g = 0,93$ ;  $1/\mu_t = 60 \mu s$ .

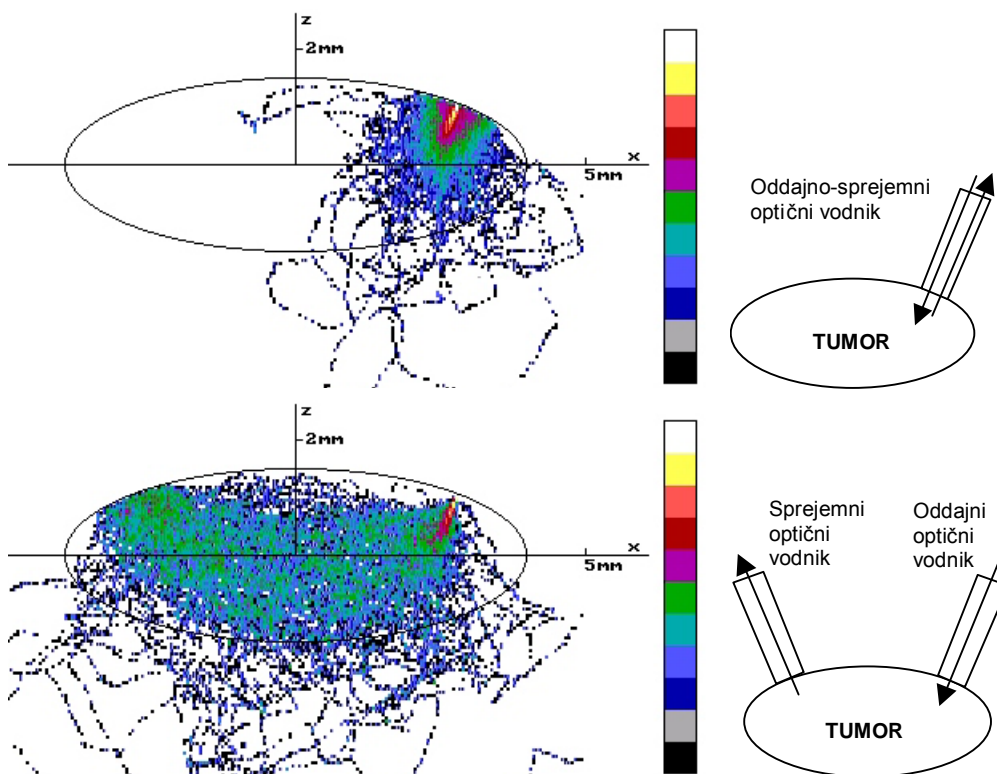


Slika C.2:  $w = 0,994$ ;  $g = 0,94$ ;  $1/\mu_t = 60 \mu s$ .

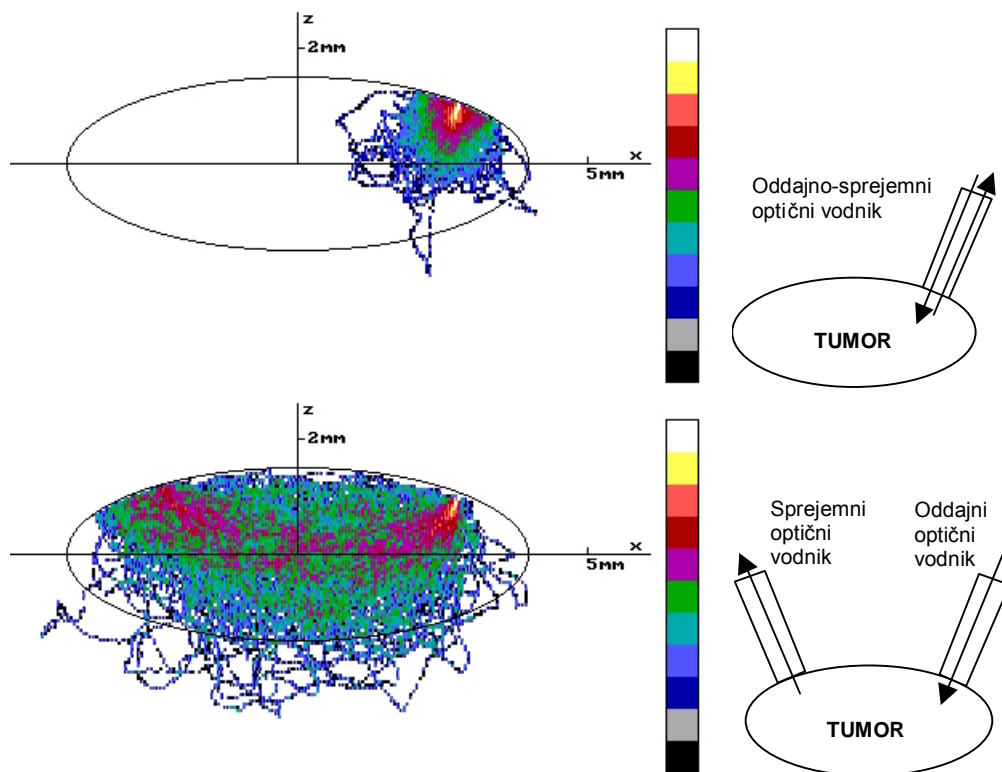




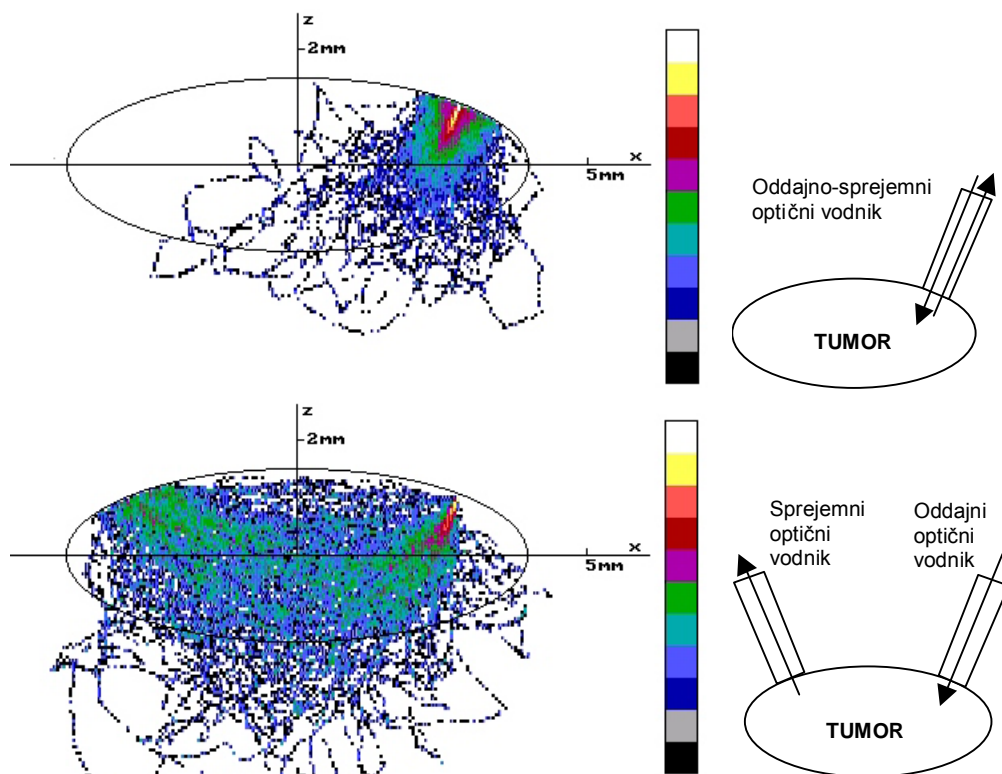
**Slika C.3:**  $w = 0,994$ ;  $g = 0,95$ ;  $1/\mu_t = 60 \mu s$ .



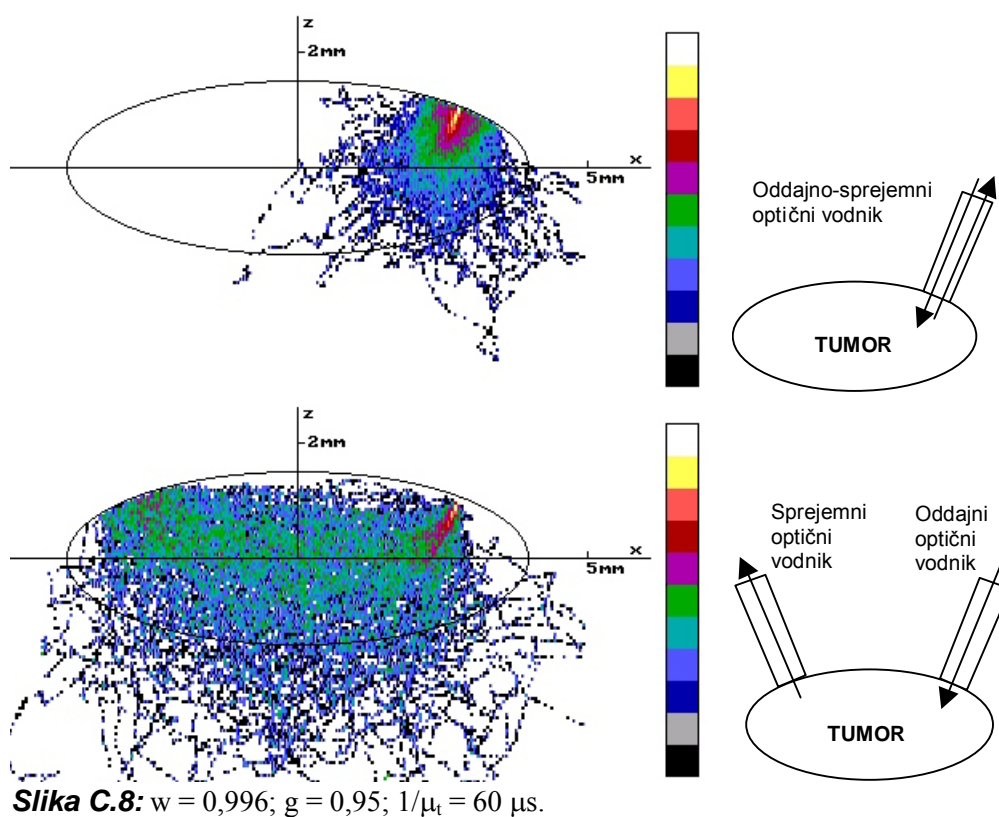
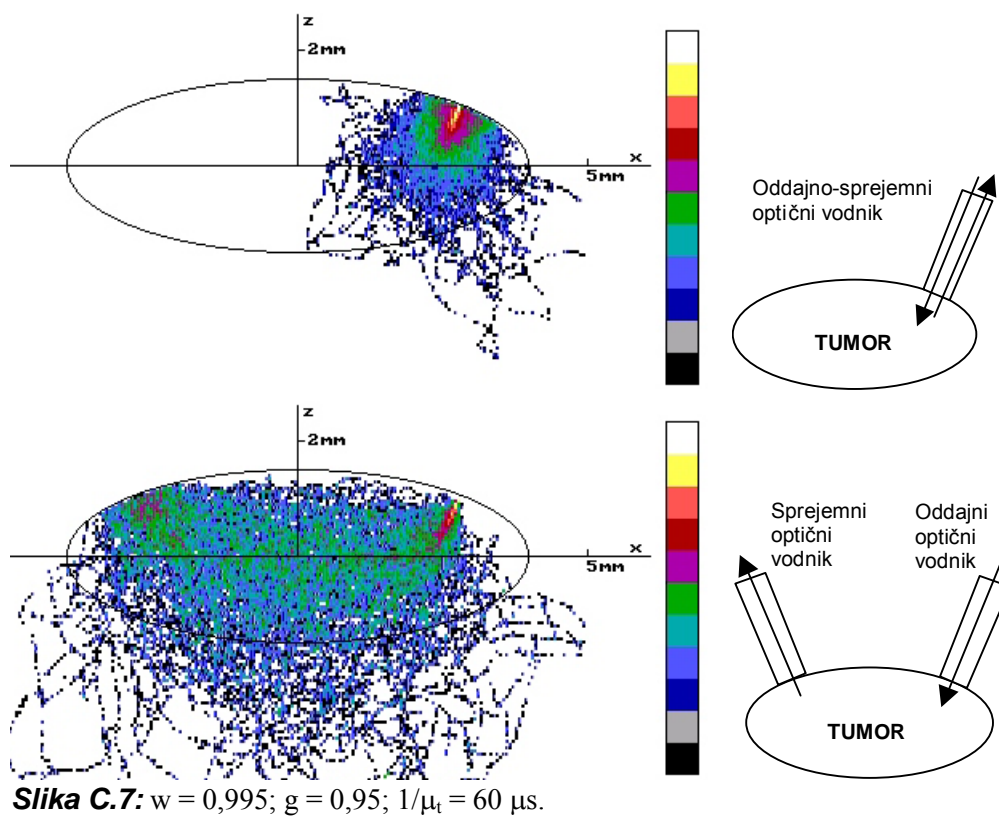
**Slika C.4:**  $w = 0,994$ ;  $g = 0,96$ ;  $1/\mu_t = 60 \mu s$ .

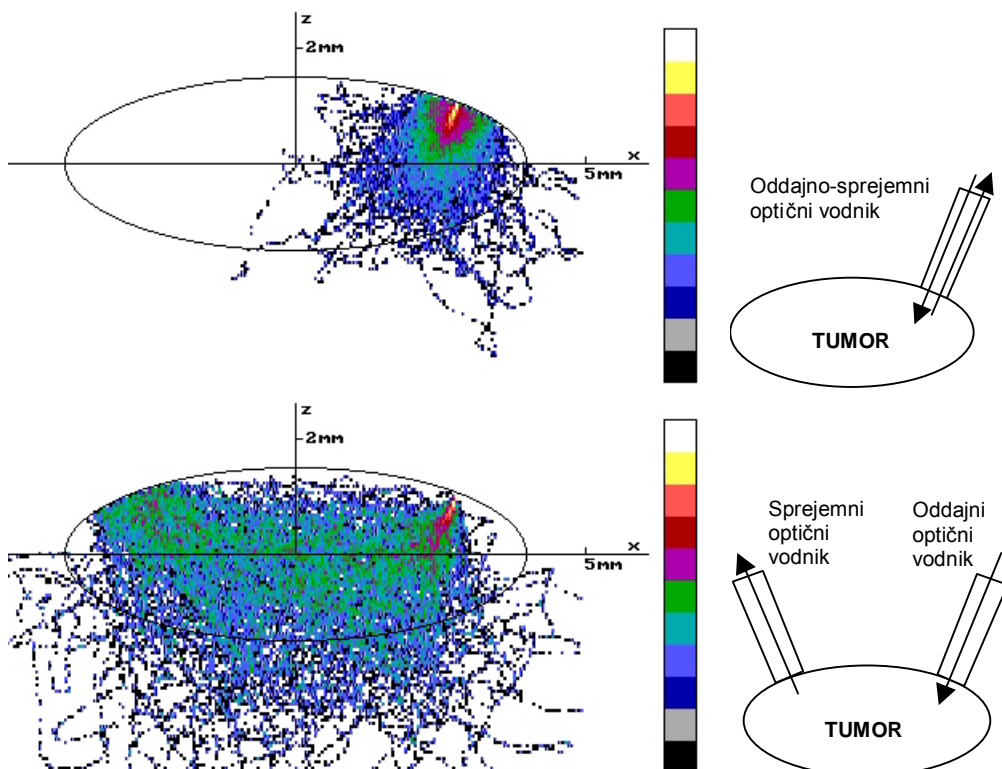


**Slika C.5:**  $w = 0,994$ ;  $g = 0,97$ ;  $1/\mu_t = 25 \mu s$ .

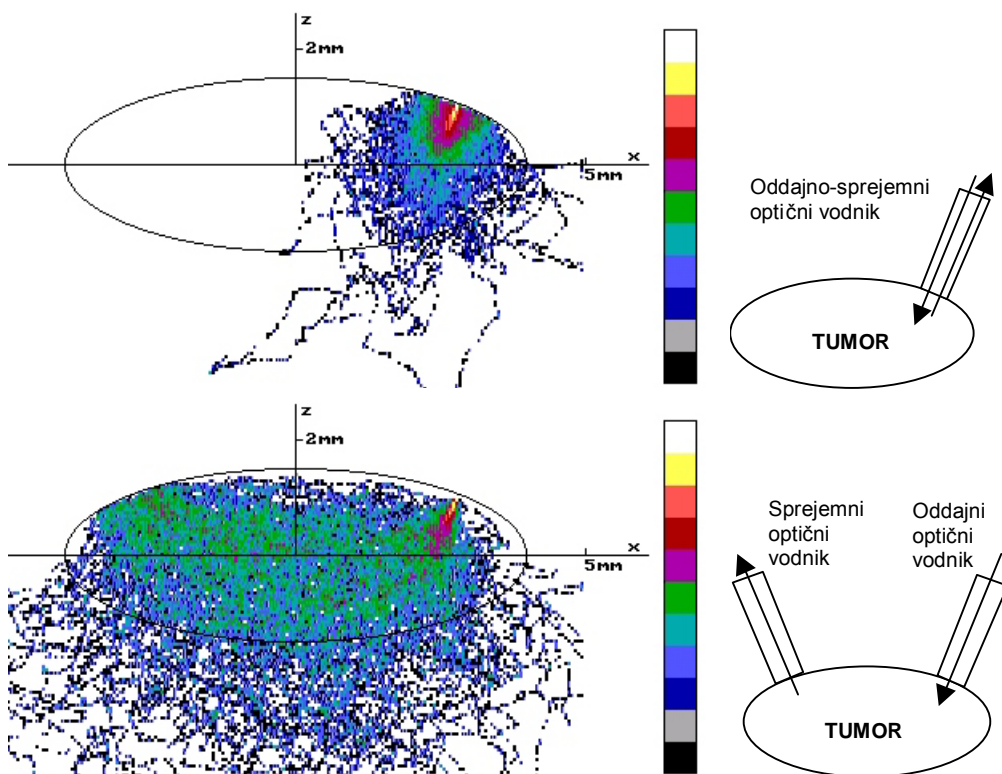


**Slika C.6:**  $w = 0,994$ ;  $g = 0,97$ ;  $1/\mu_t = 60 \mu s$ .

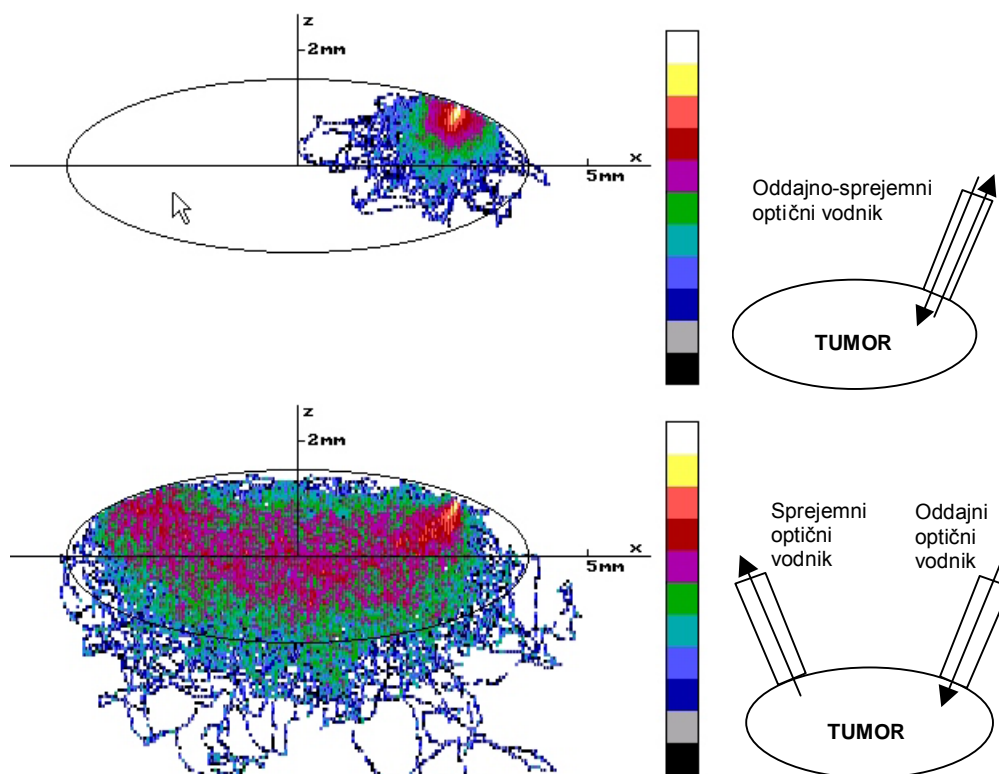




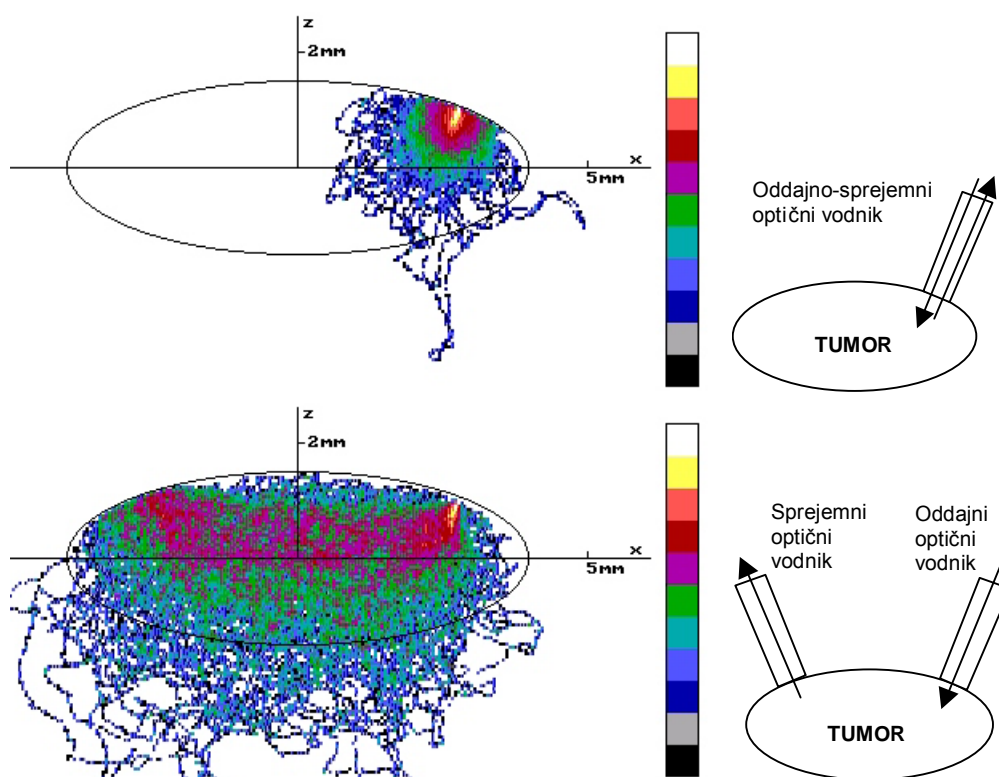
Slika C.9:  $w = 0,997$ ;  $g = 0,95$ ;  $1/\mu_t = 60 \mu s$ .



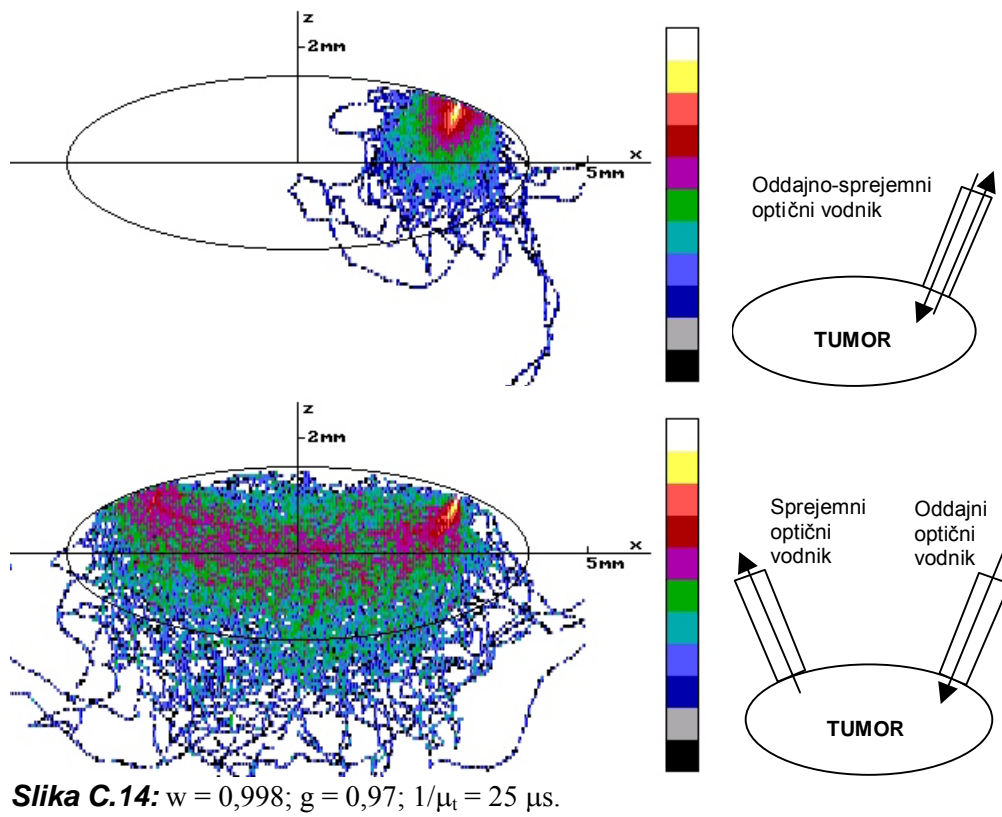
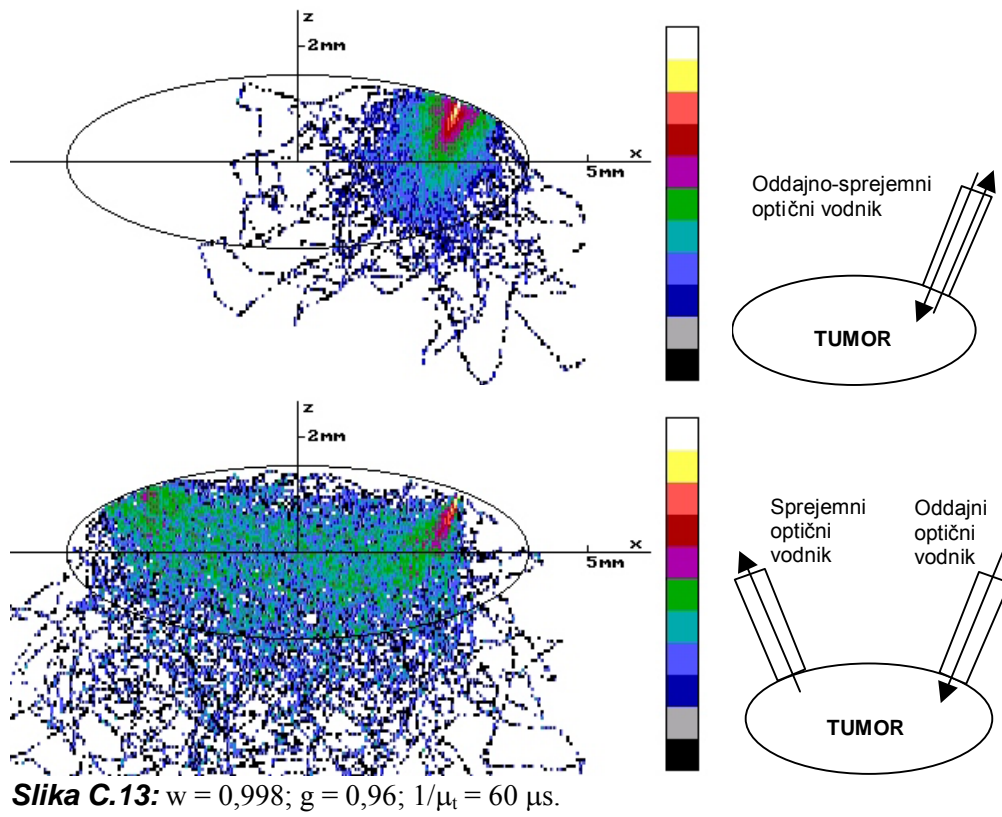
Slika C.10:  $w = 0,998$ ;  $g = 0,94$ ;  $1/\mu_t = 60 \mu s$ .

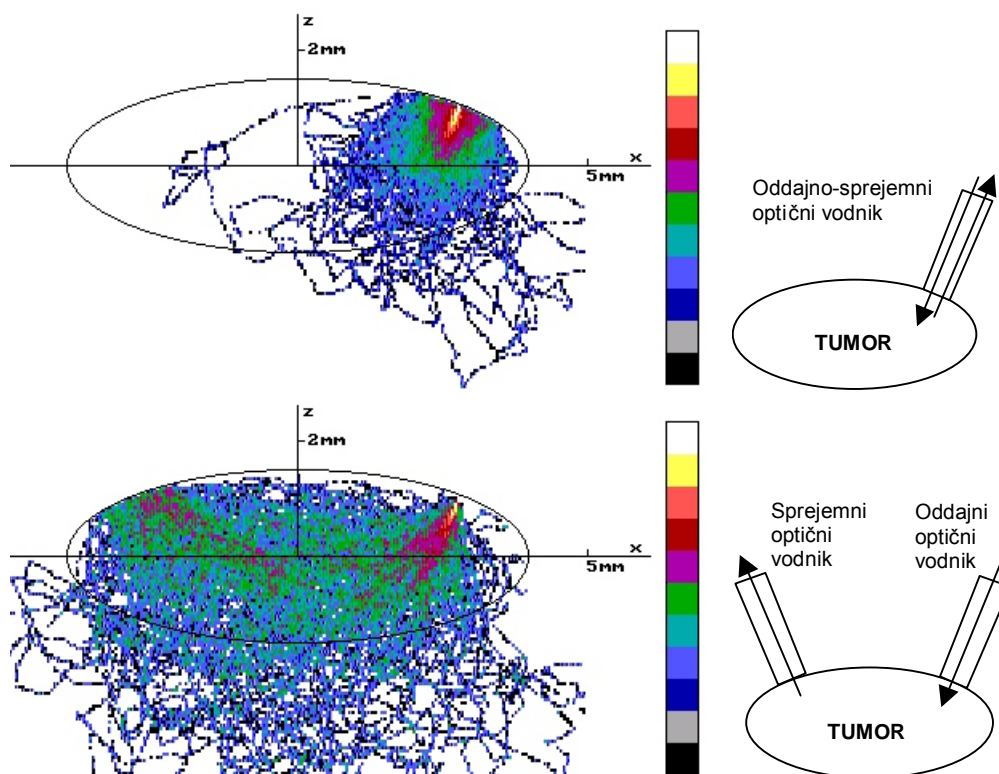


**Slika C.11:**  $w = 0,998$ ;  $g = 0,95$ ;  $1/\mu_t = 25 \mu\text{s}$ .



**Slika C.12:**  $w = 0,998$ ;  $g = 0,96$ ;  $1/\mu_t = 25 \mu\text{s}$ .





**Slika C.15:**  $w = 0,998$ ;  $g = 0,97$ ;  $1/\mu_t = 35 \mu\text{s}$ .





# LITERATURA

- [1] **Humphrey, C. E. and E. H. Seal.** Biophysical approach toward tumor regression in mice. *Science* 130: 388-390, 1959.
- [2] **David, S. L., D. R. Absolom, C. R. Smith, J. Gams, and M. A. Herbert.** Effect of low level direct current on in vivo tumor growth in hamsters. *Cancer Research* 45: 5625-5631, 1985.
- [3] **Marino, A. A., D. Moris, and T. Arnold.** Electrical treatment of Lewis lung carcinoma in mice. *Journal of Surgical Research* 41: 198-201, 1986.
- [4] **Heiberg, E., W. J. Nalesnik, and C. Janney.** Effects of varying potential and electrolytic dosage in direct current treatment of tumors. *Acta Radiologica* 32: 174-177, 1991.
- [5] **Griffin, D. T., N. J. F. Dodd, J. V. Moore, B. R. Pullan, and T. V. Taylor.** The effects of low-level direct current therapy on a preclinical mammary carcinoma: tumour regression and systemic biochemical sequelae. *Br. J. Cancer* 69(5): 875-878, 1994.
- [6] **Griffin, D. T., N. J. F. Dodd, S. Zhao, B. R. Pullan, and J. V. Moore.** Low-level direct electrical current therapy for hepatic metastases. I. Preclinical studies on normal liver. *Br. J. Cancer* 72: 31-34, 1995.
- [7] **Serša, G. and D. Miklavčič.** The feasibility of low level direct current electrotherapy for regional cancer treatment. *Reg. Cancer Treat.* 1: 31-35, 1993.
- [8] **Miklavčič, D., G. Serša, M. Kryžanowski, S. Novaković, F. Bobanović, R. Golouh, and L. Vodovnik.** Tumor treatment by direct current - tumor temperature and pH, electrode material and configuration. *Bioelectroch. Bioener.* 30: 209-220, 1993.
- [9] **Miklavčič, D., A. Fajgelj, and G. Serša.** Tumour treatment by direct electric current: electrode material deposition. *Bioelectroch. Bioener.* 35: 93-97, 1994.
- [10] **Vodovnik, L., D. Miklavčič, and G. Serša.** Modified cell proliferation due to electrical currents. *Med. Biol. Eng. Comp.* 30: CE21-CE28, 1992.
- [11] **Bobanović, F.** Vpliv električnih tokov na na aktivacijo celic imunskega sistema. Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, 1993.
- [12] **Miklavčič, D., L. Vodovnik, F. Bobanović, S. Reberšek, G. Serša, S. Novaković, and R. Golouh.** Local treatment of murine tumors by electric direct current. *Electro- and Magnetobiology* 11(2): 109-125, 1992.

- [13] **Jarm, T., D. An, J. Belehradec, Jr., L.M. Mir, G. Serša, M. Čemažar, T. Kotnik, J. Pušenjak and D. Miklavčič.** Study of blood perfusion with Patent Blue staining method in LPB fibrosarcoma tumors in immuno-competent and immuno-deficient mice after electrotherapy by direct current. *Radiology & Oncology* 31:33-38, 1997.
- [14] **Jarm, T., D. Miklavčič, and R. Karba.** Mathematical modelling of tumor growth and different therapies. In: *Proceedings of the 2nd Electrotechnical and Computer Science Conference - ERK '93. Portoroz, Slovenia, September 27-29, 1993. Volume B*, edited by F. Solina and B. Zajc. Slovenia Section IEEE, 1993, p. 325-328.
- [15] **Serša, G., R. Golouh, and D. Miklavčič.** Anti-tumor effect of tumor necrosis factor combined with electrotherapy on mouse sarcoma. *Anti-Cancer Drugs* 5: 69-74, 1994.
- [16] **Serša, G. and D. Miklavčič.** Inhibition of SA-1 tumor growth in mice by human leukocyte interferon alpha combined with low-level direct current. *Mol. Biother.* 2: 165-168, 1990.
- [17] **Serša, G., D. Miklavčič, U. Batista, S. Novaković, F. Bobanović, and L. Vodovnik.** Anti-tumour effect of electrotherapy alone or in combination with interleukin-2 in mice with sarcoma and melanoma tumors. *Anti-Cancer Drugs* 3: 253-260, 1992.
- [18] **Miklavčič, D., D. An, J. Belehradec Jr. and L.M. Mir.** Host's immune response in electrotherapy of murine tumors by direct current. *Eur. Cytokine Netw.* 8(3): 275-279, 1997.
- [19] **Serša, G., S. Novaković, and D. Miklavčič.** Potentiation of bleomycin antitumor effectiveness by electrotherapy. *Cancer Letters* 69: 81-84, 1993.
- [20] **Jain, R. K.** Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Research* 48: 2641-2658, 1988.
- [21] **Jain, R. K.** Transport of molecules across tumor vasculature. *Cancer Metast. Rev.* 6: 559-593, 1987.
- [22] **Jain, R. K.** Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Research* 47: 3039-3051, 1987.
- [23] **Vaupel, P.** Oxygen supply to malignant tumors. In: *Tumor Blood Circulation: Angiogenesis, Vascular Morphology and Blood Flow of Experimental and Human Tumors*, edited by H.-I. Peterson. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 1979, p. 143-168.
- [24] **Vaupel, P.** Hypoxia in neoplastic tissue. *Microvasc. Res.* 13: 399-408, 1977.
- [25] **Vaupel, P.** Oxygenation of human tumors. *Strahlenther. Onkol.* 166(6): 377-386, 1990.
- [26] **Jain, R. K.** A bioengineering perspective of cancer research: Mass and heat transfer in normal and tumor tissues. *BMES Bulletin* 14(4): 4-7, 1990.
- [27] **Müller-Klieser, W., P. Vaupel, R. Manz, and W. A. Grunewald.** Intracapillary oxyhemoglobin saturation in malignant tumours with central or peripheral blood supply. *Eur. J. Cancer* 16: 195-207, 1980.
- [28] **Pušenjak, J.** Izdelava modela in merjenje tlaka medcelične tekočine v čvrstem tumorju. Magistrska naloga, Fakulteta za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 1999.
- [29] **Zywietz, F., W. Reeker, and E. Kochs.** Tumor oxygenation in a transplanted rat rhabdomyosarcoma during fractionated irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32: 1391-1400, 1995.
- [30] **Thomas, C. D., M. Prade, and M. Guichard.** Tumour oxygenation, radiosensitivity, and necrosis before and/or after nicotinamide, carbogen and perflubron emulsion administration. *Int. J. Radiat. Biol.* 67(5): 597-605, 1995.
- [31] **Gerweck, L. E. and F. W. Hetzel.** pO<sub>2</sub> in irradiated versus nonirradiated tumors of mice breathing oxygen at normal and elevated pressure. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32: 695-701, 1995.
- [32] **Benaron, D. A., W. E. Benitz, R. L. Ariagno, and D. K. Stevenson.** Noninvasive methods for estimating in vivo oxygenation. *Clin. Pediatr.* 31(5): 258-273, 1992.

- [33] **Delpy, D.** Optical spectroscopy for diagnosis. *Phys. World* August: 34-39, 1994.
- [34] **Brazy, J. E.** Near-infrared spectroscopy. *Clinics in Perinatology* 18(3): 519-534, 1991.
- [35] **Jöbsis, F. F.** Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 198: 1264-1267, 1977.
- [36] **Elwell, C. E.** *A Practical Users Guide to Near Infrared Spectroscopy*. London: Hamamatsu Photonics KK, 1995,
- [37] **Rea, P. A., J. Crowe, Y. Wickramasinghe, and P. Rolfe.** Non-invasive optical methods for the study of cerebral metabolism in the human newborn: a technique for the future? *J. Med. Eng. Technol.* 9(4): 160-166, 1985.
- [38] **Reynolds, E. O. R., J. S. Wyatt, D. Azzopardi, D. T. Delpy, E. B. Cady, M. Cope, and S. Wray.** New non-invasive methods for assessing brain oxygenation and haemodynamics. *Brit. Med. Bull.* 44(4): 1052-1075, 1988.
- [39] *Dictionary of Physics*. London: Penguin Books, 1991.
- [40] **Ishimaru, A.** *Wave Propagation and Scattering in Random Media*. New York / Oxford: IEEE Press / Oxford University Press, 1997,
- [41] **Chandrasekhar, S.** *Radiative Transfer*. New York: Dover Publications, 1960.
- [42] **Anderson, R.E., S. Tokuda, W.L. Williams and N.L. Warner.** Radiation-induced augmentation of the response of A/J mice to 3A1 tumor cells. *Am. J. Pathol.* 108: 24-37, 1982.
- [43] **Belehradek Jr., J., G. Barski and M. Thonier.** Evolution of the cell mediated antitumor immunity in mice bearing a syngeneic chemically induced tumour. Influence of tumor growth, surgical removal and treatment with irradiated tumour cells. *Int J Cancer* 9: 461-469, 1972.
- [44] **Short, C.E., R.R. Paddleford and R.C. Harvey.** Induction and maintenance of general anaesthesia in small animal practice. *Wien. Tierarztl. Mschr.* 80: 177-187, 1993.
- [45] **Wickramasinghe, Y. A. B. D.** *Users' Guide for the Near Infra-red Data Collection Unit*. Stoke-on-Trent, U.K. Department of Biomedical Engineering and Medical Physics, University of Keele, 1994,
- [46] **Jarm, T.** Vpliv elektroterapije na oksigenacijo podkožnih tumorjev. Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, 1996.
- [47] *Multiscan OS20/30 Operating Instructions* (Program version 1.97.5.2), Nios GmbH, Essen, 1997.
- [48] **Barajas, O., A. M. Ballangrund, G. G. Miller, R. B. Moore, and J. Tulip.** Monte Carlo modelling of angular radiance in tissue phantoms and human prostate: PDT light dosimetry. *Phys. Med. Biol.* 42: 1675-1687, 1997.
- [49] **Delpy, D. T., S. R. Arridge, M. Cope, D. Edwards, E. O. R. Reynolds, C. E. Richardson, S. Wray, J. Wyatt, and P. van der Zee.** Quantitation of pathlength in optical spectroscopy. *Adv. Exp. Med. Biol.* 248: 41-46, 1989.
- [50] **Firbank, M., S. R. Arridge, M. Schweiger, and D. T. Delpy.** An investigation of light transport through scattering bodies with non-scattering regions. *Phys. Med. Biol.* 41: 767-783, 1996.
- [51] **Flock, S. T., M. S. Patterson, B. C. Wilson, and D. R. Wyman.** Monte Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissues-I: Model predictions and comparison with diffusion theory. *IEEE T. Bio-Med. Eng.* 36(12): 1162-1168, 1989.
- [52] **Flock, S. T., B. C. Wilson, and M. S. Patterson.** Monte Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissues-II: Comparison with measurements in phantoms. *IEEE T. Bio-Med. Eng.* 36(12): 1169-1173, 1989.
- [53] **Gardner, C. M. and A. J. Welch.** Monte Carlo simulation of light transport in tissue: unscattered absorption events. *Appl. Opt.* 33(13): 2743-2745, 1994.
- [54] **Cheong, W.-F., S. A. Prahl, and A. J. Welch.** A review of the optical properties of biological tissues. *IEEE J. Quantum Elect.* 26(12): 2166-2185, 1990.

- [55] **Pavlin, M.** Modeliranje transporta svetlobe v bioloških tkivih. Diplomsko naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko, 1998.
- [56] **Beek, J. F., P. Blokland, P. Posthumus, M. Aalders, J. W. Pickering, H. J. C. M. Sterenberg, and M. J. C. van Gemert.** *In vitro* double-integrating-sphere optical properties of tissues between 630 and 1064 nm. *Phys. Med. Biol.* 42: 2255-2261, 1997.
- [57] **Fatt, I.** *Polarographic oxygen sensor.* CRC Press, 1976,
- [58] *Eppendorf pO<sub>2</sub> Histogram Operating Manual* (Program Version 2.5). Eppendorf GmbH, Hamburg, 1993.
- [59] *Chemical Microsensor Product no. 1231 Operating Maintenance Manual.* Diamond General, Ann Arbor, 1990.
- [60] **Horsman, M. R., M. Nordmark, M. Hoyer, and J. Overgaard.** Direct evidence that hydralazine can induce hypoxia in both transplanted and spontaneous murine tumours. *Br. J. Cancer* 72: 1474-1478, 1995.
- [61] **Kavanagh, M.-C., A. Sun, Q. Hu, and R. P. Hill.** Comparing techniques of measuring tumor hypoxia in different murine tumors: Eppendorf pO<sub>2</sub> Histogram, [<sup>3</sup>H]Misonidazole binding and paired survival assay. *Radiat. Res.* 145: 491-500, 1996.
- [62] **Horsman, M. R., A. A. Khalil, M. Nordmark, C. Grau, and J. Overgaard.** Relationship between radiobiological hypoxia and direct estimates of tumour oxygenation in a mouse tumour model. *Radiotherapy and Oncology* 28: 69-71, 1993.
- [63] **Strnad, V., F. Kampard, J. Jahns, P. Madaj-Sterba, M. Kirschner, M. Meyer, R. Böhme, S. Birkenhake, and R. Sauer.** Hypoxie-Radiotherapie: Veränderungen in der Sauerstoffpartialdruckverteilung im Tumor und im gesunden Gewebe unter akuter respiratorischer Hypoxie. *Strahlenther. Onkol.* 172: 427-433, 1996.
- [64] **Brizel, D. M., S. Lin, J. L. Johnson, J. Brooks, M. W. Dewhirst, and C. A. Piantadosi.** The mechanisms by which hyperbaric oxygen and carbogen improve tumour oxygenation. *Br. J. Cancer* 72: 1120-1124, 1995.
- [65] **Rasey, J. S., W. Koh, M. L. Evans, L. M. Peterson, T. K. Lewellen, M. M. Graham, and K. A. Krohn.** Quantifying regional hypoxia in human tumors with positron emission tomography of [<sup>18</sup>F]fluoromisonidazole: a pretherapy study of 37 patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 36: 417-428, 1996.
- [66] **Rampling, R., G. Cruickshank, A. D. Lewis, S. A. Fitzsimmons, and P. Workman.** Direct measurement of pO<sub>2</sub> distribution and bioreductive enzymes in human malignant brain tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 29: 427-431, 1994.
- [67] **Falk, S. J., R. Ward, and N. M. Bleehen.** The influence of carbogen breathing on tumour tissue oxygenation in man evaluated by computerised histography. *Br. J. Cancer* 66: 919-924, 1992.
- [68] **Collingridge, D. R., W. K. Young, B. Vojnovic, P. Wardman, E. M. Lynch, S. A. Hill, and D. J. Chaplin.** Measurement of tumor oxygenation: a comparison between polarographic needle electrodes and a time-resolved luminescence-based optical sensor. *Radiat. Res.* 147: 329-334, 1997.
- [69] **Sagar, K. B., L. R. Pelc, T. L. Rhyne, J. Howard, and D. C. Warltier.** Estimation of myocardial infarct size with ultrasonic tissue characterization. *Circulation* 83(4): 1419-1428, 1991.
- [70] **Szabo, G.** New steps in the intra-arterial chemotherapy of head and neck tumors. *Oncology* 42: 217-223, 1985.
- [71] **Hirnlé, P., R. Harzmann, and J. K. Wright.** Patent blue V encapsulation in liposomes: potential applicability to endolymphatic therapy and postoperative chromolymphography. *Lymphology* 21: 187-189, 1988.
- [72] **Castejon, R., C. Gamallo, and J. Jimenez-Cossio.** An experimental study of lymphatic vessel autotransplantation in the dog. *Lymphology* 23: 194-197, 1990.

- [73] **Hirnlé, P.** Histological findings in rabbit lymph nodes after endolymphatic injection of liposomes containing blue dye. *J. Pharm. Pharmacol.* 43: 217-218, 1991.
- [74] **van der Veen, H., O. S. Hoekstra, M. A. Paul, M. A. Cuesta, and S. Meijer.** Gamma probe-guided sentinel node biopsy to select patients with melanoma for lymphadenectomy. *Br. J. Surg.* 81: 1769-1770, 1994.
- [75] **Barber, C. J.** Case report: serious adverse reaction to patent blue violet at lymphography. *Clin. Radiol.* 40: 631-1989.
- [76] **Michel, C. C.** The passage of a low molecular weight dye molecule (Patent Blue V) out of individually perfused capillaries of the frog mesentery. *J. Physiol.* 204: 62P-63P, 1969.
- [77] **Curry, F. E., V. H. Huxley, and R. H. Adamson.** Permeability of single capillaries to intermediate-sized colored solutes. *Am. J. Physiol. :Heart Circ. Physiol.* 245: H495-H505, 1983.
- [78] **Fallowfield, M. E.** Blood flow distribution within transplantable tumours in mouse. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 25(12): 1683-1688, 1989.
- [79] **Zanelli, G. D. and J. F. Fowler.** The measurement of blood perfusion in experimental tumors by uptake of <sup>86</sup>Rb. *Cancer Research* 34: 1451-1456, 1974.
- [80] **Jain, R. K. and K. Ward-Hartley.** Tumor blood flow - characterization, modifications, and role in hyperthermia. *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics* SU-31: 504-526, 1984.
- [81] **Glatstein, E.** Alterations in rubidium-86 extraction in normal mouse tissues after irradiation. *Radiat. Res.* 53: 88-101, 1973.
- [82] **Zanelli, G. D., P. B. Lucas, and J. F. Fowler.** The effect of anaesthetics on blood perfusion in transplanted mouse tumours. *Br. J. Cancer* 32: 380-390, 1975.
- [83] **Sapirstein, L. A.** Regional blood flow by fractional distribution of indicators. *Am. J. Physiol.* 193: 161-168, 1958.
- [84] **Takacs, L., L. A. Bebrecezeni, and C. Farsang.** Circulation in rats with Guerin carcinoma. *J. Appl. Physiol.* 38: 696-701, 1975.



## *Izvirni prispevki k znanosti*

Na osnovi dela, predstavljenega v doktorski disertaciji, prosim za priznanje naslednjih izvirnih prispevkov k znanosti in razumevanju ožjega znanstvenega področja.

### Učinki elektroterapije s šibkim enosmernim električnim tokom na prekrvljenost in oksigenacijo tumorjev

Izvedli smo več študij na dveh eksperimentalnih tumorskih modelih na miših, kjer smo nesporno dokazali, da elektroterapija s šibkim enosmernim električnim tokom pomembno zmanjša prekrvljenost in oksigenacijo podkožnih čvrstih tumorjev. Ugotovili smo, da je učinek elektroterapije na prekrvitev in oksigenacijo tumorjev dozno odvisen od amplitude in trajanja dovedenega električnega toka. Hkrati smo pokazali, da so učinki terapije pri obeh tumorskih modelih sicer istosmiselni, da pa obstajajo določene razlike v razsežnosti induciranih sprememb med obema modeloma.

### Večparametrično merjenje parametrov prekrvljenosti in oksigenacije

Izvedli smo obsežno študijo vpliva elektroterapije na prekrvljenost in oksigenacijo tumorjev. Uporabili smo štiri različne metode, s katerimi merimo različne parametre prekrvljenosti in oksigenacije na različnih fizioloških nivojih transporta kisika v organizmu. Večparametrično merjenje parametrov prekrvljenosti in oksigenacije med in po elektroterapiji je omogočilo primerjavo med različnimi merilnimi metodami. Na ta način smo ugotovili, kako so različni parametri povezani med seboj. Korelacije med rezultati različnih metod so bile jasno pokazane. Povezave med njimi niso enostavne in funkcijska zveza med njimi ni linearna.

Z eno od izvedenk metode bližnje-infrardeče spektroskopije NIRS smo pokazali, kako se pretok krvi med terapijo dinamično spreminja. Že v prvih 15 minutah terapije upade prekrvljenost na najnižji nivo. Te rezultate smo potrdili z metodo barvanja tkiva z barvilom Patent modro-vijolično, s katero smo tudi pokazali, da je učinek zmanjšane prekrvljenosti prisoten vsaj 2 - 3 dni po terapiji. Ta podatek je potrjen tudi z metodo merjenja vsebnosti radioaktivnega izotopa rubidija. Dolgotrajnost učinka se ujema z dokazano zavoro v rasti tumorjev po elektroterapiji. Okrnjen pretok krvi posledično povzroči zmanjšanje dotoka kisika v tkivo, kar smo potrdili s polarografičnim merjenjem parcialnega tlaka kisika v tkivu in z drugo izvedenko metode NIRS, ki neposredno pokaže zmanjšano oksigenacijo krvi v tumorju po terapiji. Z vsemi metodami smo pokazali, da je eden od uporabljenih tumorskih modelov bolj občutljiv na elektroterapijo od drugega.

### Ovrednotenje primernosti in zanesljivosti metode NIRS

Pokazali smo, da se rezultati obeh izvedenk neinvazivne optične metode bližnje-infrardeče spektroskopije (NIRS) dobro ujemajo z rezultati uveljavljenih invazivnih metod in jih zato v določenih pogojih lahko povsem nadomestijo. Poleg neinvazivnosti je očitna prednost metode NIRS tudi v tem, da lahko meritev traja dalj časa na isti poskusni živali (dinamične spremembe) in da meritve z eno od obeh izvedenk metode

NIRS lahko ponavljamo na isti živali v daljšem časovnem obdobju. Ker se metoda NIRS običajno uporablja na večjih prostorninah tkiva, kot so bili naši podkožni tumorji, smo z modeliranjem transporta svetlobe v tkivu z metodo Monte Carlo ocenili, koliko izmerjenega signala dejansko prihaja iz tumorja in koliko je ta signal "onesnažen" s prispevkom okoliških tkiv v neposredni bližini tumorjev. Pokazali smo, da pretežni del signala izvira iz tumorja in da je zato metoda NIRS uporabna tudi za spremljanje prekrvitve in oksigenacije na prostorsko zelo omejenem območju tkiva kot je čvrsta podkožna tumorska tvorba.



## *Izjava*

*Izjavljam, da sem avtor te disertacije, ki je nastala pod mentorstvom izr. prof. Damijana Miklavčiča in somentorstvom izr. prof. Gregorja Serše. Pomoč drugih sodelavcev je navedena v "zahvali".*

*Tomaž Jarm*

