

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV VÝKONOVÉ ELEKTROTECHNIKY A ELEKTRONIKY

DEPARTMENT OF POWER ELECTRICAL AND ELECTRONIC ENGINEERING

ANALÝZA ELEKTRICKÝCH A TEPELNÝCH JEVŮ PŘI ELEKTROPORACI

ANALYSIS OF ELECTRICAL AND THERMAL EFFECTS DURING ELECTROPORATION

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTORKA PRÁCE

AUTHOR

Ing. Veronika Novotná

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

Ing. Dalibor Červinka, Ph.D.

BRNO 2019

Abstrakt

Dizertační práce se zabývá problematikou elektroporace. Pojednává o její teoretické podstatě a věnuje se také modelování procesů, ke kterým dochází v tkáni během elektroporace. Dále popisuje technická řešení dvou vyvinutých unikátních experimentálních vysokonapěťových zdrojů stejnosměrných a střídavých pulzů pro účely elektroporace a diskutuje také experimenty, ke kterým byly zdroje využity.

Abstract

This dissertation thesis describes a phenomenon called electroporation. It is about its theoretical aspects as well as about modeling of processes in the tissue during electroporation. Further, it describes the technical design of two developed unique experimental generators of DC and AC pulses for electroporation purposes. It also includes a description of experiments which were done using discussed generators.

Klíčová slova

Ablační techniky, ireverzibilní elektroporace, modelování, Pennesova rovnice, reverzibilní elektroporace, vysokonapěťový zdroj

Keywords

Ablation techniques, irreversible electroporation, modeling, Pennes bioheat equation, reversible electroporation, high-voltage generator

Bibliografická citace

NOVOTNÁ, Veronika. Analýza elektrických a tepelných jevů při elektroporaci. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/122349>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Ústav výkonové elektrotechniky a elektroniky. Vedoucí práce Dalibor Červinka.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svoji dizertační práci na téma „Analýza elektrických a tepelných jevů při elektroporaci“ vypracovala samostatně pod vedením vedoucího dizertační práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené dizertační práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této dizertační práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4. Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu dizertační práce Ing. Daliboru Červinkovi, Ph.D. za přátelské vedení práce i za podnětné rady při jejím vypracovávání. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Ústavu výkonové elektrotechniky a elektroniky za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Dík patří také doc. Ing. Radoslavu Cipínovi, Ph.D. za podporu a odborné konzultace. Dále chci poděkovat všem spolupracujícím institucím, jmenovitě Radiologické klinice FN Brno, ICRC FNUSA, VFU Brno a Compex – Jett Cosmetics. Děkuji také svým studentům. V neposlední řadě chci poděkovat společnosti HUMUSOFT s.r.o. za poskytnutí licence k programu COMSOL Multiphysics 5.4. Velké díky za podporu patří také mé rodině a přátelům.

V Brně dne

.....

Obsah

Seznam obrázků	vi
Seznam tabulek	vii
Seznam symbolů	viii
Seznam zkratk	xi
Úvod	1
1 Současný stav poznání o buněčné elektroporaci	2
1.1 Historie elektroporace	2
1.2 Elektrické vlastnosti buněk a tkání	3
1.2.1 Cytoplazmatická membrána	3
1.2.2 Náhradní elektrické zapojení buňky	5
1.3 Vznik nanopórů v cytoplazmatické membráně	7
1.4 Vizualizace nanopórů	8
1.5 Reverzibilní elektroporace	9
1.6 Ireverzibilní elektroporace	9
1.7 Termální ablační techniky	11
1.7.1 Radiofrekvenční ablace	11
1.7.2 Mikrovlnná ablace	12
1.7.3 Ablace fokusovaným ultrazvukem	13
1.7.4 Laserová intersticiální ablace	13
1.7.5 Kryoablace	14
2 Cíle práce	15
2.1 Výpočet a vizualizace rozložení elektrického pole v tkáni	15
2.2 Provedení tranzientní tepelné analýzy a vizualizace rozložení teplotního pole v tkáni	15
2.3 Vývoj experimentálních zdrojů stejnosměrných a střídavých pulzů pro účely elektroporace	15
3 Matematické modelování elektroporace tkáně	16
3.1 Metody výpočtu šíření elektrického pole a tepla v tkáni	18
3.2 Analytické řešení Pennesovy rovnice přenosu tepla	18
3.2.1 Analytické řešení pro případ procházející cévy	20
3.2.2 Analytické řešení pro případ zásobující cévy	22
3.2.3 Výsledky analytických řešení Pennesovy rovnice přenosu tepla	23
3.3 Simulace elektroporace standardními jehlovými elektrodami	26
3.4 Simulace elektroporace plošnou elektrodou	33
3.5 Simulace elektroporace endokardiálním katetrem	39
3.6 Simulace elektroporace balónkovým katetrem	44
4 Experimentální zdroj stejnosměrných pulzů pro elektroporaci	48
4.1 Systém NanoKnife jako výchozí bod pro vývoj	48

4.2	Vývoj zdroje stejnosměrných pulzů pro IRE	50
4.2.1	Konstrukce zdroje stejnosměrných pulzů	51
4.2.2	Návrh pulzního transformátoru	52
4.2.3	Konstrukce silové části měniče	54
4.2.4	Řídicí obvody zdroje	54
5	Experimenty provedené pomocí zdroje stejnosměrných pulzů	57
5.1	Prvotní provozní zkouška přístroje	57
5.2	Termografické srovnání stejnosměrné IRE a RFA ex vivo	58
5.3	Srovnání účinků RFA a IRE in vivo	60
5.4	IRE pro léčbu okluze kovového stentu ve žlučových cestách	63
5.5	Endoluminální elektroporace pro léčbu obstrukce stentu	64
5.6	Zprůchodňování kovového stentu pomocí endoluminální IRE	64
5.7	Klinické ověření účinků elektroporace v žlučových cestách	65
5.8	Metodologie chirurgické techniky pro endoluminální IRE žlučových cest	66
5.9	Prevence benigní stenózy způsobené endoluminální IRE v žlučovodu	67
6	Experimentální zdroj střídavých pulzů pro elektroporaci	69
6.1	Návrh vysokofrekvenčního pulzního transformátoru	70
6.2	Řídicí obvody zdroje	73
6.2.1	Synchronizace aplikačních pulzů se srdečním rytmem	73
6.3	Měření impedance při elektroporaci	75
6.4	Vznik nežádoucího kapacitního proudu do země	75
6.5	Sekundární přínos použití sériové indukčnosti	77
7	Experimenty provedené pomocí zdroje střídavých pulzů	78
7.1	Ověření účinků AC IRE na epikardu	79
7.2	Endokardiální katetrová ablace	81
8	Zpřesnění matematického modelu tkáně	83
8.1	Identifikace parametrů náhradního zapojení tkáně	87
8.2	Identifikace parametrů upraveného náhradního zapojení tkáně	88
Závěr		92
Literatura		94

Seznam obrázků

1.1	Model fluidní mozaiky cytoplazmatické membrány	4
1.2	Elektrický model buňky s fenoménem elektroporace	6
1.3	Chování buněk ve frekvenční oblasti	6
1.4	Vznik nanopóru v cytoplazmatické membráně	7
1.5	Póry v cytoplazmatické membráně způsobené ireverzibilní elektroporací	8
1.6	Příklad umístění jehlových elektrod kolem nádorového ložiska při IRE	10
3.1	Geometrie modelu tkáně a cévy.	18
3.2	Znárodnění okrajových podmínek pro uvedené analytické řešení.	19
3.3	Závislost ekvivalentní délky cévy na koeficientu perfuze pro procházející cévu.	24
3.4	Závislost ekvivalentní délky cévy na koeficientu perfuze pro zásobující cévu.	24
3.5	Závislost rovnovážné teploty tkáně na koeficientu perfuze pro oba případy.	25
3.6	Závislost teploty tkáně na poloze $\tilde{r}$ a $\tilde{z}$ pro procházející cévu.	25
3.7	Závislost teploty tkáně na poloze $\tilde{r}$ a $\tilde{z}$ pro zásobující cévu	26
3.8	Geometrie modelu tkáně s jehlovými elektrodami.	28
3.9	Závislost elektrické vodivosti na velikosti intenzity elektrického pole pro jaterní tkáň.	28
3.10	Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	29
3.11	Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	29
3.12	Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	29
3.13	Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.	30
3.14	Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.	30
3.15	Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.	30
3.16	Vývoj teploty v modelu tkáně s jehlovými elektrodami v průběhu simulace pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole, v časech 1, 10, 50 a 100 s.	31
3.17	Rozložení teploty v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole po 50 s.	31
3.18	Vývoj teploty v modelu tkáně s jehlovými elektrodami v průběhu simulace pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole, v časech 1, 10, 50 a 100 s.	32
3.19	Graf vývoje teploty v prvních deseti pulzech pro model tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti nezávislé a závislé na intenzitě elektrického pole.	33
3.20	Geometrie modelu tkáně s plošnou elektrodou.	33
3.21	Závislost elektrické vodivosti na velikosti intenzity elektrického pole pro srdeční tkáň.	34
3.22	Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	35

3.23	Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	35
3.24	Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	35
3.25	Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.	36
3.26	Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.	36
3.27	Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.	36
3.28	Rozložení teploty v modelu tkáně s plošnou elektrodou pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole po 60 s při napětí 500, 600 a 800 V.	37
3.29	Rozložení teploty v modelu tkáně s plošnou elektrodou pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole po 60 s při napětí 800 V.	38
3.30	Graf vývoje teploty v prvních deseti pulzech pro model tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti nezávislé a závislé na intenzitě elektrického pole.	38
3.31	Geometrie modelu tkáně s endokardiálním katetrem.	39
3.32	Závislost elektrické vodivosti na velikosti intenzity elektrického pole pro vnitřní stěnu srdce.	40
3.33	Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	41
3.34	Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	41
3.35	Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	41
3.36	Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.	42
3.37	Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.	42
3.38	Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.	42
3.39	Rozložení teploty v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	43
3.40	Rozložení teploty v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.	43
3.41	Graf vývoje teploty pro model tkáně s endokardiálním katetrem v prvních deseti pulzech pro případ vodivosti nezávislé a závislé na intenzitě elektrického pole.	43
3.42	Geometrie modelu tkáně s balónkovým katetrem.	44
3.43	Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s balónkovým katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	45
3.44	Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s balónkovým katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	46
3.45	Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s balónkovým katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	46
3.46	Rozložení teploty v modelu tkáně s balónkovým katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	46
3.47	Graf vývoje teploty pro model tkáně s balónkovým katetrem v prvních deseti pulzech pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.	47

4.1	Zařízení NanoKnife pro IRE	48
4.2	Blokové schéma silové části zařízení NanoKnife pro IRE.	49
4.3	Vnitřní uspořádání zařízení NanoKnife.	49
4.4	Ověřování parametrů zařízení NanoKnife.	50
4.5	Průběhy napětí a proudu zobrazované v softwaru zařízení NanoKnife.	51
4.6	Ideální tvar výstupního napětí zařízení pro stejnosměrnou elektroporaci.	51
4.7	Blokové schéma silové části realizovaného zařízení pro DC IRE.	52
4.8	Pulzní transformátor zdroje DC pulzů.	53
4.9	Realizace vysokonapětového diodového usměrňovače.	54
4.10	Schéma silové části zdroje.	55
4.11	Řídicí deska.	56
4.12	Verze zdroje stejnosměrných pulzů pro elektroporaci	56
5.1	Operace <i>in vivo</i> na játrech vepře	57
5.2	Typický průběh proudu při stejnosměrném napětovém pulzu v měřítku 1V/20A.	58
5.3	Termografické měření	58
5.4	Termografické měření IRE	59
5.5	Termografické měření RFA	59
5.6	Schématický náčrt ablace pro IRE a RFA pro každé z testovaných slet obou skupin	61
5.7	Játra po ablaci RFA a IRE, samostatně a v kombinaci s doxorubicinem	62
5.8	Testovaná rozmístění stentu, elektrod a tkáně.	63
5.9	Operace <i>in vivo</i> v žlučovodu vepře	65
5.10	Snímky pracoviště při elektroporaci ve žlučových cestách.	66
5.11	Výsledky histopatologického vyšetření ablované tkáně. (a) Barvení hematoxylin-eosinem, zvětšení 100x; (b) Barvení orceinem, zvětšení 100x.	68
6.1	Ideální tvar výstupního signálu zařízení pro AC IRE.	70
6.2	Blokové schéma silové části realizovaného zařízení pro AC IRE.	70
6.3	Konstrukční provedení vysokofrekvenčního pulzního transformátoru.	71
6.4	Současná podoba zařízení pro H-FIRE	72
6.5	Blokové schéma kompletního systému pro <i>in vivo</i> experimenty	72
6.6	Křivka EKG s vyznačenou vulnerabilní fází pro síně a komory	73
6.7	Ukázka z experimentálního ověření funkčnosti synchronizace elektroporačních pulzů s EKG	74
6.8	Réleový přepínač pro účely měření impedance.	75
6.9	Průběh proudu před a po zařazení sériové indukčnosti.	76
6.10	Konstrukční provedení přídatné sériové indukčnosti.	77
7.1	Snímek pracoviště při ověřování účinku AC IRE na epikardu.	79
7.2	Experiment <i>in vivo</i> na srdci	79
7.3	Typický průběh napětí na aplikačním katetru a odpovídající proudová odezva.	80
7.4	Snímky pracoviště při endokardiální katetrové ablaci.	81
7.5	Katetry pro elektroanatomické mapování pomocí CARTO 3	82
8.1	Konfigurace experimentu měření impedance srdeční tkáně.	84
8.2	Přepočet RC článku.	84
8.3	Závislost modulu změřené impedance tkáně na úhlové frekvenci pro 800V a 200 kHz.	85
8.4	Závislost modulu změřené impedance tkáně na úhlové frekvenci.	86
8.5	Náhradní elektrické schéma tkáně.	87
8.6	Graf závislosti odporu R_2 na úhlové frekvenci.	88

8.7	Závislost modulu změřené a vypočtené impedance tkáně na úhlové frekvenci . .	88
8.8	Upravené náhradní elektrické schéma tkáně.	89
8.9	Závislost modulu změřené a vypočtené impedance tkáně na úhlové frekvenci. .	90
8.10	Proudová odezva na jednotkový skok napětí.	91
8.11	Detail proudové odezvy na jednotkový skok napětí.	91

Seznam tabulek

3.1	Hodnoty parametrů analytického řešení pro jaterní tkáň.	23
3.2	Hodnoty parametrů modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro jaterní tkáň. . . .	27
3.3	Hodnoty parametrů modelu tkáně s plošnou elektrodou pro srdeční tkáň.	34
3.4	Hodnoty parametrů modelu tkáně s endokardiálním katetrem.	40
3.5	Hodnoty parametrů modelu tkáně s balónkovým katetrem.	45
4.1	Specifikace zařízení NanoKnife pro IRE.	49
4.2	Požadované parametry nově navrhovaného zdroje stejnosměrných vysokonapěťových pulzů pro elektroporaci.	52
6.1	Výstupní parametry vyrobeného zdroje střídavých vysokonapěťových pulzů pro IRE.	69
7.1	Závislost míry svalových záškubů na velikosti napětí a frekvence.	81
8.1	Hodnoty RC pro jednotlivé řády modelu.	89

Seznam symbolů

Symbol	Popis	Jednotka
B	Magnetická indukce	T
Bi	Biotovo číslo	–
C_1	Náhradní kapacita C_1	F
C_2	Náhradní kapacita C_2	F
c_b	Měrná tepelná kapacita krve	$J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$
C_{mer}	Změřená kapacita C_2	F
C_m	Kapacita plazmatické membrány	F
c_p	Měrná tepelná kapacita	$J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$
c_t	Měrná tepelná kapacita tkáně	$J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$
D	Průměr	m
d	Délka	m
D_b	Výška segmentu krve	m
D_e	Průměr elektrody	m
d_e	Vzdálenost mezi elektrodami	m
D_t	Výška segmentu tkáně	m
ϵ_b	Relativní permitivita krve	–
ϵ_t	Relativní permitivita tkáně	–
E	Vektor intenzity elektrického pole	$V \cdot m^{-1}$
F	Faradayova konstanta	$C \cdot mol^{-1}$
f	Frekvence	Hz
h	Koeficient přenosu tepla v cévě	$W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$
I_0	Modifikovaná Besselova funkce prvního druhu nul-tého řádu	–
I_1	Modifikovaná Besselova funkce prvního druhu prvého řádu	–
I_1	Primární proud	A
I_2	Sekundární proud	A
I_2'	Sekundární proud přepočítaný na primární stranu	A
I_μ	Jmenovitý magnetizační proud	A
J	Proudová hustota	$A \cdot m^{-2}$
j	Imaginární jednotka	–
J	Vektor proudové hustoty	$A \cdot m^{-2}$
k	Tepelná vodivost tkáně	$W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$
k_b	Tepelná vodivost krve v cévě	$W \cdot m^{-1} \cdot K^{-1}$

Symbol	Popis	Jednotka
L_1	Primární indukčnost	H
N_1	Počet závitů primárního vinutí	–
N_2	Počet závitů sekundárního vinutí	–
N_p	Počet aplikovaných pulzů	–
Nu	Nusseltovo číslo	–
N_z	Počet elementárních nábojů iontu	–
P	Jouleovy ztráty	W
Pe	Pecletovo číslo	–
p_e	Jouleovy měrné objemové ztráty	$W \cdot m^{-3}$
$\tilde{P}$	Bezrozměrný koeficient perfuze	–
q_b	Měrné objemové teplo v cévě	$W \cdot m^{-3}$
q_m	Měrné objemové metabolické teplo	$W \cdot m^{-3}$
$\dot{q}_v$	Měrné objemové teplo	$W \cdot m^{-3}$
R	Molární plynová konstanta	$J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$
r	Poloměr	m
$\tilde{r}$	Bezrozměrný poloměr	–
R_0	Náhradní odpor R_0	Ω
R_1	Náhradní odpor R_1	Ω
R_2	Náhradní odpor R_2	Ω
r_b	Poloměr cévy	m
R_e	Odpor extracelulárního média	Ω
R_{ep}	Odpor měnící se vlivem elektroporace	Ω
ρ	Hustota hmoty	$kg \cdot m^{-3}$
ρ_b	Hustota krve	$kg \cdot m^{-3}$
ρ_t	Hustota tkáně	$kg \cdot m^{-3}$
R_i	Odpor intracelulárního média	Ω
R_{mer}	Změřený odpor R_{mer}	Ω
R_m	Svodový odpor plazmatické membrány	Ω
r_t	Poloměr segmentu tkáně	m
σ	Měrná elektrická vodivost	$S \cdot m^{-1}$
S_{Fe}	Průřez jádra transformátoru	m^2
σ_b	Měrná elektrická vodivost krve	$S \cdot m^{-1}$
σ_t	Měrná elektrická vodivost tkáně	$S \cdot m^{-1}$
St	Stantonovo číslo	–
T	Absolutní teplota	$^{\circ}C$
t	Čas	s
T_0	Počáteční teplota	$^{\circ}C$
T_b	Teplota arteriální krve	$^{\circ}C$
θ	Úhel	rad
$\tilde{\vartheta}_s$	Bezrozměrná teplota cévní stěny	–
$\tilde{\vartheta}$	Bezrozměrná teplota	–
$\tilde{\vartheta}_a$	Bezrozměrná arteriální teplota	–
$\tilde{\vartheta}_b$	Bezrozměrná teplota krve	–
$\tilde{\vartheta}_{b,i}$	Vstupní bezrozměrná teplota krve v cévě	–
$\tilde{\vartheta}_{b,\infty}$	Bezrozměrná rovnovážná teplota krve v cévě	–

Symbol	Popis	Jednotka
T_p	Délka pulzu	s
T_t	Teplota tkáně	°C
U_1	Napětí na primárním vinutí transformátoru	V
$U_{1\max}$	Maximální napětí na primárním vinutí transformátoru	V
$U_{1\min}$	Minimální napětí na primárním vinutí transformátoru	V
U_2	Napětí na sekundárním vinutí transformátoru	V
U_K	Klidové membránové napětí	V
U_p	Napětí aplikovaného pulzu	V
V	Objem	m ³
v_b	Střední rychlost krve v artérii	m·s ⁻¹
φ	Elektrický potenciál	V
ω	Úhlová rychlost	rad·s ⁻¹
ω_b	Perfuze krve na jednotku objemu tkáně	kg·m ⁻³ ·s ⁻¹
$\omega_{\max}$	Maximální úhlová rychlost	rad·s ⁻¹
$\mathcal{X}$	Pomocná proměnná	–
Y_0	Besselova funkce druhého druhu nultého řádu	–
Y_1	Besselova funkce druhého druhu prvního řádu	–
z	Délka cévy	m
$\tilde{z}$	Bezrozměrná délka cévy	–
$\tilde{z}_{\text{eq}}$	Bezrozměrná ekvivalentní délka cévy	–
$Z_{\max}$	Maximální impedance	Ω
$Z_{\min}$	Minimální impedance	Ω

Seznam zkratek

Zkratka	Popis
AC	Střídavý proud
AF	Atriální fibrilace
AP	Akční potenciál
AST	Aspartátaminotransferáza
ATP	Adenosintrifosfát
CRYO	Kryoablace
CT	Počítačová tomografie
DC	Stejnoseměrný proud
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EAM	Elektroanatomické mapování
ECT	Elektrochemoterapie
EKG	Elektrokardiografie
EM	Extracelulární médium
FNUSA	Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně
FPGA	Programovatelné hradlové pole
H-FIRE	Vysokofrekvenční ireverzibilní elektroporace
HIFU	Ablace fokusovaným ultrazvukem
ICRC	Mezinárodní centrum klinického výzkumu
IKEM	Institut klinické a experimentální medicíny
IM	Intracelulární médium
IRE	Ireverzibilní elektroporace
LIFO	Last in first out
LITT	Laserová intersticiální ablace
MKD	Metoda konečných diferencí
MKP	Metoda konečných prvků
MRI	Magnetická rezonance
MWA	Mikrovlnná ablace
PET	Pozitronová emisní tomografie
RE	Reverzibilní elektroporace
RFA	Radiofrekvenční ablace
RNA	Ribonukleová kyselina
RTG	Rentgen
SPECT	Jednofotonová emisní výpočetní tomografie
VFU	Verinární a farmaceutická univerzita Brno

Úvod

Medicínské technologie patří mezi nejrychleji se rozvíjející vědecké disciplíny. Stále se vyvíjí nové přístroje a metody. Chirurgické zákroky jsou kratší, robotizované a minimálně invazivní. Léčba je cílená nebo navržena přímo na míru každého pacienta. Mezi časté potíže patří například rakovinová onemocnění či nemoci kardiovaskulárního systému.

Tato práce se zabývá speciální metodou zvanou elektroporace, která slouží k léčbě zmíněných onemocnění. Práce se věnuje elektroporaci po teoretické, technické i uživatelské stránce. Konkrétně pojednává o modelování šíření elektrického pole a tepla v elektroporované tkáni, věnuje se technickému řešení nových experimentálních zdrojů stejnosměrných a střídavých vysokonapěťových pulzů pro účely elektroporace a v neposlední řadě také experimentům, ke kterým byly tyto zdroje využity.

Práce má za cíl pomoci rozšířit povědomí o metodě ireverzibilní elektroporace, najít nové oblasti aplikace této techniky, zpřístupnit ji širšímu okruhu vědeckých a lékařských týmů díky vyvíjeným přístrojům a přispět tak k řešení řady závažných lékařských diagnóz.

1 | Současný stav poznání o buněčné elektroporaci

Elektroporace je jev, při kterém se pomocí krátkého vysokonapětového pulzu zvýší propustnost buněčné membrány pro makromolekuly a ionty. Tento neřízený pohyb molekul přes plazmatickou membránu je umožněn díky nanopórům, které se zde vytvoří právě působením elektrického proudu. Tyto póry vznikají v membráně buď dočasně, pak elektroporaci nazýváme reverzibilní (RE) neboli vratnou, a nebo jsou póry trvalé a dochází k ireverzibilní (IRE), tzv. nevratné elektroporaci. V takovém případě buňka není schopna zacelení vzniklých pórů a zahyne buněčnou smrtí zvanou apoptóza, viz [1].

Skutečnost, zda bude poškození membrány vratné nebo nevratné, je závislá na řadě faktorů. Mezi tyto faktory patří jednak vlastnosti aplikovaných pulzů (napětí, proud, tvar, délka, amplituda, frekvence či počet pulzů a časový interval mezi nimi), ale také vlastnosti buněk a tkání v daném elektrickém poli (typ tkáně nebo buněk, tvar, velikost, hustota, teplota, vodivost buněk, jejich orientace vůči směru působení elektrického pole, pružnost a propustnost membrány, apod.), viz [2].

1.1 Historie elektroporace

První zmínka o fenoménu elektroporace pochází již z roku 1754, kdy J. A. Nollet popsal vznik červených skvrn na pokožce lidí a zvířat způsobených aplikací elektrických jisker. Během 18. a 19. století se zájem o bioelektrické jevy dále prohluboval. Do této éry patří například pokusy L. Galvaniho a A. Volty s pohybem svalů mrtvých žab či objev elektrofyziologie J. W. Richterm, viz [1].

Pravděpodobně první práce zabývající se IRE byla studie G. W. Fullera o baktericidním účinku vysokonapětových výbojů při čištění vody v řece Ohio. Ve druhé polovině 20. století již byl akceptován dnešní pohled na elektroporaci. Tedy, že elektrické pole může mít termální i netermální účinek a způsobuje rozrušení buněčné membrány. Výzkum IRE probíhal paralelně v biomedicině a v technologiích zpracování potravin. Reverzibilní elektroporace se také stala velmi populární v biotechnologiích a medicíně a to díky objevům s fúzí buněk a zaváděním genů do buňky. Od roku 1987 byly prováděny pokusy nejen s buňkami, ale také s tkáněmi. Od devadesátých let je RE používána pro komerční a klinické aplikace. Ať už je to zavádění plazmidové DNA do živých buněk či léků proti rakovině do maligních buněk, podrobněji viz [1,3,4].

V roce 2004 C. Yao se svým týmem provedli řadu experimentů s rychle rostoucími (200 ns) a pomalu exponenciálně klesajícími (200 μ s) elektrickými pulzy tvořenými vybíjením konden-

zátoru, viz [5]. Prováděli *in vivo*¹ ablaci² a zpomalování růstu nádoru. Byli tak pravděpodobně první vědci, kteří získali empirická data o ablačních schopnostech ireverzibilní elektroporace.

Nejvýraznějšími jmény v oblasti elektroporace jsou však R.V. Davalos, B. Rubinsky a Ch.B. Arena, kteří mají na svém kontě celou řadu vědeckých publikací, viz např. [6–11] a patentových přihlášek např. [12, 13]. V roce 2007 byl na americký trh uveden firmou AngioDynamics první komerčně dostupný přístroj pro ireverzibilní elektroporaci NanoKnife. Toto zařízení se skládá ze zdroje vysokonapětových pulzů a jednorázových jehlových elektrod, viz [1, 14].

Pro vysoké finanční náklady, je toto zařízení obtížně dostupné pro velké množství organizací v České republice. Z tohoto důvodu byla v roce 2014, na přání lékařů z Radiologické kliniky Fakultní nemocnice Brno, zkonstruována první verze experimentálního zdroje stejnosměrných vysokonapětových pulzů pro účely elektroporace (tzv. DC IRE generátor), viz kapitola 4. Stalo se tak na Ústavu výkonové elektrotechniky a elektroniky Fakulty elektrotechniky a komunikačních technologií Vysokého učení technického v Brně (UVEE VUT). Zařízení bylo podrobeno celým řadám pokusů a stále se pracuje na jeho vylepšování a aplikování v různých lékařských experimentech několika vědeckých týmů.

Od roku 2011 se začaly objevovat také práce zkoumající elektroporaci vyvolanou střídavými elektrickými pulzy a v roce 2016 si Ch. Arena, R. Davalos a M. Sano patentovali zařízení pro vysokofrekvenční elektroporaci nádorů H-FIRE, viz [15]. Toto zařízení však zatím není komerčně dostupné. Lze také najít další patenty podobného druhu sloužící pro specifické aplikace v lékařství, viz např. [16, 17]. Od roku 2017 probíhá na UVEE VUT také vývoj zdroje pro vysokofrekvenční ireverzibilní elektroporaci (tzv. AC IRE generátor), viz kapitola 6. V roce 2019 byla podána česká patentová přihláška na technické řešení tohoto zdroje a jeho použití v kardiologii.

1.2 Elektrické vlastnosti buněk a tkání

1.2.1 Cytoplazmatická membrána

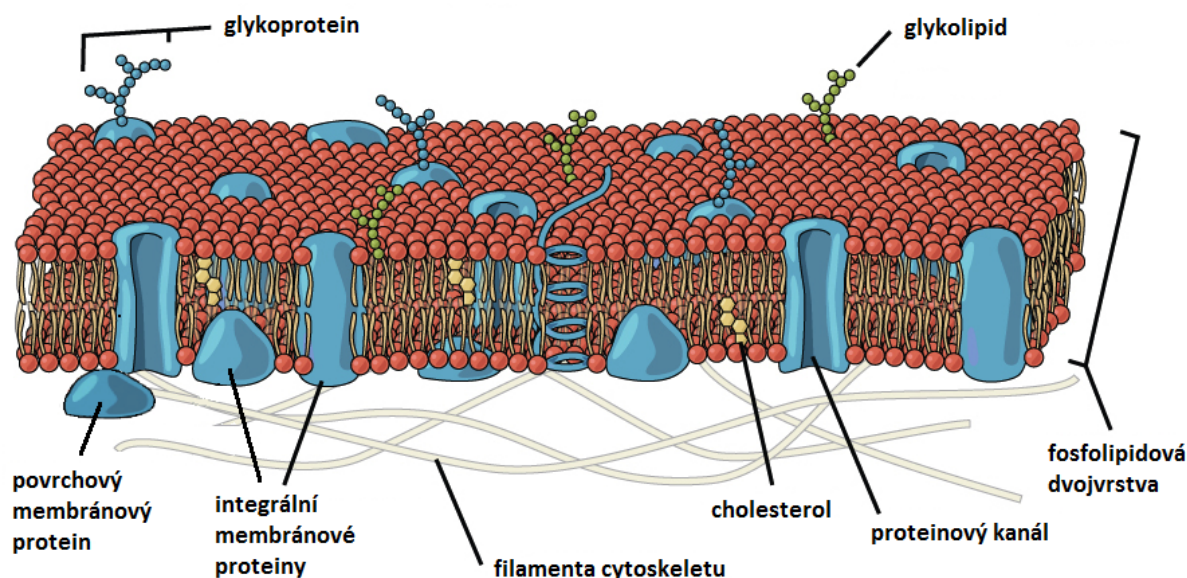
Pro pochopení jevu elektroporace, je užitečné vědět, jak vypadá plazmatická membrána buňky. Cytoplazmatická membrána je vrstva ohraničující buňku od jejího vnějšího prostředí, tedy odděluje intracelulární (IM) a extracelulární médium (EM) buňky. Membrána buňku chrání a zprostředkovává látkovou výměnu a komunikaci s jejím okolím. Je semipermeabilní, neboli selektivně propustná pro organické molekuly a ionty a reguluje tak jejich obsah v buňce. Podílí se také na buněčných procesech, jako je buněčná signalizace, vodivost či adheze. Šířka membrány se pohybuje v rozmezí 8 – 10 nm, kdy v literatuře nejčastěji uváděná tloušťka je přibližně 7,5 nm, viz [18].

Membránu lze popsat tzv. modelem fluidní mozaiky, viz Obr. 1.1, který byl poprvé navržen v roce 1972. Dle tohoto modelu je membrána dynamická struktura a její komponenty se neustále pohybují, pokud nejsou vázány na vnitrobuněčné struktury. Membrána se skládá z fosfolipidů, proteinů, cholesterolu, glykolipidů a glykoproteinů a dalších přidružených molekul, viz [19].

Hlavním stavebním kamenem cytoplazmatické membrány jsou fosfolipidy. Ty se spontánně uspořádávají do dvojvrstvy o šířce přibližně 5 nm. V rámci fluidní mozaiky jsou fosfolipidy schopny tří různých pohybů; laterálního, rotačního a velmi vzácně může dojít i k translokaci. Každý fosfolipid se skládá ze dvou mastných kyselin (uhlovodíkových řetězců) vázaných na

¹*in vivo* – lat. „v živém“. Pokusy na organismu, lidském nebo zvířecím.

²ablace – Odstranění části těla či tkáně.



Obr. 1.1: Model fluidní mozaiky cytoplazmatické membrány, převzato z [19].

glycerol, na jehož třetí hydroxyl se prostřednictvím fosfátové skupiny váže cholin nebo látka podobného charakteru. Tato formace způsobuje, že uhlovodíkové konce jsou hydrofobní, nepolární a druhý konec komplexu je hydrofilní a polární. Hydrofobní konce směřují dovnitř dvojvrstvy a hydrofilní jsou na povrchu membrány. Z tohoto důvodu je pro vodu a jiné polární a nabitě molekuly složité projít přes hydrofobní jádro membrány, viz [18–20].

Kromě fosfolipidů obsahuje cytoplazmatická membrána již zmiňované proteiny. Mezi dvě nejdůležitější kategorie proteinů patří proteiny integrální a povrchové. Integrální bílkoviny prostupují celou membránou (transmembránové proteiny) nebo se do ní jen částečně zanořují. Transmembránové proteiny mohou být dlouhé řetězce procházející skrz membránu až dvanáctkrát. Některé z těchto proteinů tvoří kanály a pumpy, které jsou významné pro řízení pohyb iontů přes membránu. Buněčná membrána je také asymetrická, což znamená, že složení vnitřní a vnější monovrstvy se mírně liší. Každá z vrstev obsahuje různé množství fosfolipidů, glykolipidů i proteinů, viz [18, 19].

Z hlediska membránového potenciálu je nejdůležitější Na^+ / K^+ pumpa. Tento mechanismus vytěsňuje molekuly Na^+ ven z buňky výměnou za ionty K^+ a udržuje jejich koncentrace v obou médiích různé. Sodíkové ionty převažují uvnitř buňky a draslíkové vně. Činnost této pumpy lze přirovnat k současnému nabíjení dvou akumulátorových zdrojů. Její funkce vyžaduje stálý přísun energie ve formě molekul adenosintrifosfátu (ATP); je tedy příkladem aktivního transportu. Koncentrační gradient těchto dvou iontů vytváří zdroje elektrického napětí, poskytující energii potřebnou pro generování a šíření impulzů akčního napětí u excitabilních buněk (nervové a svalové buňky). V důsledku své činnosti vede k vytvoření koncentračních gradientů také vápníkových a chlorových iontů. Ca^{2+} i Cl^- převažují v extracelulárním prostoru, viz [18, 20].

Membránové kanály jsou dalším transportním mechanismem. Tyto kanály nemají pevná vazebná místa a vytvářejí v membráně póry selektivně propustné pro různé ionty. Jejich otevírání a uzavírání (tzv. vrátkování) je náhodný proces, jenž je závislý na membránovém napětí. Vrátkování kanálu však může být podníceno i chemickou reakcí nebo mechanickým napětím. Ionty neprocházejí kanálem zcela volnou difúzí, ale kanály jsou vždy více či méně selektivní. Z tohoto důvodu mluvíme o draslíkových, sodíkových, vápníkových a chlorových kanálech.

Díky nerovnoměrnému rozložení hlavních iontů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) v EM a IM se na membránách všech živých buněk udržuje klidové membránové napětí (U_K). Například v neuronech je přibližně na hodnotě -70 mV. Excitabilní buňky (nervové a svalové) pak mohou reagovat na stimuly vedoucí ke změně propustnosti pro tyto ionty a vzniku a šíření akčního potenciálu (AP), viz [18]. Jeho šíření je nelineární pasivní jev, který však značně závisí na transmembránovém napětí.

Pokud by byla membrána propustná například pouze pro draslíkové ionty, při iontovém rozložení uvedeném výše, budou mít draslíkové ionty tendenci difuzně prostupovat membránou přes kanály z buňky do vnějšího prostoru. Dojde tak k přenosu náboje a naruší se elektrická rovnováha. Buňka získá negativní potenciál vůči jejímu okolí a v membráně se vytvoří elektrické pole. Elektrický gradient membrány působí proti koncentračnímu gradientu iontů. V rovnováze se ustaví rozdíl potenciálů, tj. membránové napětí, při němž je elektrický proud protékající membránou nulový. Toto napětí se nazývá rovnovážné neboli klidové a závisí na rozložení iontů v obou prostředích, viz [18]. Lze jej vyjádřit pomocí Nernstovy rovnice, která v obecném tvaru platí pro všechny ionty.

$$U_K = \frac{RT}{N_z F} \ln \frac{[X^z]_e}{[X^z]_i}, \quad (1.1)$$

kde R je molární plynová konstanta ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T je absolutní teplota, F je Faradayova konstanta ($96,485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), $\ln$ je přirozený logaritmus poměru koncentrací daného iontu X v EM a IM [18] a N_z je počet elementárních nábojů iontu. Rovnovážné membránové napětí je přibližně rovno ekvilibriu draslíkových iontů. K vytvoření rovnováhy stačí přenos jen malého množství iontů přes membránu, kdy se prakticky nemění jejich koncentrace v obou prostředích. Stejně tak celková hustota náboje v IM a EM zůstává nulová. Vzájemně opačné náboje se plošně rozloží na vnější a vnitřní straně nevodivé fosfolipidové membrány, tak jako náboje na deskách nabitého kondenzátoru.

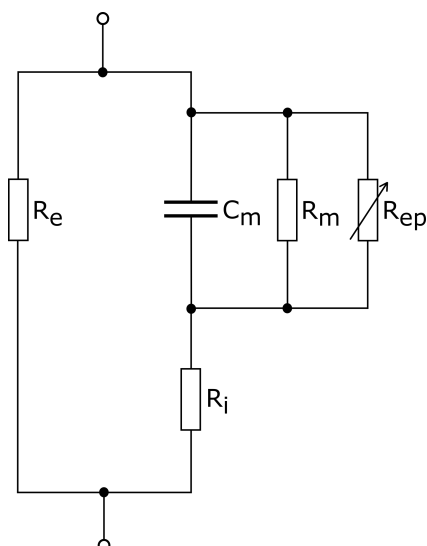
1.2.2 Náhradní elektrické zapojení buňky

Jak již bylo naznačeno, buňky mají elektrické vlastnosti. Lze tedy sestavit náhradní elektrické schéma popisující pasivní elektrické vlastnosti buněk. Elektrický model buňky, který je více-méně platný dodnes, navrhl Fricke ve dvacátých letech dvacátého století.

Základní náhradní zapojení buňky obsahuje odpor R_e reprezentující extracelulární médium, který je zapojen paralelně se sériovým zapojením odporu vnitřního prostředí R_i a kapacitou plazmatické membrány C_m a tvoří tak vlastně RC obvod. Pokud toto schéma zapojíme sérioparalelně, získáme náhradní zapojení tkáně.

Pro účely elektroporace je třeba základní schéma modifikovat. Nejčastěji lze v literatuře nalézt rozšířený model, který je na Obr. 1.2. K základnímu zapojení je přidán svodový odpor membrány R_m , protože membrána není perfektní dielektrikum a dochází k unikání proudu přes iontové kanály. Dále je zde navíc proměnný odpor R_{ep} reprezentující proces elektroporace, viz [1, 18]. Ani tento model však není zcela dokonalý pro určení jmenovaných parametrů. Problematice změny impedance během elektroporačního procesu a další modifikaci modelu buňky se věnuje kapitola 8.

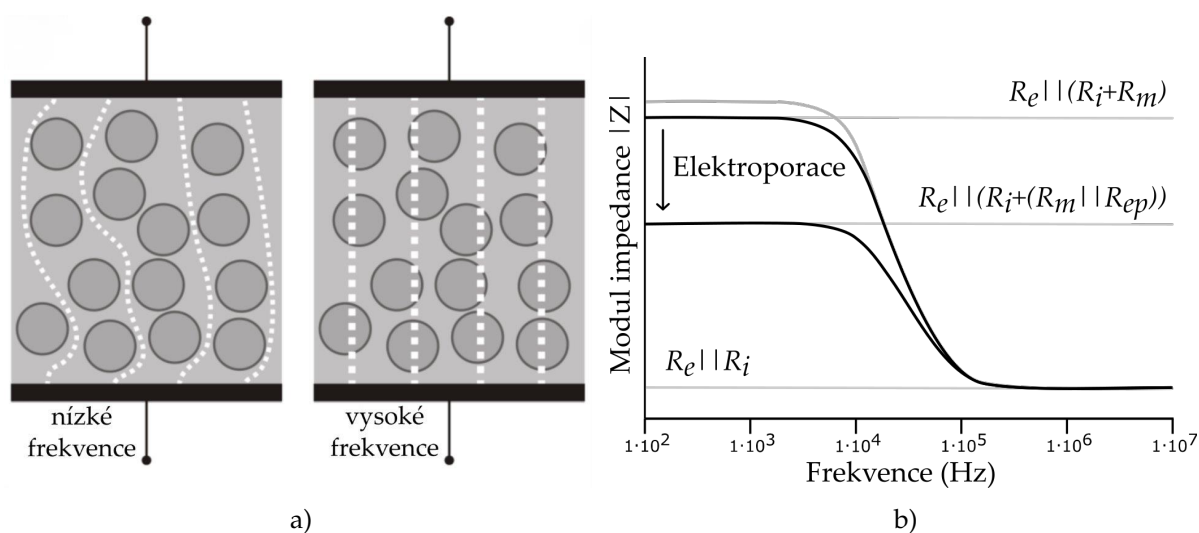
Jak bylo řečeno, plazmatickou membránu lze chápat jako dielektrikum oddělující dvě vodivá prostředí, extracelulární a intracelulární médium, s nerovnoměrným rozdělením hlavních iontů. Typicky se uvádí hodnota měrné kapacity biologické membrány asi $1 \text{ } \mu\text{F} \cdot \text{m}^{-2}$. Pro vodivost extracelulárního prostoru se nejčastěji využívá hodnoty vodivosti krevní plazmy při 37°C ,



Obr. 1.2: Elektrický model buňky s fenoménem elektroporace [1].

tedy $1,5 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ (rezistivita $0,66 \text{ } \Omega \cdot \text{m}$). Pro vodivost intracelulárního prostoru se volí hodnota okolo $0,6 \text{ S} \cdot \text{m}^{-1}$ (rezistivita $1,66 \text{ } \Omega \cdot \text{m}$).

Buňky mají rozdílné chování v nízkofrekvenční a vysokofrekvenční oblasti, viz Obr. 1.3. Přejít mezi nimi je u většiny živočišných buněk oblast mezi 10 kHz a 1 MHz, viz [1]. Při nízkých frekvencích proud prochází primárně extracelulárním médiem. Naopak při vysokých frekvencích prochází proud volně i přes buňky vlivem poklesu impedance buněčných membrán. Z toho plyne, že celková impedance je vyšší při nižších frekvencích a naopak.



Obr. 1.3: (a) Chování buněk ve frekvenční oblasti a (b) idealizovaný graf závislosti modulu impedance na frekvenci v živé tkáni [1].

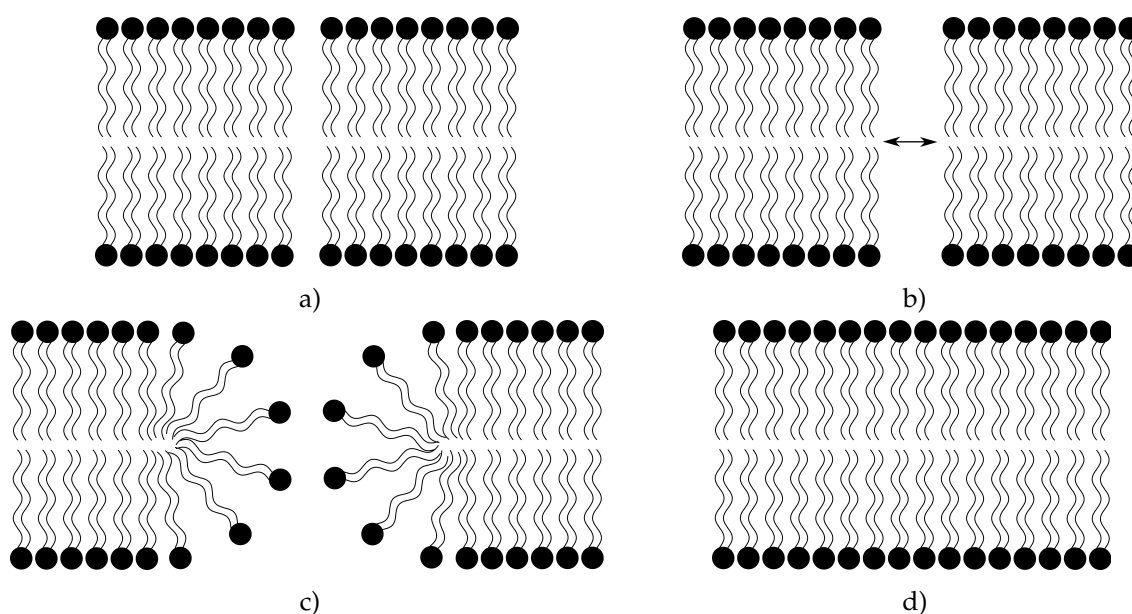
Pokud je buňka vystavena externímu elektrickému pulzu, výsledkem je rychlá změna membránového napětí, může dojít k mechanickému poškození membrány následované změnou iontového složení vně a uvnitř buňky, jak již bylo diskutováno. Stane se tak pokud membránový potenciál překročí určitou prahovou hodnotu cca 0,2 až 1 V, viz [21, 22].

1.3 Vznik nanopórů v cytoplazmatické membráně

Je-li buňka vystavena dostatečně velkému elektrickému poli, dochází v membráně k určitým změnám, které vedou k její propustnosti pro makromolekuly. Proces vzniku těchto pórů však není zcela objasněn. Relativně dobré znalosti máme o dvou speciálních případech mechanismu ireverzibilní elektroporace. Jedním z nich je elektroporace planární lipidové membrány. Tyto pokusy byly prováděny již v roce 1979, viz [1].

Druhý případ je IRE buněk či tkání vystavených ultrakrátkému (stovky nanosekund) vysokonapěťovému pulzu (stovky kV/cm). Takovéto pulzy způsobují tzv. supraelektroporaci, kdy jsou proděravěny přímo membrány intracelulárních organel (např. mitochondrií) bez nevratného poškození plazmatické membrány, viz [1].

Vznik pórů po aplikaci pulzu je velmi rychlý. Póry se začnou utvářet v prvních milisekundách po pulzaci. Počáteční průměr pórů je kolem 1 nm. V řádu několika milisekund až sekund se rapidně zvětší. V čase kolem 40 ms se jejich velikost pohybuje v rozmezí 20 nm až 120 nm. V momentě maximální vodivosti membrány však zabírají asi jen 0,1 % plochy elektroporované membrány, viz [23]. I tak zprostředkovávají masivní transport elektrolytů mezi IM a EM.



Obr. 1.4: Vznik nanopóru v cytoplazmatické membráně. (a) Vznik hydrofobního póru, (b) rozšiřování hydrofobního póru, (c) stabilizace póru – změna z hydrofobního na hydrofilní pór, (d) zacelení membrány, viz [24,25].

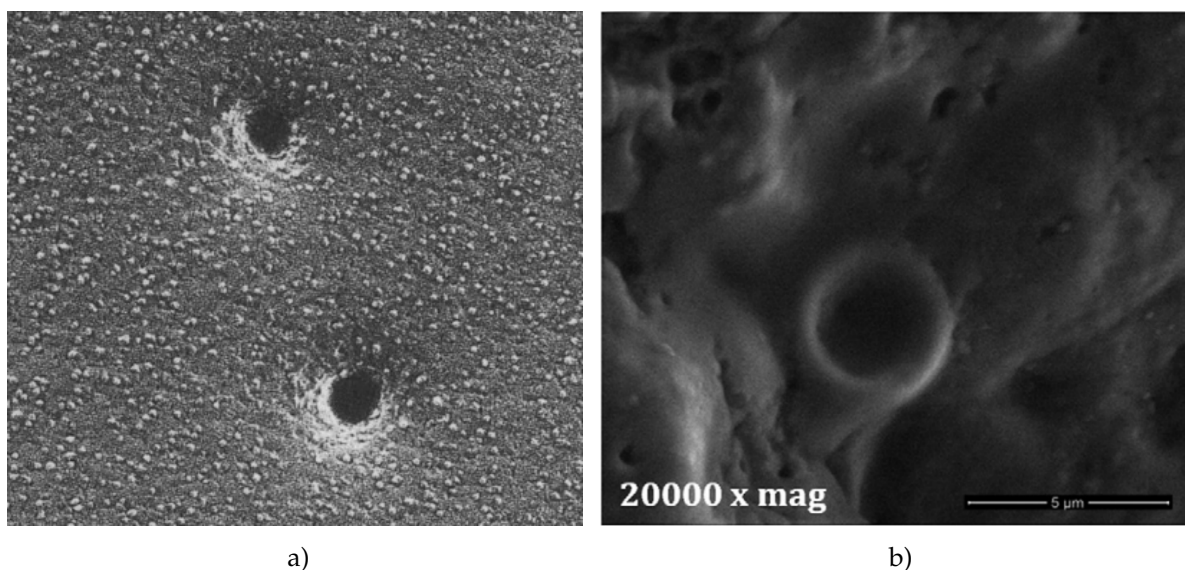
Vznik nanopórů je následkem teplotních změn, s tím že míra vzniku pórů roste nelineárně s vyšší hodnotou membránového napětí. Když už se pór vytvoří, jeho stabilita závisí na energii póru, což je suma mechanické a elektrické energie. Nejdříve se vytvoří hydrofobní pór, viz Obr. 1.4 a). V závislosti na působícím elektrickém poli se můžou pory dále rozšiřovat, viz Obr. 1.4 b). Pokud dosáhne hodnota lokálního membránového napětí metastabilního stavu, pory se stabilizují a mění se v hydrofilní, viz Obr. 1.4 c). Vznikající pory vytváří nelineární hysterzní nárůst vodivosti membrány, která dále interaguje s vnějšími vodivými drahami. Na místě kde došlo k elektroporaci se tedy prudce změní elektrická vodivost a odpor membrány prudce klesne. Tento pokles odporu však mění míru vzniku dalších pórů. Lokální membránové napětí v místě pórů je menší než průměrné membránové napětí na zbytku membrány buňky, což je

zřejmě způsobeno lokální nehomogenitou elektrického pole v důsledku míchání elektrolytů na obou koncích každého z pórů. Tím, že se póry zvětšují, lokální membránové napětí v póru samotném klesá, což růst pórů zpomaluje, viz [21, 24]. Vzniklé hydrofilní póry umožňují vstup makromolekul do buňky. Pokud externí elektrické pole přestane působit, může se membrána zase zacelit, viz Obr. 1.4 d), tedy došlo k reverzibilní elektroporaci. V opačném případě k zacelení pórů už nedojde a buňky umírá a dochází tedy k ireverzibilní elektroporaci.

Proces zacelení pórů je ještě méně jasný než proces jejich vzniku. Póry v lipidové dvojvrstvě jsou obecně metastabilní. Jejich životnost je při teplotě 25 °C jen okolo 1 s. Velikost pórů se po určité době ustálí a poté se začnou znova zacelovat. Tedy jakmile začne klesat indukované transmembránové napětí způsobené aplikovaným pulzem, dojde ke zpomalení procesu rozšiřování pórů. Děje se tak díky vybíjení přes membránové kanály, viz [24]. Nejdříve se pravděpodobně uzavřou jen částečně a k úplnému zacelení pórů o průměru asi 1 nm dochází v řádu desítek minut, viz [26].

1.4 Vizualizace nanopórů

Výsledky experimentů ani simulací nejsou dostačující pro dokonalou představu o tom jak nanopóry vypadají a co se v membráně při elektroporaci skutečně děje. V průběhu zkoumání procesu elektroporace bylo provedeno několik pokusů o vizualizaci nanopórů.



Obr. 1.5: Póry v cytoplazmatické membráně způsobené ireverzibilní elektroporací (a) převzato z [26] a (b) převzato z [27].

Poměrně jednoduše lze účinky elektroporace prokázat absorbcí makromolekul z okolí do buněk, což je jedna z hlavních aplikací reverzibilní elektroporace. Typicky jsou buňky suspen-dované ve vodném prostředí s vysokou koncentrací nabitých látek značených například fluorescenčním barvivem. Po aplikaci pulzů se tyto molekuly dostanou dovnitř buněk a lze je pak sledovat ve fluorescenčním mikroskopu. Stejně tak lze zkoumat tenké řezy elektroporované tkáně barvené hematoxylyem a eosinem pomocí optického mikroskopu nebo kontrastované ultratenké řezy pomocí transmisního elektronového mikroskopu a určit tak rozsah elektroporace, viz [28]. Tyto pokusy prokazují spíše funkčnost metody a chování tkáně po elektroporaci, ale nezobrazují přímo vzhled nanopóru.

Opravdovou vizualizací vzniklých pórů se zabýval málokdo. Většina odborných publikací se odkazuje na [26] a [27]. Chang v [26] využil k zobrazení nanopórů tzv. freeze-fracture electron microscopy, kdy se vzorek rychle zmrazí, rozlomí, vytvoří se replika a zobrazí se v elektronovém mikroskopu, viz Obr. 1.5 a). Lee v [27] zobrazil nanopóry pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (NanoSEM), viz Obr. 1.5 b). Na základě uvedených obrázků je diskutabilní jestli se jedná opravdu o póry způsobené elektroporací.

1.5 Reverzibilní elektroporace

Reverzibilní elektroporace je proces, kdy v buněčné membráně vznikají dočasné póry jako důsledek aplikace krátkého vysokonapěťového pulzu. Jejich vznik i zacelování jsou popsány v kapitole 1.3.

Reverzibilní elektroporace je hojně využívaná metoda pro vpravování léčiv, chemikálií, barev, cizích genů, DNA, RNA a jiných molekul, které za normálních podmínek neprojdou přes buněčnou membránu dovnitř buňky. Využívá se také pro buněčnou fúzi a transdermální aplikaci léků proti rakovině (elektrochemoterapie – ECT). Je tedy užitečná v biomedicínských aplikacích, mikrobiologii nebo genovém inženýrství, viz [1, 26]. Pomocí reverzibilní elektroporace je také možné zprůchodňovat žlučové a močové cesty. V této problematice byly prováděny experimenty ve spolupráci s Radiologickou klinikou Fakultní nemocnice Brno Bohunice. Experimentům se dále věnuje kapitola 5.

1.6 Ireverzibilní elektroporace

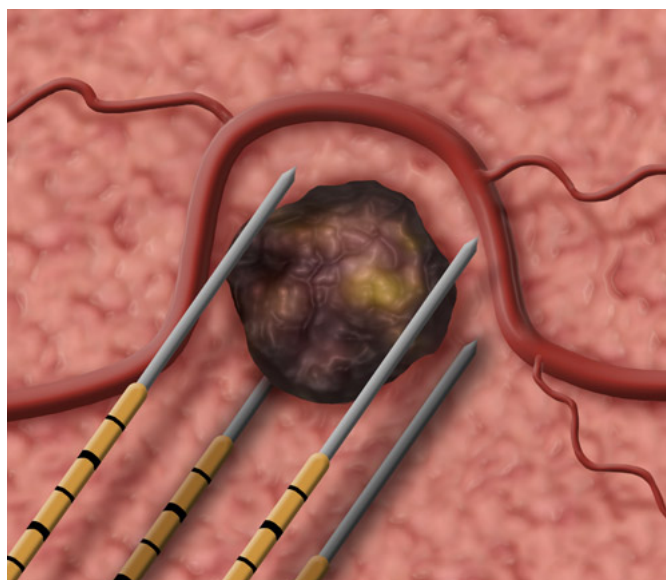
Ireverzibilní neboli nevratná elektroporace (IRE) vzniká při dostatečně intenzivním elektrickém impulzu, kdy membrána již není schopna póry zacelit. K tomuto dochází tehdy, dosáhne-li elektrická intenzita v elektroporované tkáni hodnoty okolo $800 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, viz [1].

Jak již bylo zmíněno, IRE byla v minulosti využívána spíše pro odstraňování bakterií a mikroorganismů z potravin a tekutin. Až od roku 2004 se o ní můžeme dočíst jako o ablační technice a to hlavně zásluhou Rafaela V. Davalose a Borise Rubinskeho. Právě tato dvě jména se nejčastěji objevují ve vědeckých publikacích o tématu IRE. Nejčastěji využívaným zařízením pro IRE je pak systém NanoKnife od firmy AngioDynamics, diskutovaný v kapitole 4.1.

Ireverzibilní elektroporace je netermální, minimálně invazivní ablační metoda, která za použití vysokonapěťových pulzů podněcuje přirozenou buněčnou smrt (apoptózu). Nezpůsobuje zánět ani nežádoucí imunoreakci, viz [2]. Přes nanopóry v membráně z buňky odchází voda a jiné důležité molekuly. Buňka se nejdříve sraší a poté uhynie. Buněčné zbytky jsou eliminovány imunitním systémem. Tím se uvolní prostor pro buněčnou regeneraci zdravé tkáně, na rozdíl od tepelných ablačních technik, kdy po zákroku dochází k fibróze a jizvení. Podle [1] a [28] dochází k regeneraci tkáně po zákroku IRE asi po 14 dnech.

IRE je alternativou k termálním ablačním technikám, mezi něž patří zejména radiofrekvenční ablace (RFA), mikrovlnná ablace (MWA) a kryoablace (CRYO), jež jsou diskutovány v kapitole 1.7. Jak názvy napovídají, tyto metody využívají termální změny pro destrukci nežádoucí tkáně. Ničí tedy veškerou tkáň v daném prostoru včetně pojivové tkáně a citlivých struktur jako jsou cévy, nervy, průdušky, žlučové nebo močové cesty. IRE tyto struktury ovlivňuje jen minimálně. Vyznačuje se také kratší délkou zákroku, schopností léčit větší nádorová ložiska, čistým

ohraničením elektroporované oblasti, minimálním teplotním rozptylem do okolí a není negativně ovlivněna protékající krví v přilehlých cévách. IRE se zpravidla provádí intraoperačně, laparoskopicky nebo perkutánně, viz [29]. Při standardní proceduře jsou do těsné blízkosti nádoru umístěny jehlové elektrody, viz Obr. 1.6. Přesné umístění elektrod je kontrolováno pomocí výpočetní tomografie (CT) nebo magnetické rezonance (MRI). Série pulzů je následně aplikována vždy mezi dvěma aktivními elektrodami, které se mohou cyklicky přepínat.



Obr. 1.6: Příklad umístění jehlových elektrod kolem nádorového ložiska při IRE, převzato z [14].

Ireverzibilní elektroporace může být vyvolána buď stejnosměrnými nebo střídavými pulzy. Tradičně jsou využívány stejnosměrné obdélníkové pulzy o amplitudě jednotek kilovoltů. Značnou nevýhodou DC IRE je však nutnost úplné anestezie pacienta, a také podávání svalových relaxantů, aby nedocházelo k žádným pohybům těla a nebyl tak narušen zákrok. Stejnosměrné napětí je nebezpečné také kvůli riziku vzniku fibrilace komor, je-li elektroporační pulz aplikován do vulnerabilní fáze³ srdečního rytmu, odpovídající zhruba vlně T EKG signálu. Tomuto typu elektroporace se věnuje kapitola 4.

Při použití střídavých pulzů AC IRE je nežádoucí vliv na srdce minimalizován a pulzy nezpůsobují svalové záškuby, tedy je zde naděje, že by mohla být eliminována nutnost celkové anestezie a další medikace. Předpokládá se však, že při použití vyšších frekvencí roste oteplující účinek, což je nežádoucí efekt. Je tedy třeba provést řadu experimentů, aby bylo zařízení bezpečně použitelné v klinické praxi. Elektroporační generátor střídavých pulzů zatím není komerčně dostupným zařízením. Jeho vývoji se věnuje kapitola 6 a provedeným experimentům kapitola 7.

Cesta od návrhu zařízení až k jeho schválení pro klinické použití je dlouhá. Pro zkoumání principů a aplikací elektroporace se v první fázi výzkumu využívají zvířecí modely, a to buď *ex vivo*⁴ nebo *in vivo*. Nejčastějším modelem jsou vepři, jejichž fyziologie je velmi podobná člověku. Jsou známy pokusy na nádorech a metastázích na játrech [28], ledvinách, srdci, slinivce [29], svalech, plicích [2] nebo močovém traktu [2]. Často bývají modelem také myši (slinivka, prsní žlázy, sarkom) [2] a krysy (játra, mozek, gastrointestinální trakt) [2]. Popsány jsou také pokusy

³vulnerabilní fáze – citlivá fáze srdečního rytmu při níž dochází k repolarizaci srdečních komor.

⁴*ex vivo* – lat. „mimo živý“. Pokusy mimo živý organismus, ale na orgánech z něj odebraných.

na králících (játra) [27] nebo na psech (prostata, mozek) [2]. Ke zkoumání účinků elektroporace je možné využít i lidské buněčné linie (buňky děložního hrdla [2], červené krvinky [26]). V další fázi výzkumu přichází řada na sérii klinických studií přímo na lidech. V současnosti se ireverzibilní elektroporace používá na ablaci primárních a sekundárních nádorů měkkých tkání jako jsou játra, slinivka nebo plíce, ale testuje se i pro léčbu jiných nádorů a metastáz, viz [2,30]. Před spuštěním jakýchkoliv testů se často provádí simulování procesu elektroporace a to zejména její termální účinky při různých nastavení parametrů pulzů a zapojeních elektrod. Této problematice se věnuje kapitola 3.

1.7 Termální ablační techniky

Elektroporace jako ablační technika je vždy srovnávána s termálními technikami destrukce živé tkáně, proto následující kapitola popisuje nejznámější z nich. Mezi hlavní termální ablační techniky řadíme radiofrekvenční ablaci (RFA), mikrovlnnou ablaci (MWA), ablaci fokusovaným ultrazvukem (HIFU) a laserovou intersticiální ablaci (LITT), kde se využívá vysokých teplot, a také kryoablaci (CRYO), jež využívá nízkých teplot.

1.7.1 Radiofrekvenční ablace

Radiofrekvenční ablace (RFA) je nefarmakologická metoda, která je nejpoužívanější ablační technikou a je tak považována za standard v oblasti ablace. Destruktivním elementem je zde tepelný účinek procházejícího střídavého nemodulovaného elektrického proudu o frekvenci 460 – 1000 kHz [31,32]. Nejčastěji je prováděna v unipolární nebo bipolární konfiguraci. V případě unipolárního režimu je proud dodáván přes hrot elektrody nebo skupiny elektrod, kdy referenční elektrodu tvoří plošná elektroda, která je nejčastěji umístěna na záda pacienta. V případě bipolárního režimu jsou do cílové tkáně zavedeny dva hroty a elektrický obvod se uzavírá mezi nimi. Výhodou bipolárního módu je cílené a efektivnější ohřátí tkáně mezi elektrodami, snížená závislost na vodivosti okolí a eliminace zemnicí elektrody. Na druhou stranu vyžaduje dodávku solného roztoku pro zlepšení vodivosti. Výhodou unipolárního zapojení je větší zóna ohřevu kolem každé elektrody, nižší invazivnost a větší klinická dostupnost metody, viz [33]. Další formou aplikátoru je například expandibilní elektroda, což je izolovaná jehla, která je zasouvána do cílové tkáně a skrývá v sobě zatažitelnou elektrodu s několika hroty. Tím lze zvětšit oblast působení RFA až na 5 cm [32,34].

Destruktivní účinek RFA je limitován pouze na blízké okolí hrotu elektrody. V místě styku hrotu elektrody a tkáně dochází v 1 mm tenké vrstvě tkáně k vzniku tepla vlivem radiofrekvenční energie. Ionty v tkáni se totiž snaží následovat směr proudu a v důsledku jejich rychlého pohybu vzniká teplo, které se vedením šíří dále do tkáně. Dojde-li k ohřátí tkáně na 40 – 50 °C nastane její nevratné tepelné poškození. To se projevuje denaturací nitrobuněčných bílkovin a koagulační nekrózou. Vlivem nekrózy se zvýší elektrický odpor tkáně, který omezí další zvětšování radiofrekvenční léze.

Komplikací RFA je proudící krev ve větších cévách v blízkosti cílového ložiska, jež toto místo trvale ochlazuje. Je tedy nutné dosáhnout daleko vyšší teploty ke kompletní nekróze dané oblasti. Pokud teplota tkáně dosáhne 100 °C dojde k přehřátí tkáně a následné vaporizaci či karbonizaci tkáně v okolí aktivní elektrody, viz [32,35]. Vznikající koagulum izoluje elektrodu a brání průtoku proudu. Při zákroku na srdci může dojít k embolizaci koagul a trombů nebo dokonce k perforaci srdeční stěny. Z tohoto důvodu je teplota hrotu udržována na nastavené

hodnotě pomocí měřicího a regulačního systému. Proto se v dnešní době využívají zejména systémy, které jsou vybaveny vnitřním nebo vnějším chlazením hrotu elektrody bránící vzniku vaporizace. V rámci jednoho zákroku lze tak ablovat ložiska o velikosti pět až sedm centimetrů, viz [35]. Kromě termálních účinků RFA je problémem i to, že pokud rakovinná tkáň není kompletně zničena, reziduální nádory a satelitní nádorové uzly mají tendenci proliferovat. Navíc ložiska v blízkosti žlučníku, žaludku, střev nebo srdce mohou být složitá pro RFA zákrok právě pro její tepelné účinky. Netermální techniky jako elektroporace jsou velkou nadějí, viz [28].

Mezi hlavní aplikace radiofrekvenční ablace patří odstraňování jak primárních nádorů, tak i sekundárních metastáz zejména v játrech a ledvinách. Nejdůležitější vlastnosti tkáně v ohledu RFA jsou elektrická a tepelná vodivost. V tomto případě se do postiženého místa zavádí jehlová elektroda perkutánně pod kontrolou CT nebo MRI. Tepelné poškození se začíná projevovat již při 42 °C, kdy se následná doba expozice, tedy doba potřebná ke kompletnímu zničení daných buněk, pohybuje v rozmezí 3 až 50 hodin. Se vzrůstající teplotou doba expozice exponenciálně klesá, kdy při teplotě okolo 60 °C dochází téměř k okamžitému zničení tkáně [34, 35]. Pro zákroky na játrech se nejčastěji využívá frekvence kolem 460 kHz a výkon 50 až 250 W, viz [31].

Radiofrekvenční ablace má své uplatnění také v kardiologii při katetrizační ablací srdečních arytmií. Používá se jak pro supraventrikulární tachyarytmie, tak i pro ventrikulární tachykardie. Multipolární katetr je zaváděn v lokální anestezii a pod RTG kontrolou perkutánně cestou velkých žil nebo tepen (tříslo, krk). Nekróza vznikající jako důsledek ablace se hojí dobře ohraňovanou, nevodivou jizvou a je podkladem trvalého efektu ablace. Při použití standardního katetru vznikají dobře ohraničené nekrózy o velikosti asi 4 mm. Metoda tedy umožňuje velmi selektivní destrukci postižené tkáně pouze s minimálním rizikem poškození okolních struktur, viz [32].

Dále RFA slouží k terapii žilních varixů. Pro tuto aplikaci se využívá bipolární zapojení elektrod. Radiofrekvenční sonda je zavedena do poškozené povrchové žíly perkutánně pod ultrazvukovou kontrolou. Aplikovaný elektrický proud způsobí uvnitř žíly poškození její výstelky, kontrakci a úplné uzavření žíly, a pak následnou přeměnu ve vazivový pruh. Tato technika je šetrná a nebolestivá, a proto je možné ji provádět ambulantně. Zákrok trvá jednu až dvě minuty, viz [36]. Pro všechny aplikace RFA je charakteristické, že je dodáván konstantní výkon po dobu několik minut. Pokusy srovnávající účinky RFA a IRE jsou uvedeny v kapitolách 5.2 a 5.3.

1.7.2 Mikrovlnná ablace

Mikrovlnná ablace (MWA) je minimálně invazivní a rychlá metoda, jež umožňuje využití všech operačních přístupů (laparoskopicky, perkutánně, při otevřeném chirurgickém zákroku) za kontroly pod CT nebo pomocí ultrazvuku. Je vhodná pro ablaci novotvarů měkkých tkání, zejména pro velkoobjemové ablaci v plicích, játrech, ledvinách, nadledvinách nebo kostech.

Metoda pracuje na principu mikrovlnného ohřevu. K destrukci využívá elektromagnetické vlnění o vysoké frekvenci (900 – 2450 MHz). Molekuly vody jsou polární a jejich elektrický náboj není symetrický. Molekuly mají pozitivní náboj na atomech vodíku a negativní náboj na atomech kyslíku, viz [35, 37]. Frekvence mikrovlnného záření je naladěná na hodnotu přirozené rezonanční frekvence vody (2,45 GHz). Změnou frekvence mikrovlnného záření lze ovlivňovat hloubku vniku záření do tkáně. Kmitání molekul vody způsobuje vznik frikčního tepla v cílové tkáni a buněčnou smrt následkem koagulační nekrózy. Mikrovlnná ablaci je typem dielektrického ohřevu, kde dielektrikum je v tomto případě tkáň. Z pohledu vlastností tkáně jsou nejdůležitější její relativní permitivita a elektrická vodivost, viz [33]. Mikrovlnná anténa

je zavedena přímo do nádoru a vlnění je dodáváno z mikrovlnného generátoru. Pro měření teploty uvnitř nádoru se využívá samostatně umístěný termočlánek, viz [37].

Oproti RFA má několik výhod zvyšujících efektivitu léčby nádorových onemocnění. Vzhledem k použité frekvenci není nutné použití zemnicí elektrody, což vylučuje riziko popálení a umožňuje také použití více aplikátorů současně. Méně ji ovlivňují změny v impedanci tkáně a chladicí efekt protékající krve v blízkých velkých cévách. Další výhodou je, že za kratší čas je schopna dosáhnout vyšších teplot v ablační zóně. Je možné ablovat větší nádory a okolní tkáň se ohřívá v únosné míře. Tato metoda je pro pacienta celkově méně bolestivá, viz [37].

1.7.3 Ablace fokusovaným ultrazvukem

Ablace fokusovaným ultrazvukem o vysoké intenzitě (HIFU) je minimálně invazivní ablační technika, která byla vyvinuta jako alternativa k chirurgickému odstraňování nádorů. Je možno ošetřovat ložiska hluboko v těle bez chirurgického zákroku. Používá se v boji proti nádorovým ložiskům v mozku, prostatě, prsou, ledvinách, játrech, vaječnících či kostech a její další aplikace se zkoumají. Odstraňují se s ní děložní myomy, viz [38], používá se také k zastavení krvácení při traumatech nebo gastrointestinálním krvácení.

Lokálně soustředěný ultrazvuk se generuje pomocí piezoelektrického měniče pracujícího na frekvenci až 10 MHz. Velikost ohniska je asi 2 mm na šířku a 5 až 15 mm na délku. Hustota energie v daném místě může dosahovat až 1000 W/cm^2 a vede k lokálnímu ohřevu a rozrušení tkáně. Lokální teplota může v několika sekundách dosáhnout až 100°C . Efekt HIFU je soustředěn pouze do místa ohniska a umožňuje tedy velmi přesný a lokalizovaný zákrok. Při vysoké intenzitě stimuluje přítomné akustické pole bubliny v médiu k pohybu a dochází tak ke kavitaci. Velikost kavitace a výsledném efektu metody je závislá na intenzitě a frekvenci HIFU a na délce expozice. Kvůli oscilaci vzduchových bublin dochází k poškození tkáně smykovými silami. Navíc kolabující bubliny vyvolávají velký akustický tlak a vysokou teplotu. Oblasti léčené touto metodou vykazují ostré ohrazení mezi zdravou a odumřelou tkání, ve které dochází ke klasickým stavům při termální ablaci (koagulační nekróza, denaturace proteinu, poškození buněčných jader, narušení membrány, ztráta tekutin a apoptóza), viz [39].

1.7.4 Laserová intersticiální ablace

Laserová intersticiální ablace (LITT) je opět minimálně invazivní alternativa k chirurgickému odstranění nádorů. Metoda využívá laser s vysokou energií umístěný do nádorové léze. Umožňuje zavedení několika laserových vláken podle velikosti ložiska a jejich simultánní záření zrychluje zákrok. Jedním vpichem se aplikuje energie okolo 25 W po dobu několika sekund až minut, viz [40]. V moderních systémech mají vlákna aktivní chlazení aplikátorů, aby nedocházelo k nežádoucímu popálení tkáně. Absorpce energie laserového paprsku způsobuje ohřátí tkáně a zničení nádoru. LITT je kompatibilní s magnetickou rezonancí, která slouží k plánování, monitorování a vyhodnocení zákroku. Laserová intersticiální ablace se využívá k léčení nádorových ložisek v mozku, játrech, nadledvinách, prsou, slinivce, kostech, prostatě, atd. [41]. Tato metoda je poměrně bezpečná a jednoduchá a nabízí efektivní a méně bolestivé řešení pro léčení epilepsie, která nereaguje na běžnou léčbu. S její pomocí lze eliminovat epileptické záchvaty, viz [42].

1.7.5 Kryoablace

Kryoablace (CRYO) je termální ablační technika, která na rozdíl od dříve uvedených technik, využívá extrémně nízkých teplot k zničení nežádoucí tkáně. Metoda se nejčastěji používá pro odstraňování nádorů plic, jater, prsou, ledvin, prostaty, očí, kůže, kostí (i páteře) a dělohy, ale také pro léčbu srdečních aritmií.

Kryoablace je většinou prováděna perkutánně, ale je možný laparoskopický i otevřený přístup. K výkonu se používá duté jehly, jimiž proudí chlazený plyn (tekutý dusík nebo argon). Pro přesné zavedení aplikátoru k nemocné tkáni se používá CT, MRI nebo ultrazvuk. Podle velikosti léze a její lokaci může být zavedeno více aplikátorů. Například v případě rakoviny prostaty se do nádoru zavádí šest až osm aplikátorů. Kryoterapie se skládá ze série několika kroků vedoucích k buněčné smrti.

Nádory jsou opakovaně zmrazovány a rozmrazovány a to ve dvou a více cyklech. Odumřelé buňky jsou pak odstraněny bílými krvinkami imunitního systému. Je-li buňka vystavena extrémně chladnému prostředí, viz [43], zahyne z následujících příčin:

- Dojde k vytvoření ledových krystalů vně buňky, které vedou k její dehydrataci.
- Ledové krystaly se tvoří také uvnitř buňky. Již při teplotách kolem -40°C znamenají formující se ledové krystaly jistou smrt.
- Buňka praskne buď následkem jejího zvětšení z důvodu roztažnosti ledových krystalů uvnitř buňky nebo jejího scvrknutí kvůli úniku vody z buňky.
- Přeruší se přísun krve do buňky vlivem vznikajících ledových krystalů v drobných cévách zásobujících nádor. Průměrná doba potřebná k uzavěru cévy je okolo 10 minut, proto se extrémně nízká teplota udržuje po dobu alespoň 10 – 15 minut.

Kryoablace má své výhody i nevýhody. Jednou z výhod je kratší doba rekonvalescence a šetrnost oproti klasické otevřené resekcii, viz [43]. Jedna z komplexních studií porovnávající výsledky CRYO a RFA metody pro léčbu fibrilací srdečních síní (AF) ukázala, že metody jsou srovnatelné co do efektivnosti i bezpečnosti. Největší výhodou kryoablace oproti radiofrekvenční ablaci je však kratší celková délka procedury, viz [44]. V případě léčby fibroadenomu způsobuje kryoablace jen minimální jizvy a po zákroku nedochází ke kalcifikaci. Zákrok však nese také řadu rizik jako například krvácení v případě zákroků na játrech, ledvinách a plicích. Dále nelze zcela vyloučit poškození okolní tkáně jako jsou žlučovody (zákroky na játrech), močovod (ledviny), konečník (prostata), střeva (jakékoliv zákroky v břiše). Plíce mohou kolabovat nebo se zde může tvořit nežádoucí výpotek, viz [43]. Poškození zdravé tkáně v blízkosti nádorového ložiska je společné všem termálními technikám a ireverzibilní elektroporace, která je předmětem této práce, má v tomto ohledu ohromnou výhodu.

Účinky kryoablace mohou být podpořeny imunoterapií. V tomto případě mluvíme o kryoimunoterapii. Imunitní reakce vyvolaná samotnou ablací může být nedostatečná. Pokud je kryoablace kombinována s imunoterapií podporuje a zvyšuje se imunitní odpověď organismu, což má synergický efekt na léčbu rakoviny.

2 | Cíle práce

2.1 Výpočet a vizualizace rozložení elektrického pole v tkáni

Pro stanovení rozsahu oblastí reverzibilní a ireverzibilní elektroporace v závislosti na tvaru a umístění aplikačních elektrod je užitečným nástrojem výpočet metodou konečných prvků. Cílem je stanovit rozložení elektrických potenciálů v tkáni, na kterou je přiloženo konstantní stejnosměrné napětí. Tato vizualizace je využívána operátorem provádějícím zákrok. Zmíněná metoda je vyhovující pro zákroky ve velkých orgánech jako jsou např. játra, které lze chápat jako homogenní prostředí. Výrazného zlepšení přesnosti metody lze docílit zavedením nehomogenního prostředí s vodivostí závislou na směru a velikosti intenzity elektrického pole. Výpočet je pak použitelný i pro elektroporaci v blízkosti či uvnitř žlučovodu, cév a podobně.

2.2 Provedení tranzientní tepelné analýzy a vizualizace rozložení teplotního pole v tkáni

Pro popsání fyzikálních jevů v tkáni při elektroporaci však nestačí pouze určení rozsahu elektroporace, ale je nutné stanovit i nežádoucí tepelné namáhání tkáně vypočtené na základě rozložení Jouleových ztrát v tkáni způsobených elektrickým polem.

2.3 Vývoj experimentálních zdrojů stejnosměrných a střídavých pulzů pro účely elektroporace

Experimenty vyžadují vývoj a realizaci zdroje pravoúhlých pulzů stejnosměrného vysokého napětí a zdroje vysokofrekvenčních pulzů vysokého napětí. Součástí vývoje je vytvoření komplexního pracoviště s podpůrnými subsystémy zahrnujícími synchronizaci pulzu se signálem EKG či měření impedance tkáně.

3 | Matematické modelování elektroporace tkáně

Modelování a simulace jsou užitečným nástrojem při zkoumání jevu elektroporace. Poskytují cenné informace o procesu zákroku, aniž by bylo třeba reálných pokusů na zvířatech nebo lidech. Výsledky, které jsou získávány modelováním děje je možné následně korelovat s reálnými naměřenými daty, kdy může být potvrzena nebo vyvrácena jejich správnost. V ideálním případě, přesné simulace pomáhají chirurgovi naplánovat zákrok na základě zadaných informací o ložisku nádoru (velikost, tvar) a lze tak rozhodnout jaké parametry pulzů budou vyhovující pro daný případ, viz [11]. Dají se využít pro statistickou predikci velikosti ablovaného objemu tkáně, viz [45], nebo pro stanovení prahů mezi zákrokem bez efektu, reverzibilní elektroporací, ireverzibilní elektroporací a termálním poškozením tkáně.

Elektroporace je dynamický proces ovlivněný mnoha aspekty jak ze strany elektroporované tkáně (typ tkáně nebo buněk, tvar, hustota, orientace v prostoru s ohledem na směr působícího elektrického pole, vodivost, teplota, atd.), tak ze strany parametrů aplikovaného pulzu (napětí, proud, délka, frekvence a počet pulzů, časový interval mezi pulzy).

Pomocí modelování a simulací se zkoumá hlavně rozložení elektrického pole v tkáni, viz např. [46–49] a její teplotní namáhání a s tím spojené šíření tepla v průběhu zákroku, viz např. [10, 50–54]. K modelování bývá použita metoda konečných prvků s tím, že modely jsou nejčastěji realizovány v programovém prostředí COMSOL Multiphysics (FEMLab, Stockholm, Sweden), stejně jako v případě této práce.

Nejčastěji se jako simulovaná tkáň uvažují játra, což má několik důvodů, mezi něž patří například jejich tkáňová homogenita. Játra jsou také nejčastěji léčeným orgánem pomocí IRE, a tak je k dispozici mnoho reálných dat, se kterými mohou být výsledky simulací srovnávány, viz [55]. Experimentální studie týkající se elektroporace bývají také velmi často zaměřeny právě na játra. Dále se také využívají modely kompozitní, ve kterých se uvažují různé tkáně, např. kůže, tuk a nádorová tkáň, viz [49]. Lze nalézt také simulace modelující proces elektroporace na izolovaných buňkách, viz [48].

Elektrody se volí buď jehlové nebo plošné. Zkoumá se jak jejich vzdálenost, velikost či materiál ovlivňují výsledek elektroporace, viz [10, 46, 50, 51]. Stěžejním bodem simulace je volba parametrů, jejich hodnot, okrajových podmínek, zjednodušení modelu či zvolená geometrie, fyzika a síť.

Modelování nejdříve začíná analýzou elektrického pole, které způsobuje zvýšení potenciálu na buněčných membránách. Většinou se ireverzibilní elektroporace provádí sekvencí obdélkových pulzů, které jsou mnohem delší než elektrická časová konstanta buněk a tkání. Což znamená, že indukované transmembránové napětí dosáhne svého maxima dlouho před tím,

než pulz skončí, viz [56], a proto je možné zanedbat přechodové stavy a uvažovat rozložení elektrického pole při ustáleném stavu.

Intenzitu elektrického pole je možné řešit pomocí diferenciální rovnice v podobě Laplaceovy rovnice

$$\nabla \cdot (\sigma \nabla \varphi) = 0, \quad (3.1)$$

kde σ je měrná elektrická vodivost, φ je elektrický potenciál definovaný vztahem $\mathbf{E} = -\nabla \varphi$, viz [57], a ∇ je Laplaceův operátor. Z intenzity elektrického pole $\mathbf{E}$ je možné vypočítat proudovou hustotu $\mathbf{J}$ pomocí Ohmova zákona v diferenciálním tvaru

$$\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E}. \quad (3.2)$$

Ze znalostí rozložení proudové hustoty v tkáni lze vypočítat Jouleovy měrné objemové ztráty

$$p_e = \frac{dP}{dV} = \frac{J^2}{\sigma}, \quad (3.3)$$

kde J je proudová hustota, P jsou Jouleovy ztráty a V je objem. Po získání rozložení Jouleových ztrát v daném objemu tkáně je dále možné počítat rozložení tepla.

Pro popis šíření tepla se využívá Poissonova parciální diferenciální rovnice. Může být vyjádřena také stavovou rovnicí vycházející z prvního termodynamického zákona.

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} - \nabla \cdot (k \nabla T) = \dot{q}_v, \quad (3.4)$$

kde ρ je hustota hmoty, c_p je měrná tepelná kapacita, T je teplota, t je čas, k je tepelná vodivost a $\dot{q}_v$ je objemový zdroj tepla (ztráty). Vhodnou volbou $\dot{q}_v$ lze získat tzv. Pennesovu rovnici přenosu tepla v živé tkáni, viz [10, 11, 51, 58–61], která v sobě zahrnuje funkci metabolismu, průtok krve i teplo generované působením vnějšího elektrického pole, ale nebere v potaz směr, kterým krev systémem proudí.

Pennesova rovnice je nejpoužívanější rovnicí pro matematický popis šíření tepla v tkáni. Rovnice byla navržena Harry Pennesem v roce 1948 a publikována v časopise aplikované fyziologie. Pennes měřil rozložení teploty jako funkci radiální pozice v předloktí devíti osob. Jeho data odhalila rozdíl teplot na povrchu a uvnitř ruky asi o tři až čtyři stupně Celsia. Pennes připisoval tuto změnu teploty efektu vzniku metabolického tepla a perfuze krve v paži. Pennesova rovnice popisuje vliv metabolismu a perfuze krve na energetickou bilanci živé tkáně. Modifikovaná Pennesova rovnice má tvar

$$\rho_t c_t \frac{\partial T_t}{\partial t} = \nabla \cdot (k \nabla T_t) - \rho_b \omega_b c_b (T_t - T_b) + q_m + p_e, \quad (3.5)$$

kde ρ_t je hustota tkáně, c_t je tepelná kapacita tkáně, k je tepelná vodivost tkáně, ω_b je perfuze krve (objemový průtok krve na jednotku objemu tkáně), ρ_b je hustota krve, c_b je tepelná kapacita krve, T_b je teplota arteriální krve, T_t je teplota tkáně, q_m je měrné objemové metabolické teplo a p_e je měrný výkon přiváděný elektrickými pulzy a představuje teplo způsobené Jouleovými objemovými ztrátami.

Člen $\rho_t c_t \frac{\partial T_t}{\partial t}$ rovnice (3.5) reprezentuje míru změny teploty. Je to tzv. akumulované teplo, což je množství měrného výkonu v tkáni, které nestihlo opustit tkáň, radiací, kondukcí nebo konvekcí. Člen $\nabla \cdot (k \nabla T_t)$ na pravé straně rovnice představuje vedení tepla v těle způsobené teplotním gradientem. Tedy je to výkon odcházející z povrchu objemového elementu. Člen $\rho_b \omega_b c_b (T_t - T_b)$ představuje vedení tepla mezi tkání a perfuzí krve v kapilárách, tedy výkon odváděný pryč krví. Členy q_m a p_e představují generování tepla metabolismem a externím tepelným zdrojem (elektroporace).

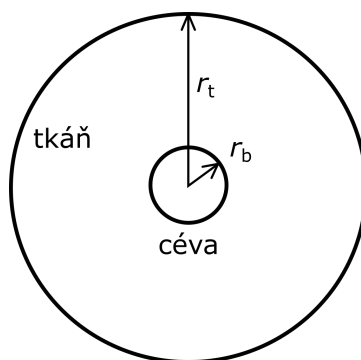
3.1 Metody výpočtu šíření elektrického pole a tepla v tkáni

Pro výpočet elektroporačních dějů je třeba vytvořit matematický model definovaný soustavou rovnic. Výpočty je možné řešit analyticky nebo pomocí numerických metod. Jelikož je šíření potenciálu a tepla v tkáni velmi komplexní problém, analytické metody mohou být použity pouze pro výpočty jednodušších, například dvourozměrných geometrií při uvažování homogenní tkáně. Mnohem častěji se využívají numerické metody, pomocí kterých lze modelovat trojrozměrná nehomogenní prostředí. Nejpoužívanější z nich je metoda konečných prvků (MKP, známá také pod anglickou zkratkou FEM). MKP je iterační metoda, která spočívá v rozdělení spojitého modelu na velké, ale konečné množství malých domén jednoduchého tvaru, přičemž hledané parametry jsou určovány v jednotlivých uzlech tzv. sítě konečných prvků. Nejdříve se tedy model nekonečného objemu nahradí konečným počtem uzlových bodů. Poté se vyberou interpolační funkce, sestaví se matice neznámých parametrů pro každý uzel, a pak také globální matice pro celý řešený model. Dále je nutné zavést okrajové podmínky a vypočítat soustavy algebraických rovnic a vyřešit úlohu. Poté následuje grafické zobrazení výsledků na modelu a výpis důležitých hodnot [47,62].

Druhou numerickou metodou používanou pro výpočet komplexních modelů je metoda konečných diferencí (MKD, anglicky FDM nebo také metoda sítí). Metoda řeší diferenciální rovnice jejich aproximací rovnicemi rozdílů (diferencí), je to tedy také diskretizační metoda. Metodou MKD se v současnosti řeší hlavně parciální diferenciální rovnice. Metoda převádí lineární nebo nelineární diferenciální nebo parciální diferenciální rovnice na lineární nebo nelineární rovnice, které mohou být řešeny algebraicky. Typicky je definována na pravidelné mřížce, což ji dělá nevhodnou pro řešení nepravidelných geometrií. Naopak funguje dobře pro blokové nebo obdélníkové modely [47,62].

3.2 Analytické řešení Pennesovy rovnice přenosu tepla

Tato část textu se zabývá analytickým řešením Pennesovy rovnice pro speciální případ geometrie, viz např. [63], skládající se z osově symetrického segmentu tkáně s cévou uvnitř podle Obr. 3.1.



Obr. 3.1: Geometrie modelu tkáně a cévy.

Z podstaty modelu vyplývá, že není vhodné model řešit v kartézské souřadnicové soustavě, nýbrž v polární souřadnicové soustavě, viz [64], kde operátor divergence má tvar

$$\nabla \cdot \mathcal{X} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r}(r\mathcal{X}) + \frac{1}{r} \frac{\partial \mathcal{X}}{\partial \theta} + \frac{\partial \mathcal{X}}{\partial z}. \quad (3.6)$$

Pro tento konkrétní případ lze operátor divergence dále zjednodušit na základě toho, že veškeré veličiny jsou nezávislé na poloze z a úhlu θ , potom tento operátor má následující tvar

$$\nabla \cdot \mathcal{X} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r}(r\mathcal{X}). \quad (3.7)$$

Pennesova rovnice (3.5), pak může být přepsána do tvaru

$$\rho_t c_t \frac{\partial T_t}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(rk \frac{\partial T_t}{\partial r} \right) - \rho_b \omega_b c_b (T_t - T_b) + q_m + p_e. \quad (3.8)$$

Analytické řešení této parciální diferenciální rovnice není možné v časové oblasti z důvodu její komplexnosti. Východiskem může být nalezení řešení rovnice v ustáleném stavu, kdy $\frac{\partial T_t}{\partial t} = 0$. Potom je možné rovnici (3.8) převést do bezrozměrného tvaru v radiálním směru, který určuje bezrozměrné rozložení teploty uvnitř tkáně v ustáleném stavu

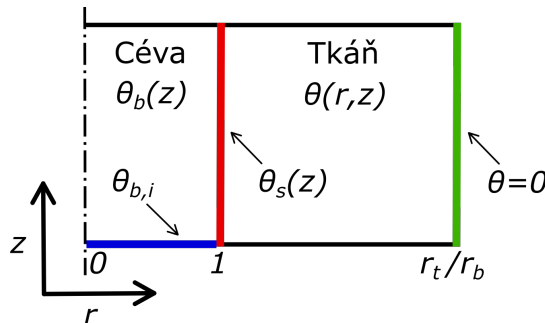
$$\frac{1}{\tilde{r}} \frac{d}{d\tilde{r}} \left(\tilde{r} \frac{d\tilde{\theta}}{d\tilde{r}} \right) - \tilde{P}^2 [\tilde{\theta} - \tilde{\theta}_a] + 1 = 0, \quad (3.9)$$

kde bezrozměrná teplota, poloměr, délka a koeficient perfuze jsou definovány:

$$\begin{aligned} \tilde{\theta} &= k \frac{T_t - T_b}{q_m r_b^2}, \\ \tilde{r} &= \frac{r}{r_b}, \\ \tilde{z} &= \frac{z}{r_b}, \\ \tilde{P} &= r_b \sqrt{\frac{\omega_b c_b}{k}}. \end{aligned} \quad (3.10)$$

Dále se předpokládá, že tkáň je rovnoměrně prokrvována a ohřívána. Celá odmocnina v posledním výrazu rovnice (3.10) může být interpretována jako penetrační hloubka [65]. Jouleovy měrné objemové ztráty následkem elektroporace p_e nejsou součástí rovnice (3.9), ale jsou nahrazeny okrajovou podmínkou, viz Obr. 3.2, ve tvaru

$$\begin{aligned} \tilde{\theta}(1, \tilde{z}) &= \tilde{\theta}_s(\tilde{z}), \\ \tilde{\theta}(r_t/r_b, \tilde{z}) &= 0. \end{aligned} \quad (3.11)$$



Obr. 3.2: Znázornění okrajových podmínek pro uvedené analytické řešení.

Průměrná teplota krve v cévě je dána rovnicí

$$\frac{d\tilde{\theta}_b}{d\tilde{z}} = 2 \text{St}(\tilde{\theta}_s - \tilde{\theta}_b) + \frac{q_b}{q_m} \frac{k}{k_b} \frac{2}{\text{Pe}}, \quad (3.12)$$

$$\tilde{\theta}_{b,\infty}(0) = \tilde{\theta}_{b,i}, \quad (3.13)$$

kde

$$\begin{aligned} \text{St} &= \frac{h}{\rho_b c_b v_b} = \frac{\text{Nu}}{\text{Pe}}, \\ \text{Nu} &= \frac{hD}{k_b} = 4, \\ \text{Pe} &= \frac{2\rho_b c_b v_b r_b}{k_b}. \end{aligned} \quad (3.14)$$

Dále je dána podmínka pro cévní stěnu ($\tilde{r}=1$)

$$\frac{d\tilde{\theta}}{d\tilde{r}} = \text{Bi} (\tilde{\theta}_s - \tilde{\theta}_b), \quad (3.15)$$

kde

$$\text{Bi} = \frac{hr_b}{k} = \text{Nu} \frac{k_b}{2k}, \quad (3.16)$$

a teplota cévní stěny je určena z řešení rovnice přenosu tepla

$$\tilde{\theta}_s(\tilde{z}) = \theta(1, \tilde{z}). \quad (3.17)$$

Popisované analytické řešení nebere v potaz vedení tepla v axiálním směru a je nahrazeno konstantním koeficientem přenosu tepla. Oproti jiným modelům [65] však zahrnuje měrné objemové metabolické teplo (q_m), měrné objemové teplo v cévě (q_b) a proměnou teplotu arteriální krve v závislosti na poloze v ose z .

Analytické řešení je počítáno pro dva speciální případy. V prvním případě se předpokládá, že teplota arteriální krve ($\tilde{\theta}_a$) je rovna teplotě krve proudící v hlavní cévě ($\tilde{\theta}_b$). Tato céva tedy zásobuje krví daný orgán. V druhém případě se jedná o velkou cévu, která pouze prochází napříč tkání, ale nemá zásobní funkci a její teplota je po celé délce konstantní. Dalším předpokladem je, že veškeré materiálové vlastnosti krve a tkáně jsou nezávislé na teplotě.

Postup analytického řešení přenosu tepla v tkáni je proveden v následujících třech krocích:

1. Najde se obecné řešení $\tilde{\theta}(\tilde{r}, \tilde{z})$ rovnice (3.9) za použití okrajových podmínek (3.11).
2. Dosazením $\tilde{\theta}(\tilde{r}, \tilde{z})$ do rovnice (3.15) při $\tilde{r}=1$ získáme $\tilde{\theta}_s(\tilde{z})$.
3. Dosazením $\tilde{\theta}_s(\tilde{z})$ do rovnice (3.12) získáme $\tilde{\theta}_b(\tilde{z})$.
4. Získané $\tilde{\theta}_s(\tilde{z})$ a $\tilde{\theta}_b(\tilde{z})$ dosadíme zpět do obecného řešení $\tilde{\theta}(\tilde{r}, \tilde{z})$.

3.2.1 Analytické řešení pro případ procházející cévy

Rovnici (3.9) je pro další výpočty vhodné přepsat do tvaru:

$$\frac{1}{\tilde{r}} \frac{d\tilde{\theta}(\tilde{r}, \tilde{z})}{d\tilde{r}} + \frac{d^2\tilde{\theta}(\tilde{r}, \tilde{z})}{d\tilde{r}^2} - \tilde{P}^2[\tilde{\theta}(\tilde{r}, \tilde{z}) - \tilde{\theta}_a] + 1 = 0. \quad (3.18)$$

Tato rovnice teploty tkáně představuje Besselovu diferenciální rovnici, jejíž obecné řešení je:

$$\tilde{\theta}(\tilde{r}, \tilde{z}) = c_2 Y_0(-j\tilde{P}\tilde{r}) + c_1 I_0(\tilde{P}\tilde{r}) + \tilde{\theta}_a + \frac{1}{\tilde{P}^2}, \quad (3.19)$$

kde c_1 a c_2 jsou konstanty řešení, $Y_0(\cdot)$ je Besselova funkce druhého druhu nultého řádu a $I_0(\cdot)$ je modifikovaná Besselova funkce prvního druhu nultého řádu, viz [64]. Zmíněné konstanty je možné určit na základě uvedených okrajových podmínek (3.11). Výsledný tvar rovnice je:

$$\tilde{\theta}(\tilde{r}, \tilde{z}) = \mathcal{X}_1(\tilde{r})\tilde{\theta}_s(\tilde{z}) + \mathcal{X}_2(\tilde{r}) [\tilde{\theta}_a\tilde{P}^2 + 1], \quad (3.20)$$

kde $\tilde{\theta}$ je teplota tkáně a $\tilde{\theta}_s$ je teplota cévní stěny a kde $\mathcal{X}_1$ a $\mathcal{X}_2$ jsou pomocné funkce definované následovně:

$$\mathcal{X}_1(\tilde{r}) = \frac{Y_0(-j\tilde{P}\tilde{r})I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) - I_0(\tilde{P}\tilde{r})Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)}{Y_0(-j\tilde{P})I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) - I_0(\tilde{P})Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)}, \quad (3.21)$$

$$\mathcal{X}_2(\tilde{r}) = \frac{\left[Y_0(-j\tilde{P}) - Y_0(-j\tilde{P}\tilde{r})\right] I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) + I_0(\tilde{P}) \left[Y_0(-j\tilde{P}\tilde{r}) - Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)\right]}{\tilde{P}^2 \left[Y_0(-j\tilde{P})I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) - I_0(\tilde{P})Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)\right]} + \frac{I_0(\tilde{P}\tilde{r}) \left[Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) - Y_0(-j\tilde{P})\right]}{\tilde{P}^2 \left[Y_0(-j\tilde{P})I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) - I_0(\tilde{P})Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)\right]}. \quad (3.22)$$

Teplotu cévní stěny získáme dosazením rovnice (3.20) do (3.15) pro $\tilde{r}=1$, kdy její tvar je:

$$\tilde{\theta}_s(\tilde{z}) = \tilde{\theta}_a\mathcal{X}_3 + \tilde{\theta}_b(\tilde{z})\mathcal{X}_4 + \mathcal{X}_5 \quad (3.23)$$

a konstanty $\mathcal{X}_3$, $\mathcal{X}_4$ a $\mathcal{X}_5$ jsou definovány následovně:

$$\mathcal{X}_3 = \frac{\tilde{P}^2 [-I_1(\tilde{P})] \left[Y_0(-j\tilde{P}) - Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)\right] - j\tilde{P}^2 Y_1(-j\tilde{P})I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) + j\tilde{P}^2 Y_1(-j\tilde{P})I_0(\tilde{P})}{\tilde{P} [\tilde{P}I_1(\tilde{P}) - \text{Bi}I_0(\tilde{P})] Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) + \tilde{P} [\text{Bi}Y_0(-j\tilde{P}) - j\tilde{P}Y_1(-j\tilde{P})] I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)}, \quad (3.24)$$

$$\mathcal{X}_4 = \frac{\text{Bi}\tilde{P}Y_0(-j\tilde{P})I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) - \text{Bi}\tilde{P}I_0(\tilde{P})Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)}{\tilde{P} [\tilde{P}I_1(\tilde{P}) - \text{Bi}I_0(\tilde{P})] Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) + \tilde{P} [\text{Bi}Y_0(-j\tilde{P}) - j\tilde{P}Y_1(-j\tilde{P})] I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)}, \quad (3.25)$$

$$\mathcal{X}_5 = \frac{-I_1(\tilde{P}) \left[Y_0(-j\tilde{P}) - Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)\right] - jY_1(-j\tilde{P})I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) + jY_1(-j\tilde{P})I_0(\tilde{P})}{\tilde{P} [\tilde{P}I_1(\tilde{P}) - \text{Bi}I_0(\tilde{P})] Y_0\left(-j\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) + \tilde{P} [\text{Bi}Y_0(-j\tilde{P}) - j\tilde{P}Y_1(-j\tilde{P})] I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)}. \quad (3.26)$$

Dosazením $\tilde{\theta}_s(\tilde{z})$ do rovnice (3.12) získáme teplotu krve v cévě

$$\tilde{\theta}_b(\tilde{z}) = \frac{e^{-2\text{St}(1-\mathcal{X}_4)\tilde{z}} \left(\frac{2q_b k}{q_m k_b \text{Pe}} + 2\text{St}(\tilde{\theta}_a\mathcal{X}_3 + \tilde{\theta}_{b,i}(\mathcal{X}_4 - 1) + \mathcal{X}_5) \right) - \frac{2q_b k}{q_m k_b \text{Pe}} - 2\tilde{\theta}_a\text{St}\mathcal{X}_3 - 2\text{St}\mathcal{X}_5}{2\text{St}(\mathcal{X}_4 - 1)}. \quad (3.27)$$

V posledním kroku by se dosadily získané teploty $\tilde{\theta}_s(\tilde{z})$ a $\tilde{\theta}_b(\tilde{z})$ zpět do obecného řešení $\tilde{\theta}(\tilde{r}, \tilde{z})$. Vzhledem ke komplexnosti řešené rovnice, tato zde není uvedena.

Na základě rovnice (3.27) je možné definovat tzv. ekvivalentní délku cévy, což odpovídá vzdálenosti, ve které teplota krve klesne na hodnotu $e^{-1} \approx 0,368$ své původní hodnoty.

$$\tilde{z}_{\text{eq}} = \frac{1}{2\text{St}(1 - \mathcal{X}_4)}. \quad (3.28)$$

Dále lze definovat tzv. rovnovážnou teplotu krve, která by odpovídala teplotě krve v nekonečně dlouhé cévě, resp. ve vzdálenosti $\tilde{z}$ mnohem větší než je ekvivalentní délka cévy.

$$\tilde{\theta}_{b,\infty} = \frac{\frac{2q_b k}{q_m k_b \text{Pe}} + 2\text{St} \tilde{\theta}_a \mathcal{X}_3 + 2\text{St} \mathcal{X}_5}{2\text{St}(1 - \mathcal{X}_4)}. \quad (3.29)$$

Možnost zanedbání vedení tepla krví ve směru osy $\tilde{z}$ může být dokázána pomocí poměru teplotních gradientů ve směru $\tilde{z}$ vůči $\tilde{r}$

$$\frac{\frac{d\tilde{\theta}_b}{d\tilde{z}}}{\frac{d\tilde{\theta}}{d\tilde{r}}} = \frac{2\text{St}}{\text{Bi}} + \frac{\frac{2q_b k}{q_m k_b \text{Pe}}}{\text{Bi}(\tilde{\theta}_s - \tilde{\theta}_b)}. \quad (3.30)$$

Z rovnice (3.30) je patrné, že Stantonovo číslo je malé a Pecletovo číslo naopak velké. Teplotní gradient v cévě ve směru osy $\tilde{z}$ ku gradientu v tkáni ve směru $\tilde{r}$ je tedy možné zanedbat.

3.2.2 Analytické řešení pro případ zásobující cévy

Postup analytického řešení pro případ zásobující cévy je obdobný jako v předchozím případě. Řešení rovnice (3.18) má stejný tvar jako již dříve uvedený vztah (3.20) jen s tím rozdílem, že $\tilde{\theta}_a$ není konstantní, ale je závislá na výšce $\tilde{z}$, dojde tedy k záměně $\tilde{\theta}_a$ za $\tilde{\theta}_b(\tilde{z})$.

$$\tilde{\theta}(\tilde{r}, \tilde{z}) = \mathcal{X}_1(\tilde{r}) \tilde{\theta}_s(\tilde{z}) + \mathcal{X}_2(\tilde{r}) [\tilde{\theta}_b \tilde{P}^2 + 1], \quad (3.31)$$

kde konstanty jsou dány rovnicemi (3.21) a (3.22).

Teplota cévní stěny může být vyjádřena pomocí teploty krve v cévě

$$\tilde{\theta}_s(\tilde{z}) = \tilde{\theta}_b(\tilde{z}) \mathcal{X}_6 + \mathcal{X}_7, \quad (3.32)$$

kde $\mathcal{X}_6$ a $\mathcal{X}_7$ jsou pomocné konstanty definované následovně

$$\mathcal{X}_6 = \frac{[\text{Bi}Y_0(-j\tilde{P}) - j\tilde{P}Y_1(-j\tilde{P})] I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right) + I_0(\tilde{P}) [j\tilde{P}Y_1(-j\tilde{P}) - \text{Bi}Y_0\left(-\frac{j\tilde{P}r_t}{r_b}\right)]}{[\tilde{P}I_1(\tilde{P}) - \text{Bi}I_0(\tilde{P})] Y_0\left(-\frac{j\tilde{P}r_t}{r_b}\right) + [\text{Bi}Y_0(-j\tilde{P}) - j\tilde{P}Y_1(-j\tilde{P})] I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)} + \frac{\tilde{P}I_1(\tilde{P}) [Y_0\left(-\frac{j\tilde{P}r_t}{r_b}\right) - Y_0(-j\tilde{P})]}{[\tilde{P}I_1(\tilde{P}) - \text{Bi}I_0(\tilde{P})] Y_0\left(-\frac{j\tilde{P}r_t}{r_b}\right) + [\text{Bi}Y_0(-j\tilde{P}) - j\tilde{P}Y_1(-j\tilde{P})] I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)}, \quad (3.33)$$

$$\mathcal{X}_7 = \frac{I_1(\tilde{P}) [Y_0\left(-\frac{j\tilde{P}r_t}{r_b}\right) - Y_0(-j\tilde{P})] + jY_1(-j\tilde{P}) [I_0(\tilde{P}) - I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)]}{\tilde{P} [\tilde{P}I_1(\tilde{P}) - \text{Bi}I_0(\tilde{P})] Y_0\left(-\frac{j\tilde{P}r_t}{r_b}\right) + \tilde{P} [\text{Bi}Y_0(-j\tilde{P}) - j\tilde{P}Y_1(-j\tilde{P})] I_0\left(\frac{\tilde{P}r_t}{r_b}\right)}. \quad (3.34)$$

Dosazením $\tilde{\theta}_s(\tilde{z})$ do rovnice (3.12) získáme teplotu krve v cévě

$$\tilde{\theta}_b(\tilde{z}) = \frac{-e^{2\text{St}(\mathcal{X}_6-1)\tilde{z}} \left(\frac{2q_b k}{q_m k_b \text{Pe}} + 2\text{St} [\tilde{\theta}_{b,i}(\mathcal{X}_6 - 1) + \mathcal{X}_7] \right) + \frac{2q_b k}{q_m k_b \text{Pe}} + 2\text{St} \mathcal{X}_7}{2\text{St}(1 - \mathcal{X}_6)}, \quad (3.35)$$

kde je možné definovat ekvivalentní délku

$$\tilde{z}_{\text{eq}} = \frac{1}{2\text{St}(1 - \mathcal{X}_6)}, \quad (3.36)$$

a rovnovážná teplota krve je dána

$$\tilde{\vartheta}_{b,\infty} = \frac{\frac{2q_b k}{q_m k_b \text{Pe}} + 2\text{St}\mathcal{X}_7}{2\text{St}(1 - \mathcal{X}_6)}. \quad (3.37)$$

3.2.3 Výsledky analytických řešení Pennesovy rovnice přenosu tepla

Pro posouzení teploty krve jsou nejzajímavější dvě veličiny; rovnovážná délka cévy $\tilde{z}_{\text{eq}}$ a rovnovážná teplota $\tilde{\vartheta}_{b,\infty}$. Rovnovážná délka cévy je funkcí čtyř bezrozměrných parametrů (poměr poloměrů tkáně a cévy, Bi, $\tilde{P}$ a St). To stejné platí také pro rovnovážnou teplotu s tím rozdílem, že do rovnice vstupují také $2q_b k / q_m k_b \text{Pe}$ a $\tilde{\vartheta}_a$ (pro případ procházející cévy).

Poměr poloměrů tkáně a cévy reprezentuje vliv geometrie na model, $\tilde{P}$ lze chápat jako bezrozměrný koeficient perfuze, Bi reprezentuje sílu proudění v cévě, St je pak míra proudění v rámci cévy. $2q_b k / q_m k_b \text{Pe}$ je míra poměru síly tepelného zdroje v rámci tkáně vůči cévě, $\tilde{\vartheta}_a$ je konstantní teplota arteriální krve a Pe určuje vztah mezi prouděním a vedením tepla. Modelovanou tkání jsou játra, která jsou bohatě prokrvena. Z tohoto důvodu je možné mnoho hodnot parametrů modelu, viz Tab. 3.1, uvažovat stejné pro jaterní tkáň i krev.

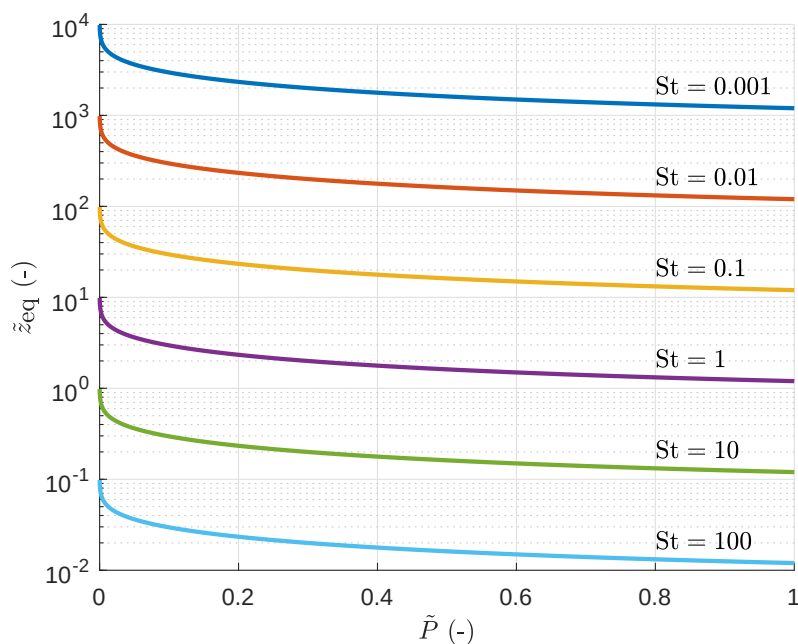
Tab. 3.1: Hodnoty parametrů analytického řešení pro jaterní tkáň.

Parametr	Symbol	Hodnota	Jednotka
Poloměr tkáně	r_t	4	cm
Poloměr cévy	r_b	4	mm
Biotovo číslo	Bi	2	–
Nusseltovo číslo	Nu	4	–
Pecletovo číslo	Pe	8	–
Hustota tkáně	ρ_t	1050	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
Hustota krve	ρ_b	1060	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
Bezrozměrná arteriální teplota	$\tilde{\vartheta}_a$	0	–
Tepelná vodivost tkáně/krve	k	0,52	$\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
Měrná tepelná kapacita krve	c_b	3617	$\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
Perfuze krve na jednotku objemu	ω_b	10	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$
Měrné objemové teplo v cévě	q_b	0	$\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$
Měrné objemové metabolické teplo	q_m	9930	$\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$

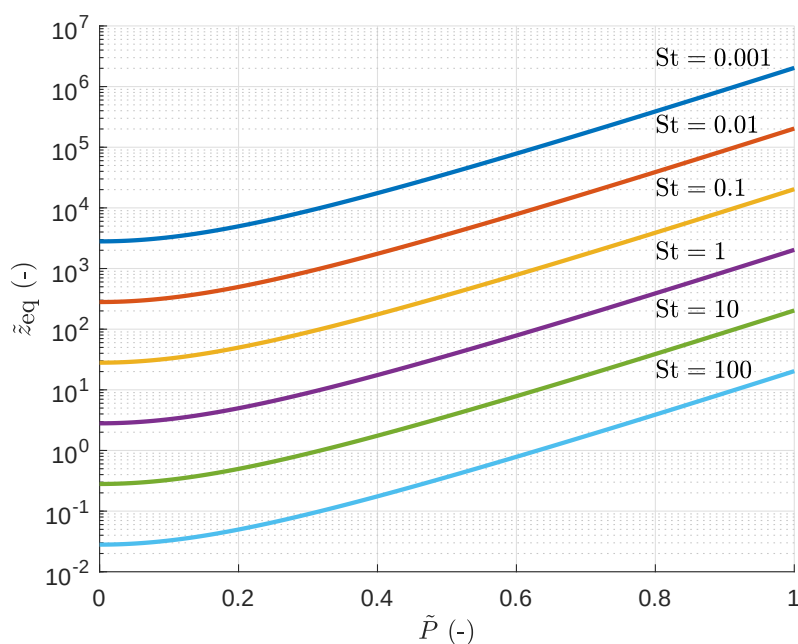
Na Obr. 3.3 a Obr. 3.4 lze vidět rovnovážnou délku cévy v závislosti na bezrozměrném koeficientu perfuze pro různá Stantonova čísla pro model procházející a zásobující cévy. U obou případů dochází ke snižování bezrozměrné rovnovážné délky cévy s rostoucím Stantonovým číslem. Tyto výsledky potvrzují skutečnost, že Stantonovo číslo reprezentuje efektivitu vedení v cévě. Pokud srovnáme oba případy lze vidět, že rovnovážná délka je delší pro případ zásobující cévy. V případě procházející cévy je tkáň plně zásobena krví o vstupní teplotě $\tilde{\vartheta}_a$. To znamená, že tkáň je ochlazována v celém svém objemu, kdy tato teplota je blízká teplotě krve. Tato skutečnost snižuje délku potřebnou pro dosažení rovnováhy.

Na druhou stranu ohřátá krev v zásobující cévě přenáší více tepla do tkáně než procházející céva. Je to způsobeno stoupáním bezrozměrné teploty $\tilde{\vartheta}_b$ s rostoucím $\tilde{z}$, tedy stoupající teplota

tkáně zpomaluje dosažení rovnováhy. V obou případech pak teplota krve přesáhne teplotu tkáně. Z toho plyne, že v případě zásobující cévy se perfuze chová jako zdroj, a proto bezrozměrná rovnovážná délka stoupá s bezrozměrným koeficientem perfuze $\tilde{P}$ pro případ zásobující cévy a klesá s $\tilde{P}$ pro případ procházející cévy.



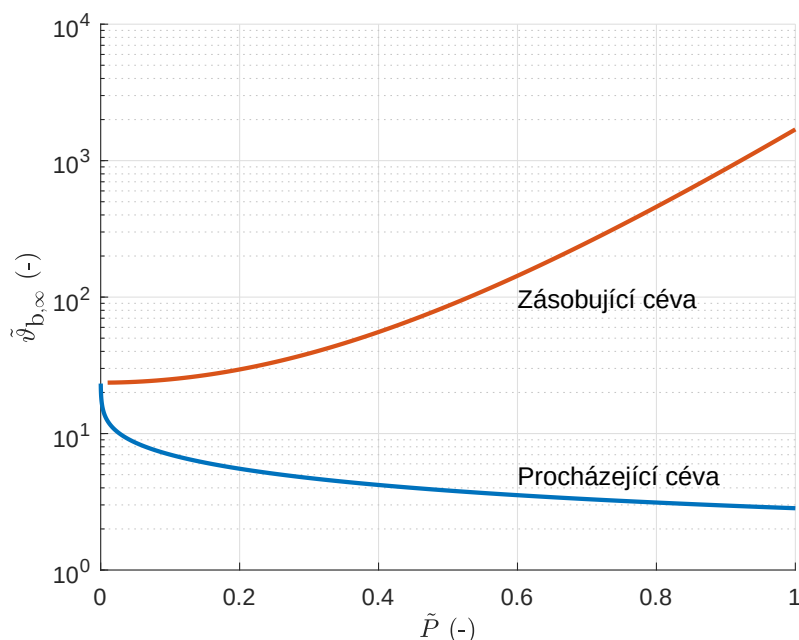
Obr. 3.3: Závislost ekvivalentní délky cévy na koeficientu perfuze pro procházející cévu.



Obr. 3.4: Závislost ekvivalentní délky cévy na koeficientu perfuze pro zásobující cévu.

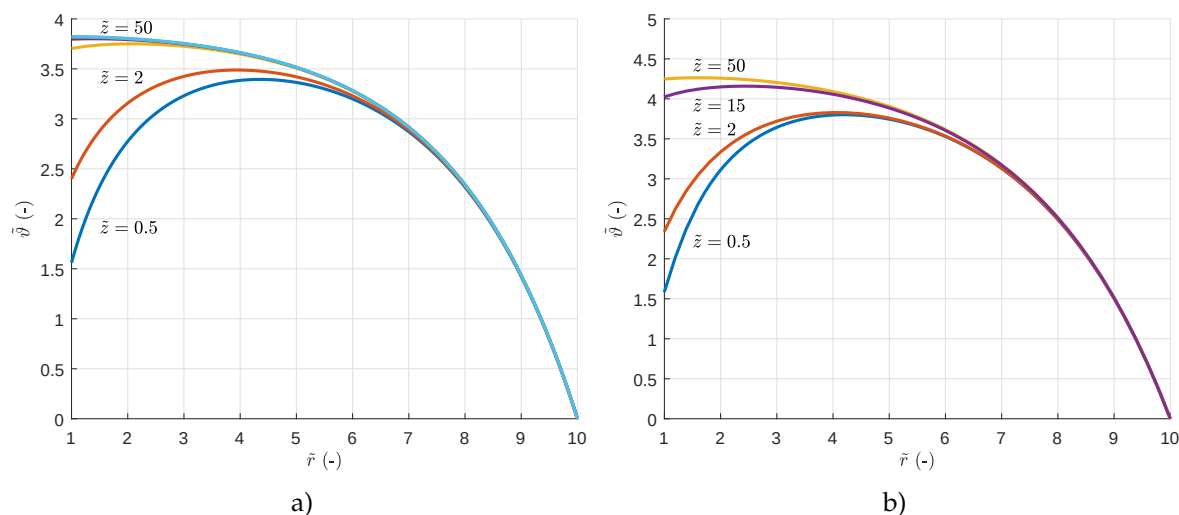
Obr. 3.5 znázorňuje bezrozměrnou rovnovážnou teplotu krve v cévě $\tilde{\theta}_{b,\infty}$ jako funkci bezrozměrného koeficientu perfuze $\tilde{P}$ pro oba diskutované modely. V obou případech, při splnění podmínky $2q_b k / q_m k_b Pe = 0$, se stane rovnovážná teplota nezávislou na Stantonově čísle. Typicky vychází tento člen v řádu 10^{-2} vyjma velmi malých cév, jako jsou arterioly, které jsou modelovány rovnicí přenosu tepla. Pokud srovnáme modely obou typů cév lze vidět, že bezrozměrná rovnovážná teplota krve pro případ zásobující cévy je vyšší než pro případ procházející

cévy. Tento výsledek je potvrzením toho, že zásobující céva snižuje odvod tepla tkání. Rovnovážná teplota roste s $\tilde{P}$ pro případ zásobující cévy a klesá s $\tilde{P}$ pro případ procházející cévy.



Obr. 3.5: Závislost rovnovážné teploty tkáně na koeficientu perfuze pro oba případy.

Obr. 3.6 a) a Obr. 3.7 a) mapují závislost teploty tkáně pro daný poloměr $\tilde{r}$ a délku cévy $\tilde{z}$ pro procházející a zásobující cévu získanou analytickým výpočtem.

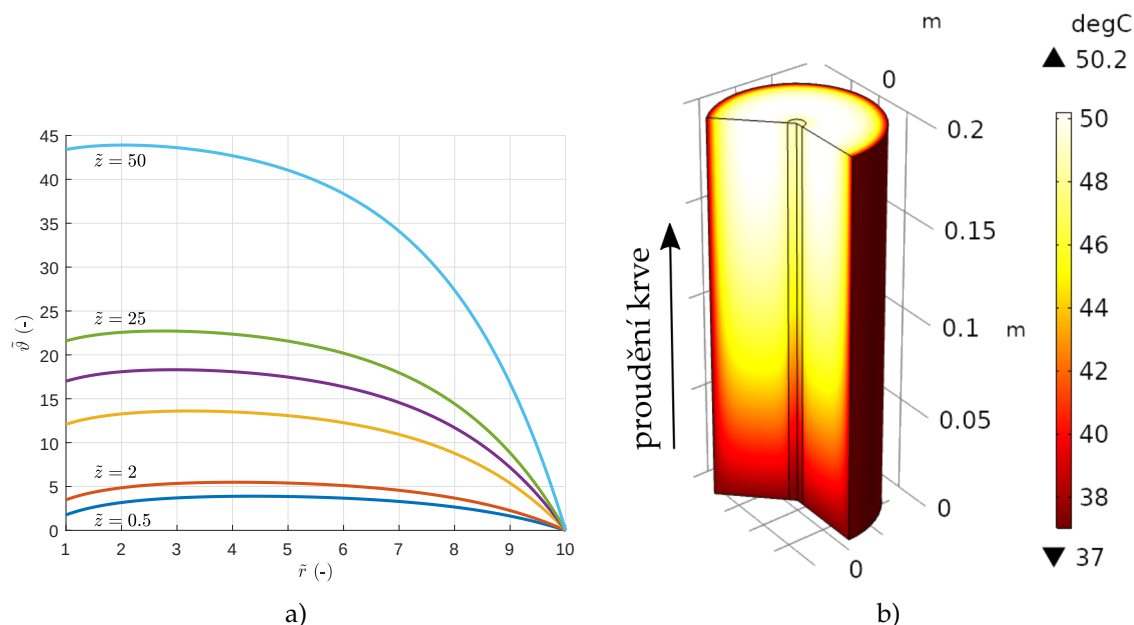


Obr. 3.6: Závislost teploty tkáně na poloze $\tilde{r}$ a $\tilde{z}$ pro procházející cévu. a) vypočtená analyticky a b) vypočtená pomocí COMSOL Multiphysics.

V obou případech jsou uvažovány hodnoty $2q_b k / q_m k_b Pe = 0$, $St = 0,5$, $\tilde{P} = 0,5$, $Nu = 4$, $Bi = 2$, $r_t / r_b = 10$, $\tilde{\vartheta}_{b,i} = 0$, $\tilde{\vartheta}_a = 0$ a $\tilde{z} = \{0,5, 2, 10, 15, 25, 50\}$. V případě procházející cévy je patrné, že teplo tkáně je cévou odváděno, nicméně při hodnotě $\tilde{z} \geq 15$ dochází ke snižování množství odváděného tepla. Odvod tepla se zvyšuje s rostoucím průměrem cévy a průtokem krve v cévě.

Pro porovnání diskutovaných závislostí zobrazují Obr. 3.6 b) a Obr. 3.7 b) data vypočtená pomocí programu COMSOL Multiphysics. Z grafů je patrné, že oba způsoby dávají podobné

výsledky, ne však zcela totožné. Dá se předpokládat, že rozdíly jsou dány způsobem řešení Pennesovy rovnice zejména pak tím, že se v analytickém řešení neuvažuje vzájemnou interakci teploty v radiálním a axiálním směru. Z Obr. 3.7 b) je patrné, že na začátku je céva schopna velmi dobře odvádět teplo. Postupně se však krev otepluje a klesá tak odvod tepla z okolní tkáně.



Obr. 3.7: Závislost teploty tkáně na poloze $\tilde{r}$ až pro zásobující cévu. a) vypočtená analyticky a b) vypočtená pomocí COMSOL Multiphysics.

3.3 Simulace elektroporace standardními jehlovými elektrodami

Nejčastěji zkoumanou geometrií pro studium vlivu elektroporace na tkáň jsou jehlové elektrody, viz např. Obr. 1.6. Je to dáno tím, že první komerčně dostupné zařízení NanoKnife pro stejnosměrnou elektroporaci využívá právě tento typ elektrod a slouží tedy jako standardní model ověřený letitou klinickou praxí. Tato simulace byla vytvořena v souvislosti s reálnými experimenty uvedenými v kapitolách 5.1 a 5.3. Parametry modelu jsou uvedeny v Tab. 3.2. Zdrojem hodnot jednotlivých parametrů pro tuto i následující simulace je databáze biologických dat IT'IS Foundation, viz [66].

Na Obr. 3.8 lze vidět analyzovanou geometrii modelu. Do jaterní tkáně jsou zapíchnuty dvě izolované jehlové elektrody, které mají odizolovanou pouze koncovou část o délce 1,5 cm. Výpočet byl proveden pro dva případy uvažované vodivosti jaterní tkáně a to s vodivostí závislou a nezávislou na velikosti intenzity elektrického pole. Na Obr. 3.9 je graficky zobrazena zvolená závislost elektrické vodivosti na velikosti intenzity elektrického pole jaterní tkáně. Tato závislost má tvar sigmoidální funkce, obdobně jako v [47].

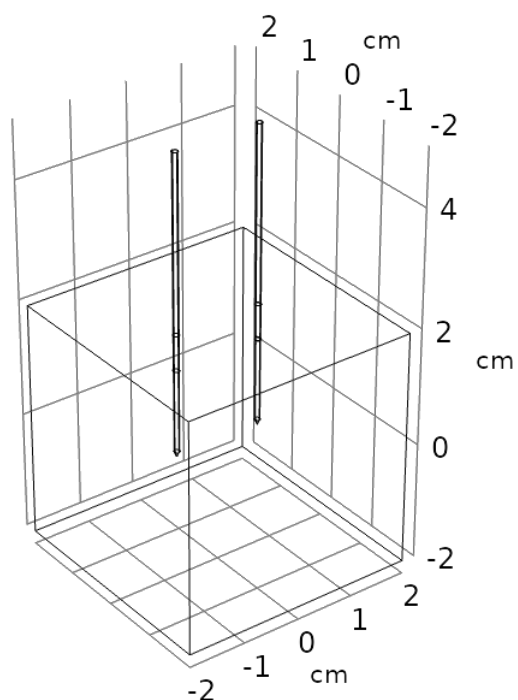
Rozložení aplikovaného napětí 2,25 kV v modelu s vodivostí nezávislou a závislou na intenzitě elektrického pole je zobrazeno na Obr. 3.10 a Obr. 3.13 a to v horním a bočním pohledu. Odpovídající hodnoty intenzity elektrického pole jsou na Obr. 3.11 a Obr. 3.14. Z těchto dat jsou na základě rovnic (3.2) a (3.3) vypočteny Jouleovy ztráty, které jsou zobrazeny na Obr. 3.12 a Obr. 3.15. Na základě získaných Jouleových ztrát bylo v programu COMSOL, za použití

rovnice (3.4), vypočteno šíření tepla v tkáni při aplikaci 100 pulzů. Obr. 3.19 zobrazuje graf vývoje maximální teploty v prvních deseti pulzech pro oba případy. Teplota exponenciálně roste až na ustálenou hodnotu 42 °C v případě nezávislé vodivosti a v modelu s vodivostí závislou na intenzitě elektrického pole se teplota ustálí na hodnotě 39,6 °C. Obr. 3.16 a Obr. 3.18 ukazují vývoj teploty po prvním, desátém, padesátém a stém pulzu pro případ s vodivostí nezávislou na intenzitě elektrického pole. Obr. 3.17 zobrazuje rozložení teploty po padesáti pulzech v případě vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.

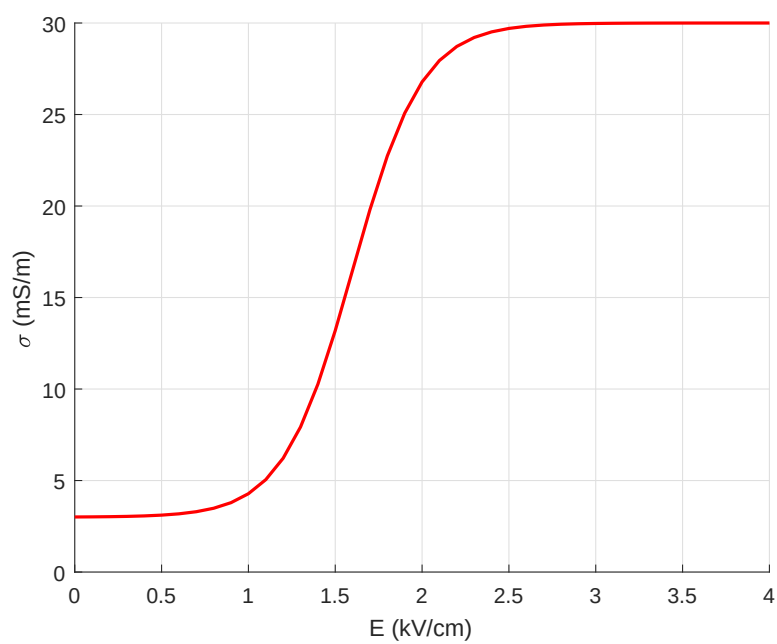
Z uvedených výsledků vyplývá, že ke změnám v tkáni dochází hlavně v blízkosti elektrod. To znamená, že by nežádoucí tkáň, která má být elektroporací zničena, měla být v této oblasti. Velikost ablované oblasti je možné ovlivňovat vzdáleností elektrod i velikostí aplikovaného napětí. Je však třeba uvažovat, že se zvyšujícím se napětím roste i ohřev tkáně, který může vést k její nežádoucí nevratné destrukci. V případě konstantní vodivosti jsou všechny zkoumané veličiny rozloženy souměrně kolem elektrod na rozdíl od modelu s vodivostí závislou na intenzitě elektrického pole, kde se změny soustředí ují spíše do prostoru mezi elektrodami.

Tab. 3.2: Hodnoty parametrů modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro jaterní tkáň.

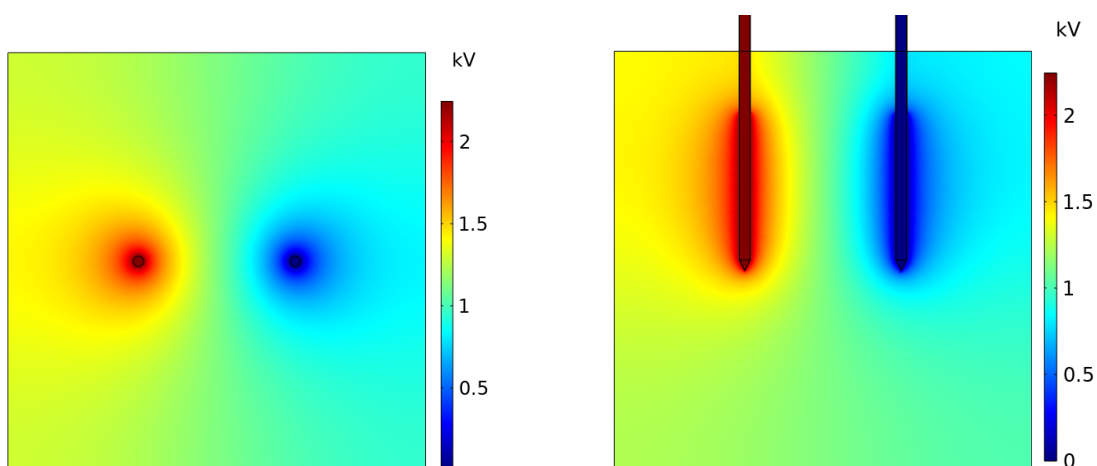
Parametr	Symbol	Hodnota	Jednotka
Průměr ocelové elektrody	D_e	1	mm
Výška segmentu jaterní tkáně	D_t	4	cm
Vzdálenost mezi elektrodami	d_e	1,5	cm
Tloušťka kaptonové izolace	r_b	0,05	mm
Délka odizolované části elektrody	d	1,5	cm
Hustota jaterní tkáně	ρ_t	1050	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
Tepelná vodivost tkáně	k	0,52	$\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
Měrná tepelná kapacita krve/tkáně	c_t	3540	$\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
Elektrická vodivost tkáně	σ_t	0,0277	$\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$
Relativní permitivita tkáně	ϵ_t	$1,51 \cdot 10^7$	–
Počáteční teplota	T_0	37	°C
Délka pulzu	T_p	100	μs
Počet pulzů	N_p	100	–
Napětí pulzů	U_p	2250	V



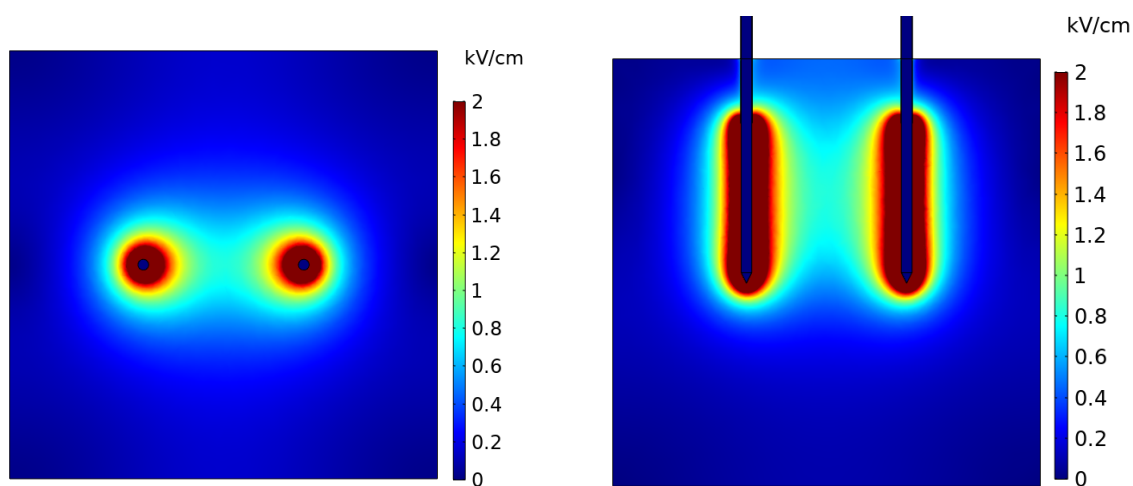
Obr. 3.8: Geometrie modelu tkáně s jehlovými elektrodami.



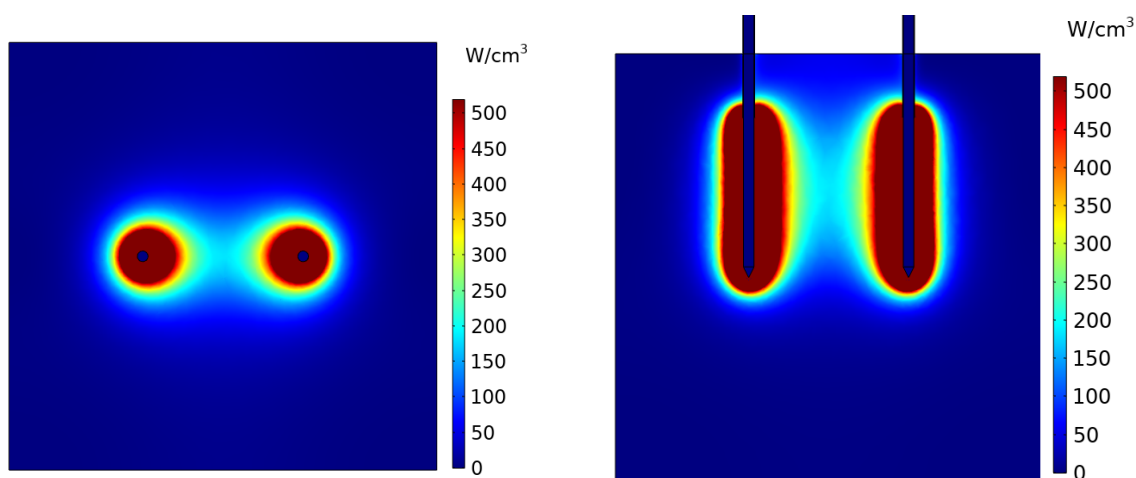
Obr. 3.9: Závislost elektrické vodivosti na velikosti intenzity elektrického pole pro jaterní tkáň.



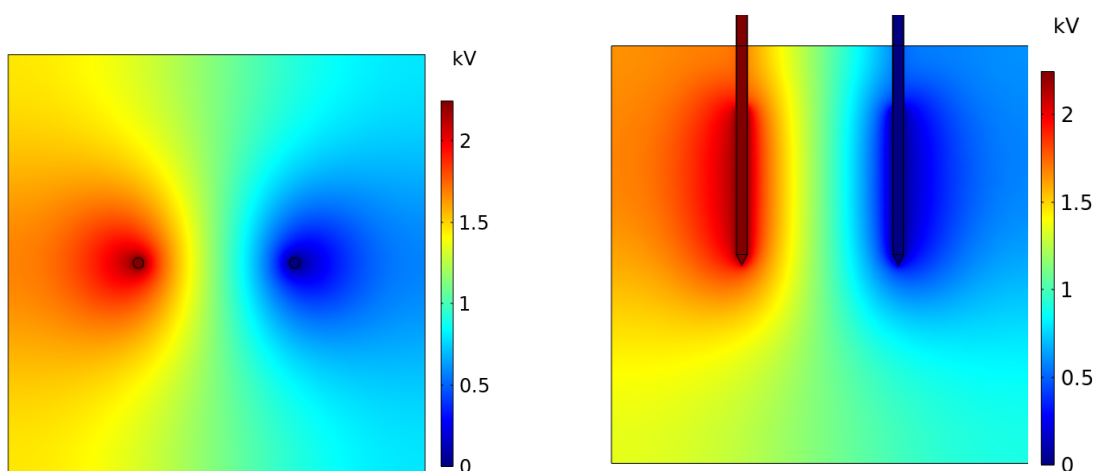
Obr. 3.10: Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



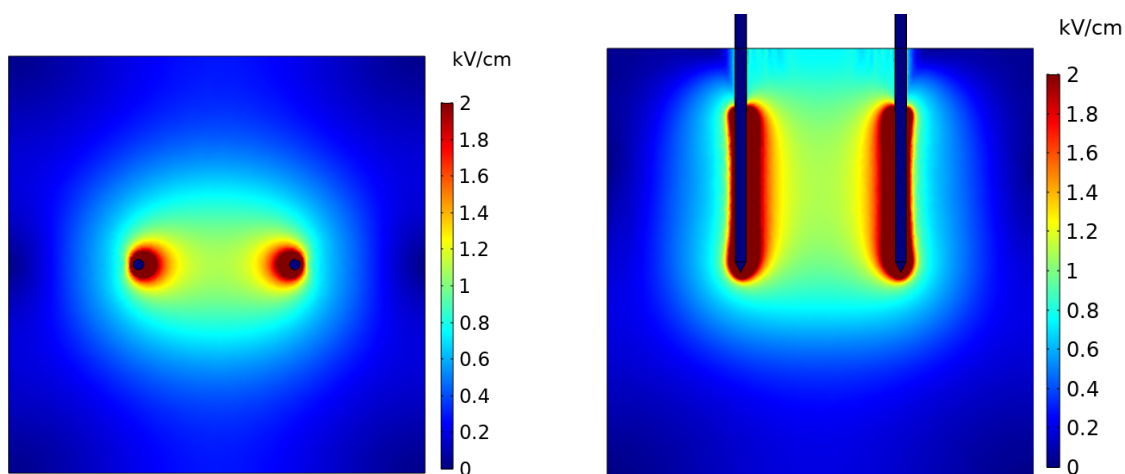
Obr. 3.11: Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



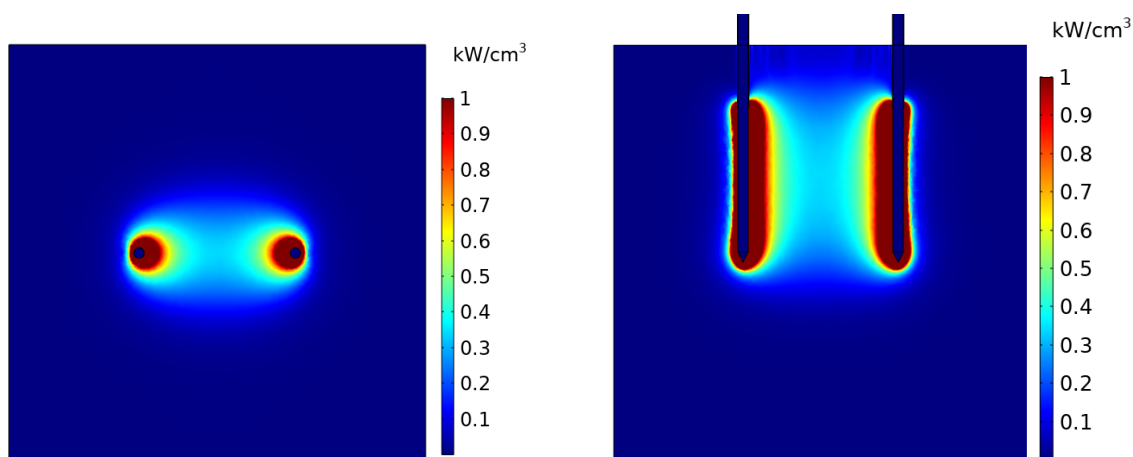
Obr. 3.12: Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



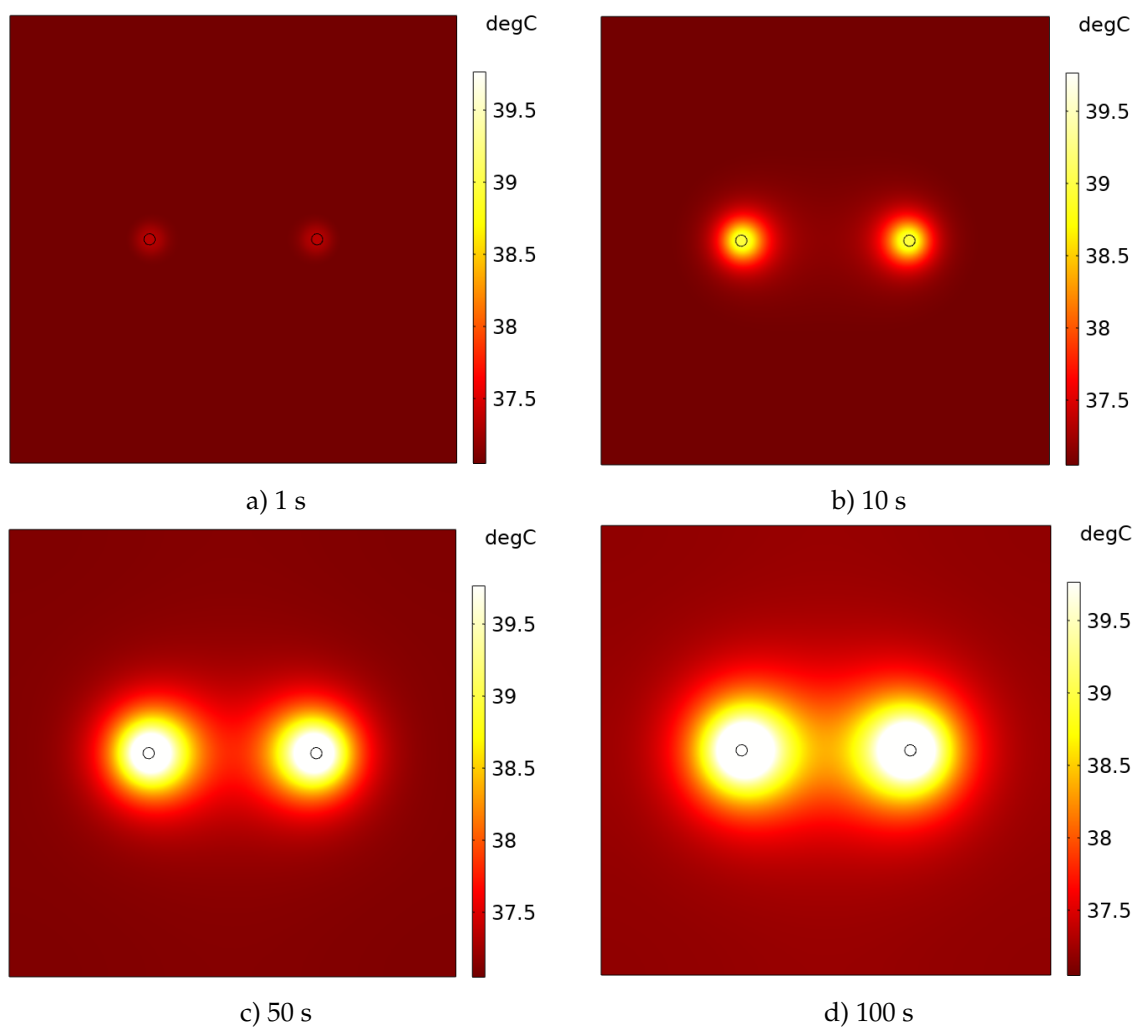
Obr. 3.13: Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.



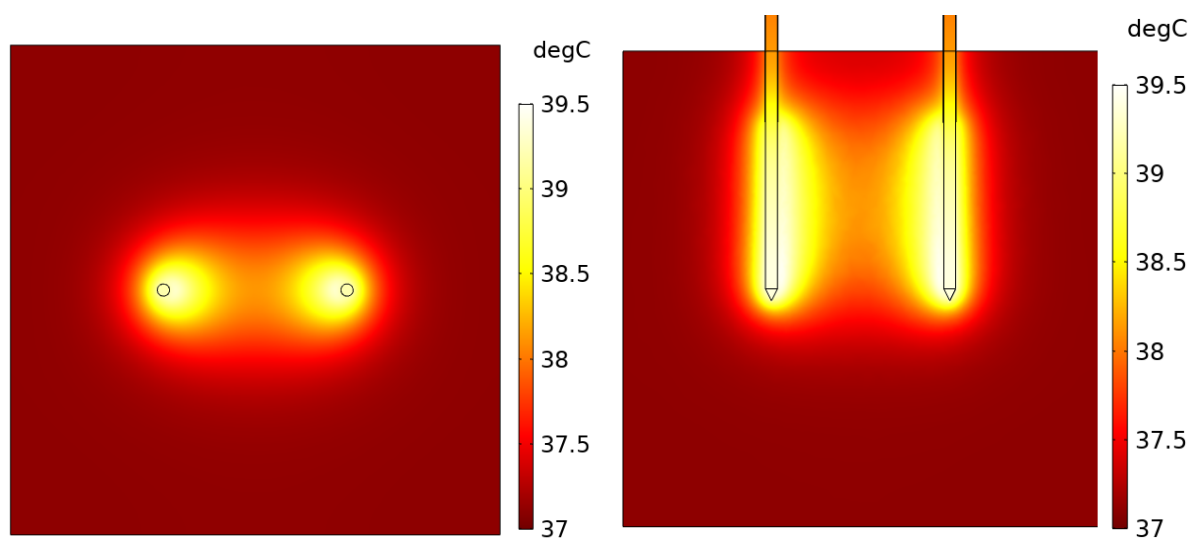
Obr. 3.14: Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.



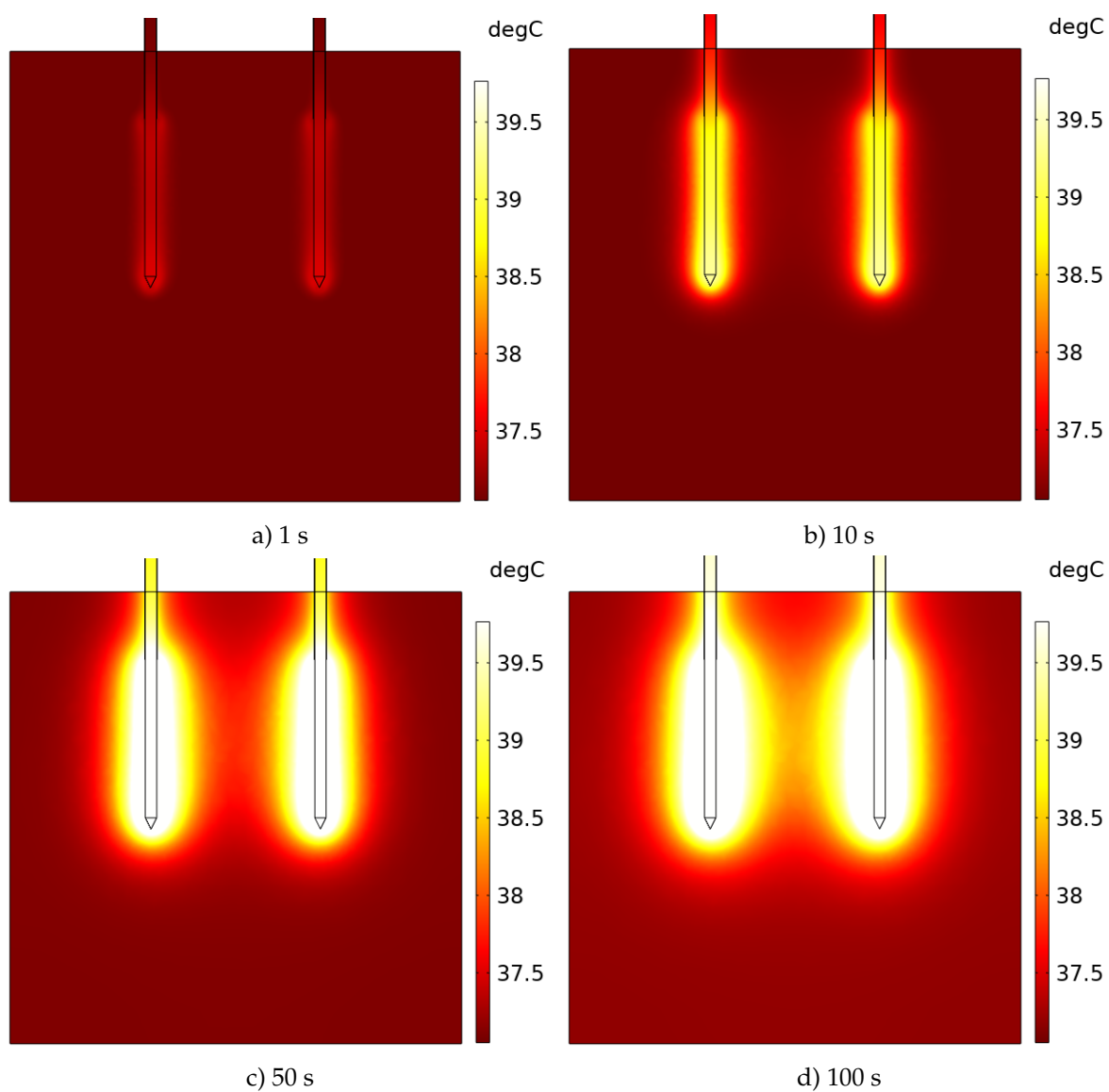
Obr. 3.15: Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.



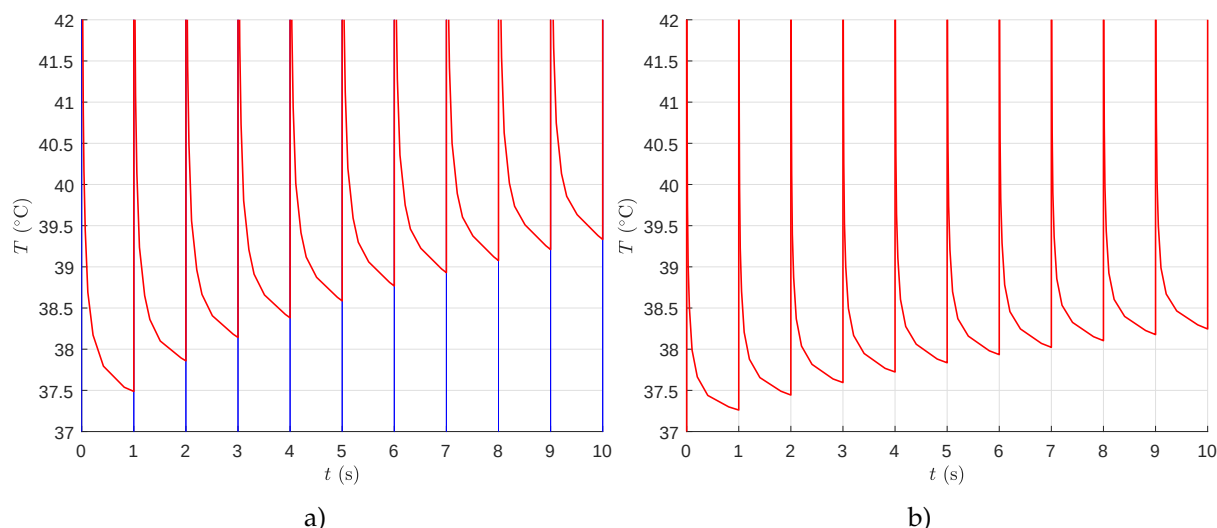
Obr. 3.16: Vývoj teploty v modelu tkáně s jehlovými elektrodami v průběhu simulace pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole, v časech 1, 10, 50 a 100 s.



Obr. 3.17: Rozložení teploty v modelu tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole po 50 s.



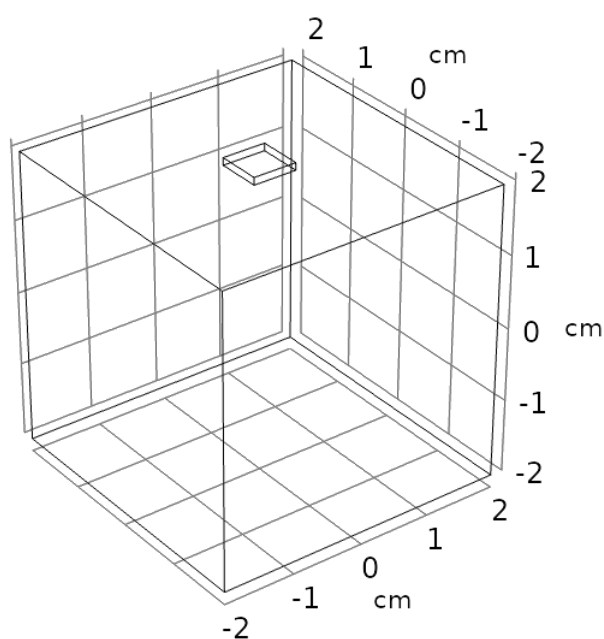
Obr. 3.18: Vývoj teploty v modelu tkáně s jehlovými elektrodami v průběhu simulace pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole, v časech 1, 10, 50 a 100 s.



Obr. 3.19: Graf vývoje teploty v prvních deseti pulzech pro model tkáně s jehlovými elektrodami pro případ vodivosti nezávislé a závislé na intenzitě elektrického pole.

3.4 Simulace elektroporace plošnou elektrodou

Tento model byl vytvořen v souvislosti s reálnými experimenty na srdci prasete *in vivo* s přísavnou elektrodou o velikosti 6×6 mm popsány v kapitole 7.1. Geometrie tohoto modelu je na Obr. 3.20 a parametry modelu v Tab. 3.3. Pro tuto simulaci byl materiál srdeční tkáně nastavený jako teplotně závislý. Tyto závislosti byly zvoleny na základě [67]. Výpočet byl proveden pro dva případy uvažované vodivosti srdeční tkáně a to pro vodivost závislou a nezávislou na velikosti intenzity elektrického pole. Na Obr. 3.21 je graficky zobrazená zvolená závislost elektrické vodivosti na velikosti intenzity elektrického pole srdeční tkáně.

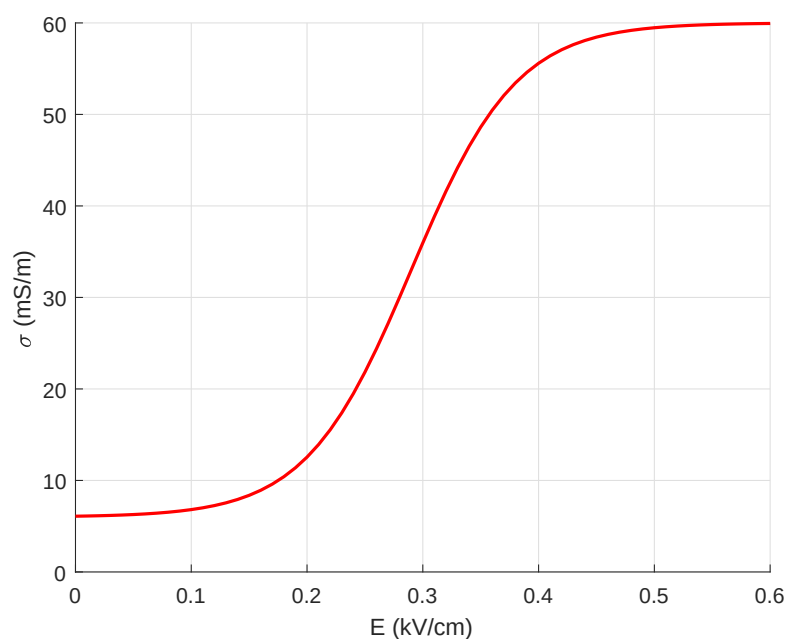


Obr. 3.20: Geometrie modelu tkáně s plošnou elektrodou.

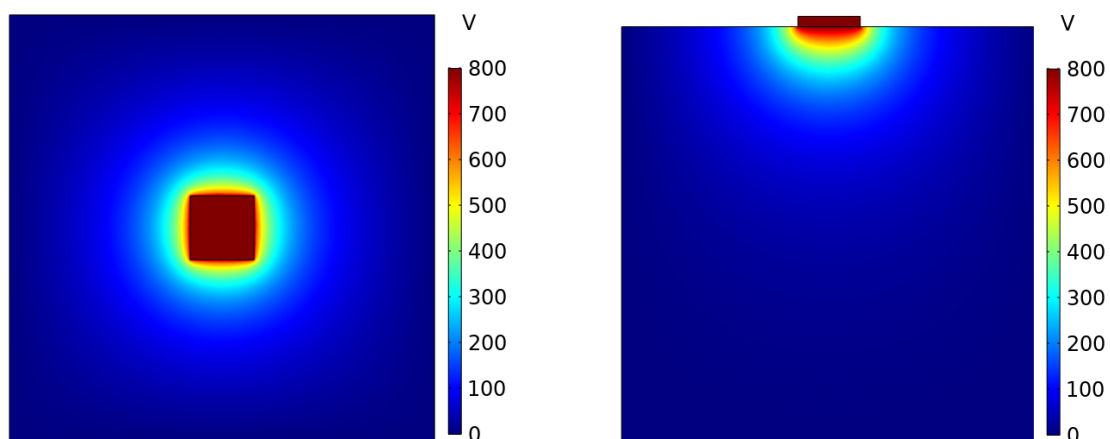
Rozložení aplikovaného napětí 800 V v modelu elektroporace plošnou elektrodou s vodivostí nezávislou a závislou na intenzitě elektrického pole je zobrazeno na Obr. 3.22 a Obr. 3.25 je zobrazeno na Obr. 3.22. Odpovídající hodnoty intenzity elektrického pole jsou na Obr. 3.23 a Obr. 3.26. Jouleovy ztráty jsou zobrazeny na Obr. 3.24 a Obr. 3.27. Ze získaných dat bylo vypočteno šíření tepla v tkáni při aplikaci 60 pulzů. Obr. 3.28 zobrazuje rozložení teploty ve zkoumaném modelu při napětí 500, 600 a 800 V pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole. Obr. 3.29 zobrazuje rozložení teploty po šedesáti pulzech v případě vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole. Obr. 3.30 zobrazuje graf vývoje maximální teploty v prvních deseti pulzech pro oba případy. Teplota exponenciálně roste až na ustálenou hodnotu 40 °C v případě nezávislé vodivosti a v modelu s vodivostí závislou na intenzitě elektrického pole se teplota ustálí na hodnotě 38 °C.

Tab. 3.3: Hodnoty parametrů modelu tkáně s plošnou elektrodou pro srdeční tkáň.

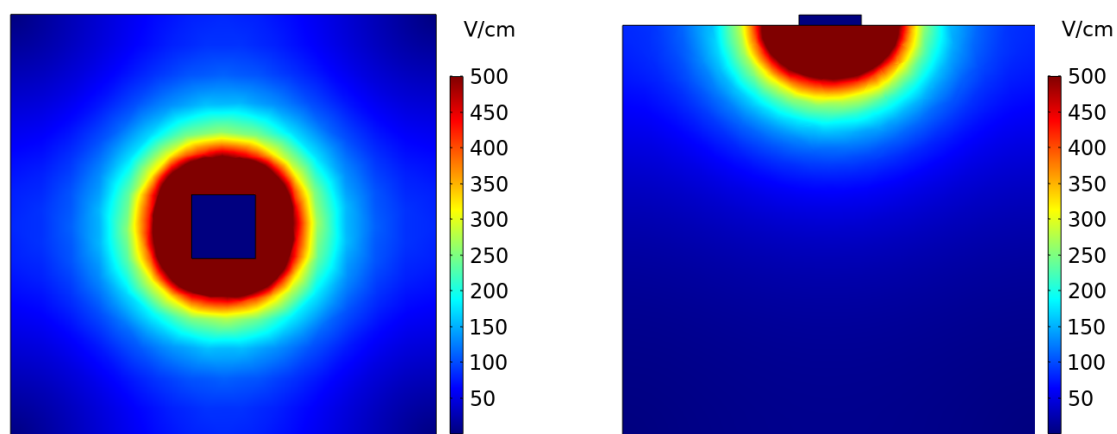
Parametr	Symbol	Hodnota	Jednotka
Délka hrany elektrody	D_e	2,667	mm
Výška segmentu srdeční tkáně	D_t	4	cm
Hustota krve	ρ_b	1060	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
Měrná tepelná kapacita tkáně	c_t	3212	$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
Měrná tepelná kapacita krve	c_t	3617	$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
Měrné objemové metabolické teplo tkáně	q_m	41817	$\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$
Perfuze krve na jednotku objemu	ω_b	18,73	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$
Elektrická vodivost tkáně	σ_t	0,0537	$\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$
Relativní permitivita tkáně	ϵ_t	$2,36\cdot 10^7$	–
Počáteční teplota	T_0	37	°C
Délka pulzu	T_p	100	μs
Počet pulzů	N_p	60	–
Napětí pulzů	U_p	500/600/800	V



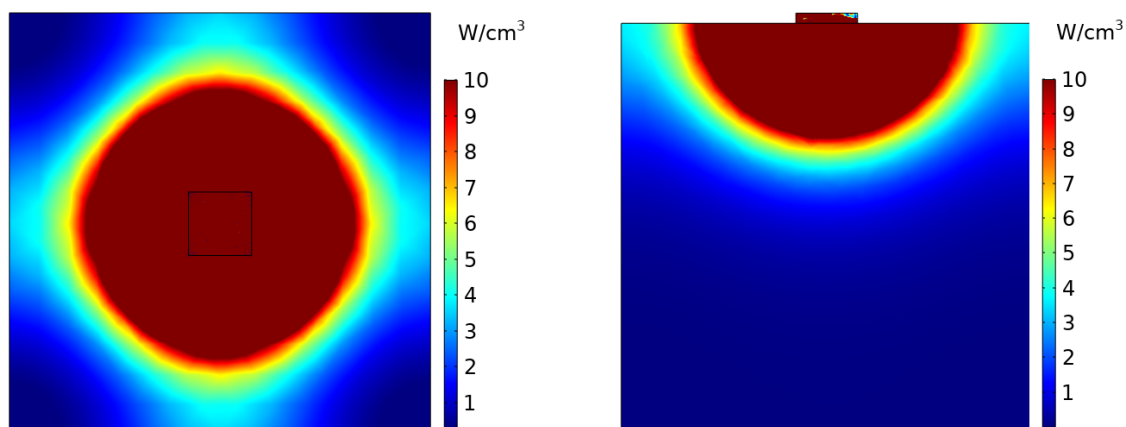
Obr. 3.21: Závislost elektrické vodivosti na velikosti intenzity elektrického pole pro srdeční tkáň.



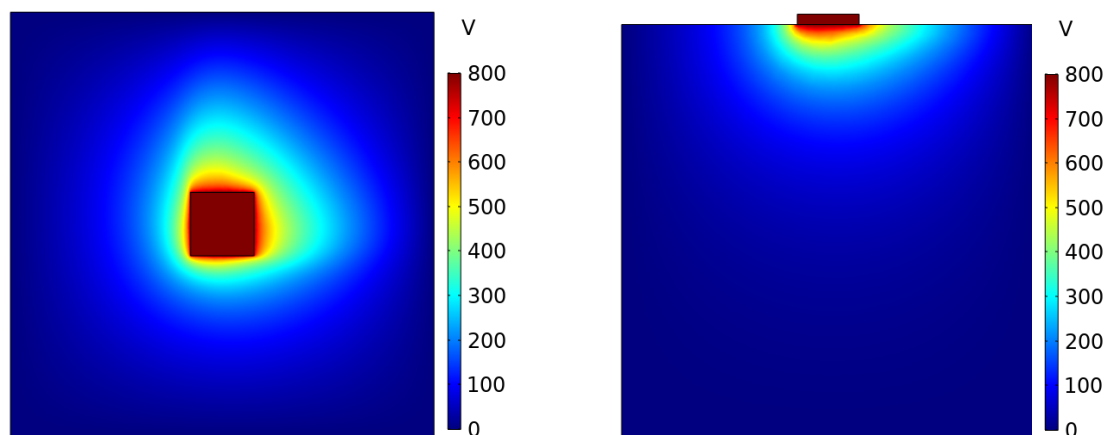
Obr. 3.22: Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



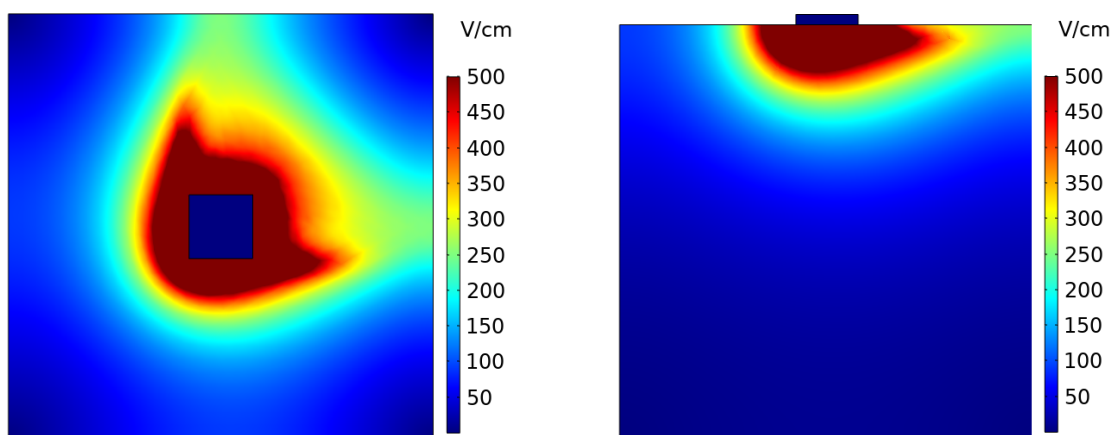
Obr. 3.23: Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



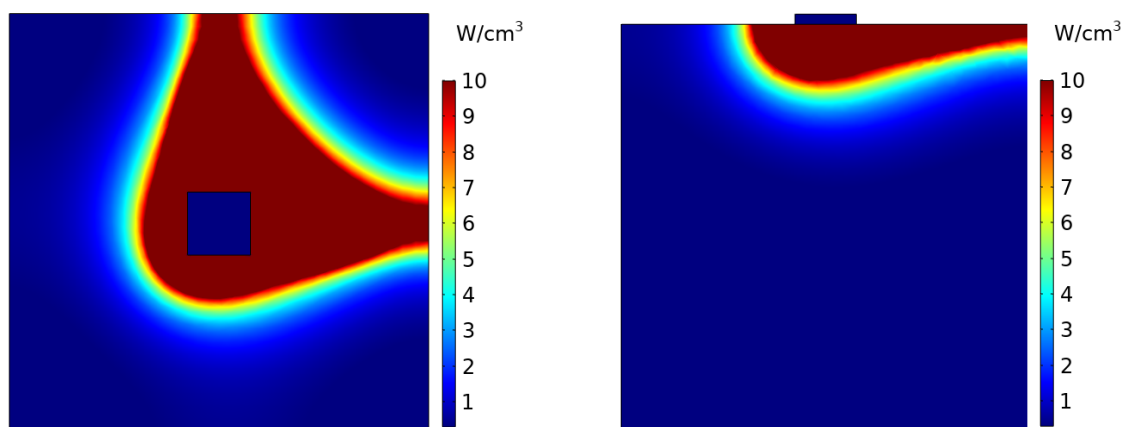
Obr. 3.24: Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



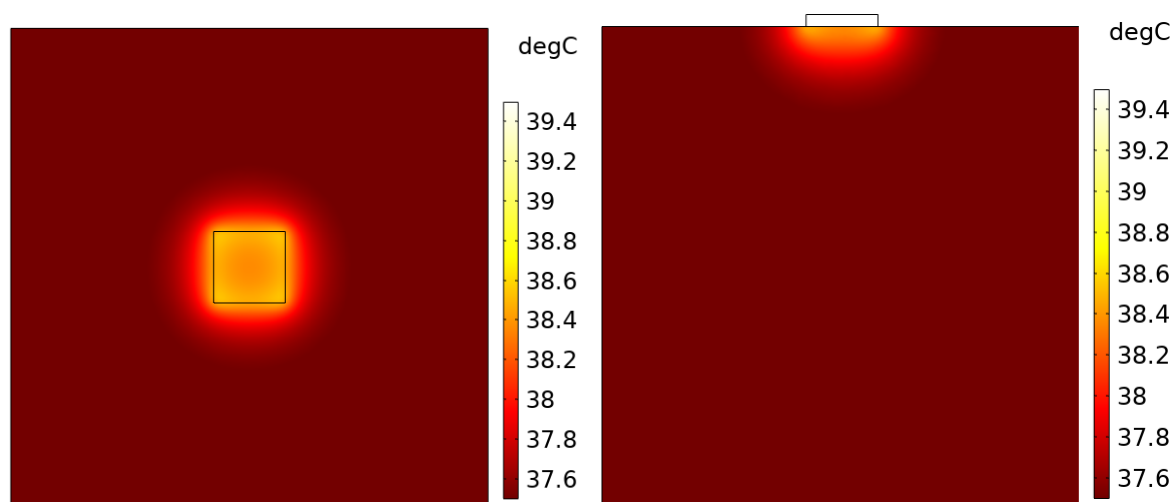
Obr. 3.25: Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.



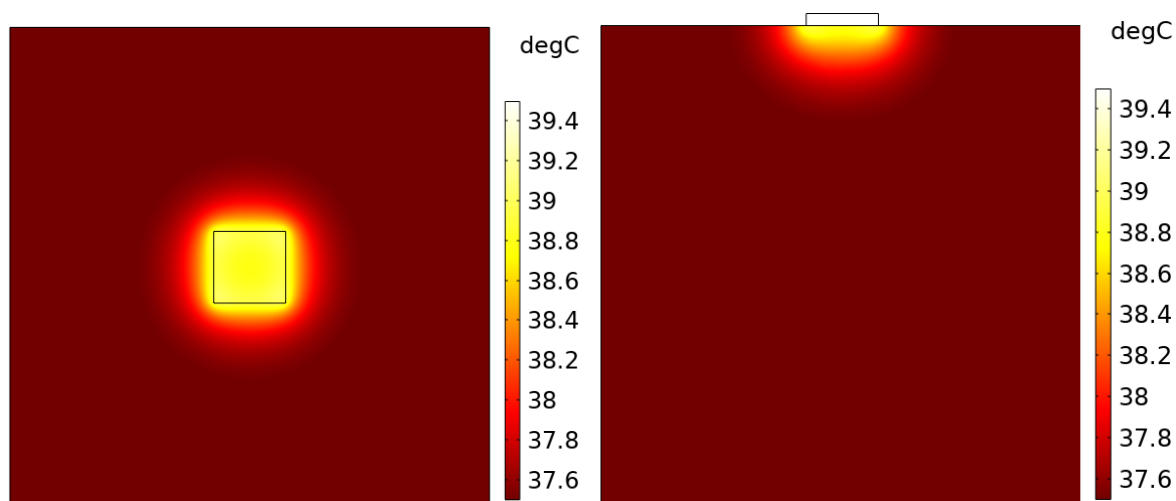
Obr. 3.26: Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.



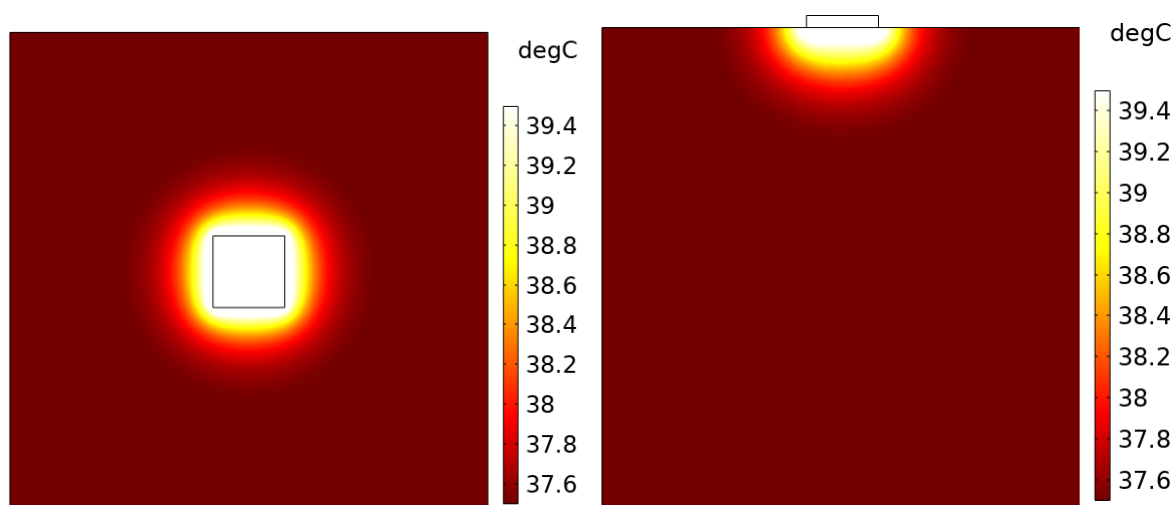
Obr. 3.27: Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.



a) 500 V

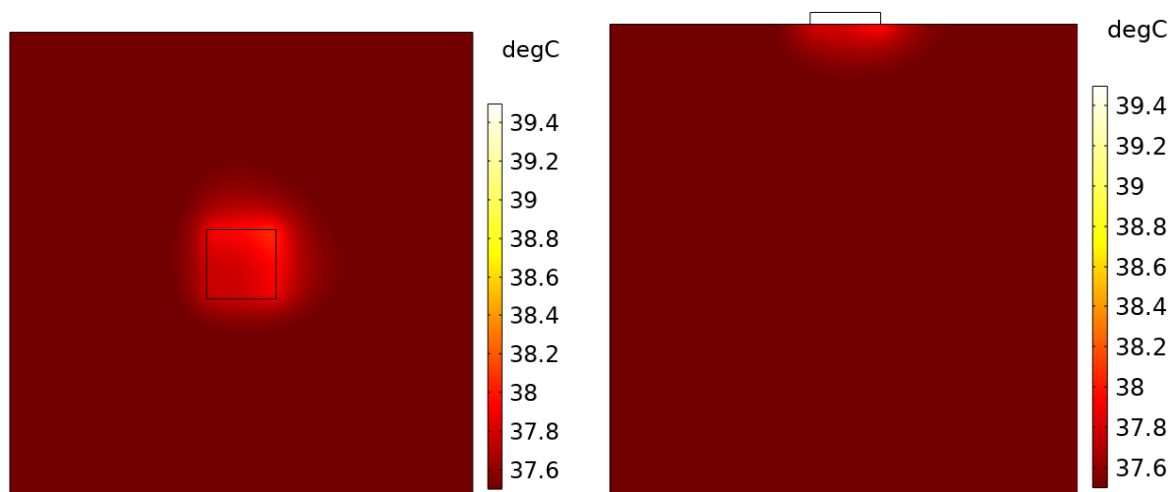


b) 600 V

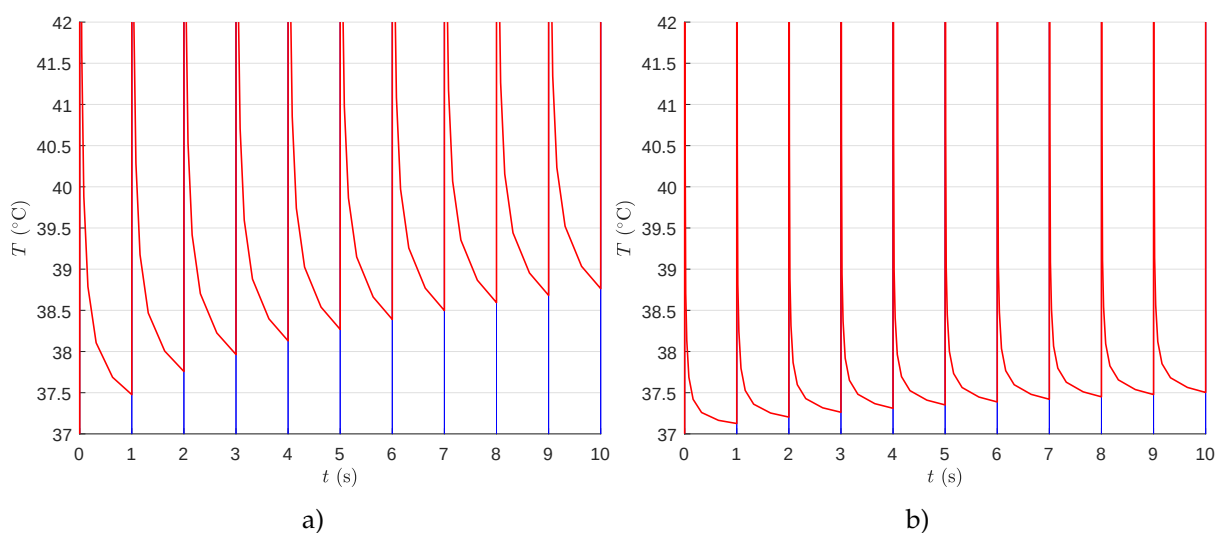


c) 800 V

Obr. 3.28: Rozložení teploty v modelu tkáně s plošnou elektrodou pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole po 60 s při napětí 500, 600 a 800 V.



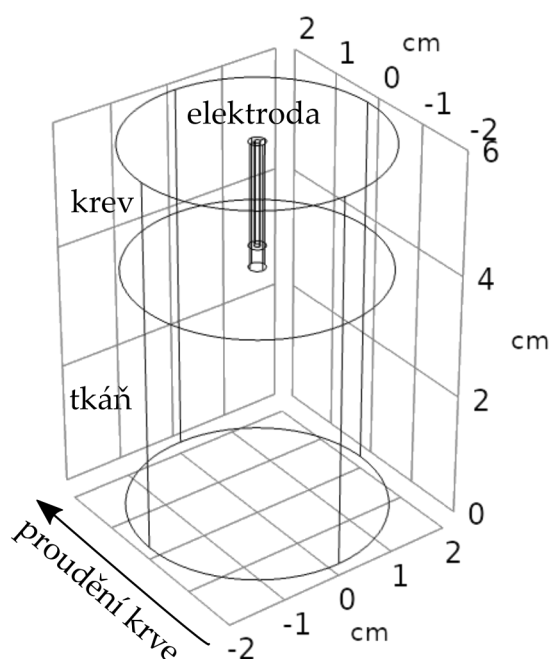
Obr. 3.29: Rozložení teploty v modelu tkáně s plošnou elektrodou pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole po 60 s při napětí 800 V.



Obr. 3.30: Graf vývoje teploty v prvních deseti pulzech pro model tkáně s plošnou elektrodou při napětí 800 V pro případ vodivosti nezávislé a závislé na intenzitě elektrického pole.

3.5 Simulace elektroporace endokardiálním katetrem

Simulace elektroporace za použití endokardiálního katetru byla vytvořena v souvislosti s reálnými experimenty uvedenými v kapitole 7.2. Parametry modelu jsou uvedeny v Tab. 3.4. Na Obr. 3.31 lze vidět analyzovanou geometrii modelu se zvolenou orientací proudící krve. Elektroda je tvořena izolovaným vodičem, který má na svém konci odizolovaný válcový segment. Tato elektroda je zcela obklopena proudící krví, kdy pouze její čelní část je v kontaktu s vnitřní stěnou srdeční. Na monopolární elektrodu je přiváděno kladné napětí 900 V a vnější obal modelu je spojen se zemí. Výpočet byl taktéž proveden pro dva případy uvažované vodivosti srdeční tkáně a to pro vodivost závislou a nezávislou na velikosti intenzity elektrického pole. Na Obr. 3.32 je graficky zobrazena zvolená závislost elektrické vodivosti na velikosti intenzity elektrického pole srdeční tkáně.



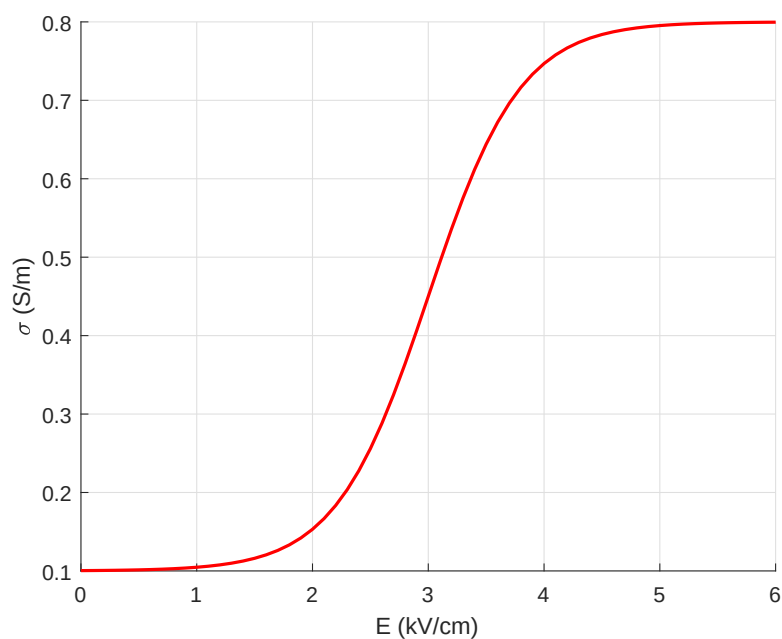
Obr. 3.31: Geometrie modelu tkáně s endokardiálním katetrem.

Rozložení aplikovaného napětí v modelu s nezávislou a závislou vodivostí na intenzitě elektrického pole je zobrazeno na Obr. 3.33 a Obr. 3.36. Odpovídající hodnoty intenzity elektrického pole jsou na Obr. 3.34 a Obr. 3.37. Jouleovy ztráty jsou zobrazeny na Obr. 3.35 a Obr. 3.38. Ze získaných dat bylo vypočteno šíření tepla v tkáni při aplikaci 60 pulzů. Obr. 3.39 a Obr. 3.40 zobrazují rozložení teploty ve zkoumaném modelu. Na Obr. 3.41 jsou k vidění grafy vývoje maximální teploty v prvních deseti pulzech pro oba případy. Teplota exponenciálně roste až na ustálenou hodnotu 45 °C pro případ s nezávislou vodivostí a 40,7 °C pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.

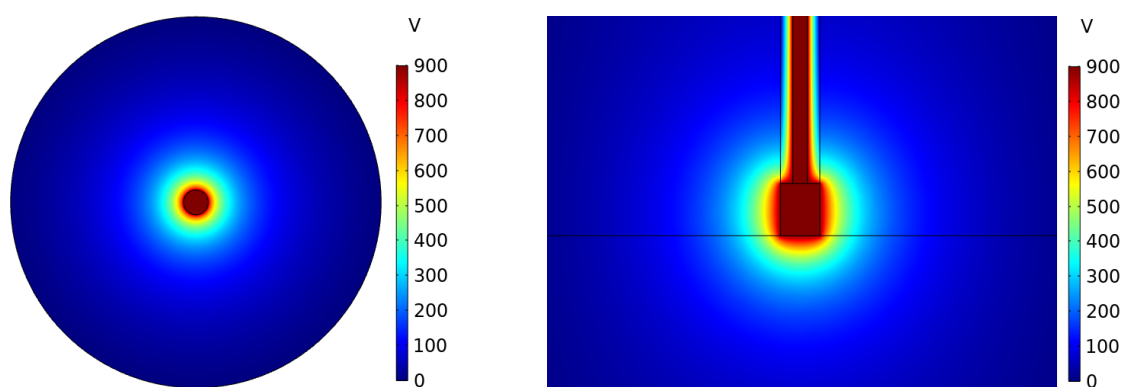
Z Obr. 3.39 a Obr. 3.40 je patrné, že proudící krev má významný vliv na výsledné rozložení teploty v tkáni. Dále je z těchto obrázků zřejmé, že v případě vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole je většina vznikajícího tepla odvedena proudící krví. Tomu odpovídá také nižší maximální ustálená teplota než v případě s nezávislou vodivostí. Je to dáno tím, že v simulaci se závislou vodivostí má srdeční tkáň ve většině případů nižší elektrickou vodivost oproti krvi, kde se tím pádem generuje většina Jouleových ztrát. Výše popsané skutečnosti byly experimentálně potvrzeny.

Tab. 3.4: Hodnoty parametrů modelu tkáně s endokardiálním katetrem.

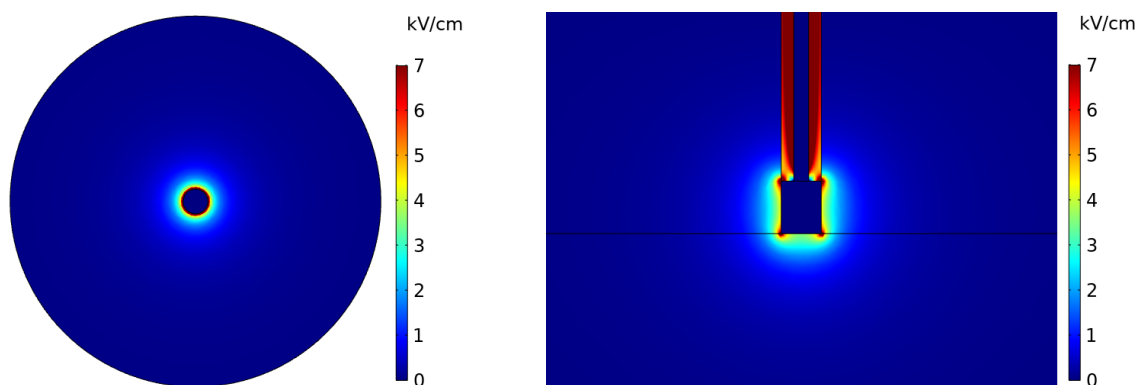
Parametr	Symbol	Hodnota	Jednotka
Průměr elektrody	D_e	2,667	mm
Poloměr segmentu srdeční tkáně	r_t	2	cm
Výška segmentu srdeční tkáně	D_t	4	cm
Výška segmentu krve	D_b	4	cm
Tloušťka kaptonové izolace	r_b	0,83	mm
Délka odizolované části elektrody	d	3,5	mm
Hustota vnitřní srdeční stěny	ρ_t	1050	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
Hustota krve	ρ_b	1060	$\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$
Tepelná vodivost tkáně/krve	k	0,52	$\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
Měrná tepelná kapacita krve/tkáně	c_t	3617	$\text{J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$
Elektrická vodivost tkáně	σ_t	0,7	$\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$
Elektrická vodivost krve	σ_b	0,66	$\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$
Relativní permitivita tkáně	ϵ_t	5260	–
Relativní permitivita krve	ϵ_b	1	–
Počáteční teplota	T_0	37	$^{\circ}\text{C}$
Rychlost proudění krve	v_b	11	$\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
Délka pulzu	T_p	100	μs
Počet pulzů	N_p	60	–
Napětí pulzů	U_p	900	V



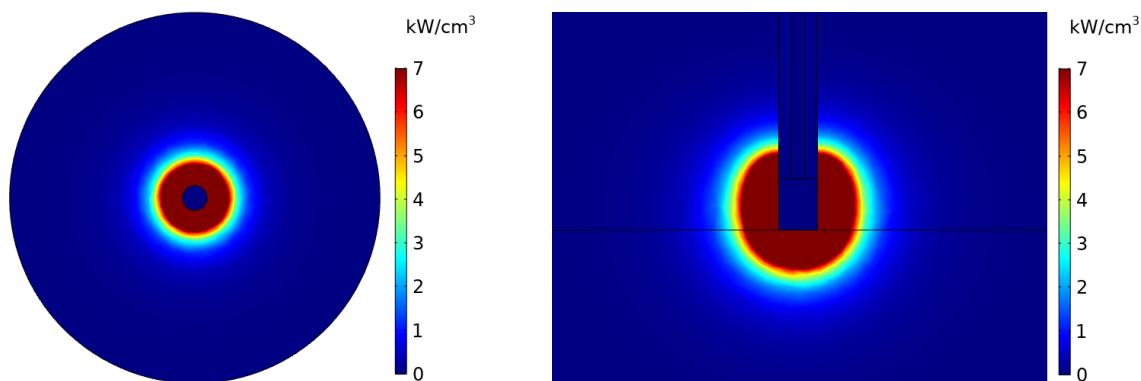
Obr. 3.32: Závislost elektrické vodivosti na velikosti intenzity elektrického pole pro vnitřní stěnu srdce.



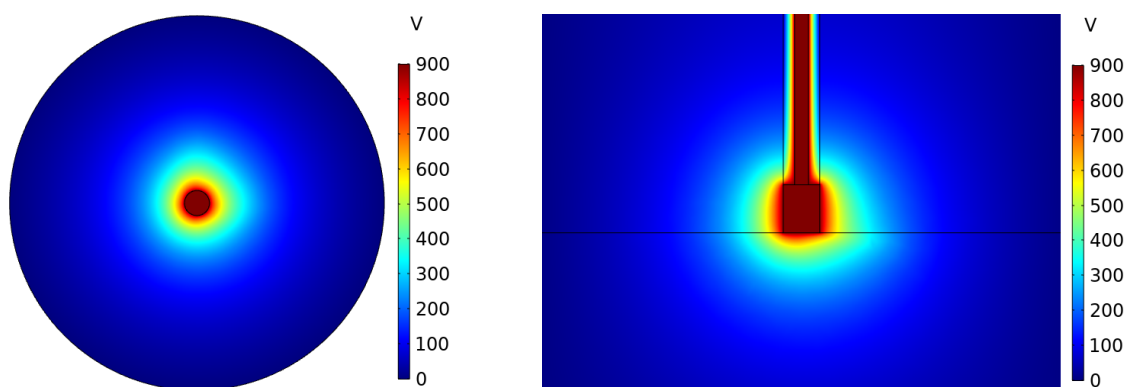
Obr. 3.33: Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



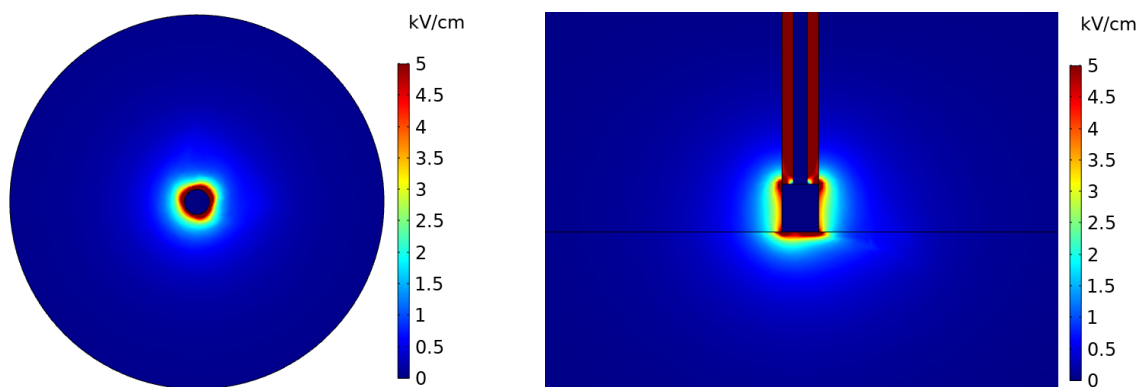
Obr. 3.34: Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



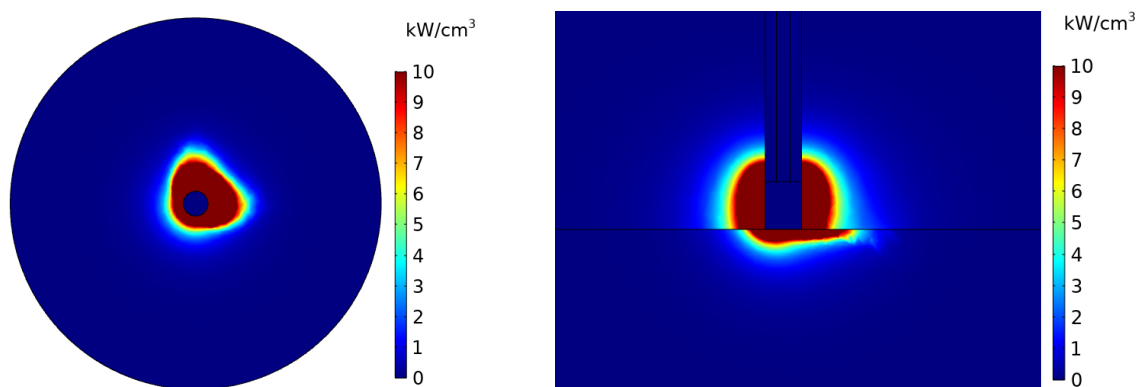
Obr. 3.35: Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



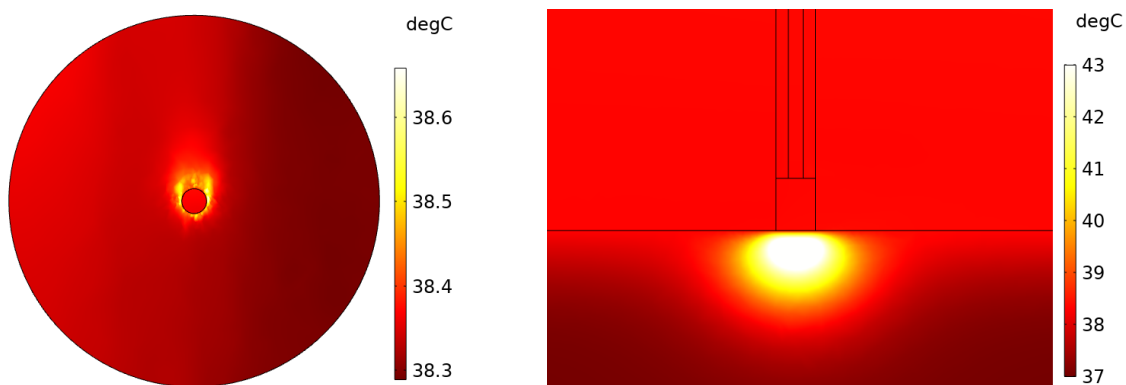
Obr. 3.36: Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.



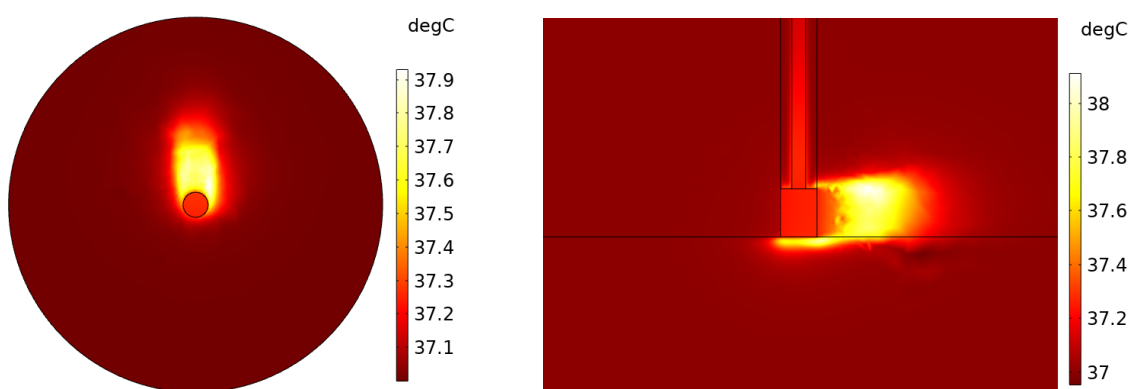
Obr. 3.37: Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.



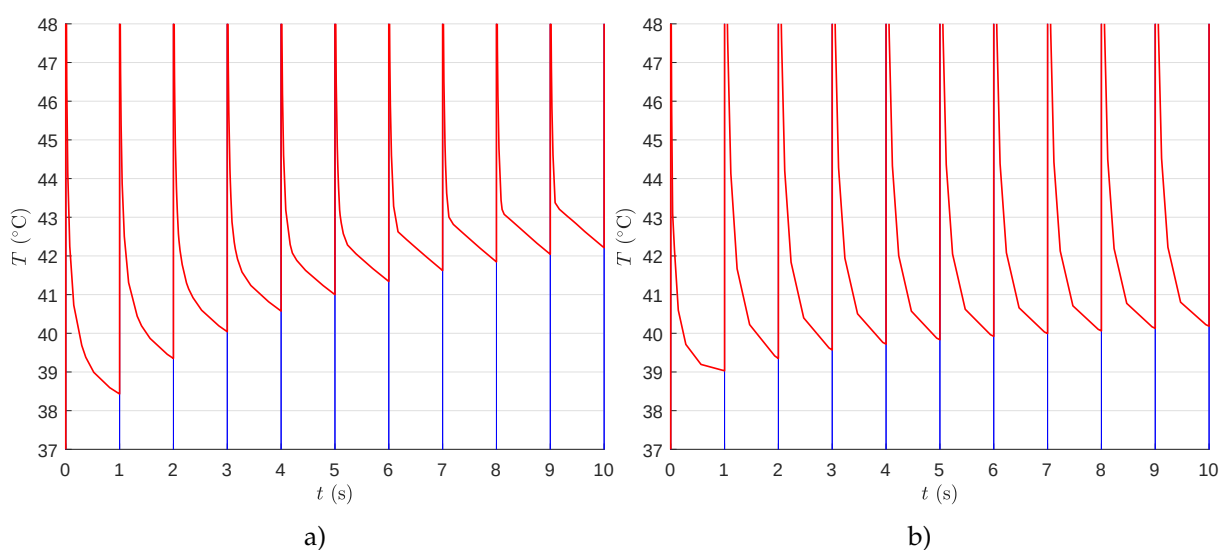
Obr. 3.38: Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.



Obr. 3.39: Rozložení teploty v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



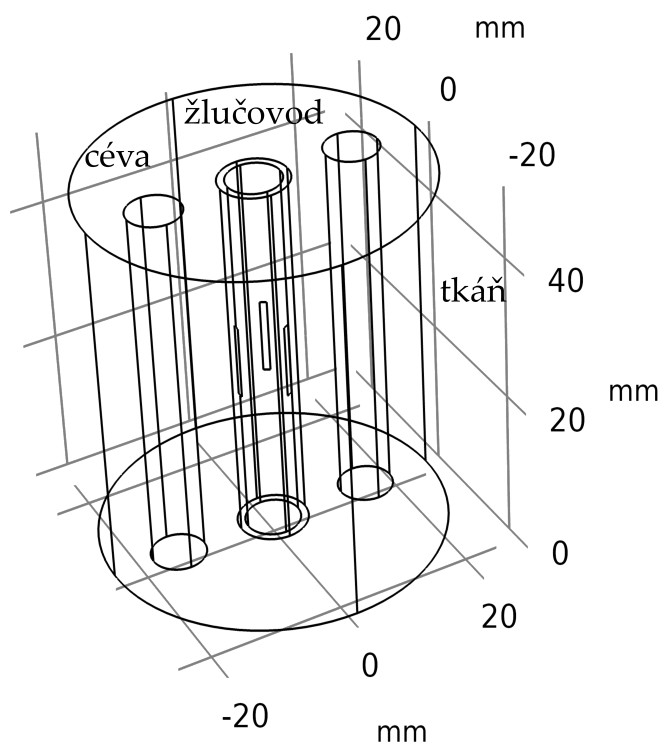
Obr. 3.40: Rozložení teploty v modelu tkáně s endokardiálním katetrem pro případ vodivosti závislé na intenzitě elektrického pole.



Obr. 3.41: Graf vývoje teploty pro model tkáně s endokardiálním katetrem v prvních deseti pulzech pro případ vodivosti nezávislé a závislé na intenzitě elektrického pole.

3.6 Simulace elektroporace balónkovým katetrem

Tento model byl rovněž vytvořen v návaznosti na experimenty popsané v kapitolách 5.2, 5.7 a 5.8. Geometrie tohoto modelu je na Obr. 3.42 a parametry modelu v Tab. 3.5. V segmentu jaterní tkáně jsou dvě cévy a žlučovod. Do žlučovodu je vložen balónkový katetr opatřený třemi elektrodami, viz Obr. 5.3 b). Při této simulaci jsou elektrody cyklicky přepínány a to tak, že na první z dvojic je přiváděno napětí 1500 V po dobu 90 pulzů a následně se takto napájí druhá i třetí dvojice elektrod. Celkem je tedy aplikováno 270 pulzů. Celý proces je detailněji popsán v kapitole 5.8.

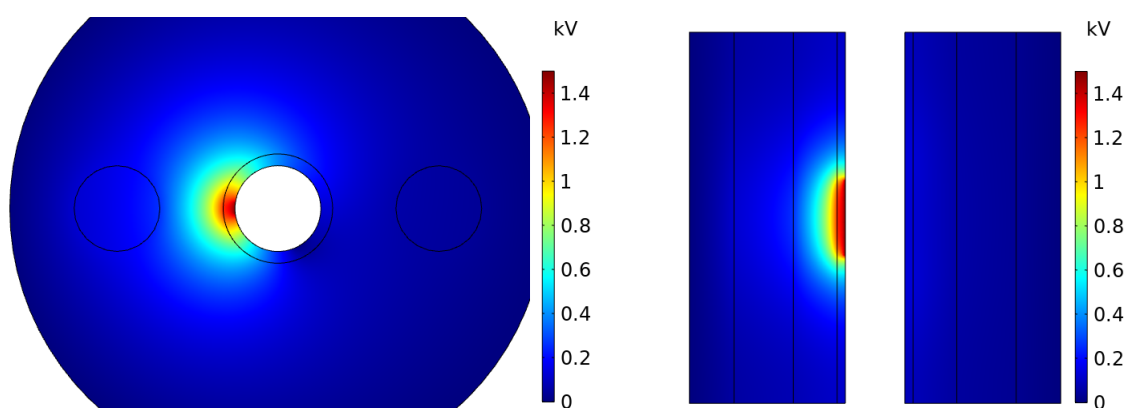


Obr. 3.42: Geometrie modelu tkáně s balónkovým katetrem.

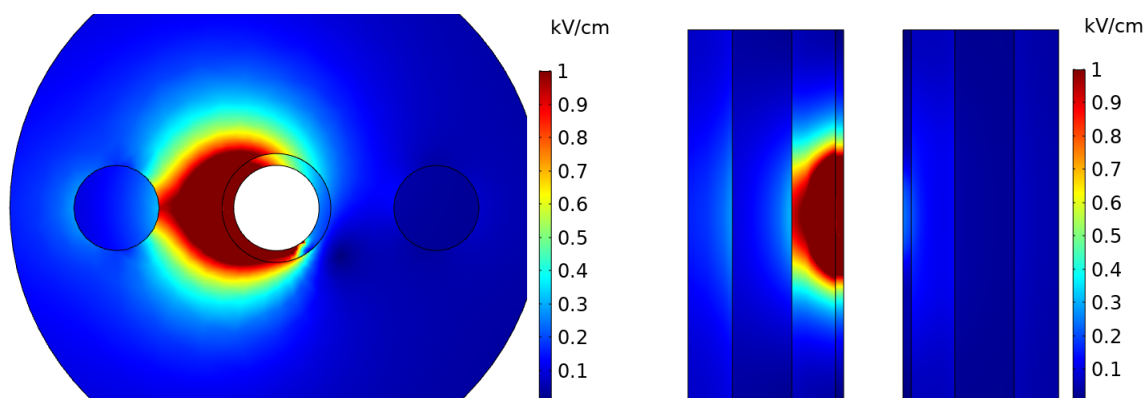
Rozložení aplikovaného napětí v modelu elektroporace balónkovým katetrem s vodivostí nezávislou na intenzitě elektrického pole je zobrazeno na Obr. 3.43. Odpovídající hodnoty intenzity elektrického pole jsou na Obr. 3.44 a Jouleovy ztráty jsou zobrazeny na Obr. 3.45. Ze získaných dat bylo vypočteno šíření tepla v tkáni po jednom cyklu pulzů, viz Obr. 3.46. Obr. 3.47 zobrazuje graf vývoje maximální teploty v prvních deseti pulzech pro oba případy. Teplota exponenciálně roste až na ustálenou hodnotu 43 °C.

Tab. 3.5: Hodnoty parametrů modelu tkáně s balónkovým katetrem.

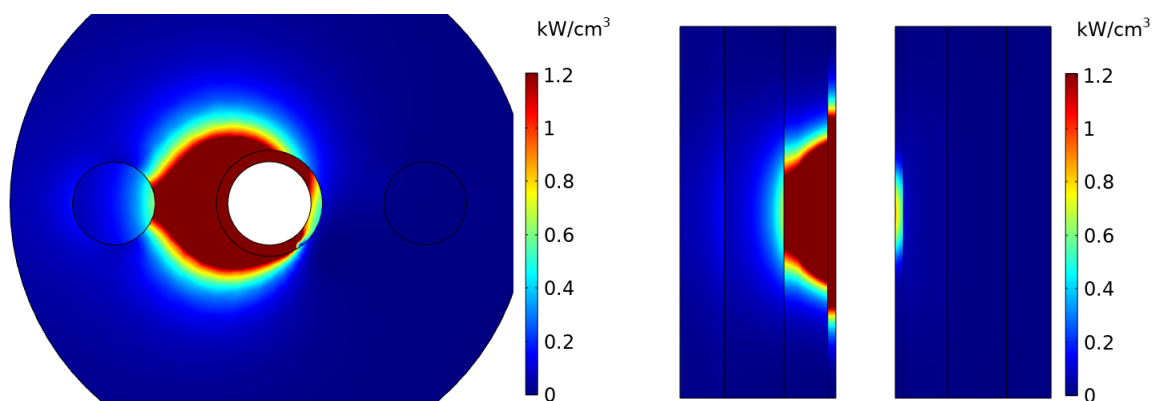
Parametr	Symbol	Hodnota	Jednotka
Velikost ocelové elektrody	d	1×10	mm
Výška segmentu jaterní tkáně	D_t	5	cm
Hustota jaterní tkáně	ρ_t	1079	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
Tepelná vodivost tkáně a krve	k	0,52	$\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
Měrná tepelná kapacita tkáně	c_t	3540	$\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
Elektrická vodivost tkáně	σ_t	0,0221	$\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$
Relativní permitivita tkáně a krve	ϵ_t	1	–
Hustota krve	ρ_b	1060	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
Elektrická vodivost krve	σ_t	0,66	$\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$
Měrná tepelná kapacita tkáně	c_t	3617	$\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
Tepelná vodivost žlučového	k	0,58	$\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
Měrná tepelná kapacita žlučového	c_t	3500	$\text{J} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$
Elektrická vodivost žlučového	σ_t	1,4	$\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$
Relativní permitivita žlučového	ϵ_t	120	–
Hustota krve	ρ_b	1050	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
Průtok krve v cévě	v_b	23	$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$
Počáteční teplota	T_0	37	$^{\circ}\text{C}$
Perfuze krve na jednotku objemu	ω_b	10	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$
Měrné objemové metabolické teplo	q_m	9930	$\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$
Délka pulzu	T_p	100	μs
Počet pulzů	N_p	270	–
Napětí pulzů	U_p	1500	V



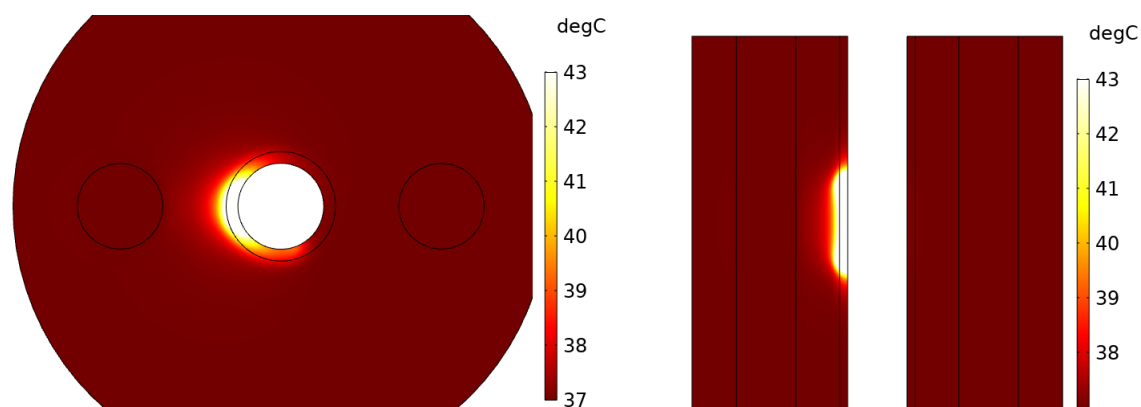
Obr. 3.43: Rozložení elektrického potenciálu v modelu tkáně s balónkovým katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



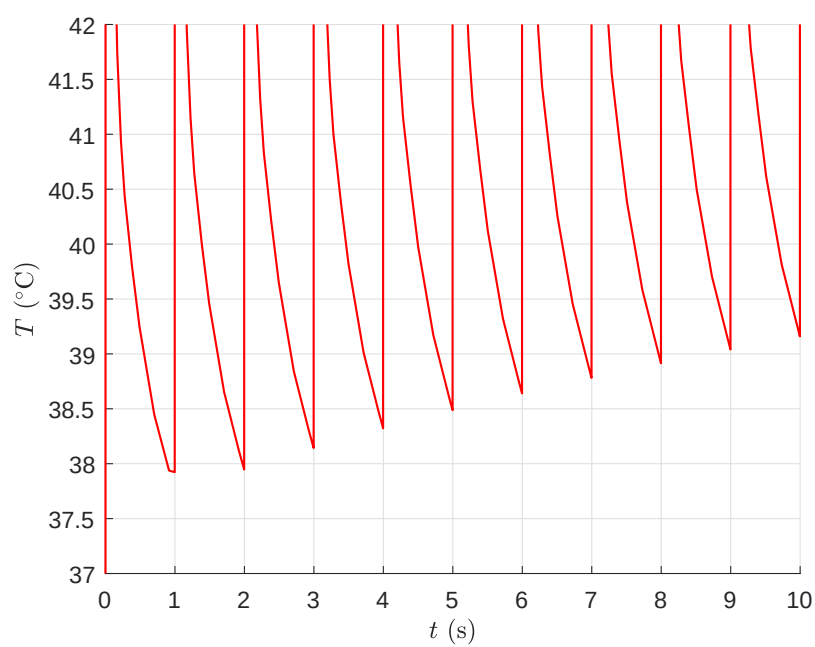
Obr. 3.44: Rozložení intenzity elektrického pole v modelu tkáně s balónkovým katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



Obr. 3.45: Rozložení Jouleových ztrát v modelu tkáně s balónkovým katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.



Obr. 3.46: Rozložení teploty v modelu tkáně s balónkovým katetrem pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.

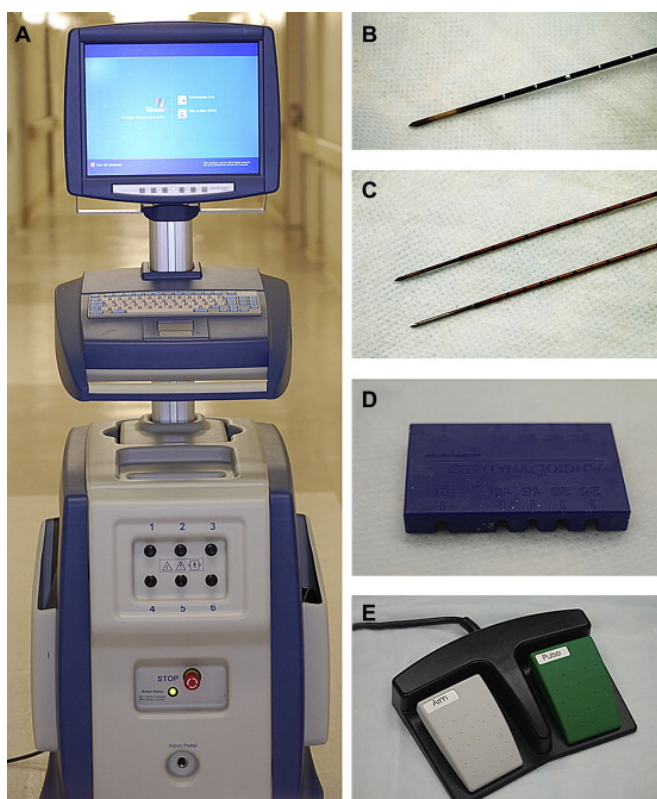


Obr. 3.47: Graf vývoje teploty pro model tkáně s balónkovým katetrem v prvních deseti pulzech pro případ vodivosti nezávislé na intenzitě elektrického pole.

4 | Experimentální zdroj stejnosměrných pulzů pro elektroporaci

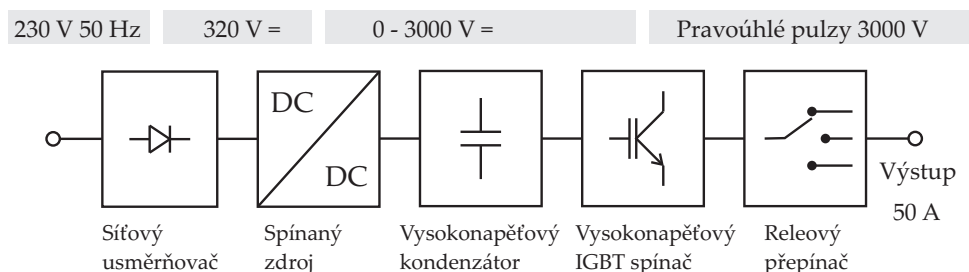
4.1 Systém NanoKnife jako výchozí bod pro vývoj

Vývoji experimentálního zdroje stejnosměrných vysokonapěťových pulzů pro ireverzibilní elektroporaci předcházelo ověření funkce a parametrů přístroje NanoKnife (AngioDynamics, Lantham, NY, USA). NanoKnife je zatím jediný komerčně dostupný přístroj pro ireverzibilní elektroporaci a to od roku 2007, viz Obr. 4.1. Je schválen pro chirurgickou ablací měkkých tkání, nikoli však pro terapii a léčbu nějaké specifické nemoci nebo zdravotního stavu, viz [14].



Obr. 4.1: Zařízení NanoKnife pro IRE. (a) IRE generátor, (b) bipolární elektroda 16G pro IRE, (c) unipolární elektroda 19G pro IRE, (d) distanční blok pro udržení správné vzdálenosti jehlových elektrod, (e) pedál pro spouštění elektroporačního zákroku, převzato z [2].

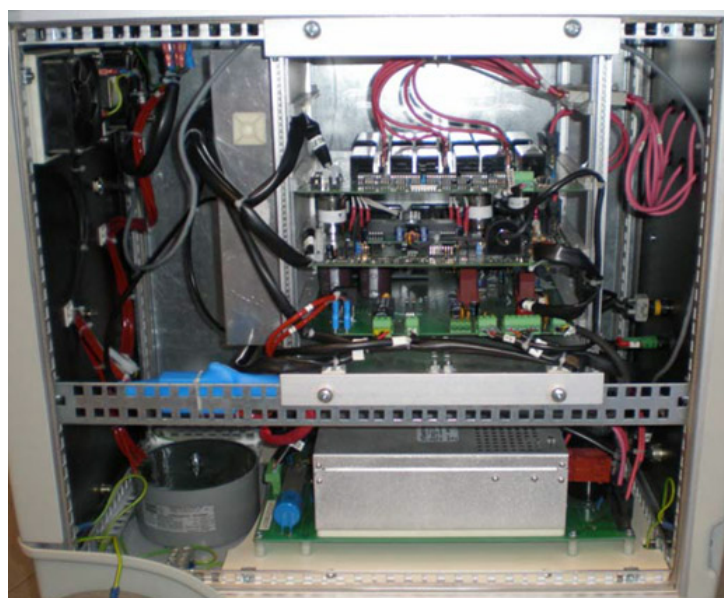
Silová část přístroj NanoKnife se skládá z vysokonapětového zdroje napájejícího vysokonapětový kondenzátor. Vybíjecí proud tohoto kondenzátoru teče přes vysokonapětový IGBT tranzistor do výstupního reléového přepínače. Vysoké napětí z kondenzátoru je tedy přivedeno přímo na aplikační elektrody. Ideové schéma diskutovaného zapojení je možné vidět na Obr. 4.2. Technické specifikace zařízení uvádí Tab. 4.1. Obr. 4.3 nabízí pohled na vnitřní uspořádání zařízení.



Obr. 4.2: Blokové schéma silové části zařízení NanoKnife pro IRE.

Tab. 4.1: Specifikace zařízení NanoKnife pro IRE.

Parametr	Hodnota
Počet výstupů pro sondy	1 – 6
Počet pulzů pro každý pár elektrod	10 – 100
Amplituda pulzu	100 – 3000 V
Délka pulzu	20 – 100 μ s
Maximální proud	50 A



Obr. 4.3: Vnitřní uspořádání zařízení NanoKnife.

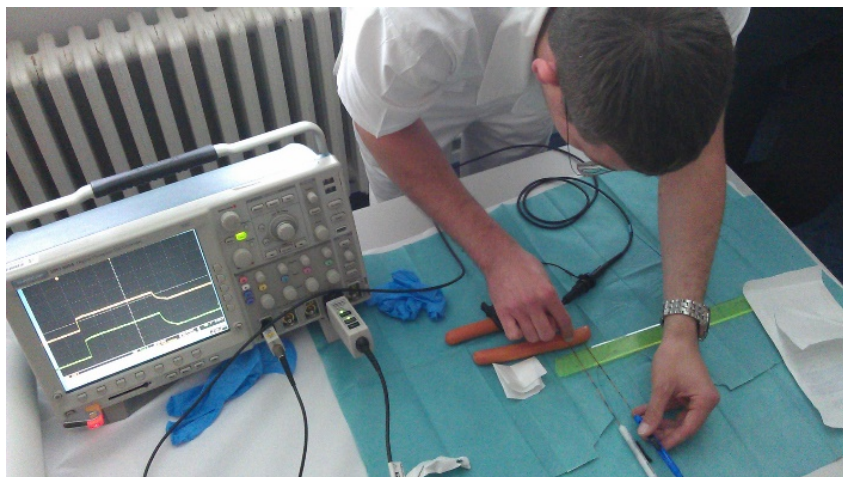
Reléový přepínač umožňuje připojení až šesti elektrod současně. Elektrody jsou postupně cyklicky připojovány na výstup a tvoří aktivní dvojice. Nejčastěji se však využívají pouze tři elektrody, ale vždy záleží na velikosti a tvaru léze. Elektrody mají průměr 1 mm a délku 15 cm nebo 25 cm. Jejich povrch je echogenní a aktivní odizolovaná část elektrody je nastavitelná v rozmezí 0 – 40 mm po 5 mm krocích. Vždy musí být použita jedna elektroda jako řídicí. Tato

elektroda (modré barvy) obsahuje čip, aby ji nebylo možné použít opakovaně. Cena elektrod je v řádu desítek tisíc Kč, což výrazně komplikuje využití zařízení NanoKnife pro experimentální účely.

Aplikované pulzy mají pravidelný obdélníkový tvar díky přímému řízení proudu IGBT tranzistorem, ale jejich délka je v případě závady omezena pouze nábojem na vysokonapěťovém kondenzátoru. Toto jednoduché konstrukční řešení klade značné nároky na řídicí a ochranné algoritmy, viz [14], a vyžaduje přítomnost druhého (bezpečnostního) tranzistoru, který umožňuje nouzový zásah k zajištění nulového napětí na výstupu. Tímto způsobem je zamezeno vzniku pulzu o nekontrolované délce ($>100 \mu\text{s}$), který by mohl nastat při poruše řízení nebo poruše na hlavním tranzistorovém spínači.

Medicínská zařízení kladou vysoké nároky na kvalitu a bezpečnost, proto elektroporační zařízení podléhá mnohým regulacím a standardům. Vysoká bezpečnost zařízení je zajištěna složitými řídicími a ochrannými obvody realizovanými pomocí programovatelného hradlového pole (FPGA). Nicméně díky vysoké koncentraci energie akumulované ve vysokonapěťovém kondenzátoru je tato topologie výhodná z pohledu rozměrů a hmotnosti výsledného zařízení.

Typická délka aplikovaného pulzu je $100 \mu\text{s}$ s pauzou mezi pulzy o délce 1 s v sekvenci o 90 pulzech. Méně často využívanou funkcí je synchronizace výstupních pulzů s periodou srdečního tepu (EKG). Pro tyto účely má přístroj přídatný vstup.

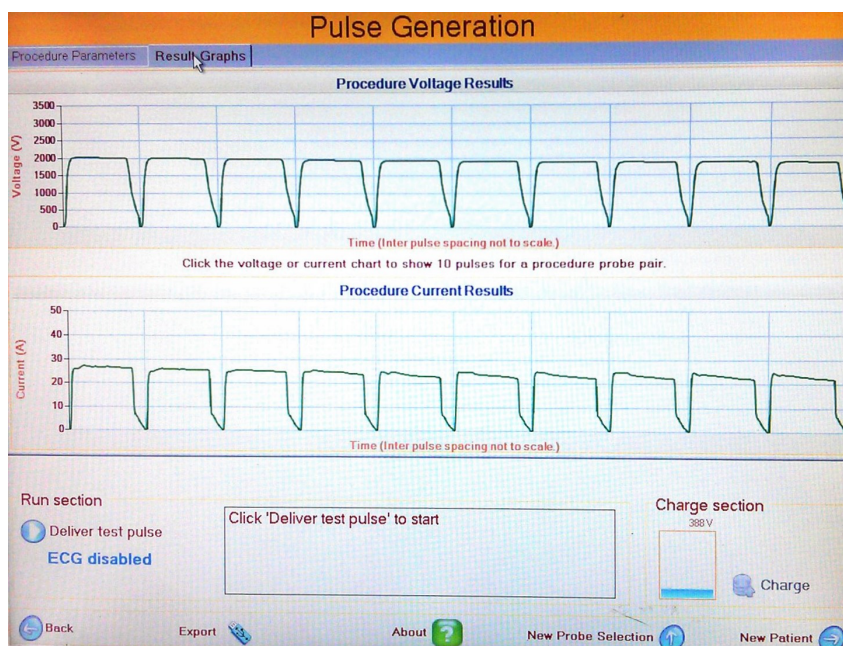


Obr. 4.4: Ověřování parametrů zařízení NanoKnife.

Při ověření parametrů přístroje NanoKnife bylo sledováno výstupní napětí a proud do experimentální zátěže. K měření byla využita přesná proudová sonda TCP0030 od firmy Tektronix a vysokonapěťová sonda N2771A od firmy Agilent, viz Obr. 4.4. Tato měření byla provedena na Radiologické klinice Fakultní nemocnice Brno. Pokus prokázal, že napětí i proud pulzů má skutečně obdélníkový tvar, tak jako to prezentuje originální vizualizační software na obrazovce přístroje, viz Obr. 4.5. Ve skutečnosti jsou mezi jednotlivými obdélníkovými pulzy mezery dlouhé např. 1 s, které vizualizační software z důvodu přehlednosti nezobrazuje.

4.2 Vývoj zdroje stejnosměrných pulzů pro IRE

Drtivá většina světových vědeckých týmů zkoumající ireverzibilní elektroporaci pracuje právě se systémem NanoKnife. V České republice je k dispozici pouze jeden jediný přístroj tohoto

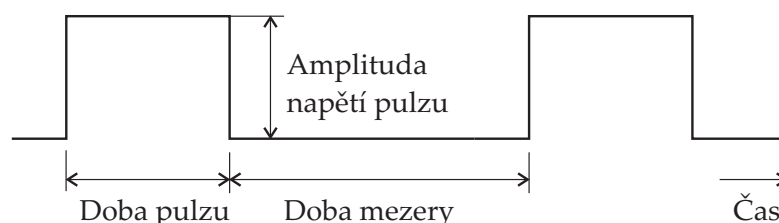


Obr. 4.5: Průběhy napětí a proudu zobrazované v softwaru zařízení NanoKnife.

druhu, který je v IKEM v Praze, odkud si jej mohou zapůjčit jiná lékařská a lékařsko-vědecká pracoviště. Tato kapacita je však nedostatečná. Díky iniciativě lékařů z Fakultní nemocnice Brno byl na Ústavu výkonové elektrotechniky a elektroniky FEKT VUT v Brně vyvinut a zkonstruován funkční vzorek nového přístroje pro elektroporaci. Toto zařízení bylo vytvořeno pro účely experimentů vedoucích k hlubšímu pochopení procesu elektroporace a k hledání jejích nových aplikačních oblastí v lékařství. Primární cíl vývoje tedy není nahrazení přístroje NanoKnife, ale umožnění vědecké práce širšímu okruhu týmů zabývajících se touto problematikou.

4.2.1 Konstrukce zdroje stejnosměrných pulzů

Bylo nutné navrhnout a sestavit zařízení s vysokonapěťovým zdrojem, které je schopno dodat impulz o napětí v jednotkách kilovoltů a proudu v desítkách ampérů. Požadovaná elektrická intenzita v elektroporované tkáni by měla dosahovat hodnot okolo $800 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, viz [1], což je považováno za práh IRE. Inspirací byl sice přístroj NanoKnife, ale jeho konkrétní vnitřní řešení vyžaduje komplikovaný řídicí a bezpečnostní systém pro zajištění přijatelné míry bezpečnosti. Problémem je také nutnost použití vysokonapěťového IGBT tranzistoru. Jak bylo uvedeno, zařízení bylo zkonstruováno za účelem experimentálního použití. Maximální hodnoty jeho výstupních parametrů byly tedy zvoleny vyšší než u NanoKnife a dalším důležitým požadavkem byla vysoká variabilita nastavení všech parametrů, viz Tab. 4.2, která definuje výchozí návrhové parametry přístroje. Ideální průběh aplikovaných pulzů je na Obr. 4.6.



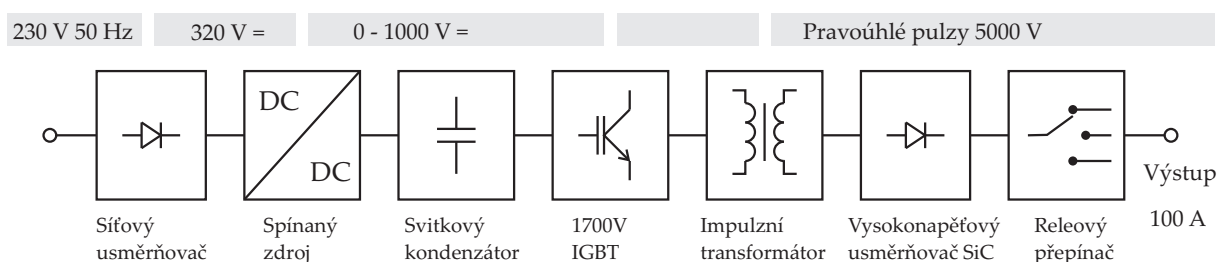
Obr. 4.6: Ideální tvar výstupního napětí zařízení pro stejnosměrnou elektroporaci.

Tab. 4.2: Požadované parametry nově navrhovaného zdroje stejnosměrných vysokonapěťových pulzů pro elektroporaci.

Parametr	Hodnota
Výstupní napětí pulzu	0 – 5000 V
Maximální výstupní proud	100 A
Doba pulzu	20 – 150 μ s
Doba mezery	0,2 – 2 s

Z uvedených důvodů je princip vysokonapěťového impulzního zdroje vyvinutého na UVEE naprosto odlišný od zařízení NanoKnife. Jako hlavní zásobník energie slouží baterie svitkových impulzních kondenzátorů, umístěná v napěťovém meziobvodu se jmenovitým napětím 1000 V, který je galvanicky oddělen od sítě.

V závislosti na verzi přístroje jsou kondenzátory meziobvodu nabíjeny buď diodovým násobičem, napájeným z regulačního autotransformátoru, viz Obr. 4.12 a), nebo regulovatelným spínaným zdrojem, viz Obr. 4.12 b). Z napěťového meziobvodu je prostřednictvím tranzistorů IGBT napájeno primární vinutí výstupního impulzního transformátoru. Jeho sekundární vinutí je připojeno přes vysokonapěťový diodový usměrňovač k výstupnímu reléovému přepínači elektrod. Blokové schéma přístroje je na Obr. 4.7.



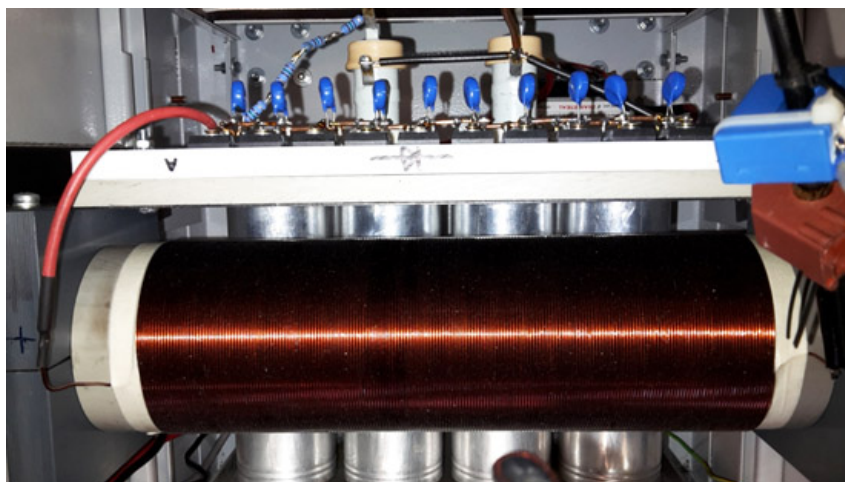
Obr. 4.7: Blokové schéma realizovaného zařízení pro DC IRE.

Diskutované zařízení je navrženo pro experimentální účely, preklinické studie a zatím se nepočítá s využitím daného funkčního vzorku v klinické praxi. I přes tuto skutečnost je navrženo s maximálním důrazem na bezpečnost obsluhujícího personálu i pacienta. Toho je docíleno mimo jiné dvojnásobným galvanickým oddělením výstupu od sítě. První oddělení je pomocí transformátoru ve stejnosměrném zdroji a druhé pomocí dobře izolovaného hlavního impulzního transformátoru. Dalším bezpečnostním faktorem je přirozené omezení maximální délky výstupního napěťového pulzu na 150 μ s. Dojde-li k selhání některé řídicí nebo silové části zařízení, což znamená, že by se mohl na výstupu objevit pulz o delší než bezpečné délce, tak se jádro transformátoru přesytí. To způsobí strmý nárůst primárního proudu, čímž se vybaví nadproudová ochrana silového IGBT tranzistoru. Díky tomuto konstrukčnímu řešení není třeba dalších bezpečnostních zařízení hlídajících délku pulzu, jako je to u zařízení NanoKnife. Tím jsou řídicí obvody značně zjednodušeny.

4.2.2 Návrh pulzního transformátoru

Nejvýraznější součástí přístroje je objemný pulzní transformátor, viz Obr. 4.8. Jeho návrh začíná určením primárního napětí. Toto napětí je limitováno pouze možnostmi polovodičového spínače. Ke konstrukci byl použit běžně dostupný IGBT tranzistor se závěrným napětím 1700 V.

Kvůli dostatečné bezpečnosti byl zvolen stejnosměrný meziobvod se jmenovitým napětím 1200 V.



Obr. 4.8: Pulzní transformátor zdroje DC pulzů.

Jako základ pro transformátor bylo využito feromagnetické jádro (z transformátorových plechů) o průřezu 30 cm^2 . Konstrukce byla podřízena vysokonapěťové odolnosti zajištěné kvalitní PVC izolací. Primární vinutí transformátoru musí být schopno přenést pulz stejnosměrného napětí o velikosti 1200 V a délce $150 \text{ } \mu\text{s}$. Jmenovitá hodnota magnetické indukce v jádře je 1,25 T.

Počet závitů primárního vinutí lze spočítat z následující rovnice

$$N_1 = \frac{U_1 T_p}{S_{Fe} B} = \frac{1200 \cdot 150 \cdot 10^{-6}}{30 \cdot 10^{-4} \cdot 1,25} = 48. \quad (4.1)$$

Požadovaný výstupní proud je 100 A při napětí 5500 V. Počet závitů sekundárního vinutí lze pak spočítat následujícím způsobem:

$$N_2 = N_1 \frac{U_2}{U_1} = 48 \frac{5500}{1200} = 220. \quad (4.2)$$

Sekundární proud přepočítaný na primární stranu je proto

$$I'_2 = I_2 \frac{N_2}{N_1} = 100 \frac{220}{48} = 459 \text{ A}. \quad (4.3)$$

Na již zrealizovaném primárním vinutí byla změřena primární indukčnost $600 \text{ } \mu\text{H}$. Jmenovitý magnetizační proud na konci pulzu dlouhého $150 \text{ } \mu\text{s}$ je

$$I_\mu = \frac{U_1 T_p}{L_1} = \frac{1200 \cdot 150 \cdot 10^{-6}}{600 \cdot 10^{-6}} = 300 \text{ A}. \quad (4.4)$$

Celkový primární proud se rovná

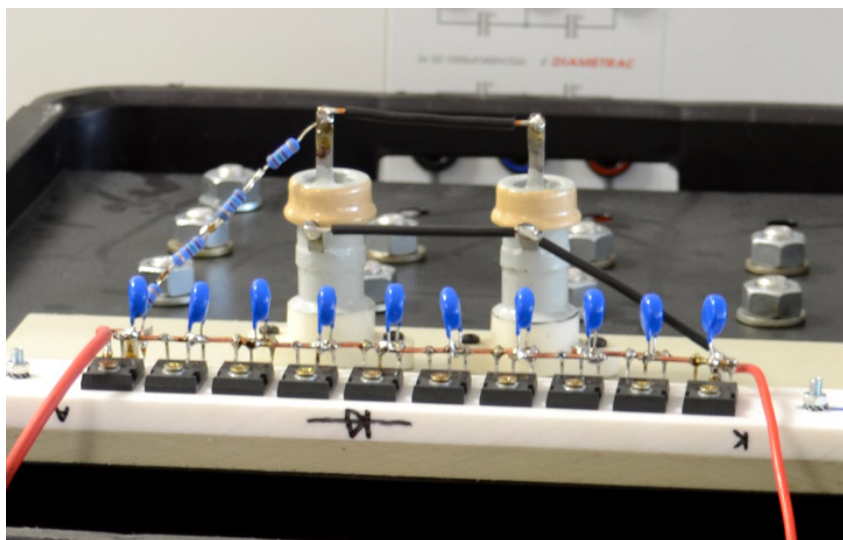
$$I_1 = I'_2 + I_\mu = 459 + 300 = 759 \text{ A}. \quad (4.5)$$

Magnetizační proud má nezvykle vysokou hodnotu vlivem použití otevřeného magnetického obvodu. Toto konstrukční provedení bylo vynuceno zajištěním dostatečných izolačních schopností experimentálního zařízení. Při případné průmyslové výrobě by bylo vhodnější využít tradiční provedení transformátoru s mnohem nižším magnetizačním proudem, u kterého by bylo dosaženo dobrých izolačních vlastností jeho zalitím například běžnou polyuretanovou zalévací hmotou.

4.2.3 Konstrukce silové části měniče

Z výše uvedených rovnic vyplývá dimenzování tranzistorů měniče. Primární proud nabývá hodnoty 795 A a pro zajištění dostatečné rezervy je nutné použít tranzistor s proudem alespoň 1000 A. Na základě tohoto požadavku byly vybrány tranzistorové moduly Infineon FF1000R17IE4 zapojené do asymetrického můstku umožňujícího vrácení magnetizační energie transformátoru zpět do stejnosměrného meziobvodu na konci pulzu. Pro spínání tranzistorů jsou použity budiče Infineon 2ED300C17-S.

Dalším důležitým faktorem jsou vlastnosti kondenzátorů stejnosměrného meziobvodu. Ty musí být schopny dodat značný proud při napětí o hodnotě 1200 V. Byla použita baterie bezindukčních svitkových kondenzátorů $110\ \mu\text{F}/1700\ \text{V}$ tvořících nízkoimpedanční stejnosměrný meziobvod pomocí sendvičové konstrukce z tlustých hliníkových plechů. Jistou nevýhodou této topologie je značná velikost akumulárního kondenzátoru, spolu s rozměry a hmotností impulzního transformátoru, který musí být schopen dodat jednotlivé pulzy o délce 150 μs .



Obr. 4.9: Realizace vysokonapěťového diodového usměrňovače.

Sekundární vinutí je připojeno k jednočinnému diodovému usměrňovači bez nulové diody, jejíž použití by v tomto případě nemělo význam. Výstupní dioda je realizována sériovým spojením deseti kusů diod CREE C4D20120D se závěrným napětím 1200 V a proudem 68 A, viz Obr. 4.9. Pro zajištění rovnoměrného rozložení napětí na jednotlivých diodách je paralelně ke každé diodě připojen varistor. Celkové parametry takto vzniklé diody jsou napětí 12000 V a proud 68 A. Vzhledem k impulznímu charakteru výstupu nemusí být dioda umístěna na chladiči i když je proudově přetížena. Paralelně k usměrňovači je připojen ochranný RC člen využívající vysokonapěťové keramické kondenzátory.

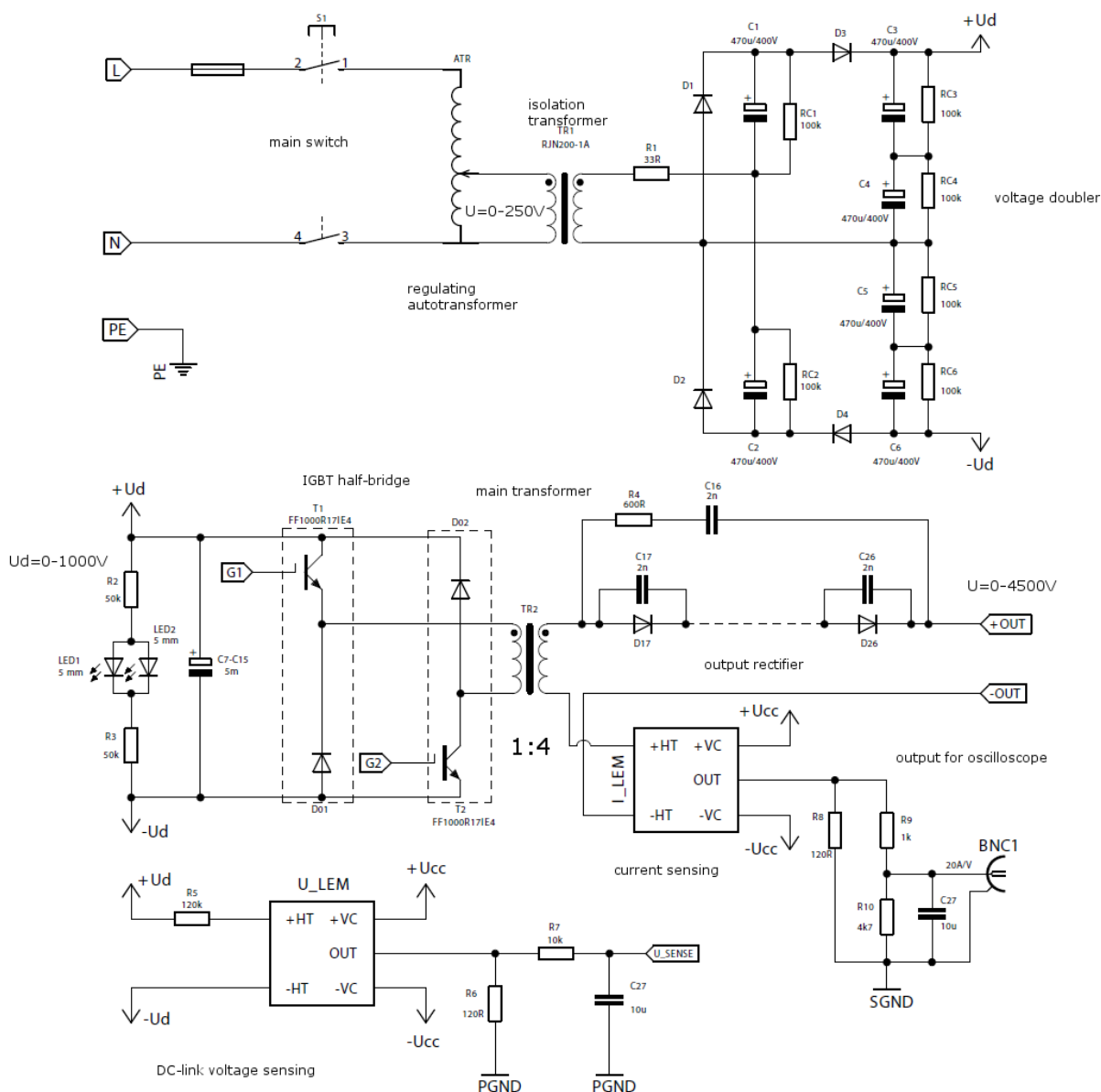
4.2.4 Řídicí obvody zdroje

Řídicí obvody, viz Obr. 4.11, jsou založeny na bázi signálového procesoru MC56F82748 a zajišťují:

- prostředí pro zadávání parametrů pulzů,
- generování řídicích pulzů pro výkonovou část zařízení,
- vyhodnocení digitálních vstupů,

- vyhodnocení poruch,
- měření parametrů pulzů,
- zobrazování měřených hodnot,
- ukládání nastavených parametrů do nevolatilní paměti.

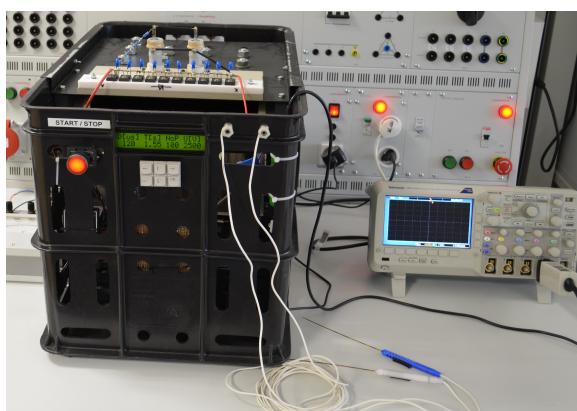
Pro nastavování a zobrazování údajů je použit dvouřádkový alfanumerický displej Midas MC22008B6W-SPTLY. K měření výstupního proudu slouží proudový snímač LEM LA100 a k měření napětí na meziobvodu slouží napěťový snímač LEM LV25 s předřadníkem. Napětí na výstupu zdroje není přímo měřeno, ale pouze estimováno na základě změřeného napětí meziobvodu a předpokládaného úbytku napětí na transformátoru a usměrňovači. Z naměřených hodnot napětí a proudu se počítá výkon v průběhu pulzu, který je důležitou informací pro stanovení dopadu na tkáň v průběhu IRE. Vedlejším výsledkem je také vypočítaný celkový zatěžovací odpor, z kterého je dále možno určit aktuální odpor tkáně a usuzovat na kvalitu kontaktu mezi elektrodou a tkání, případně na přerušení vodiče. Schéma silové části zdroje je na Obr. 4.10.



Obr. 4.10: Schéma silové části zdroje.



Obr. 4.11: Řídicí deska.



a)



b)

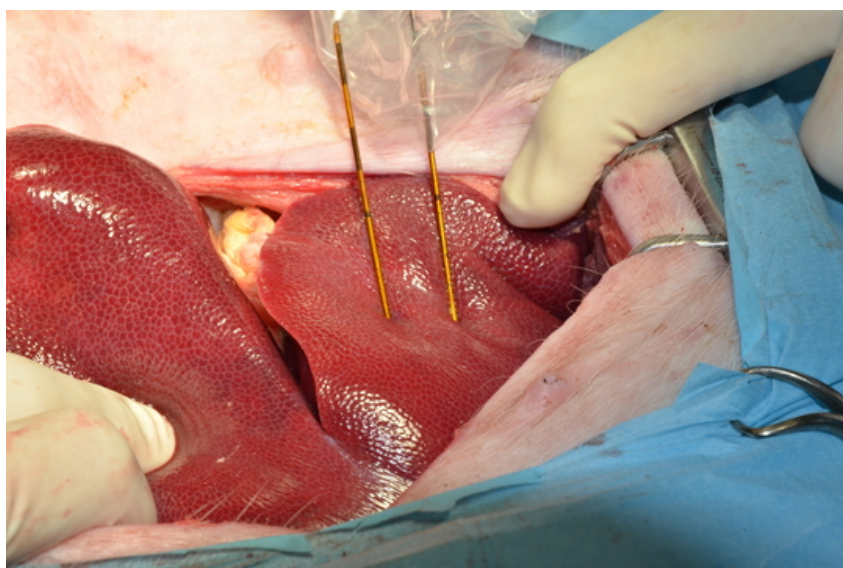
Obr. 4.12: (a) zkušební a (b) finální verze zdroje stejnosměrných pulzů pro elektroporaci.

5 | Experimenty provedené pomocí zdroje stejnosměrných pulzů

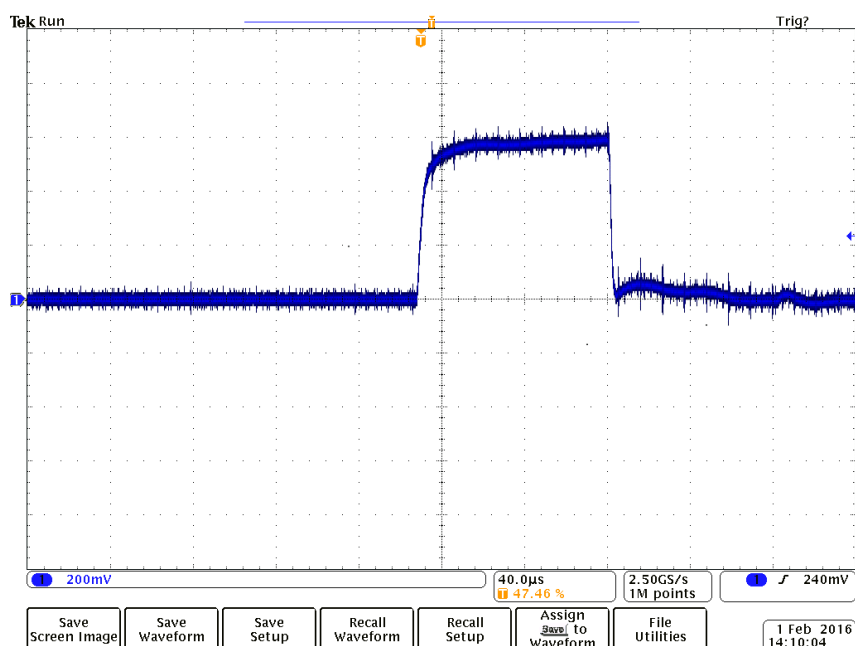
5.1 Prvotní provozní zkouška přístroje

Požadavek na výstupní proud je dán plochou aplikačních elektrod a vodivostí ošetřované tkáně. Zařízení bylo testováno za použití jehlových elektrod k systému NanoKnife. Elektrody o průměru 1 mm s 10 mm dlouhou aktivní částí byly zasunuty do *ex vivo* vepřových jater ve vzdálenosti 15 mm od sebe. Toto nastavení elektrod se považuje za standardní. S měnící se vzdáleností elektrod se mění také efekt elektroporace.

Experimenty odhalily zajímavé skutečnosti. Pokud je při standardní konfiguraci elektrod špičkový výkon během 100 μ s v rozmezí 5 až 8 kW, tepelné poškození je zanedbatelné a makroskopicky neviditelné. Histologické vyšetření však minimální změny zobrazuje. Změny tkáně, které nastávají při špičkovém výkonu 15 kW, jsou viditelné pouhým okem. Na základě experimentů je výkon o hodnotě 15 kW hranicí mezi IRE a termálním poškozením tkáně. Pokud je špičkový výkon například 25 kW, tkáň je viditelně termálně poškozená a zbělá, protože dochází k denaturaci proteinů a koagulační nekróze, viz [68]. Typická proudová odezva na obdélníkový napěťový pulz je na vidět na Obr. 5.2. Následné experimenty s použitím těchto elektrod byly prováděny také *in vivo*, viz Obr. 5.1.



Obr. 5.1: Operace *in vivo* na játrech vepře za použití vyrobeného IRE generátoru a standardních jehlových elektrod k systému NanoKnife.



Obr. 5.2: Typický průběh proudu při stejnosměrném napěťovém pulzu v měřítku 1V/20A.

5.2 Termografické srovnání stejnosměrné IRE a RFA *ex vivo*

Měření oteplení zkoumané tkáně po zákroku DC IRE a RFA byla provedena na půdě FEKT VUT za spolupráce Radiologické kliniky Fakultní nemocnice Brno Bohunice a Biofyzikálního ústavu lékařské fakulty Masarykovy univerzity. Vzorkem byla *ex vivo* vepřová játra s počáteční teplotou 17 °C. Teplotní změny byly měřeny termokamerou FLIR B200 ve vzdálenosti 1 m od vzorku a citlivým termočlánkem přímo na játrech.

Uspořádání pracoviště je možné vidět na Obr. 5.3 a), viz [68]. Cílem tohoto experimentu bylo srovnání oteplení tkáně při standardních zákrocích jak IRE, tak i RFA. K vyhodnocení získaných termogramů byl využit program FLIR Quick-Report 1.2 a pro další analýzu programy ImageJ a Microsoft Excel. Pro statistickou evaluaci pak program STATISTICA, viz [68].

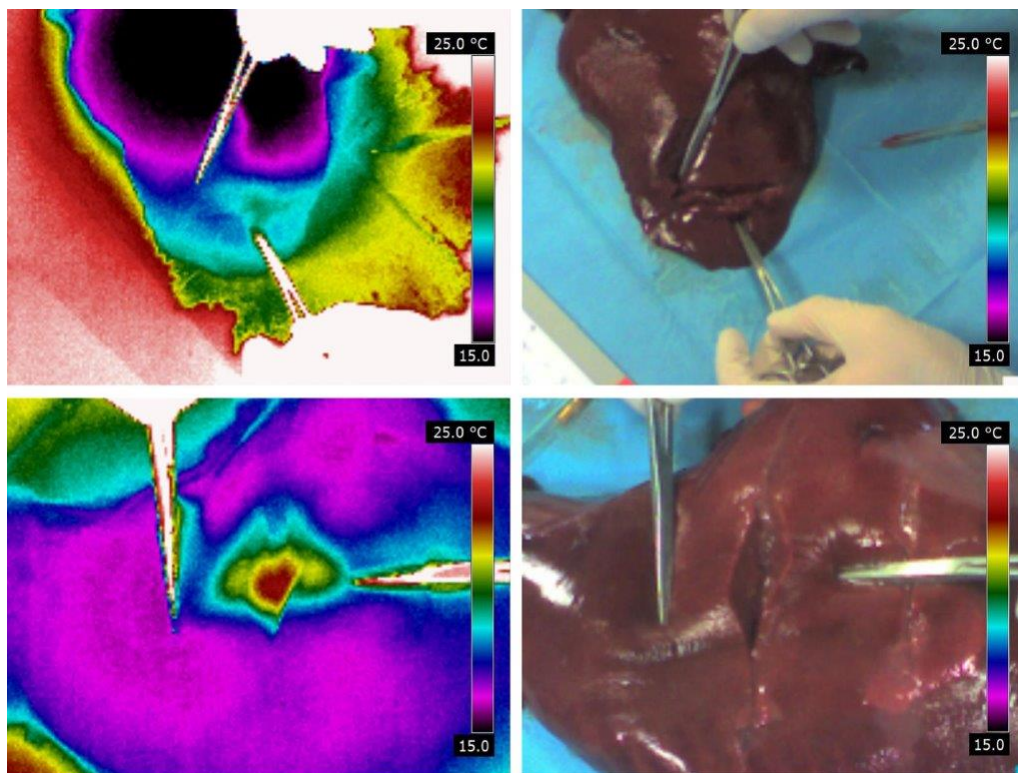


a)

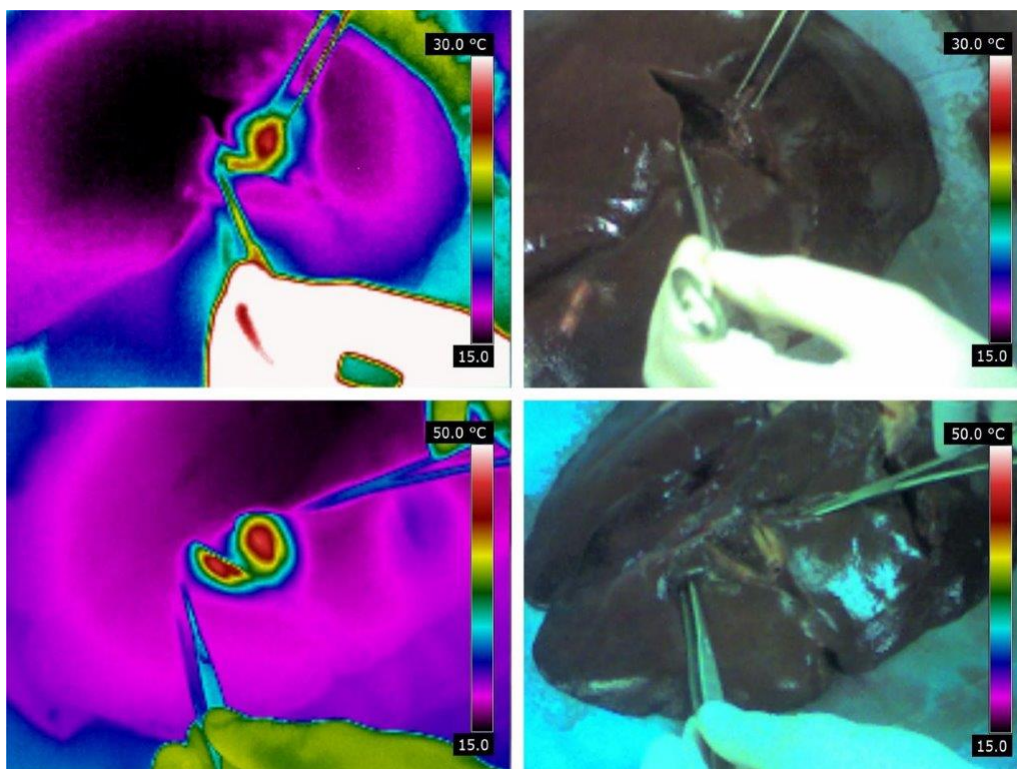


b)

Obr. 5.3: Termografické měření: (a) Ukázka pracoviště, (b) Unikátní balónkový katetr použitý pro IRE.



Obr. 5.4: Termografické měření IRE. Horní obrázky - střední výkon 0,6 W (výstupní napětí 1,5 kV). Spodní obrázky - střední výkon 2,5 W (výstupní napětí 2,5 kV) po 150 pulzech o délce 100 μ s [68].



Obr. 5.5: Termografické měření RFA. Horní obrázky - výkon 5 W. Spodní obrázky - výkon 10 W [68].

K radiofrekvenční ablacii byl použit přístroj RFA 1500, RITA Medical Systems. Pulzy byly aplikovány s použitím katetru Habib EndoHPB. Tento katetr se skládá ze dvou prstencových elektrod vzdálených 8 mm od sebe s distální elektrodou 5 mm od náběžné hrany. Byly testovány dvě výkonové hladiny 5 W a 10 W při různých délkách aplikace (max. 90 s).

Pro ireverzibilní elektroporaci byl použit výše diskutovaný zdroj stejnosměrných vysoko-napěťových pulzů. Při běžné ablacii nádorové tkáně jsou využívány jehlové elektrody, ty však není možné použít pro odstranění stenóz ve žlučových cestách. Z tohoto důvodu byl vyvinut unikátní balónkový katetr pro aplikace IRE přímo v žlučovodu či močových cestách. Použitý katetr má na vnější straně balónku o průměru 8 mm tři zlaté elektrody, které vůči sobě svírají úhel 120°. Každá elektroda je 1 mm široká a 10 mm dlouhá, tedy aktivní plocha elektrody má 10 mm², viz Obr. 5.3 b).

Katetr byl vložen do jaterní tkáně přibližně 1 cm pod povrch a naplněn fyziologickým roztokem. Tímto je docíleno dobrého kontaktu elektrod a okolní tkáně. Byla aplikována sekvence 50 pulzů o délce 100 μs pro všechny tři kombinace aktivních párů elektrod; tzn. 150 pulzů za celý experiment. Byla testována dvě výstupní napětí, 1500 V a 2500 V, což odpovídá elektrickému proudu o velikosti 4 A a 10 A. Z těchto hodnot je možné spočítat špičkový výkon, který odpovídá 6 kW pro 1,5 kV a 25 kW pro 2,5 kV. To znamená, že střední tepelný výkon v průběhu celého zákroku je 0,6 W nebo 2,5 W.

Nejdříve bylo provedeno měření IRE. Maximální naměřené oteplení tkáně při aplikaci 1,5 kV bylo 3 °C a 6 °C při 2,5 kV. Histologické změny byly pozorovány pouze v případě vyššího napětí. Termogramy je možno vidět na Obr. 5.4. Tato hodnota je výrazně nižší než v případě RFA, kdy maximální oteplení při 5 W bylo 20,7 °C a 38,5 °C při použití 10 W. Změny zkoumané tkáně byly symetrické a jasně viditelné pouhým okem pro obě použité výkonové hladiny (viz Obr. 5.5). Histologická analýza také prokázala tepelné poškození tkáně. Tato měření potvrzují poznatky uvedené v předchozí sekci o vlivu různých hodnot špičkového výkonu, viz [68].

Vzhledem ke skutečnosti, že výkon při zákroku RFA je dodáván kontinuálně, je nutné pro srovnání obou metod uvažovat v případě IRE průměrné hodnoty výkonu. Měření ukazují, že teplota vzrůstá podobně co do velikosti zasažené oblasti, ale liší se v absolutních hodnotách. Teplota v oblasti ošetřené IRE je více homogenní v porovnání s RFA. Tyto experimenty potvrdily také schopnost termokamery produkovat spolehlivá data při pokusech tohoto druhu.

V současnosti je RFA rozšířenější pro hepatobiliární aplikace než IRE. Má však jisté nevýhody. Protože využívá tepelnou destrukci tkáně, jsou poničeny veškeré struktury v oblasti aplikace pulzů. To však neplatí při použití IRE, kde citlivé struktury nejsou ovlivněny. Dalším problémem RFA jsou cévy o průměru 3 mm a více v okolí léze. Ty mají totiž ochlazující efekt díky kontinuálnímu průtoku krve. Tato skutečnost je z pohledu RFA nevýhodná, protože cílem je tkáň zahřát. Na druhou stranu, chladící efekt cév je výhodný v případě IRE. Z těchto důvodů se jeví IRE jako vhodnější metoda pro ablacii nádorů v blízkosti zmiňovaných struktur.

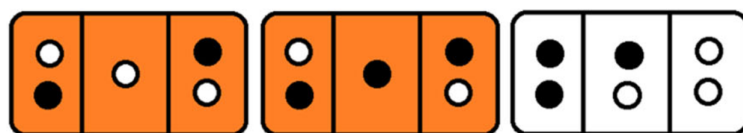
5.3 Srovnání účinků RFA a IRE *in vivo*

Tato studie měla za cíl srovnání efektu a hromadění lipozomálního doxorubicinu v tkáni léčené pomocí RFA a IRE. Ablační techniky se pro odstraňování jaterních malignit, zejména nádorů, používají už 25 let, viz [69]. V porovnání s klasickým chirurgickým odstraněním nádoru mají některé minimálně invazivní ablační techniky nevýhodu v tom, že je zde vyšší riziko návratu nádoru, viz [70]. U termálních ablačních technik je míra návratnosti úměrná velikosti původního

nádorového ložiska, tedy roste s jeho velikostí. Jednou z možností zvýšení účinnosti zákroku je současná intraarteriální embolizace pro snížení průtoku krve v dané části orgánu nebo podávání chemoterapeutik, viz [71]. Nejzkoumanějším z nich je doxorubicin, používaný často ve formě molekuly zapouzdřené do lipozomu. V této formě je bezpečnější a přijatelnější pro srdce a gastrointestinální trakt. Dle některých studií, viz [72, 73], lipozomální doxorubicin významně zvětšuje ablační objem při RFA. Během elektroporace se očekával podobný efekt. V blízkém okolí aplikačních elektrod dochází k ireverzibilní elektroporaci a na okrajích ablačního objemu pak k elektroporaci reverzibilní. Ta se sama o sobě používá pro zvýšení propustnosti membrán za účelem vpravování makromolekul.

V tomto experimentu bylo použito šest laboratorních selat. Ta byla dále rozdělena do dvou skupin po třech. V každé skupině bylo provedeno osm zákroků RFA a IRE. K radiofrekvenční ablaci bylo použito zařízení Model 1500 RF generator a vícehrotové elektrody StarBurst XL (AngioDynamics, Lantham, NY, USA). Jehličky byly od sebe vzáleny 3 cm. Byl použit výkon 100 W, cílová teplota byla nastavena na 105 °C a procedura trvala 7 minut.

K ireverzibilní elektroporaci byl použit diskutovaný experimentální zdroj pulzů a dvě monopolární elektrody. Bylo použito napětí o velikosti 2250 V, 100 pulzů o délce 100 μ s a s periodou opakování 1 s. Délka aktivní části elektrody byla 1,5 cm a elektrody byly od sebe vzdáleny $1,5 \pm 0,3$ cm.



Obr. 5.6: Schématický náčrt ablace pro IRE a RFA pro každé z testovaných selat obou skupin, převzato z [71].

Na Obr. 5.6 je schématický náčrt experimentu ablace pro RFA a IRE pro obě testované skupiny. Jednotlivé části každého z boxů naznačují laloky jaterní tkáně. Černá kolečka ukazují místa kde byla provedena RFA a bílá kolečka místa IRE. Dvěma selatům byl během ablace podán lipozomální doxorubicin přes pomalu kapající infuzi (oranžové boxy) a jedno sele sloužilo jako kontrola (bílý box). Jedna skupina selat (A) byla usmrcena 24 hodin po zákroku a druhá skupina (B) 72 hodin po zákroku. Ablované zóny byly vyříznuty, změřeny a podrobeny dalším testům. U skupiny A bylo provedeno imunohistochemické vyšetření a fotometrická kvantifikace doxorubicinu. Byla stanovena míra buněčného stresu, poškození DNA a úroveň vzniklé apoptózy. U skupiny B byla provedena pouze fotometrická kvantifikace doxorubicinu. K vyhodnocení dat byla použita STATISTICA. Hodnota p^5 menší než 0,05 byla považována za významnou, viz [71].

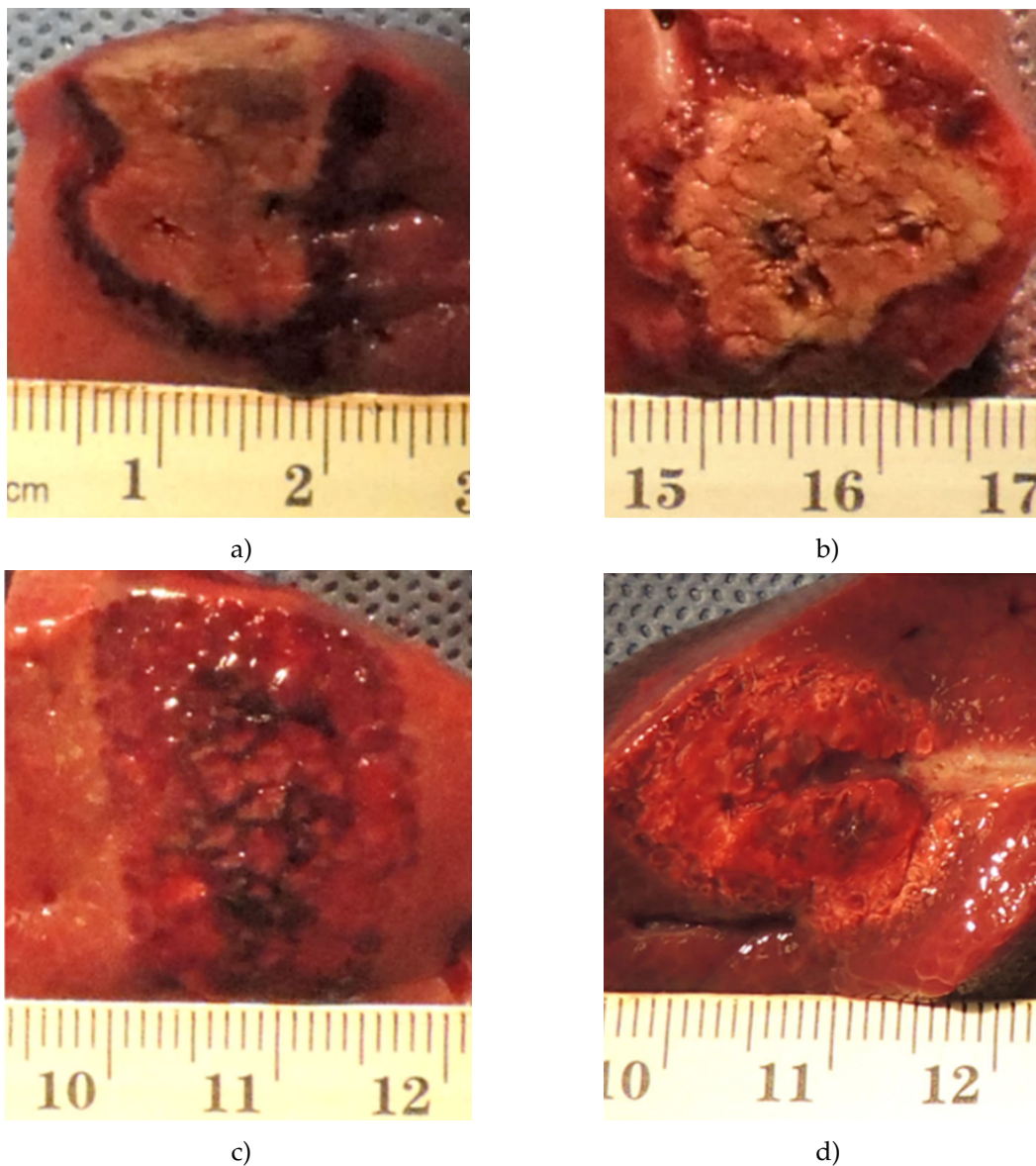
U skupiny A byly pozorovány ostré hranice ablačních zón pro obě techniky, viz Obr. 5.7 d). Doxorubicin při RFA zvětšil všechny ablační zóny v porovnání s těmi kontrolními, $2,5 \pm 0,3$ cm vs. $2,21 \pm 0,21$ cm; $p = 0,04$. Zóny po ablaci pomocí IRE byly menší při aplikaci doxorubicinu než v kontrolním měření, $2,22 \pm 0,4$ cm vs. $2,63 \pm 0,43$ cm; $p = 0,05$.

U skupiny B byly zóny po RFA opět ostře ohraničené a málo menší než u skupiny A, $2,45 \pm 0,23$ cm vs. $2,11 \pm 0,17$ cm; $p = 0,01$. V případě IRE byly ve skupině B hranice ablované zóny velmi špatně definované.

⁵p-hodnota – Tato hodnota slouží ve statistice k rozhodování o platnosti nulové hypotézy. Je to číselný indikátor platnosti nebo neplatnosti nulové hypotézy, který je vyjádřený na pravděpodobnostní škále.

U skupiny A byly hodnoty koncentrace doxorubicinu vyhodnoceny jako statisticky významné ($p < 0,01$) pro RFA v periferní i centrální části ablační zóny byly $2,4\times$ a $1,74\times$ větší než v kontrolním vzorku. U IRE byly hodnoty celkově nižší než u RFA. V porovnání byla koncentrace v léčené zóně $1,17\times$ vyšší než u kontrolní zóny.

U skupiny B v zónách po RFA byla zaznamenána zvýšená koncentrace doxorubicinu, jež byla statisticky vyšší než pro zóny po IRE. Nebyl zde však významný rozdíl v koncentraci ve středu a na periférii jako ve skupině A. Pro IRE nebyly pozorovány významné rozdíly.



Obr. 5.7: Játra po ablaci RFA (a, b) a IRE (c, d) a pro kombinovanou léčbu s lipozomálním doxorubicinem (a, c) a pro kontrolní vzorek (b, d), převzato z [71].

Experimenty ukázaly, že ablační zóny se chovají jinak co do akumulace doxorubicinu a míry buněčné smrti pro studované techniky RFA a IRE. V rozporu s předpoklady, zóny po IRE ablaci nevykazovaly vyšší míru koncentrace než v kontrolním vzorku. Předchozí studie ukázaly, že hromadění doxorubicinu v tkáni ablované pomocí RFA závisí na mnoha faktorech (koncentraci, teplotě, čase, atd.). Zvyšující se teplota poškozuje endotel, čímž se zvyšuje mikrovaskulární perfuze a doxorubicin v lipozomálním obalu může do oblasti lépe pronikat, viz [71]. Jelikož

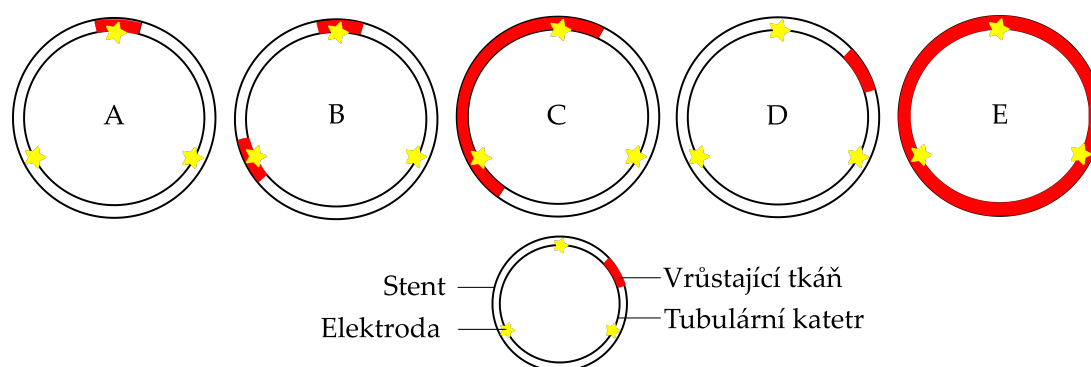
při IRE dochází jen k minimálním teplotním změnám ve tkáni, nemá zřejmě tato technika významný vliv na míru koncentrace látky v ablované zóně. Je možné, že v případě IRE jsou liposomy poškozeny přímo vysokonapěťovými pulzy, čímž ztrácejí svou funkci a jsou odneseny cévním systémem místo toho aby byly zachytávány tkání. U RFA je tomu právě naopak.

Skutečnost, že se ablační zóna RFA při použití doxorubicinu zvětšuje, již byla v minulosti zdokumentována, viz [74]. Na druhou stranu to, že se ablační zóna v kombinaci IRE s doxorubicinem zmenšuje, bylo spíše překvapivé zjištění, viz [71]. Na základě výsledků experimentu lze také říci, že v případě IRE dochází k rychlejší apoptóze a hojení ablované zóny. Výsledky ukazují, že kombinace IRE s doxorubicinem nemá synergický efekt. Pro zlepšení účinnosti této kombinované léčby je třeba dalších klinických pokusů a optimalizací, aby byl její efekt lepší nebo srovnatelný s RFA.

5.4 IRE pro léčbu okluze kovového stentu ve žlučových cestách

Léčení obstrukce žlučových cest se dnes standardně provádí endoskopickým zavedením stentu do postiženého místa. Poměrně častým problémem je však snížení jeho průchodnosti vedoucí až k blokádě stentu. Nejčastější příčinou je buď vrůst nádoru nebo jeho zanesení žlučovým kalem, viz [75]. Experimenty byly prováděny za účelem prokázání bezpečnosti a proveditelnosti IRE pomocí tubulárního katetru pro léčbu okluze kovového stentu a to na *ex vivo* vepřových játrech.

Zdrojem pulzů byl experimentální generátor stejnosměrných pulzů pro IRE. Tubulární katetr se třemi elektrodami byl umístěn do kovového stentu EGIS o velikosti 10×80 mm. Vždy dvě elektrody byly aktivní a jedna spojená se zemí. Do jaterní tkáně bylo aplikováno vždy sto 100 μ s dlouhých pulzů o napětí 300, 650, 1000 a 1300 V. Okluze stentu byla simulována použitím jaterní tkáně různých tloušťek (2 ± 1 mm a 5 ± 1 mm). Testovalo se pět různých nastavení rozmístění stentu, elektrod a tkáně, viz Obr. 5.8. Při experimentu byly měřeny hodnoty proudu, impedance a výkonu. Dále bylo termograficky monitorováno potenciální termální poškození tkáně, viz [76].



Obr. 5.8: Testovaná rozmístění stentu, elektrod a tkáně.

Elektroporace byla úspěšná pro všechny konfigurace při napětích 300 a 650 V. Maximální limitní proud generátoru byl překročen pro simulovaný případ vrostlého nádoru, a také pro všechna nastavení při 1300 V. Pro tyto případy bylo na tkáni viditelné tepelné poškození. Při napětí 300 a 650 V byly zaznamenané teplotní změny pouze v rozsahu jednoho až čtyř a půl stupně Celsia.

Byl zaznamenán výrazný rozdíl hodnot impedance mezi konfigurací jedné elektrody v kontaktu s vrůstající tkání a konfigurací obou elektrod v kontaktu s vrůstající tkání ($p = 0,02$, Mann-Whitney test). Pomocí těchto experimentů byla dokázána funkčnost diskutované metody pro odstraňování okluzí kovového stentu a byl ustaven protokol pro následné *in vivo* pokusy.

5.5 Endoluminální elektroporace pro léčbu obstrukce stentu

V návaznosti na předchozí experiment byla provedena srovnávací studie. Ta měla za cíl srovnání elektrických a termografických parametrů IRE a H-FIRE pomocí diskutovaného tubulárního stentu na *ex vivo* vepřových játrech. Technice H-FIRE je věnována kapitola 6 a 7.

Oba druhy elektroporace byly prováděny s diskutovanými zdroji vysokonapěťových pulzů. V obou případech byla jedna z elektrod aplikačního katetru nastavena jako aktivní a druhá byla spojena se zemí. Celkově bylo aplikováno sto pulzů s napětím 300, 650, 1000 a 1300 V. Pro případ IRE byla délka pulzů 100 μ s a v případě H-FIRE byla zvolena frekvence pulzů 400, 200, 100 a 70 kHz. Okluze stentu byla simulována pomocí jaterní tkáně o tloušťce 2 ± 1 mm vložené do kovového stentu mezi tubulární elektrodu a stěnu stentu. Byla testovány čtyři různé geometrie stentu, elektrod a tkáně, viz Obr. 5.8 A – D. Byly měřeny hodnoty proudu, impedance a výstupního výkonu. Teplotní změny na tkáni byly sledovány pomocí termokamery.

K úspěšné elektroporaci došlo při všech nastaveních pro hodnoty napětí 300 a 650 V a ve většině případů pro 1000 V. Pro jeden případ při napětí 1300 V došlo k překročení horního limitu proudu. Nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi tepelným účinkem obou metod ($p = 0,49$, Mann-Whitney test). Maximální nárůst teploty při IRE i H-FIRE byl 7°C při použití napětí 1000 V v konfiguraci, kdy byla jedna z elektrod v přímém kontaktu se stentem. Experiment prokázal použitelnost obou metod v kombinaci s diskutovaným balónkovým katetrem pro léčbu obstrukce kovového stentu v žlučových cestách pro *ex vivo* model vepřových jater a dále umožnil zpřesnění protokolu pro *in vivo* pokusy.

5.6 Zprůchodňování kovového stentu pomocí endoluminální IRE

Tento pokus navazuje na výše zmíněné. Popisuje endoluminální IRE pomocí diskutovaného balónkového katetru při *in vivo* pokusech na 25 vepřových játrech. Čtrnáct prasat podstoupilo endoluminální IRE, zbytek zvířat sloužil jako kontrola. Byly simulovány tři různé situace konfigurace elektrod a stentu. V prvním případě žádná z elektrod katetru nebyla v kontaktu se stentem. V dalších případech byla v kontaktu se stentem jedna nebo dvě elektrody. Obstrukce byla simulována řezem jaterní tkáně vložené do stentu. Pro každou konfiguraci elektrod bylo aplikováno napětí 300, 650, 1000 a 1300 V. Během experimentu byly sledovány elektrické parametry a makroskopické změny na tkáni. Výsledky byly sledovány pomocí CT okamžitě a po 72 hodinách od zákroku a z místa experimentu byly následně odebrány vzorky pro histopatologické vyšetření.

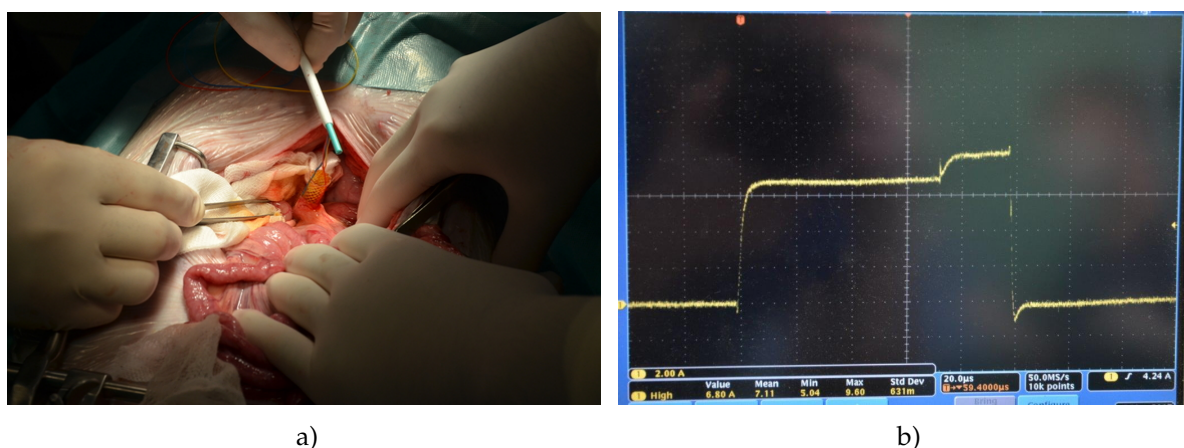
V průběhu elektroporace nedošlo k žádným komplikacím. Endoluminální elektroporace byla úspěšná ve všech případech a mezi jednotlivými konfiguracemi byl pozorován statisticky významný rozdíl ($p=0,02$, Mann-Whitney test). Při 1300 V došlo ve všech konfiguracích k okamžitému zkratu. To stejné se stalo pro 1000 V pro případ jedné a dvou elektrod v kontaktu se stentem. Nejvyšší pozorovaná a bezpečná hodnota intenzity elektrického pole byla 850 V/cm.

Histopatologické vyšetření prokázalo náznaky nekrózy tkáně, která nebyla pozorována u kontrolních vzorků. Experimenty prokázaly použitelnost a bezpečnost endoluminální katetrové ablace pro netermální léčbu vrůstů tkáně do kovových stentů.

5.7 Klinické ověření účinků elektroporace v žlučových cestách

Pro tento experiment byly využity znalosti získané při pokusech uvedených v kapitole 5.4. S použitím generátoru stejnosměrných pulzů pro IRE byla provedena preklinická studie na 22 domácích prasatech (50 až 60 kilogramů) *in vivo* týkající se léčby stenóz žlučovodu. Stenózy na žlučových cestách se mohou vytvářet po hepatopankreatobiliární operaci nebo transplantaci jater a jsou nepříjemnou komplikací. Pokud nejsou léčeny mohou vést ke stagnaci žluče, sekundární cirhóze jater a v nejhorším případě k akutnímu zánětu (cholangitida) s vysokou mírou úmrtnosti a nutností akutní intervence na žlučovém traktu. Dnes užívané termální techniky (radiofrekvenční ablace, mikrovlnná ablace a kryoablace) mají řadu nevýhod zmíněných v kapitolách 1.6 a 5.2. Vhodnou alternativu představuje netermální IRE.

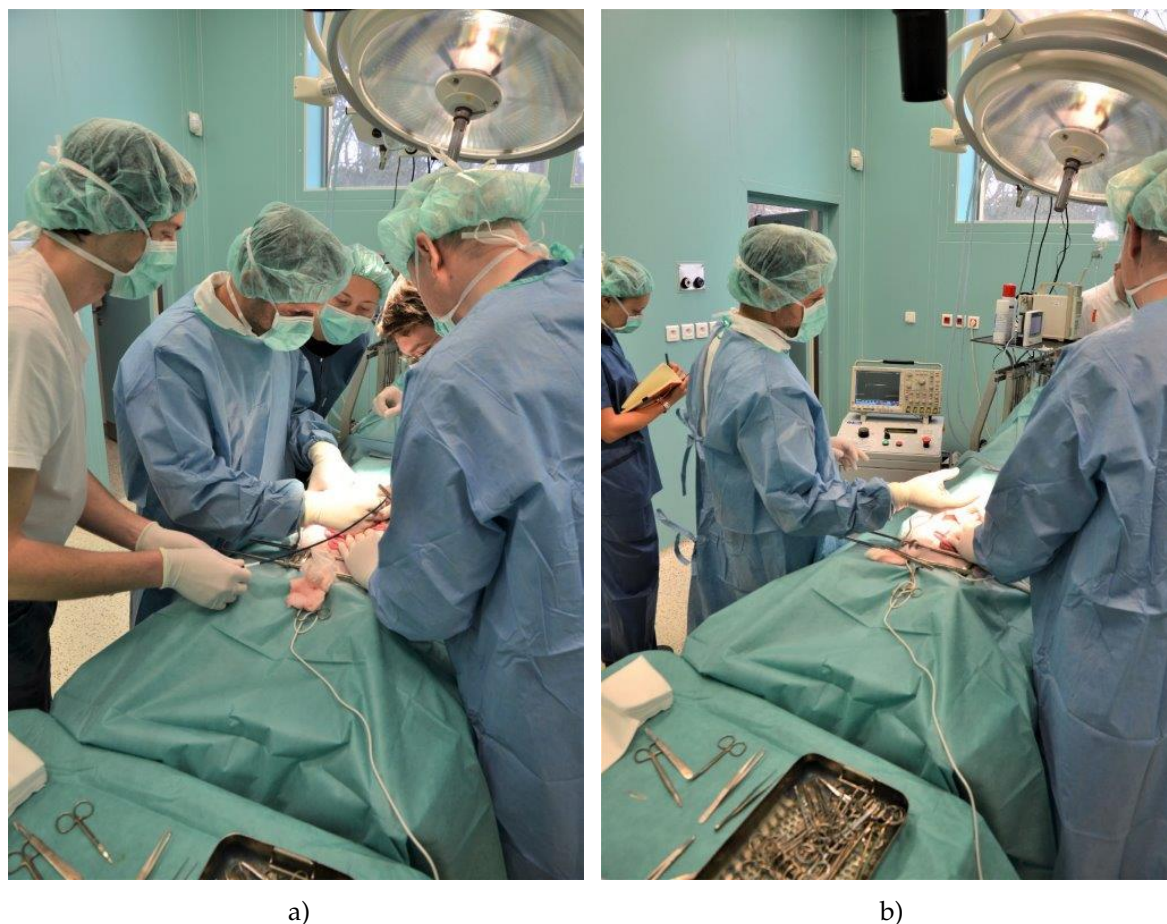
Testovaly se vlivy různých velikostí aplikovaného napětí na elektroporovanou jaterní tkáň. Pulzy byly aplikovány přímo v žlučovodu pomocí balónkového katetru (viz Obr. 5.3 b)) nebo stentu s elektrodami (viz Obr. 5.9 a)) vyvinutými pro aplikaci IRE v žlučových cestách. Katetr má formu elektricky nevodivého stentu a je na vnějším povrchu opatřen vodorovně umístěnými elektrodami uspořádanými pro připojení k zdroji vysokonapětových pulzů. Toto technické řešení aplikátoru elektroporace je právně chráněno užitným vzorem, viz [77]. Elektricky nevodivý povrch stentu je zajištěn vrstvou silikonu. Použitá napětí byla v rozmezí 1200 – 2000 V. Při napětí 2 kV již bylo zřetelně vidět poškození tkáně a vzniklou koagulační nekrózu. Při tomto napětí byl výkon komplikován perforací žlučovodu a následným hematodem. Velikost edému se zvětšovala s rostoucím počtem pulzů a aplikovaným napětím. Edém byl sledován pomocí MRI první a třetí den po výkonu, kdy bylo pozorováno jeho postupné zmenšování.



Obr. 5.9: Operace *in vivo* v žlučovodu vepře: (a) stent s elektrodami pro aplikaci pulzů; (b) projev „Handclap efektu“ na průběhu proudu do elektrody.

Během elektroporace při vyšších výkonech byl zpozorován zajímavý jev doprovázený slyšitelným akustickým efektem. Z počátku se jev projevuje skokovou změnou vodivosti patrnou na průběhu proudu na osciloskopu. Ta je následována vznikem zvuku podobnému tlesknutí. Pozorovaný jev byl pojmenován „Handclap efekt“, viz Obr. 5.9 b). Lze se domnívat, že zde dochází k částečnému výboji v druhotně vzniklé vzduchové kapse na rozhraní elektrody a tkáně. Tento

úkaz je předzvěstí vytvoření nízkoimpedančního oblouku vedoucího k vybavení nadproudové ochrany (zkrat výstupu). Elektrody mohou probíjet jak přímo v tkáni, tak hlavně na povrchu ošetřovaného orgánu. Z tohoto důvodu je důležité, aby aktivní část elektrody byla odhalena pouze v místě aplikace a eliminoval se tak vznik nežádoucího probití. Skokový pokles impedance v průběhu každého pulzu signalizuje tzv. „Handclap efekt“ vedoucí k budoucímu probití elektrod. Na druhou stranu jednorázový skokový nárůst impedance značí odpojení vodiče od aplikační elektrody. Analýza proudu v reálném čase může sloužit ke zvýšení spolehlivosti elektroporačního zákroku. Při včasné identifikaci „Handclap efektu“ mohou být automaticky sníženy parametry pulzu tak, aby nedošlo ke zkratu.



Obr. 5.10: Snímky pracoviště při elektroporaci ve žlučových cestách.

5.8 Metodologie chirurgické techniky pro endoluminální IRE žlučový cest

Tyto pokusy byly prováděny za účelem vytvoření a popsání chirurgické techniky pro endoluminální ireverzibilní elektroporaci žlučových cest. Cílem zkoumání je dosažení dlouhodobé kontroly nad nádory žlučových cest pomocí ablační techniky, která může být prováděna opakovaně, má predikovatelný ablační objem s přihlédnutím k chladicímu efektu protékající krve a má nízké riziko poškození přilehlého vaskulárního systému, viz [78].

Technika byla testována v perihilární oblasti jater osmi selat. Zvířata byla po celou dobu zákroku v celkové anestezii a na umělé ventilaci a byly jim podávány svalové relaxanty. IRE

byla provedena za použití endoluminálního aplikátoru zavedeného do jater laparoskopicky. Aplikátor měl stejnou geometrii jako v pokusech popsanych v kapitole 5.2. Základem experimentálního aplikátoru byl balónkový katetr s průměrem 8 mm a se třemi zlatými elektrodami umístěnými na povrchu balónku. Každá z elektrod byla 10 mm dlouhá a 1 mm široká, což znamená, že aktivní plocha měla velikost 10 mm². Elektrody mezi sebou svíraly úhel 120°, tedy při nafouklém balónku byla vzdálenost mezi elektrodami 8,4 mm.

Celkem bylo aplikováno 90 pulzů o napětí 1500 V mezi každým párem elektrod. Délka pulzů byla 100 μs s periodou 1 s. Během ablace byl měřen proud pohybující se v rozmezí čtyři až jedenáct ampér (průměrně 7,9 A). Při tomto nastavení byla intenzita elektrického pole mezi elektrodami balónkového katetru 1790 V/cm. Tato intenzita výrazně překračuje limit IRE, který se uvádí v rozmezí 500 až 1000 V/cm, viz [10]. Vzniklé poškození tkáně ve formě perforace žlučovodu nalezené u jednoho z testovaných zvířat je možné vysvětlit vznikem nežádoucího tepla vlivem takto vysoké intenzity elektrického pole. V budoucnosti bude testován vliv nižších intenzit na ablovanou tkáň s ohledem na potenciální vznik tohoto typu poškození.

Výsledek ablace byl kontrolován pomocí CT nebo MRI v časech 2, 24 a 72 hodin po zákroku. Tato vyšetření odhalila otok hepatoduodenálního vazů, zatímco jaterní tepna a portální žíla byly po zákroku dobře rozeznatelné. Jedna skupina zvířat byla usmrcena po 24 a druhá po 96 hodinách. Zákrok byl úspěšný ve všech případech a zvířata přežila po definovanou dobu. Makroskopicky byla ablovaná tkáň dobře rozpoznatelná, viz [78].

Vzorky ablované tkáně byly podrobeny také histopatologickému vyšetření. Po 24 hodinách byla tkáň hemoragická a po 96 hodinách zežloutla. Tkáň barvená hematoxylin-eosinem je na Obr. 5.11 a). Je vidět masivní regresivní změny proximální stěny žlučovodu a přilehlé tukové tkáně. Změny byly viditelné do hloubky tří až dvanácti milimetrů (průměrně 6 mm). Barvení orceinem zvýrazňuje elastická vlákna. Na Obr. 5.11 b) lze vidět zachovalou elastickou membránu portální žíly, zatímco endoteliální buňky jsou zničeny. Podobné změny byly pozorovatelné také na stěně arteriální cévy. Endoteliální buňky nekrotizovaly, zatímco vnitřní elastická membrána byla zachována. Zákrok IRE totiž netermálně poškozuje pouze plazmatickou membránu.

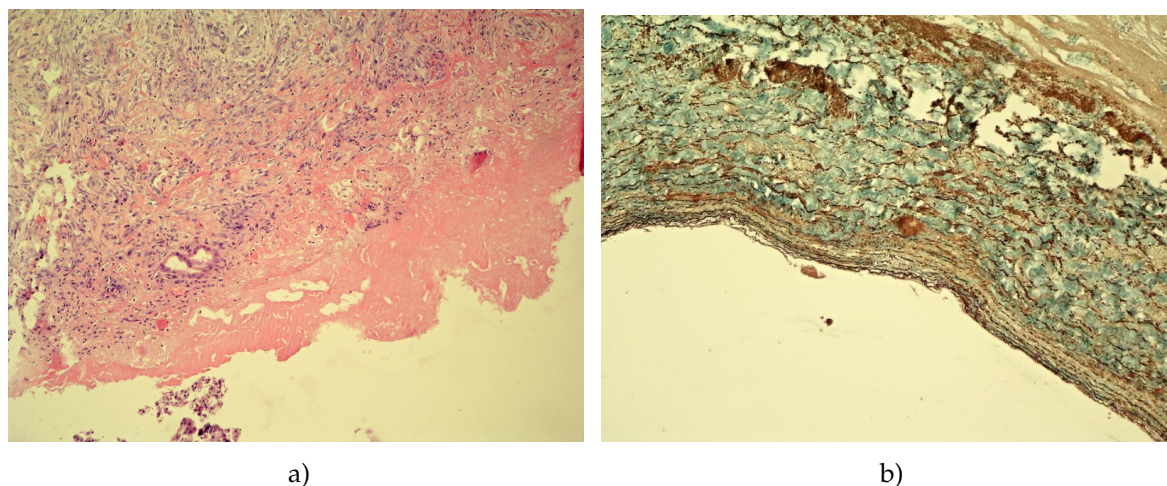
Diskutovaná metoda je nová, účinná a dobře predikovatelná. Následující pokusy budou sloužit k optimalizaci protokolu katetrové ablace, tak aby nedocházelo k operačním komplikacím. Pokusy byly prováděny na Veterinární a farmaceutické univerzitě Brno za spolupráce Radiologické kliniky Fakultní nemocnice Brno Bohunice.

5.9 Prevence benigní stenózy způsobené endoluminální IRE v žlučovodu

Výsledkem předchozích studií bylo určení správného protokolu ablace žlučových cest. Bohužel, experimenty ukázaly, že po 22 dnech vzniká téměř ve 100 % případů benigní stenóza žlučovodu. V tomto experimentu se testoval vliv preventivní implantace biodegradabilního stentu na vznik stenózy.

Endoluminální ablace žlučovodu byla provedena na 15 prasatech pomocí endoluminálního zařízení vloženého laparoskopicky. Zdrojem pulzů byl opět generátor stejnosměrných pulzů. Celkem bylo aplikováno 90 pulzů o napětí 900 – 1500 V. Zvířecí modely byly rozděleny do dvou kontrolních skupin. Skupině pěti prasat (A) byl do ablované části žlučovodu implantován biodegradabilní stent (Ella-CS, 30x10 mm). U zbývajících deseti prasat (B) zůstala ablovaná

oblast bez dalšího zásahu.



Obr. 5.11: Výsledky histopatologického vyšetření ablované tkáně. (a) Barvení hematoxylin-eosinem, zvětšení 100x; (b) Barvení orceinem, zvětšení 100x.

Všechna prasata byla usmrcena 22 dní po ablaci. Biochemické jaterní testy a MRI byly provedeny hned po zákroku, třetí a 22. den. Elektroporace a implantace stentu byla úspěšná ve všech případech a všechna zvířata přežila po stanovenou dobu experimentu. Všechny stenty zůstaly na místě kam byly při zákroku umístěny. Po zákroku byly hodnoty sérového bilirubinu u skupiny A lehce zvýšeny (průměrná hodnota 19,08 $\mu\text{mol/l}$ v porovnání se skupinou B kde to bylo 8,33 $\mu\text{mol/l}$). Dvacátý druhý den byl opět sérový bilirubin zvýšen stejně jako hodnoty AST. U skupiny A nedošlo k intrahepatální dilataci žlučovodu, naopak u skupiny B byla mírná dilatace pozorována, viz [79].

Pokus ukázal, že preventivní implantace biodegradabilního stentu po léčbě pomocí IRE ve žlučovodu je nadějnou technikou pro léčbu pozákrkové benigní stenózy. V budoucích experimentech budou ablovány nádory, kde pravděpodobně nebude docházet ke vzniku stenózy v porovnání se zákroky na zdravém žlučovodu. Dojde-li však v průběhu ablace k zásahu zdravé tkáně měla by být preventivní aplikace biodegradabilního stentu výhodná.

6 | Experimentální zdroj střídavých pulzů pro elektroporaci

Ireverzibilní elektroporace může být vyvolána nejen stejnosměrnými vysokonapěťovými pulzy, ale také pomocí vysokofrekvenčních střídavých pulzů. Metoda vysokofrekvenční elektroporace pro odstraňování nádorů byla patentována již v roce 2016, viz [15]. Zařízení by mělo být schopno dodávat bipolární pulzy o frekvenci 250 kHz až 2 MHz, není však ještě komerčně dostupné.

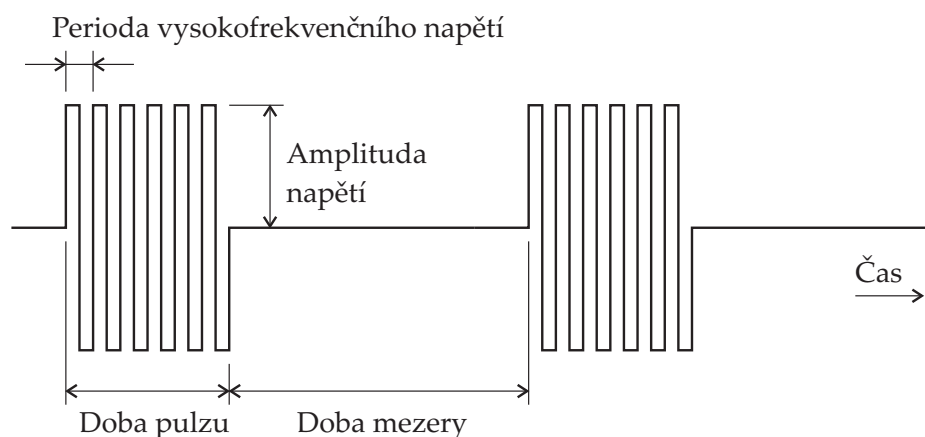
Takovéto zařízení se v literatuře označuje jako vysokofrekvenční generátor IRE (H-FIRE) používající frekvence v rozmezí 125 až 500 kHz. H-FIRE vyžaduje pro dosažení stejného efektu vyšší amplitudu napětí v porovnání se stejnosměrnou IRE. Z pohledu frekvence tak sice splývá hranice mezi AC IRE a RFA, nicméně je nutné vést v patrnosti, že u RFA působí proud trvale při nízké hodnotě výkonu, kdežto u H-FIRE je aplikován krátký pulz o vysokém výkonu. Nejnížší možná frekvence vyhovující pro ošetření bez svalových kontrakcí a nutnosti použití svalových relaxantů může být určena až na základě experimentů a je závislá na konkrétním místě aplikace v těle pacienta. Předpokládá se, že díky tomu by měla být eliminována také nutnost celkové anestezie při zákroku a není potřeba synchronizovat pulzy se srdečním rytmem, jako je tomu při DC IRE, viz [9].

Z výše uvedených důvodů, byl na základě potřeb ICRC FNUSA navržen a zkonstruován zcela nový vysokofrekvenční zdroj pulzů určený speciálně pro kardiologické účely, především pro léčbu arytmií. Zařízení nahrazuje jeden pravoúhlý 100 μ s pulz stejně dlouhým úsekem střídavého napětí o frekvenci stovek kilohertzů. Terapeutický účinek se při stejném napětí a proudu oproti elektroporaci stejnosměrnými pulzy sice o něco sníží, avšak svalové kontrakce jsou sníženy na pouhý zlomek původní hodnoty, což je při zákrocích v blízkosti myokardu zásadní, viz [9]. Jelikož se pracuje přímo v/na srdci, jsou nižší hodnoty napětí a proudu dostačující v porovnání s předchozími zákroky na játrech. Předpokládá se, že metoda je bezpečná a neporušuje koronární cévy v blízkosti elektroporované oblasti, což je výhodné v porovnání s jinými ablačními technikami.

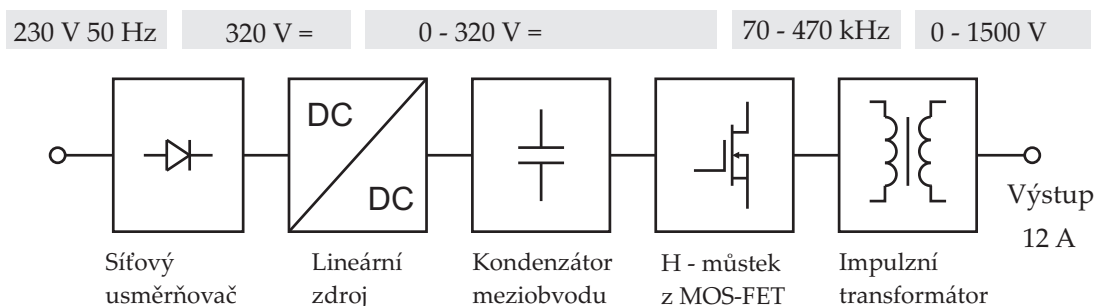
Tab. 6.1: Výstupní parametry vyrobeného zdroje střídavých vysokonapěťových pulzů pro IRE.

Parametr	Hodnota
Amplituda výstupního napětí pulzu	0 – 1500 V
Maximální proud	12 A
Výstupní frekvence	70 – 440 kHz
Doba pulzu	40 – 120 μ s
Doba mezery	0,5 – 1,5 s

Návrh přístroje byl podřízen požadavkům na výstupní parametry uvedených v Tab. 6.1 a na Obr. 6.1. Zařízení bylo primárně navrhováno pro kardiologické účely, kde nejsou potřebné tak vysoké hodnoty napětí a proudu. To umožnilo vytvořit kompaktní přístroj, jehož současná podoba je vidět na Obr. 6.4. Na Obr. 6.5 je blokové schéma kompletního systému při reálném experimentu. Vysoká frekvence výstupního napětí umožňuje použití běžné konstrukce dvojčinného spínaného zdroje s ferritovým zvyšujícím transformátorem. Usměrněné napětí sítě je přivedeno na běžný lineární regulovatelný napěťový stabilizátor, který nabíjí velký akumulací kondenzátor. Stabilizátor je doplněn o vybíjecí obvod tvořený sériově zapojeným rezistorem a tranzistorem, aby bylo možné napětí na kondenzátoru i snižovat. Ke kondenzátoru je připojen meziobvod H-můstku z tranzistorů MOSFET, do jehož úhlopříčky je připojeno primární vinutí transformátoru.



Obr. 6.1: Ideální tvar výstupního signálu zařízení pro AC IRE.



Obr. 6.2: Blokové schéma realizovaného zařízení pro AC IRE.

6.1 Návrh vysokofrekvenčního pulzního transformátoru

Stejně jako v případě zdroje pro stejnosměrnou elektroterapii je i pro vysokofrekvenční elektroterapii klíčovým prvkem pulzní transformátor. Na tento transformátor jsou kladeny vysoké požadavky týkající se izolace primárního a sekundárního vinutí, nutné pro zajištění vysoké provozní bezpečnosti. Z tohoto důvodu bylo použito zdánlivě zbytečně velké ferritové U-jádro, umožňující snadno realizovat výbornou izolaci mezi oběma vinutími. Vedlejším přínosem tohoto řešení je nízký počet závitů umožňující použití velkého průřezu vodiče, což zajišťuje malý napěťový úbytek na odporu vinutí vedoucí k dobré tvrdosti zdroje. Průřez jádra je 400 mm^2 , celková délka pro vinutí 75 mm a šířka okna 28 mm.

Maximální napětí na primárním vinutí 330 V je dáno amplitudou usměrněné sítě. Maximální indukce v jádře je zvolena 0,3 T.

Počet závitů primárního vinutí lze pro dvojčinný měnič spočítat z následující rovnice

$$N_1 = \frac{U_{1\max}}{4fS_{\text{Fe}}B} = \frac{330}{4 \cdot 70 \cdot 10^3 \cdot 0,4 \cdot 10^{-3} \cdot 0,3} = 10. \quad (6.1)$$

Požadovaný výstupní proud je 12 A při napětí 1500 V. Počet závitů sekundárního vinutí lze pak spočítat následujícím způsobem:

$$N_2 = N_1 \frac{U_2}{U_{1\min}} = 10 \frac{1500}{270} = 55. \quad (6.2)$$

kde $U_{1\min}$ je minimální hodnota napětí při respektování různých napěťových úbytků a tolerance napětí sítě.

Sekundární proud přepočítaný na primární stranu je proto

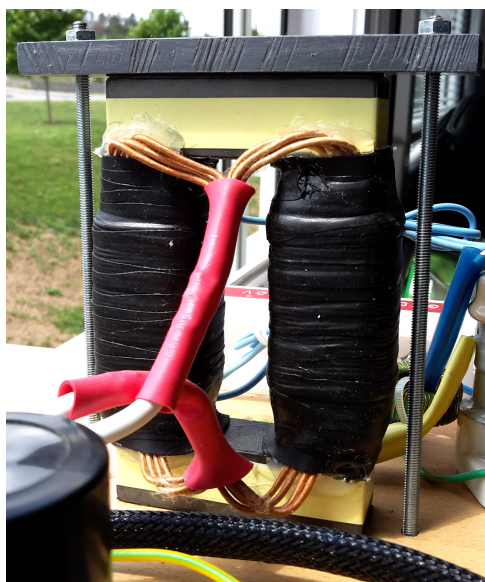
$$I_2' = I_2 \frac{N_2}{N_1} = 12 \frac{55}{10} = 66 \text{ A}. \quad (6.3)$$

Na již zrealizovaném primárním vinutí byla změřena primární indukčnost 170 μH . Maximum magnetizačního proudu bude v tomto případě pro délku pulzu 1/(2 $\times$ 70 kHz)

$$I_\mu = \frac{U_1 T_p}{L_1} = \frac{330}{170 \cdot 10^{-6} \cdot 2 \cdot 70 \cdot 10^3} = 13,9 \text{ A}. \quad (6.4)$$

Celkový primární proud se rovná

$$I_1 = I_2' + I_\mu = 66 + 13,9 = 79,9 \text{ A}. \quad (6.5)$$

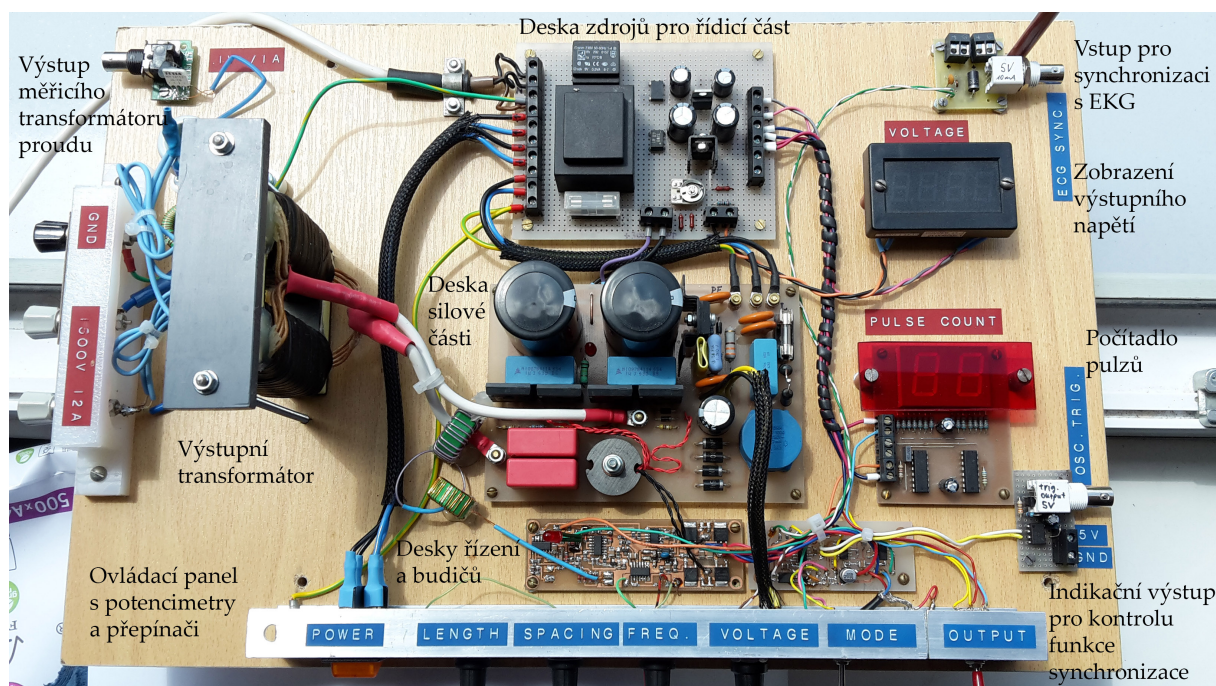


Obr. 6.3: Konstrukční provedení vysokofrekvenčního pulzního transformátoru.

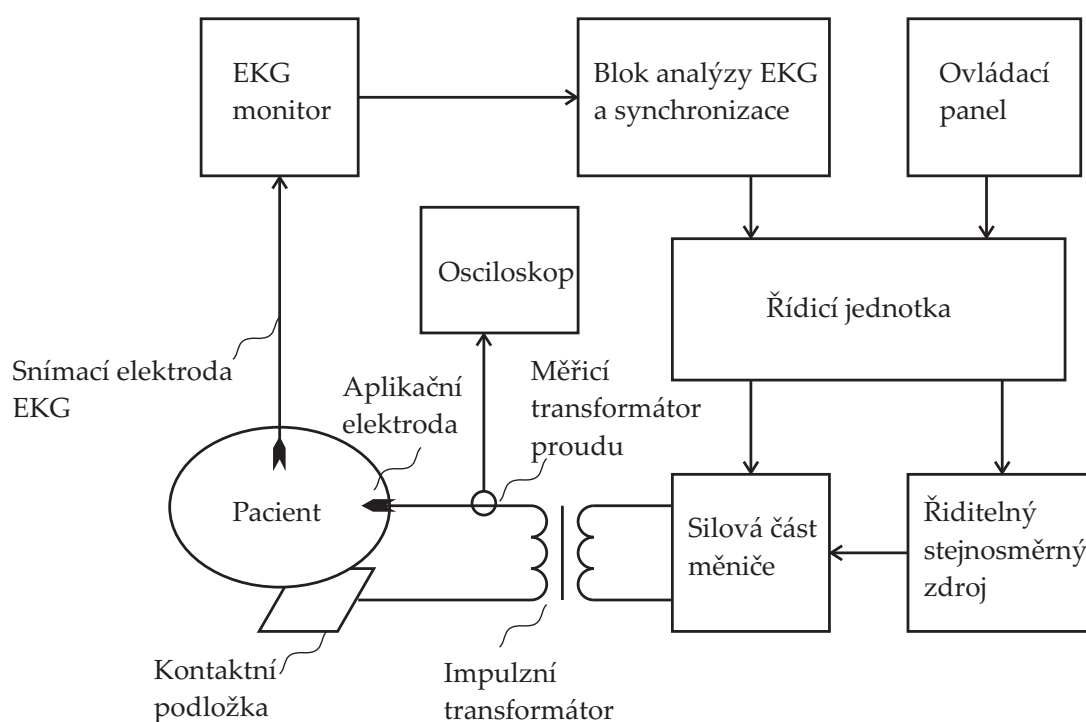
Pro vinutí byl použit svazkový vysokofrekvenční vodič Rupalit, jehož průřez mohl být vzhledem k prostorovým možnostem okna transformátoru předimenzován. Pro zajištění dobrého činitele vazby transformátoru bylo primární i sekundární vinutí rozděleno na oba sloupky

U-jádra. Obě poloviny mají shodný počet závitů a byly zapojeny paralelně. Izolace mezi primárním a sekundárním vinutím byla zajištěna robustní smršťovací trubičkou. V sérii s primárním vinutím je zařazen měřicí transformátor proudu pro účely nadproudové ochrany.

Tranzistory měniče byly dimenzovány na základě napětí meziobvodu a výše vypočítaného proudu I_1 . Byl zvolen typ tranzistoru IXFK 100N65X2 o mezních parametrech 650 V, 100 A a odporu otevřeného kanálu menší než 30 mΩ. Buzení tranzistorů je zajištěno impulzním transformátorem.



Obr. 6.4: Současná podoba zařízení pro H-FIRE.



Obr. 6.5: Blokové schéma kompletního systému pro *in vivo* experimenty.

6.2 Řídicí obvody zdroje

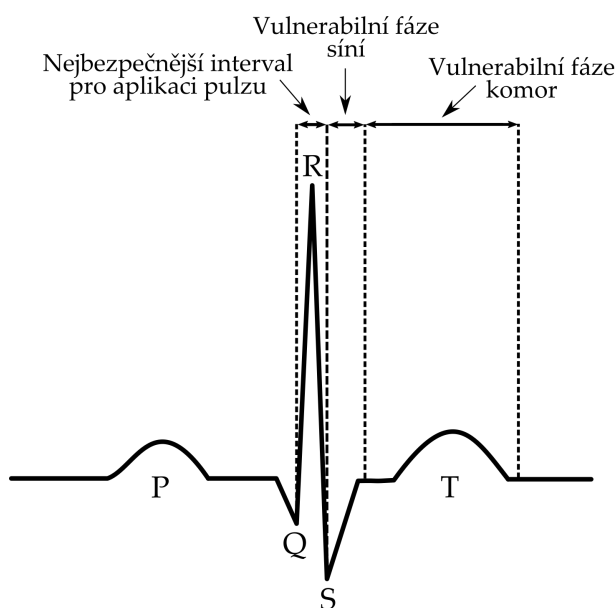
Řídicí obvody zdroje jsou poměrně jednoduché a nepotřebují mikroprocesor. Jsou vytvořeny pouze z logických obvodů. Pro nastavování parametrů pulzů slouží běžné potenciometry s oceichenou stupnicí. Řídicí obvody mají za úkol pouze realizovat průběh pulzu, viz Obr. 6.1, a zajistit spolehlivou nadproudovou ochranu. Vzhledem k náročnosti zamýšlené aplikaci v kardiologii byly sofistikované řídicí funkce zajištěny až nadřazeným systémem, viz kapitola 6.2.1.

Signalizační prvky jsou omezeny na několik LED diod indikujících provozní stavy jako je například indikace pulzů či vybavení nadproudové ochrany a dva LED displaye z nichž jeden zobrazuje nastavené napětí pulzu a druhý slouží jako počítadlo aplikovaných pulzů.

6.2.1 Synchronizace aplikačních pulzů se srdečním rytmem

Nejdůležitější součástí nadřazených řídicích systému jsou obvody zajišťující synchronizaci se srdečním rytmem. Srdeční synchronizace se používá při celé řadě diagnostických (CT, MRI, PET, SPECT, zátěžová echokardiografie) a terapeutických (elektrická kardioverze, kardiostimulace) technik. I když je vysokofrekvenční elektroporace relativně bezpečná, pracujeme-li v blízkosti myokardu je vhodné dodávané pulzy s rytmem srdce synchronizovat. Pokud by byl pulz aplikován do vulnerabilní fáze srdce (vlna T), mohlo by dojít k život ohrožující komorové fibrilaci.

Fyziologický rytmus srdce, viz Obr. 6.6, obsahuje vlnu P, která odpovídá depolarizaci síní trvající okolo 80 ms. Dále je zde výrazný QRS komplex, který odpovídá depolarizaci komor a trvá okolo 100 ms. V této době dochází rovněž k repolarizaci síní. Buňky srdeční svaloviny jsou v absolutní refrakterní fázi, což znamená, že jsou nedráždivé i na silný podnět. Proto je nejbezpečnější elektroporační pulz aplikovat právě do oblasti QRS komplexu. Bezpečná aplikace je možná až do momentu, kdy přichází vlna T, která odpovídá repolarizaci komor a je dlouhá okolo 160 ms.

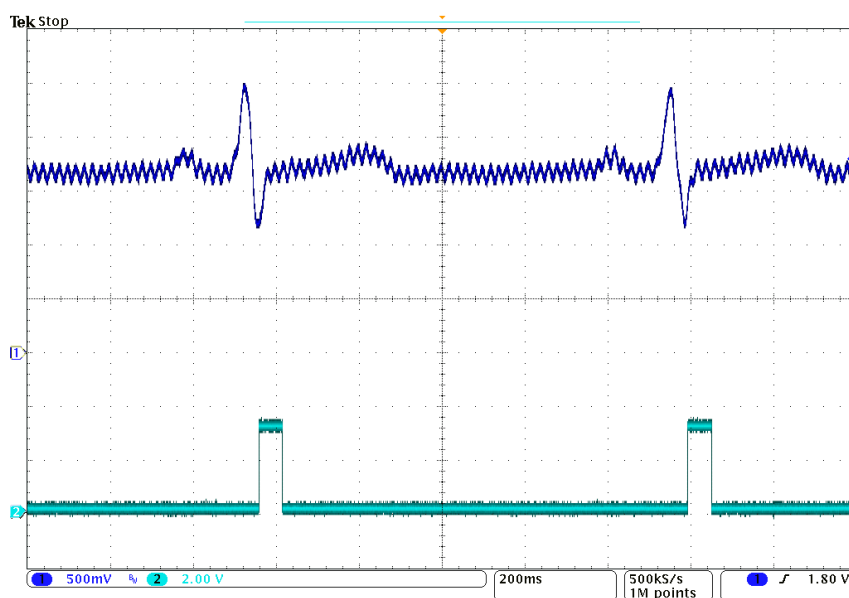


Obr. 6.6: Křivka EKG s vyznačenou vulnerabilní fází pro síně a komory, viz [80].

Detekci a analýzu signálu EKG je možné provést pomocí prospektivního nebo retrospektivního trigrování. Retrospektivní trigrování není pro účely elektroporace vhodné, protože jej nelze provádět v reálném čase, což je v případě elektroporace nezbytné. Prospektivní trigrování je založeno na detekování výrazné R vlny a měření R-R intervalů a je možné jej provádět v reálném čase.

Pro účely elektroporace srdečního svalu byl vytvořen program pro synchronizaci aplikačního pulzu s rytmem srdce v programovém prostředí LabVIEW. K snímání signálů EKG slouží jednoduchý jednoúčelový obvod AD8232, ke kterému jsou připojeny tři elektrody. K synchronizaci se dále využívá ten signál z končetinových svodů, který má nejvýraznější vlnu R. EKG signál je dále zpracován softwarem běžícím na platformě NI myRIO-1900, takže je systém schopen práce i bez připojeného řídicího počítače.

Algoritmus synchronizace se skládá z fáze učení, detekce a rozhodování. Z EKG se určuje průměrná velikost RR intervalu a amplituda R vlny. Signál se nejdříve filtruje pásmovou propustí FIR, nebo IIR. Následně dochází k odhadu obálky signálu pomocí Hilbertovy transformace a mediánové filtrace⁶. Pro správnou funkčnost programu je důležité získání délky RR intervalu a amplitudy R vlny pro nastavení prahu detekce. Délka RR intervalu se zaznamenává a načítá do LIFO pole hodnot, odkud se počítá jeho průměrná délka a je odečten čas překročení prahu. S pomocí nastavených rozhodovacích pravidel se určí, zda je detekovaná R vlna fyziologická a v tom případě dojde k aplikaci elektroporačního pulzu. Pulz je tedy aplikován tehdy, je-li nově detekovaná vlna R a jí odpovídající RR interval v rozmezí mínus 7 % až plus 15 % průměrné délky RR intervalu. Podrobnější popis synchronizačního algoritmu je uveden v [81]. Na Obr. 6.7 je vidět průběhy EKG a synchronizovaných pulzů při experimentálním ověření funkčnosti programu.



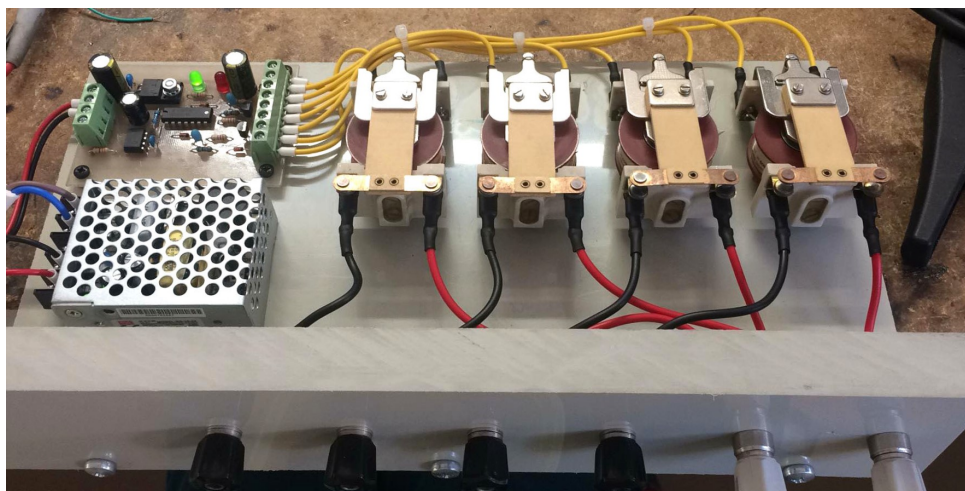
Obr. 6.7: Ukázka z experimentálního ověření funkčnosti synchronizace elektroporačních pulzů s EKG. Modrá křivka odpovídá EKG signálu a tyrkysová křivka zobrazuje synchronizační pulzy pro spouštění elektroporačních pulzů.

⁶mediánová filtrace – Nelineární druhy filtrace vhodný k odstranění náhodného šumu a pro potlačení špiček v EKG signálu.

6.3 Měření impedance při elektroporaci

Důležitou funkcí elektroporačního systému je stanovení impedance zátěže. Posuzování impedance je možno provádět dvěma nezávislými způsoby. První je odvozen od přímého měření proudu zdroje vestavěným měřicím transformátorem proudu připojeným k externímu osciloskopu. Ze známého nastaveného napětí a změřeného proudu lze stanovit odpor zátěže. Tato funkce je primárně využita k posouzení kvality kontaktu mezi aplikační elektrodou a tkání, nebo může indikovat přerušení vodičů katetru. Druhý způsob měření impedance je prováděn mimo aplikovaný pulz, neboli bez napětí. Takto získané hodnoty impedance slouží k posouzení úspěšnosti elektroporačního procesu, která je indikována malými změnami svodových odporů kondenzátorů reprezentujícího buněčné membrány.

K tomu účelu slouží reléový přepínač, viz Obr. 6.8, který po aplikaci každého pulzu od katetru dvoupólově odpojí generátor a připojí měřič impedance. V prvotních experimentech byl použit běžný RLC metr, což se ukázalo jako nevhodné. Z důvodu kompenzace elektrochemických potenciálu není totiž vhodné, aby měřicí napětí bylo stejnosměrné. Vzhledem ke kapacitnímu charakteru tkáně je výhodné, aby měřicí frekvence byla co nejnižší, aby co nejvíce měřicího proudu protékalo jejím odporem a ne kapacitou. Frekvence v rozsahu desítek až stovek hertzů způsobovala život ohrožující fibrilaci komor pacienta. Běžné měřiče impedance pracují s minimálním napětím 0,5 V, což je z tohoto pohledu příliš vysoká hodnota. Proto by v dalším kroku vývoje systému bylo vhodné použít jiný měřič impedance pracujícím s napětím pouze v řádu desítek milivoltů.



Obr. 6.8: Réleový přepínač pro účely měření impedance.

6.4 Vznik nežádoucího kapacitního proudu do země

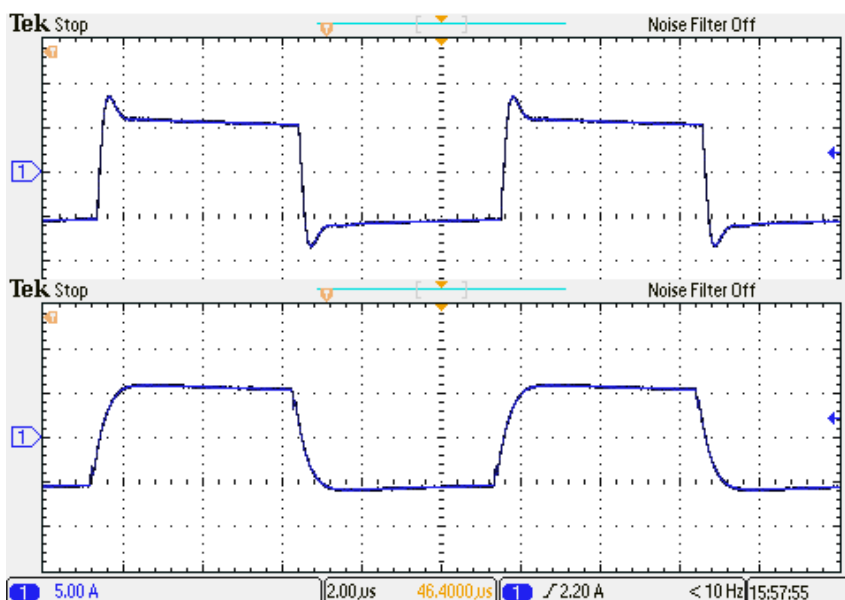
Nejednoznačné připojení pacienta k zemi při reálné operaci přináší jisté komplikace, které se při experimentech projevily. Problém způsobuje skutečnost, že uzemnění pacienta prostřednictvím nalepovací elektrody není dokonalé, což vede ke vzniku napětíového děliče (částečně kapacitního a částečně odporového). Na pacientovi je tedy v průběhu operace přítomno jisté vysokofrekvenční napětí proti zemi.

Proud vznikající vlivem tohoto napětí je sváděn do země nejen chtěnou cestou přes kontaktní podložku, ale též všemi ostatními elektrodami k pacientovi připojenými, což může vést

k rušení různých měřicích přístrojů. Situace se příliš nezlepší ani v případě, že je výstup generátoru připojen bipolárně, neboli když není ani jedním svým pólem spojen se zemí. Kapacitní proud se v tomto případě uzavírá cestou přes napájecí síť, tranzistorový měnič, kapacitu mezi primárním a sekundárním vinutím výstupního transformátoru, aplikační elektrodu, pacienta a kapacitu mezi pacientem a zemí. Kapacitní proud by v tomto případě byl eliminován pouze v situaci, že by obě dvě elektrody měly naprosto shodnou konfiguraci a stejný odpor a kapacitu proti zemi. To však při reálné operaci rozhodně zaručeno není.

Experimenty s vylepšováním uzemnění pacienta ani se změnami konfigurace uzemňovacích spojů nevedly k výraznému zlepšení. Řešení této situace přineslo až omezení strmosti nárůstu napětí na pacientovi zařazením přídavné indukčnosti mezi výstup generátoru a aplikační elektrody. Tato indukčnost vytvoří spolu se zatěžovacím odporem sériový RL článek, který omezuje kapacitní složku proudu v průběhu strmé napěťové hrany na výstupu zdroje. Velikost potřebné indukčnosti byla stanovena na základě známého sériového odporu a požadované časové konstanty RL obvodu. Ta musí být co největší, avšak ještě rozumně malá, aby zbytečně nesnižovala čas trvání pulzu a nezměňovala efektivní hodnotu napětí na výstupu. Pro takto vypočtenou indukčnost byl na základě vztahu pro indukčnost válcové vzduchové cívky stanoven počet závitů lakovaného vodiče navinutého na PVC trubku.

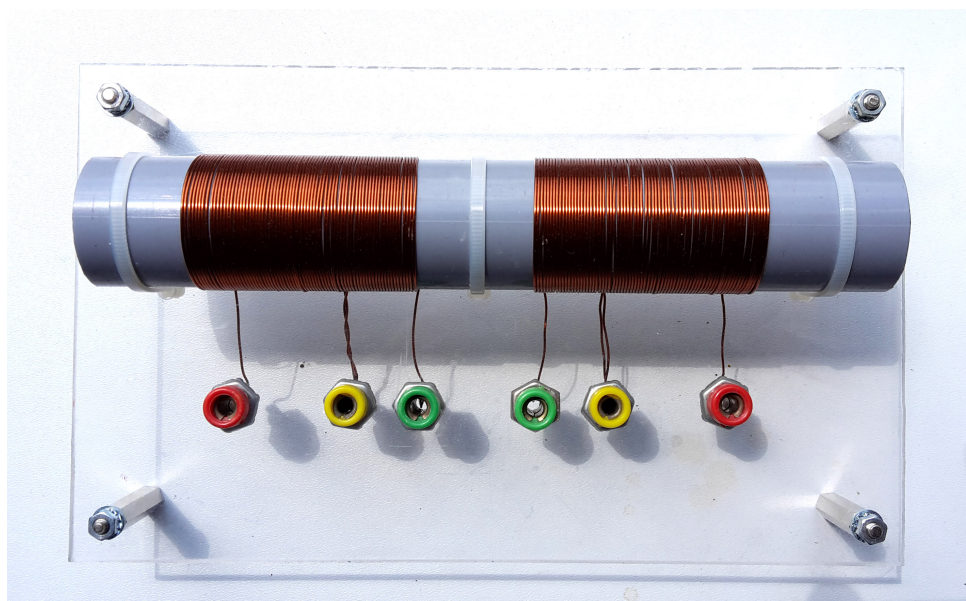
Obr. 6.9 prezentuje efekt této přídavné indukčnosti na proud přímo při kardiologickém experimentu, kdy bylo aplikováno napětí 760 V s frekvencí 100 kHz. Na prvním průběhu je původní stav a na druhém je situace po zařazení indukčnosti. Je zřejmé, že při změně zatěžovacího odporu zdroje je vždy nutné změnit hodnotu indukčnosti tak, aby byla zachována žádaná časová konstanta. Cívka, viz Obr. 6.10, má tedy odbočku, aby bylo možno přepojením konektoru zvolit 3 různé hodnoty indukčnosti, a to 20, 46 a 80 μH . V případě bipolárního použití (kardiologický experiment) s plovoucím výstupem zdroje je nutno zařadit indukčnost do obou pólů zdroje a výsledná indukčnost má potom dvojnásobnou hodnotu.



Obr. 6.9: Průběh proudu před a po zařazení sériové indukčnosti.

6.5 Sekundární přínos použití sériové indukčnosti

Z průběhu výstupního proudu zdroje na Obr. 6.9 je zřejmé, že pokud je odstraněna viditelná nežádoucí kapacitní proudová špička na začátku každého pulzu, zvýší se proudové využití zdroje při daném nastavení jeho rychlé nadproudové ochrany. V praxi to přineslo zvýšení velikosti reálně použitelného proudu zdroje z původních 8 A až na 12 A, což byla zvolená hodnota proudového omezení. Tento efekt, který výrazně rozšířil možnosti generátoru, byl paradoxně ve výsledku výraznějším přínosem, než bylo původně zamýšlené snížení rušení. Obecně lze tedy tvrdit, že v případě elektroporace tvrdým zdrojem střídavého napětí s pravoúhlým průběhem (většina v současnosti publikovaných experimentů) je zařazení nastavitelné indukčnosti velmi výhodné.



Obr. 6.10: Konstrukční provedení přídavné sériové indukčnosti.

7 | Experimenty provedené pomocí zdroje střídavých pulzů

Zdroj střídavých pulzů pro ireverzibilní elektroporaci byl sestaven zejména pro aplikace v kardiologii a to hlavně pro katetrovou ablací srdečních arytmií. Katetrová ablace srdečních arytmií je standardní terapeutický přístup pro pacienty, kteří trpí poruchami rytmu, ale jsou rezistentní na léky.

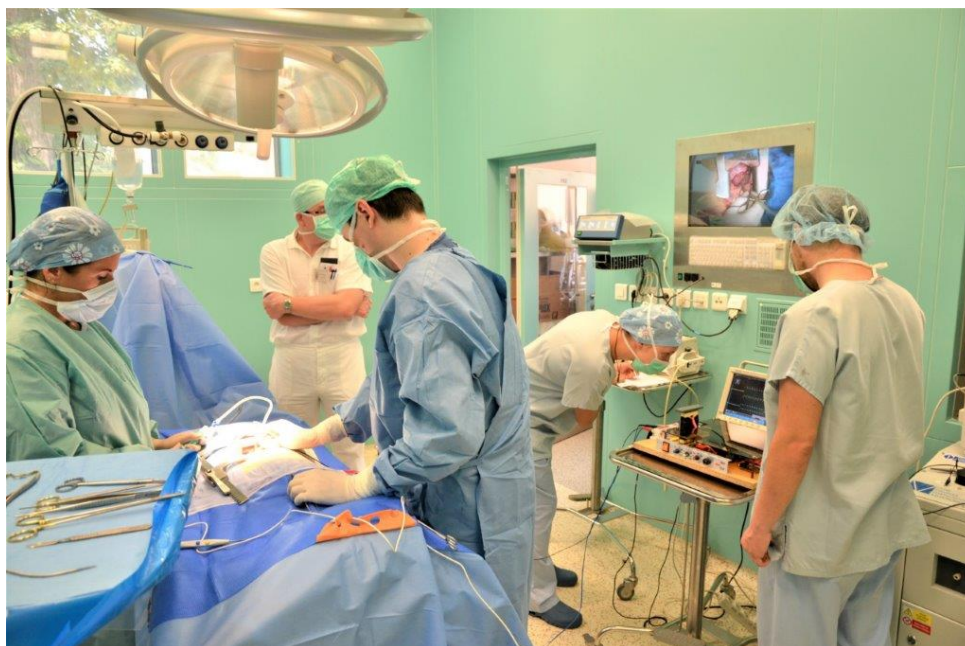
Nejpoužívanější technikou je radiofrekvenční ablace (RFA), které se věnuje kapitola 1.7.1. Přínosy této techniky v případě diskutované léčby jsou limitovány určitými riziky po zákroku. Jelikož metoda využívá vysokou teplotu indukující okamžitou lokalizovanou buněčnou nekrózu, může dojít k poškození okolních struktur jako je jícn, frenický nerv nebo koronární cévy. Po zákroku vzniká elektricky nevodivá jizva, která brání patologickému šíření vzruchu. Dále může docházet ke vzniku tzv. popů, rapidně vznikajících expanzí páry při přehřátí myokardu v místě kontaktu hrotu katetru s tkání vedoucí k poškození myokardu až s možností protržení srdeční stěny. Přibližně u 25 % pacientů dochází také k recidivě arytmií, která je dána obnovou vedení srdečních vzruchů při hojení ablačních lézí, způsobeného nedostatečnou velikostí a hloubkou lézí.

Alternativou k RFA je právě IRE. V současnosti však nejsou IRE generátory určené pro specifickou terapii srdečních arytmií komerčně dostupné. Použití stávajících generátorů stejnosměrné IRE jako je NanoKnife nebo stejnosměrný IRE generátor vyvinutý na UVEE zatím není možné vzhledem k řadě potenciálních rizik. Mezi ně patří vznik elektrolytického plynu při aplikaci DC IRE v podobě bublin s následným rizikem embolizace do mozku, nekróza buněk v důsledku změn pH v oblasti aplikace pulzů nebo nebezpečí vzniku fibrilace komor. V návaznosti na elektrické pulzy také dochází ke kontrakcím kosterního svalstva, které jsou pro pacienta velmi nepříjemné a bolestivé. DC IRE výkony u pacientů by tak bylo třeba dělat v celkové anestezii za podávání myorelaxantů, což prodlužuje i prodražuje celou operaci.

Při použití generátoru střídavých pulzů (AC IRE) je nežádoucí reakce srdce výrazně nižší a to i v případě, dojde-li k chybě synchronizace EKG signálu a elektroporačního pulzu a aplikování pulzu do vulnerabilní fáze srdečního rytmu. Tato skutečnost je sice zachytitelná na EKG záznamu, nevede však ke komorové fibrilaci. V této kapitole jsou uvedeny pokusy ověřující účinek střídavých pulzů na srdce vedoucí k vytvoření metodologie pro katetrovou ablací srdečních arytmií pomocí AC IRE.

7.1 Ověření účinků AC IRE na epikardu

S použitím generátoru střídavých pulzů IRE byl proveden pokus na dvanácti velkých prasnicích (45 až 55 kilogramů) *in vivo* za účelem testování účinků metody na srdeční tkáň, viz Obr. 7.1. Zvířata byla v plné anestezii. Přístup přímo k srdci byl zajištěn laterální torakotomií. K aplikování vysokonapěťových pulzů byla použita speciální přísavná elektroda o velikosti 6×6 mm, viz Obr. 7.2 b), aby bylo docíleno dokonalého kontaktu se srdcem, viz Obr. 7.2 a). Referenční elektroda byla velkoplošná elektroda umístěná na zádech pacienta, přibližně ve vzdálenosti 40 cm od srdce.



Obr. 7.1: Snímek pracoviště při ověřování účinku AC IRE na epikardu.



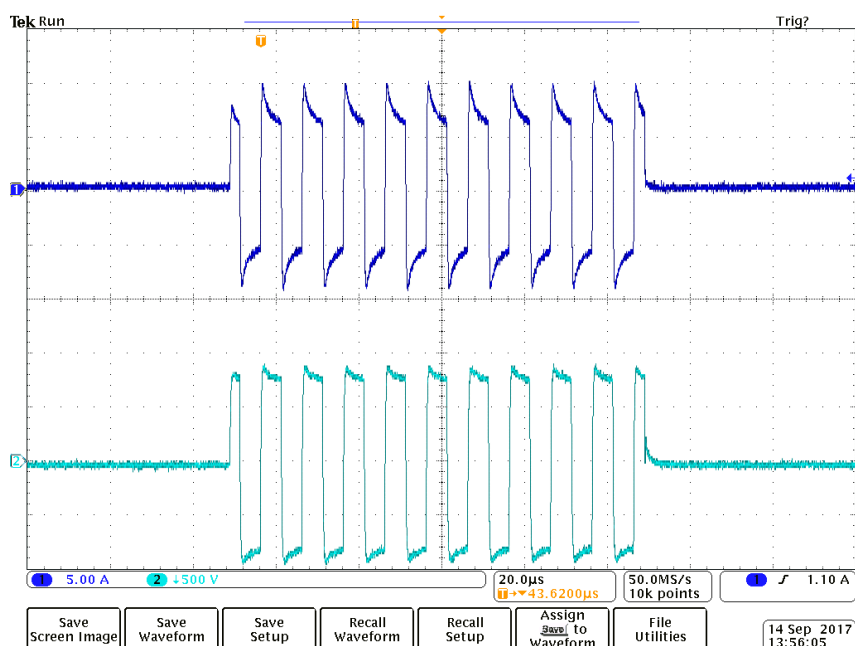
a)



b)

Obr. 7.2: Experiment *in vivo* na srdci: (a) elektroda přisátá na srdci, (b) přísavná elektroda s odhalenou aktivní ploškou o velikosti 6×6 mm.

Série pulzů byly aplikovány jak na levou komoru tak levou síň. Na levou komoru byla aplikována napětí 500, 600 a 800 V při frekvencích 100, 200 a 300 kHz. Na levou síň byla aplikována napětí 200, 300, 400 a 500 V při frekvenci 100 kHz. Příklad typického průběhu napětí a proudu je zobrazen na Obr. 7.3. Bylo vypořádováno, že při přisátí elektrody na srdce dochází k elevaci úseku ST EKG signálu, i přes to, že nebyla komprimována žádná epikardiálně zřetelná větev věnčitých tepen. Nicméně samotná elektroda fungovala dobře a v průběhu experimentů nedošlo k porušení izolační kaptonové pásky až na jeden případ. Během zákroků byly pozorovány svalové záškuby končetin, tzv. fascikulace, o různé intenzitě, i přes to, že byly zvířatům podávány svalové relaxanty.



Obr. 7.3: Typický průběh napětí na aplikačním katetru a odpovídající proudová odezva.

Z tohoto důvodu byly provedeny také kontrolní pokusy aplikace AC pulzů na kosterní sval tří prasat. Byly aplikovány pulzy o napětí 200, 400 a 800 V při frekvencích 400, 300, 200, 100, 90 a 70 kHz. Míra záškubů byla měřena pouze subjektivně pohledem na kosterní sval (lokální záškuby) a pohmatem na levé zadní končetině (celkové záškuby). Získané hodnoty jsou uvedeny v Tab. 7.1, kde nulová hodnota odpovídá stavu bez záškubů. Z dat je patrné, že míra záškubu roste s klesající frekvencí a s rostoucím napětím. V dalších experimentech bude měření zpřesněno za použití akcelerometru.

Po 14, 30 a 60 dnech od zákroku byla provedena 1,5 T MRI za účelem sledování vývoje vytvořených lézí. Funkce srdce nebyla narušena u žádného z testovaných zvířat. U prasat bylo provedeno elektroanatomické mapování pomocí 3D EAM CARTO 3. U tří sledovaných byla endokardální bipolární mapa v pořádku u ostatních tří prasat se v mapách objevily oblasti s nízkým napětí na přední a zadní stěně, avšak beze změn typických pro jizvy.

Během zákroků nedošlo k poranění plic ani jícnu. Perikard byl ve všech případech fibrotický z důvodu chirurgického přístupu a manipulaci při aplikaci pulzů. Po usmrcení zvířat byla vyňata jejich srdce a zafixována formaldehydem. Vzorky tkáně byly následně skenovány pomocí 9,4 T MRI *ex vivo*, aby byla identifikována případná fibrotická tkáň. Na tkáni nebyly viditelné jasné změny. Vzorky byly také podrobeny histopatologickému barvení hematoxilin-eosinem.

Toto vyšetření odhalilo fibrózu levé komory začínající na epikardu. Na některých preparátech byla zřejmá povrchová fibróza klínovitého tvaru, nebyla však zjištěna fibróza jdoucí do hloubky. Místa aplikace pulzů byla při zákroku označena stehy, některé z nich však vypadly a léze bylo velmi obtížné najít. Je tedy možné, že některá část z nich nebyla vůbec analyzována.

Tab. 7.1: Závislost míry svalových záškubů na velikosti napětí a frekvence.

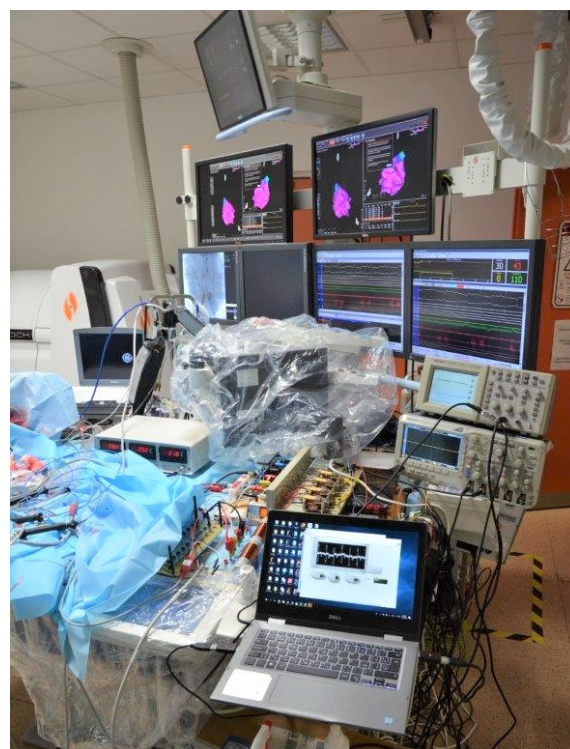
Frekvence (kHz)	Záškuby při 200 V		Záškuby při 400 V		Záškuby při 800 V	
	lokální	celkové	lokální	celkové	lokální	celkové
400	0; 1; 0	0; 0; 0	0; 0; 1,5	0; 0; 0	0,5; 1,5; 1,2	0; 0,5; 1
300	0; 1,5; 0,2	0; 0; 0	0; 0,5; 1,8	0; 0; 1	0,5; 1,5; 2	0; 1; 2
200	0; 2; 1	0; 0,8; 0	0,8; 1; 2	0; 0; 2	1; 2; 2,2	0; 1,5; 2,2
100	0; 2,1; 1,2	0; 1; 0	1; 1,5; 2,2	0; 0; 2,2	1,5; 2,5; 2,8	0; 2; 2,8
90	0; 2; 1,2	0; 1,2; 0	1,5; 2; 2,8	0; 0; 2,8	1,7; 3; 2,9	0; 2,5; 2,9
70	0,2; 2; 1,3	0; 1,2; 0	1,5; 2,1; 2,8	0; 0,5; 2,8	1,8; 3; 3	0; 2,5; 3

7.2 Endokardiální katetrová ablace

Pokusy endokardiální katetrové ablace podstoupilo devět velkých prasnic (43 až 57 kilogramů) *in vivo*. Pracoviště při zákroku je vidět na Obr. 7.4. Ablace byla prováděna v levé síni a na interventrikulárním septu. Přes tříselné cévy byly zavedeny diagnostické a ablační katetry. Současně byl v tříselné tepně invazivně monitorován krevní tlak. Po transeptální punkci byly katetry zavedeny do levé síně a bylo provedeno EAM pomocí 3D EAM CARTO 3 Lasso katetru a Smarttouch Thermocool katetru (Biosense Webster), viz Obr. 7.5, u všech testovaných prasnic.



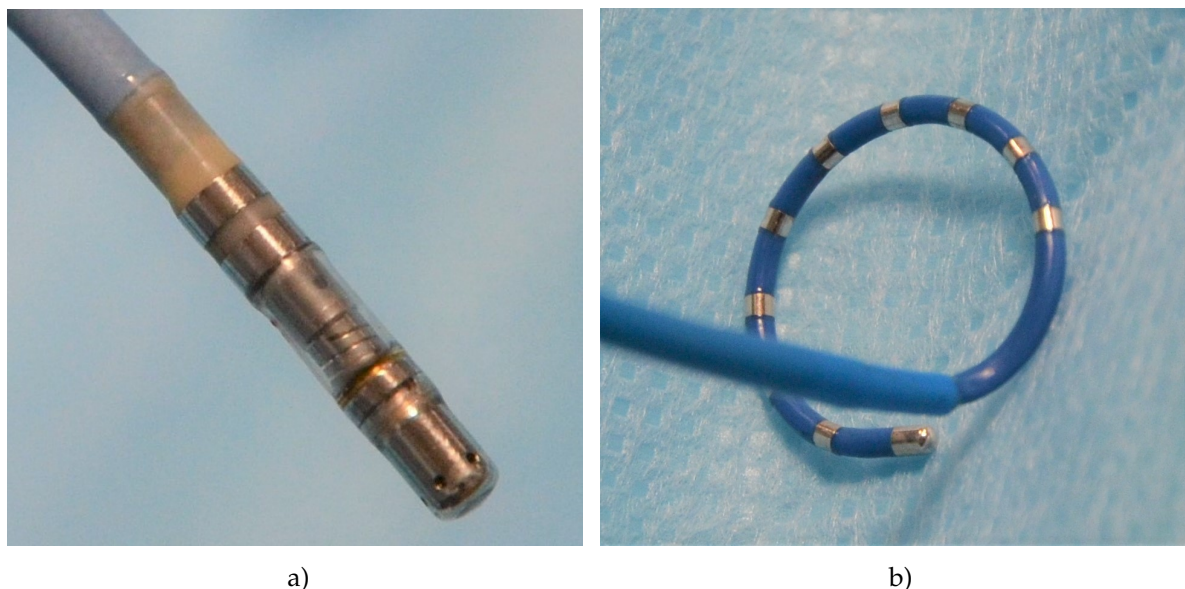
a)



b)

Obr. 7.4: Snímky pracoviště při endokardiální katetrové ablacii.

Pulzy z generátoru AC IRE byly synchronizovány s EKG rytmem pacienta. Při tomto experimentu byla využita starší a méně sofistikovaná metoda, než která je popsána v kapitole 6.2.1. Signál EKG byl detekován a zpracován pomocí experimentálního zařízení pro detekci EKG propojeného s měřicí jednotkou National Instruments a programem vytvořeným v prostředí LabVIEW. Signál byl filtrován a prahován tak, aby docházelo k detekci R vln EKG signálu. Pokud byla zaznamenána R vlna, tak s průměrným zpožděním 75 ms byl aplikován také elektroporační pulz.



Obr. 7.5: Katetry pro elektroanatomické mapování pomocí CARTO 3. (a) Smarttouch Thermo-cool katetr a (b) Lasso katetr.

Ablace v levé síni byla prováděna bipolárně pomocí Lasso katetru, který disponuje deseti póly se vzdáleností tři milimetry mezi póly. Dále byly prováděny ablace na ostiu plicní žíly a na laterální trabekulizované stěně. Celkově bylo aplikováno 60 pulzů o napětí 900 V. Velikost intenzity elektrického pole nepřesahovala 3 kV/cm.

Následně byla distální elektroda ablačního katetru Smarttouch spojena s aktivním pólem generátoru a diagnostický katetr s referenčním pólem generátoru. Katetry byly umístěny na proti sobě po obou stranách septa pod fluoroskopickou kontrolou. V této konfiguraci elektrod bylo aplikováno 120 pulzů o velikosti 1,2 kV. Velikost intenzity elektrického pole byla v tomto případě kolem 1 kV/cm. Intrakardiální potenciály byly po ablaci buď rozšířené nebo prakticky vymizely, což potvrdilo akutní efekt zákroku. Po měsíci od zákroku byla tři zvířata znovu podrobena elektroanatomickému mapování, které ukázalo, že velikost potenciálů v ablované oblasti poklesla. Následně byla provedena 9,4 T MRI na fixovaných vzorcích. Byla zřejmá změna kontrastu, což mohlo být způsobeno změnou zastoupení svalové a fibrotické (vazivové) tkáně.

Endokardiální katetrová ablace byla nejkomplexnějším experimentem ze všech provedených. V průběhu experimentu se vyskytlo několik technických problémů, které byly úspěšně vyřešeny. Z důvodu odstranění kapacitní špičky proudu byla realizována přídatná indukčnost, viz kapitola 6.4 a 6.5. Byla odladěna synchronizace pulzů s EKG, viz kapitola 6.2.1, a byl objeven problém měření impedance standardním RLC metrem, viz kapitola 6.3. Na základě odezvy od týmu odborníků z FNUSA ICRC je patrné že, získané výsledky jsou důkazem funkčnosti této nové metody a lze očekávat její nové aplikace v kardiologii i dalších lékařských oblastech.

8 | Zpřesnění matematického modelu tkáně

Impedance je jedna z klíčových veličin, která vypovídá o procesu elektroporace. Znalost impedance zátěže je důležitá pro návrh a vývoj elektroporačních zařízení, ale také pro účely modelování a simulací procesů v tkáni v průběhu elektroporace. Měření elektrických vlastností během elektroporace poskytuje okamžitou zpětnou vazbu vypovídající o úspěšnosti celého procesu.

Ivorra a Rubinsky v [82] použili k pokusům měření impedance BTX ECM 830 pulzní generátor (Harvard Apparatus, Holliston, MA) v kombinaci s vlastním analyzátozem impedance. Pro aplikaci pulzu a měření parametrů pulzu, jako je napětí a proud, využili speciální čtyřelektrodovou sondu. Jeden pár elektrod slouží k aplikaci proudu a druhý pár elektrod měří napětí ve vzorku. Impedanci měřili po zákroku a to v rozsahu 1 kHz až 400 kHz. Nominální hodnota elektrické intenzity aplikované na krysí játra byla 450 V/cm a 1500 V/cm. Střídavé pulzy byly dodávány digitálním generátorem a přiváděny do tkáně přes omezující rezistor ($1\ \Omega$).

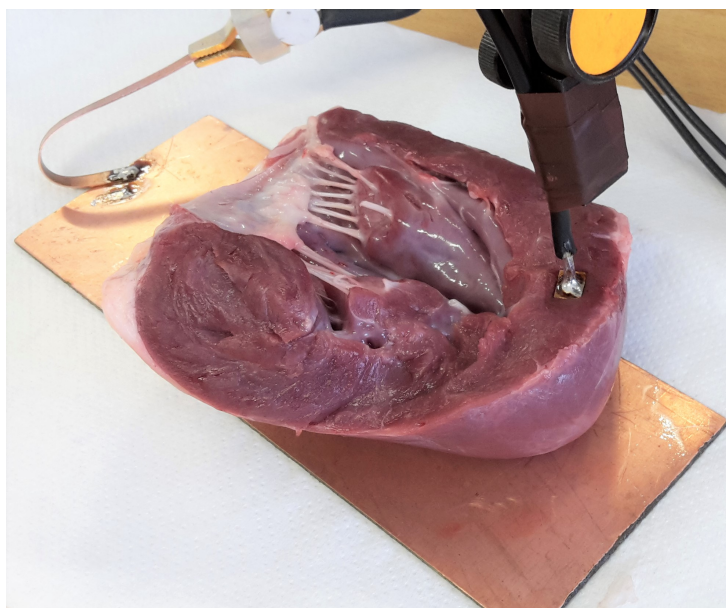
V dalším experimentu v [8] byly pro měření impedance použity plošné elektrody. Vysokofrekvenční vysokonapěťové pulzy byly aplikovány na vepřová játra pomocí vlastního generátoru založeném na topologii H-mostu. Pro zobrazení signálů byl použit osciloskop DPO2002B (Tektronix Inc., Beaverton, OR, US). Nominální hodnota elektrické intenzity získané touto metodou se pohybovala v rozmezí 140 V/cm a 7000 V/cm. Impedance byla měřena v rozsahu 1 Hz až 1 MHz.

Bhonsle v [7] použil pro své experimenty bramboru jako testovaný vzorek. Aplikoval jak unipolární, tak vysokofrekvenční bipolární elektroporační pulzy. Pro unipolární pulzaci byl použit také generátor pulzů BTX ECM 830. Pro vysokofrekvenční bipolární pulzy byl zvolen generátor univerzálních funkcí AFG3021C (Tektronix Inc., Beaverton, Or, US) s experimentálním pulzním zesilovačem. Impedance byla měřena v rozsahu frekvencí 1 Hz až 1 MHz před a po zákroku. Amplituda použitých pulzů byla 400 V v případě unipolární pulzace a 1020 V v případě bipolární pulzace.

I přes známá fakta bylo vhodné provést měření impedance na našich vzorcích. Znalost impedance je důležitá jak z pohledu chování zkoumané tkáně, tak i chování celého systému zahrnujícího také elektrody a veškerou kabeláž. Měření impedance předcházelo vývoji a výrobě AC IRE a bylo prováděno ve stejné konfiguraci. Testovacím vzorkem byla prasečí srdeční svalová tkáň *ex vivo*.

Nejdříve byla impedance měřena pomocí analyzátoru impedance QuadTech 7600 (IET Labs Inc., NY, US). Toto zařízení umožňuje přesnou analýzu impedance s proměnnou frekvencí a napětím. Měřicí napětí bylo nastaveno na hodnotu 1 V a měřicí frekvence byla rozdělena na 200 hodnot v rozsahu 100 Hz až 2 MHz. K aplikaci elektroporačních pulzů byla použita

elektroda o velikost 6×6 mm podobně jako při experimentu na živých prasatech, viz kapitola 7.1. Druhý pól elektroporačního generátoru byl připojen k velkoplošné elektrodě, viz Obr. 8.1. Pro elektroporaci byla použita napětí 500, 600 a 800 V, frekvence 100, 200 a 300 kHz, délka pulzu byla 100 μ s. Pro každou kombinaci hodnot bylo aplikováno 60 pulzů.



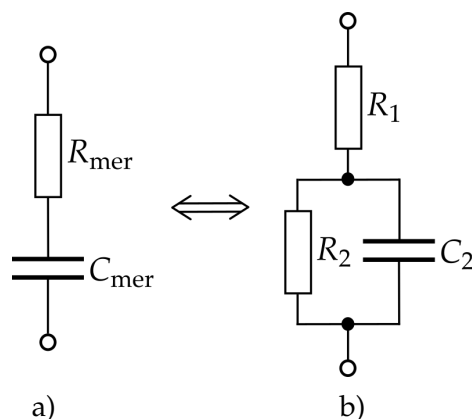
Obr. 8.1: Konfigurace experimentu měření impedance srdeční tkáně.

Impedance byla měřena vždy před a po elektroporačním zákroku, aby mohlo být posouzeno, zda dochází během elektroporace ke změně její hodnoty. Naměřená data byla vyjádřena ve formě sériového ekvivalentního RC obvodu, viz Obr. 8.2 a), s frekvenčně závislými parametry R a C . Je nasnadě ukázat, že ze změřených hodnot R a C je možno získat nekonečně mnoho kombinací parametrů ekvivalentního zapojení dle Obr. 8.2 b) pomocí rovnic

$$R_1 = -\frac{R_2}{2} + R_{\text{mer}} \pm \frac{\sqrt{-4 + R_2^2 \omega C_{\text{mer}}^2}}{2\omega C_{\text{mer}}}, \quad (8.1)$$

$$C_2 = \frac{R_2 \omega C_{\text{mer}} \pm \sqrt{-4 + R_2^2 \omega C_{\text{mer}}^2}}{2R_2 \omega}, \quad (8.2)$$

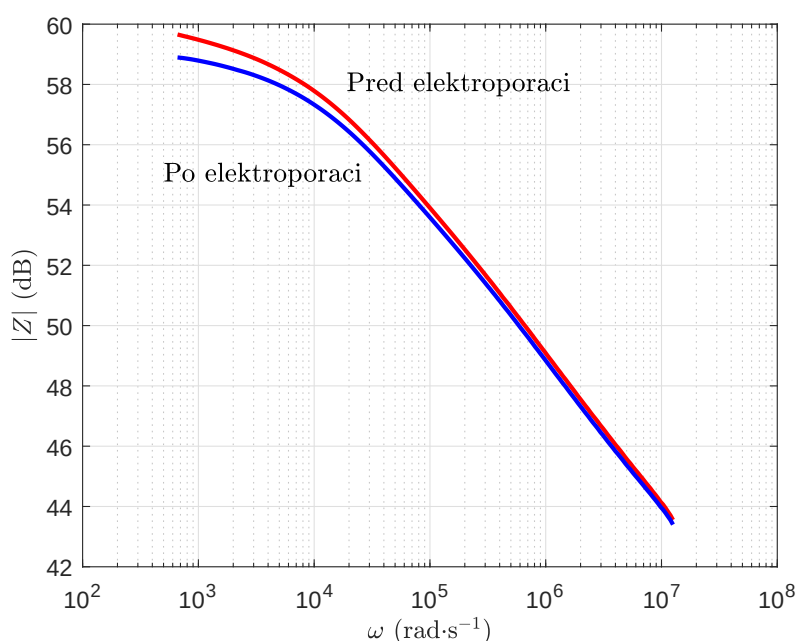
kde velikost odporu R_2 může nabývat libovolné hodnoty.



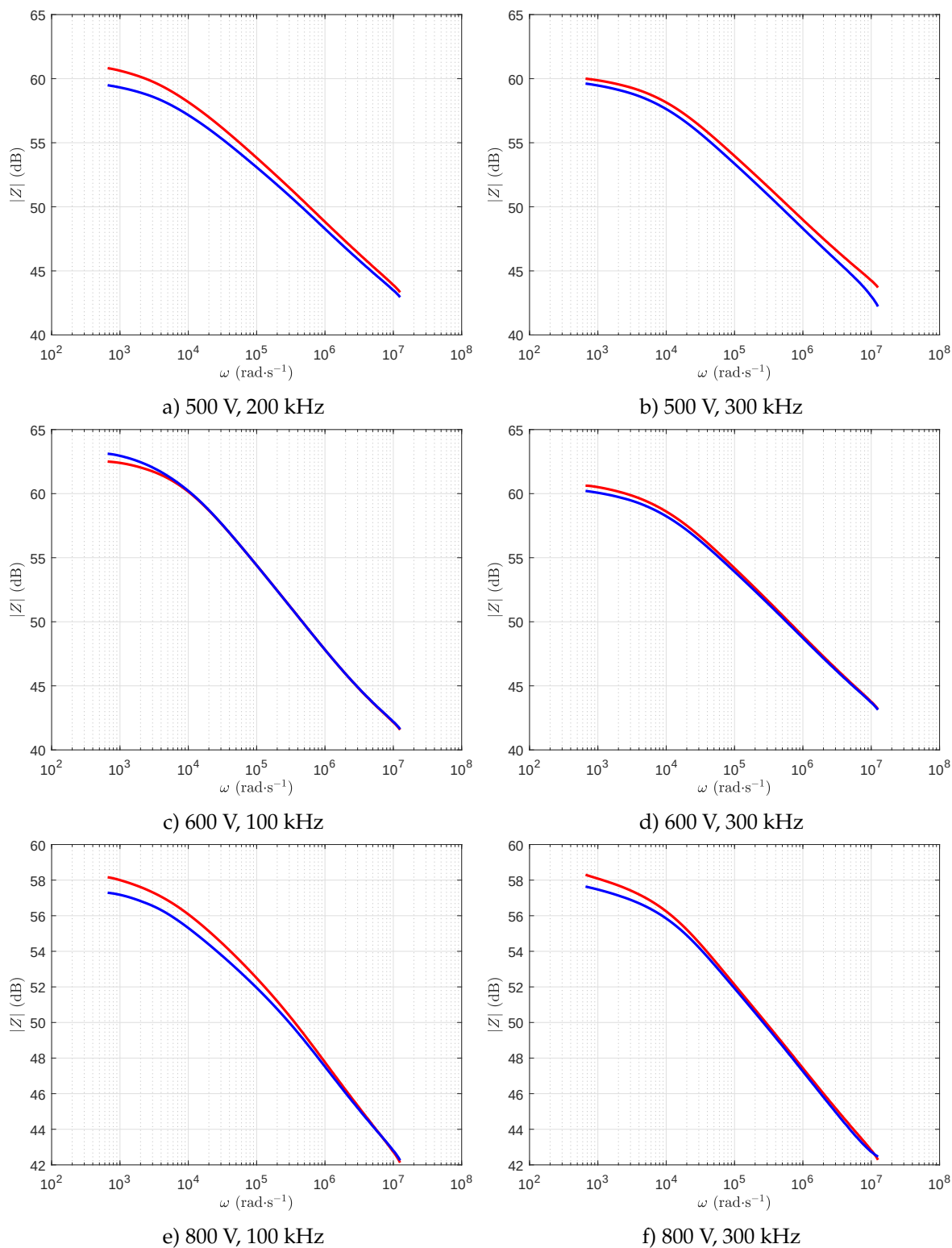
Obr. 8.2: Přepočítání RC článku.

Obdobným způsobem lze ukázat, že není možné jednoznačně identifikovat parametry běžně uváděného náhradního zapojení buňky na Obr. 1.2. Z tohoto důvodu je třeba pro identifikaci parametrů zapojení použít sofistikovanějších metod než pouhé využití rovnic (8.1) a (8.2) a jim podobným. Těmito způsoby mohou být například nelineární metoda nejmenších čtverců nebo genetické algoritmy apod.

Na druhou stranu je třeba vědět jaká je závislost měřených parametrů R_{mer} a C_{mer} na frekvenci, respektive celkové impedance na frekvenci. Tato závislost před a po elektroporaci je zobrazena na Obr. 8.3. Na Obr. 8.4 jsou vykresleny další změřené závislosti impedance pro různá nastavení hodnot napětí a frekvence elektroporace. Z těchto průběhů je zřejmé, že impedance s rostoucí frekvencí klesá a to se strmostí přibližně pět decibelů na dekádu. Z klasické teorie elektrických obvodů je však známo, že prostá kombinace R a C nabízí pokles pouze 20 dB na dekádu. Prakticky to tedy znamená, že náhradní zapojení buňky Obr. 1.2 je pro výpočty použitelný, ale závislost odporu R_{ep} na ostatních parametrech nelze jednoznačně stanovit.



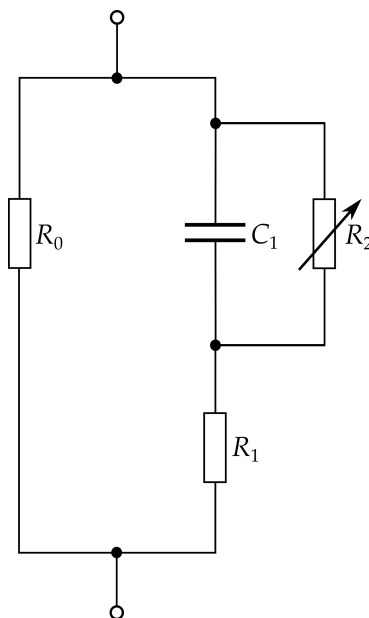
Obr. 8.3: Závislost modulu změřené impedance tkáně na úhlové frekvenci pro 800V a 200 kHz.



Obr. 8.4: Závislost modulu změřené impedance tkáně na úhlové frekvenci. Červená křivka znázorňuje data změřená před elektroporací a modrá křivka po elektroporaci.

8.1 Identifikace parametrů náhradního zapojení tkáně

Pro identifikaci parametrů bylo náhradní elektrické zapojení na Obr. 1.2 běžně užívané v literatuře upraveno do podoby na Obr. 8.5. Je snadné ukázat, že je vždy možné převést R_2 na paralelní kombinaci odporů R_{ep} a R_m a vica versa.

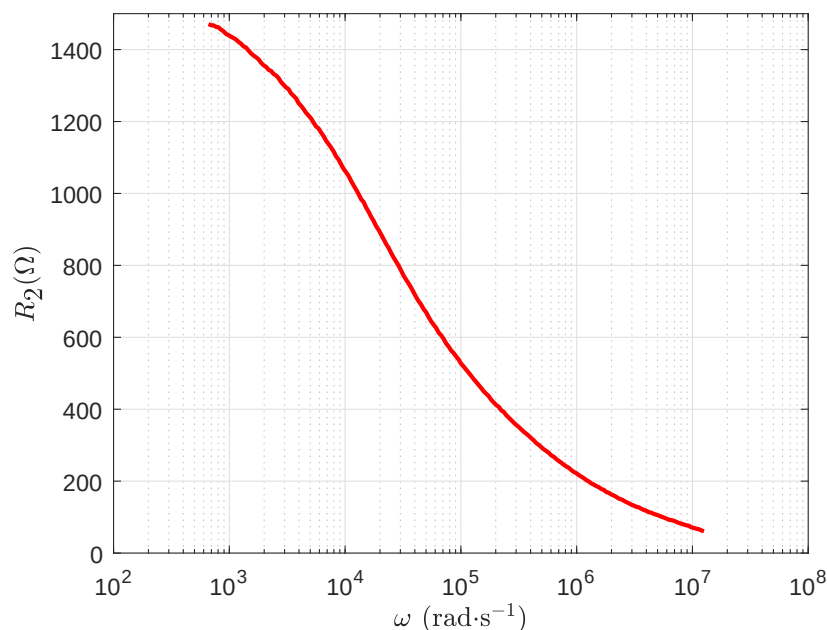


Obr. 8.5: Náhradní elektrické schéma tkáně.

Identifikace vychází ze změřených dat podle Obr. 8.3. Pro identifikaci jsou důležité dva krajní body na nejnižší a nejvyšší frekvenci. Absolutní hodnota impedance při nejnižší frekvenci je označena $Z_{\max}$. Při maximální frekvenci $\omega_{\max}$ je označena $Z_{\min}$. Jelikož není možné jednoznačně identifikovat všechny parametry, je nutné si předem některé zvolit. Je možné odvodit, že pro parametry R_0 , R_1 , R_2 a C_1 musí platit následující omezení:

$$\begin{aligned} R_0 &> 2Z_{\max}, \\ R_1 &\ll R_0, \\ \omega_{\max} C_1 &< \frac{1}{Z_{\min}}, \\ R_2 &\in \langle 0; R_0 \rangle. \end{aligned} \tag{8.3}$$

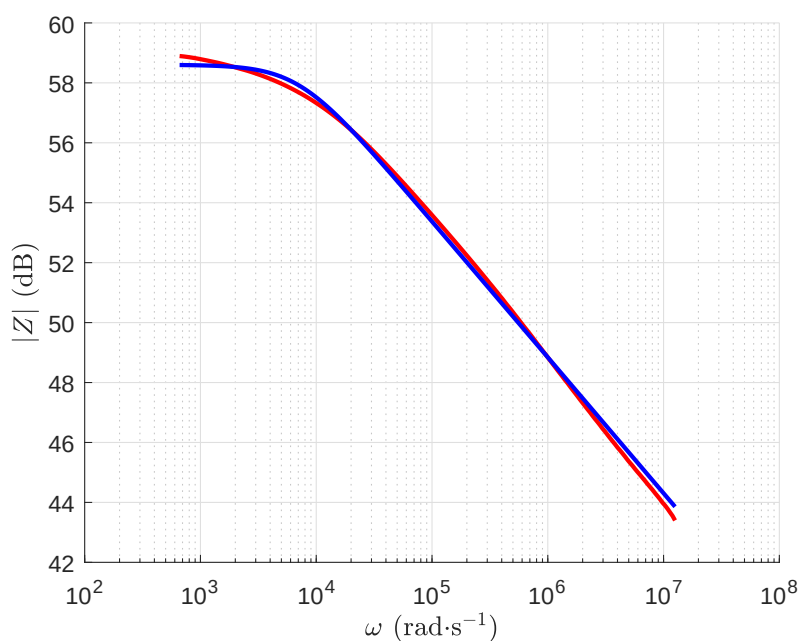
Pro identifikaci frekvenční závislosti impedance dle Obr. 8.3 byly zvoleny následující konstatní parametry $R_0=2000 \, \Omega$, $R_1=100 \, \Omega$ a $C_1=100 \, \text{pF}$. Na Obr. 8.6 je graf závislosti odporu R_2 na úhlové frekvenci. Je třeba si uvědomit, že těchto křivek je možno získat nekonečně mnoho v závislosti na zvolených parametrech. Protože tuto křivku lze jen těžko matematicky popsat, není tento model příliš vhodný pro matematický model tkáně.

Obr. 8.6: Graf závislosti odporu R_2 na úhlové frekvenci.

8.2 Identifikace parametrů upraveného náhradního zapojení tkáně

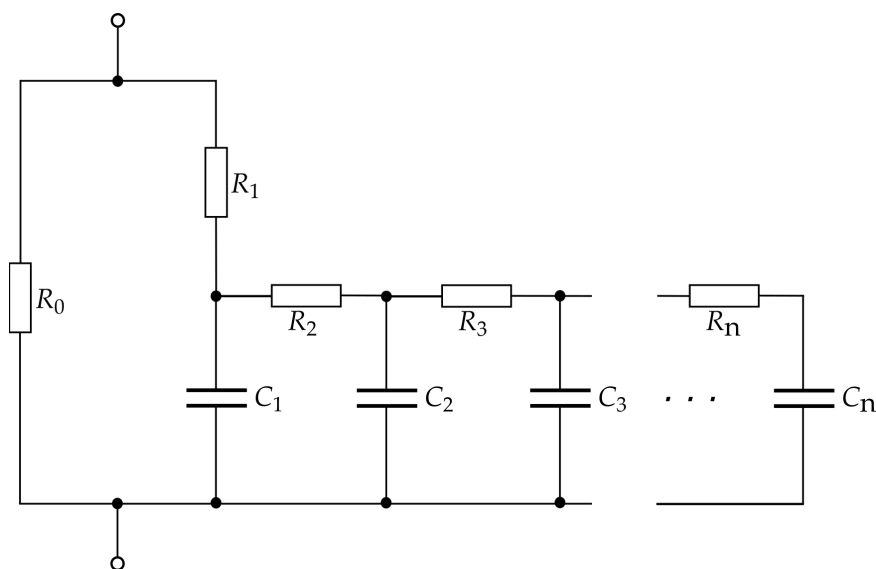
Z důvodu této neurčitosti je výhodnější při popisu takto nelineární impedance využít tzv. zobecněné kapacity, viz [83], kdy je možné impedanci kapacity vypočítat dle $1/(j\omega C)^\alpha$, kde obecný koeficient α může nabývat všech reálných hodnot. Na základě takto definované kapacity je možné určit obecnou impedanci tkáně, viz Obr. 8.7, ve tvaru:

$$Z_{\text{tk}} = 852 \frac{(j\omega + 7046)^{-0.227}}{7046^{-0.227}}. \quad (8.4)$$



Obr. 8.7: Závislost modulu změřené a vypočtené impedance tkáně na úhlové frekvenci. Červená křivka znázorňuje změřená data a modrá křivka aproximovaná data.

Nevýhodou tohoto přístupu však je, že není snadné prakticky realizovat obecnou kapacitu a samotný matematický popis je příliš obtížný pro praktické výpočty, viz (8.4) a [84–86]. Proto je vhodnější obecnou kapacitu nahradit zapojením podle Obr. 8.8.



Obr. 8.8: Upravené náhradní elektrické schéma tkáně.

Pro toto náhradní schéma skládající se z n paralelně zapojených R-C článků je možné vypočítat celkovou impedanci tkáně následujícím způsobem:

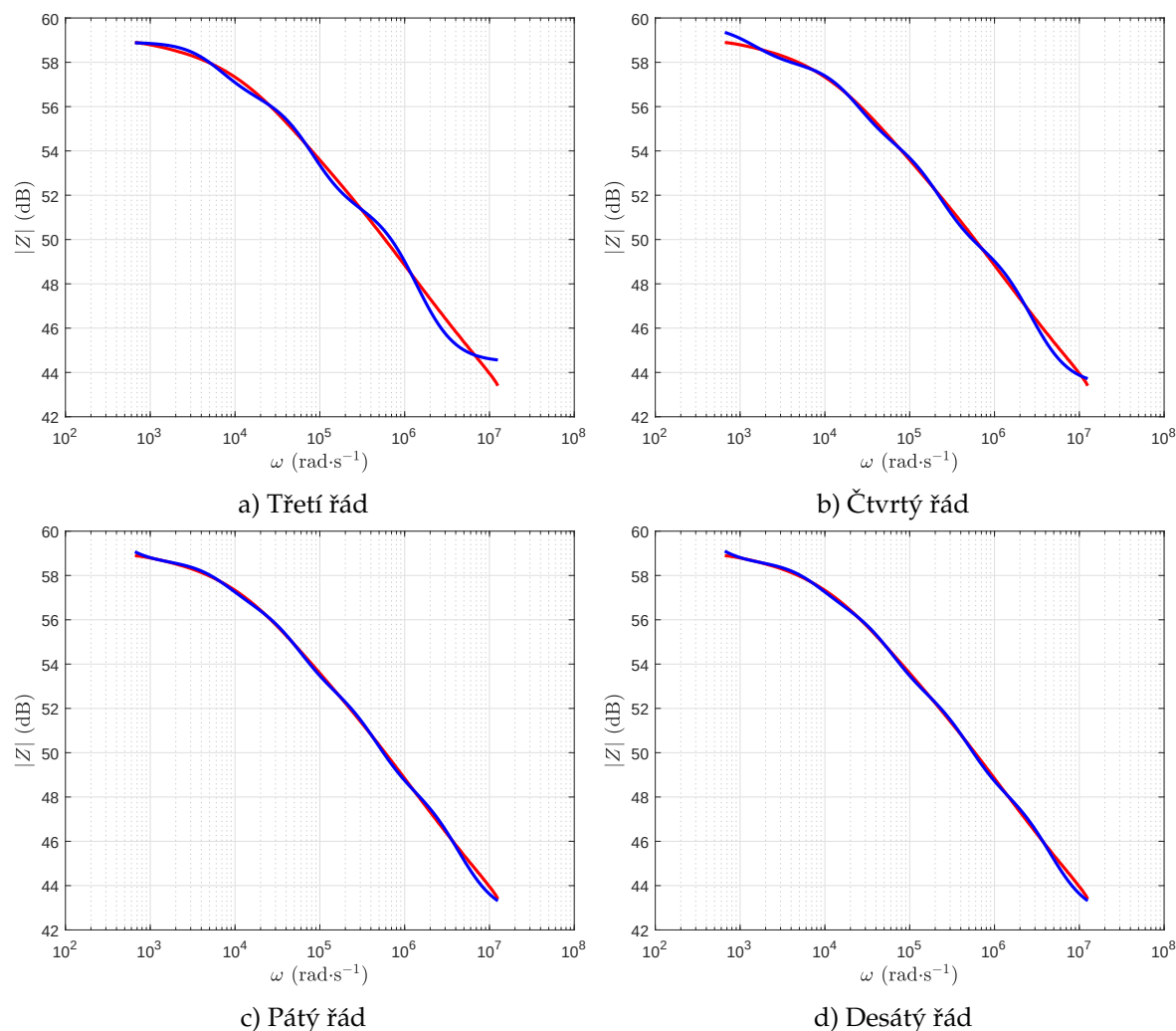
$$\begin{aligned} Z_n &= R_n + \frac{1}{j\omega C_n}, \\ Z_i &= R_i + \frac{1}{j\omega C_i} \parallel Z_{i+1} \quad \text{pro } i = \{n-1, n-2, \dots, 2, 1\}, \\ Z_{\text{tk}} &= R_0 \parallel Z_1. \end{aligned} \tag{8.5}$$

Stejným iterativním algoritmem je možné vypočítat také přenos, kde se $j\omega$ nahradí Laplaceovým operátorem.

Pomocí genetického algoritmu sestaveného na základě [87] byly získány hodnoty parametrů náhradního zapojení. V Tab. 8.1 jsou uvedeny hodnoty RC pro jednotlivé řády modelu. Graficky je možné porovnat změřená a vypočtená data, viz Obr. 8.9. Na základě zjištěných výsledků je možné konstatovat, že pro dostatečně přesnou aproximaci elektrického modelu tkáně je vhodné použít model alespoň pátého řádu.

Tab. 8.1: Hodnoty RC pro jednotlivé řády modelu.

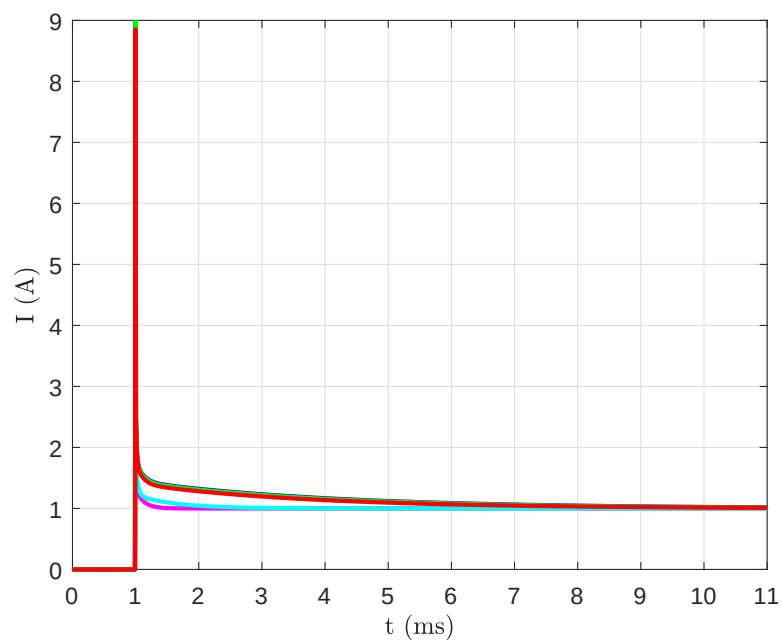
Řád	R_0 Ω	R_1 Ω	C_1 nF	R_2 Ω	C_2 nF	R_3 Ω	C_3 nF	R_4 Ω	C_4 nF	R_5 Ω	C_5 nF	R_6 Ω	C_6 nF
3.	882	207	3,3	527	16	2497	3,8	–	–	–	–	–	–
4.	962	175	2,3	337	10	903	3,2	3562	120	–	–	–	–
5.	1236	153	1,8	230	8,3	438	3,2	942	150	1266	960	–	–
6.	1225	152	1,8	228	8	441	3,1	946	140	1313	910	15562	3750



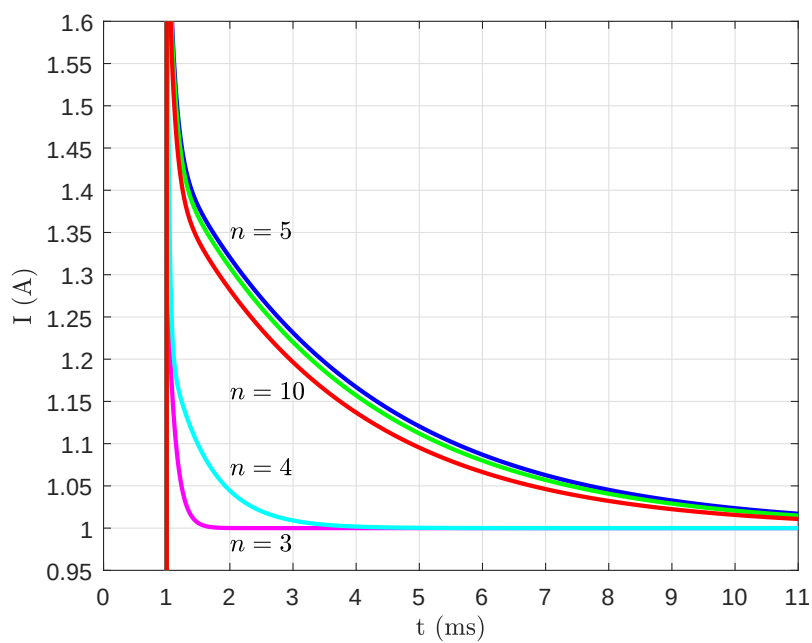
Obr. 8.9: Závislost modulu změřené a vypočtené impedance tkáně na úhlové frekvenci. Červená křivka znázorňuje data změřená data a modrá křivka aproximovaná data.

Na Obr. 8.10 je zobrazena odezva proudu na jednotkový skok napětí pro jednotlivá zapojení schématu tkáně. Detail přechodné oblasti grafu je zobrazen na Obr. 8.11. V grafu je přítomna výrazná proudová špička, která je způsobena nabíjením prvních kondenzátorů náhradního elektrického zapojení tkáně. Přítomnost proudové špičky má neblahý vliv na vyhodnocení chodu nadproudové ochrany zkonstruovaného generátoru elektroporačních pulzů. Tuto špičku lze snížit připojením sériové indukčnosti do obvodu elektroporačního zařízení, viz kapitola 6.4.

Druhou možností by byla filtrace měřeného proudu. Z detailu grafu proudové odezvy je patrný vliv řádu aproximace skutečné tkáně upraveným náhradním elektrickým schématem tkáně. Na základě průběhů na diskutovaných obrázcích lze říci, že pro nižší řády upraveného náhradního schématu tkáně mají proudové odezvy kratší časovou konstantu než má samotná tkáň. Díky tomuto budou například počítané celkové Jouleovy ztráty nižší než v případě skutečné tkáně.



Obr. 8.10: Proudová odezva na jednotkový skok napětí.



Obr. 8.11: Detail proudové odezvy na jednotkový skok napětí.

Závěr

Tato práce je prvním uceleným dílem popisujícím výzkum elektroporace v České republice. Poskytuje průřez teorií elektroporace, matematickým modelováním tohoto procesu, technickým řešením zdrojů stejnosměrných a střídavých elektroporačních pulzů i experimenty a studiemi na *ex vivo* a *in vivo* zvířecích modelech za využití vyvinutých elektroporačních generátorů. Poskytuje tedy mezioborový vhled do problematiky a má za cíl rozšíření povědomí o této nadějně terapeutické technice.

Byl zpracován analytický model šíření tepla v tkáni v jedné konkrétní geometrii. Pro tento případ byla vyřešena analyticky Pennesova rovnice šíření tepla v živé tkáni. Výsledky řešení byly ověřeny v programu COMSOL Multiphysics.

Byla provedena celá řada simulací elektrotepelných dějů při elektroporaci. Modely pro simulaci byly vytvořeny na základě reálně provedených experimentů. Tyto simulace měly posloužit nejen ke zkoumání procesu elektroporace, ale také jako základ pro další vývoj a optimalizaci elektroporačních zařízení a procesů. Mezi nejzásadnější výstupy je možné zařadit výsledky tranzientní tepelné analýzy při elektroporaci endokardiálním katetrem uvnitř srdce. Ukázalo se, že většina generovaného tepla je odváděna proudící krví a díky tomu se tkáň během elektroporačního procesu ohřívá jen minimálně. To bylo ověřeno také při reálných experimentech.

Byl navržen a zkonstruován zdroj stejnosměrných elektroporačních pulzů s parametry až 5 kV a 100 A, viz kapitola 4. Jeho funkčnost byla ověřena v řadě medicínských experimentů popsanych v kapitole 5. Na základě provedených experimentů je možné konstatovat, že pro klinickou praxi jsou dostačující výstupní parametry stejnosměrného zdroje pulzů 3 kV a 40 A. Dále bylo prokázáno, že synchronizace elektroporačních pulzů se signálem EKG je v případě stejnosměrné elektroporace bezpodmínečně nutná, aby nedocházelo ke komorovým fibrilacím. Při experimentech bylo dokázáno, že elektroporace je skutečně netermální ablační technika a vzniklé tepelné namáhání tkáně je zanedbatelné.

Byl navržen a zkonstruován zdroj střídavých elektroporačních pulzů s parametry až 1,5 kV, 12 A a 440 kHz, viz kapitola 6. Jeho funkčnost byla ověřena v několika medicínských experimentech popsanych v kapitole 7. Na základě provedených experimentů bylo zjištěno, že i pro účely kardiologie by bylo výhodnější zvýšení výstupních parametrů zařízení alespoň na 2 kV a 20 A, přičemž frekvenční rozsah je vyhovující. Byla vyvinuta a implementována metoda synchronizace pulzů s EKG signálem z důvodu snížení rizika fibrilace. Eliminace extrasystol a aplikace pulzu do vulnerabilní fáze. Současně však bylo zjištěno, že i při nevhodně zvoleném čase aplikace pulzu mimo QRS komplex je riziko vzniku ventrikulární fibrilace nižší než se předpokládalo na základě předchozích pokusů se stejnosměrným zdrojem pulzů. Nevhodně aplikovaný pulz způsobí extrasystolu, která však není život ohrožující.

Provedené experimenty se stejnosměrným i střídavým zdrojem na jaterní a srdeční tkáni

přinesly cenné informace pro budoucí aplikace elektroporace v různých lékařských odvětvích. Například bylo zjištěno, že pro aplikaci elektroporace ve žlučových cestách je kritickým prvkem kontaktní systém tvořený elektrodami na balónkovém katetru. Nejvíce problémů při zákroku způsobovalo odlepování elektrod od balónku katetru nebo odpojení vodiče od kontaktní elektrody. Byla proto nastíněna metoda predikce selhání kontaktního systému na základě analýzy průběhu proudu v reálném čase.

Na základě naměřených dat byl vytvořen zpřesněný matematický model tkáně zohledňující frekvenční závislost impedance. Standardně uváděné náhradní elektrické schéma tkáně obsahuje odpor měnící se vlivem elektroporace, což je pro realizaci nevhodné. Schéma bylo upraveno do podoby příčkového článku skládajícího se pouze z odporů a kondenzátorů s konstantními hodnotami.

V budoucím výzkumu by se autorka chtěla věnovat měření impedance při elektroporaci jehož výstupy budou použity pro přesnější modelování elektroporačního procesu.

Literatura

- [1] Rubinsky, B.: *Irreversible Electroporation*. Berlin: Springer-Verlag, první vydání, 2010, ISBN 978-3-642-05419-8.
- [2] Jourabchi, N.; Beroukhi, K.; Tafti, B. A.; aj.: Irreversible electroporation (NanoKnife) in cancer treatment. *Gastrointestinal Intervention*, ročník 3, č. 1, 2014: s. 8–18.
- [3] Mir, L. M.: Application of Electroporation Gene Therapy. *Electroporation Protocols*, 2008: s. 3–17, doi:10.1007/978-1-59745-194-9_1.
URL http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-194-9_1
- [4] Pichi, B.; Pellini, R.; Virgilio, A. D.; aj.: Electrochemotherapy: a well-accepted palliative treatment by patients with head and neck tumours. *Acta Otorhinolaryngologica italica*, ročník 38, č. 3, 2018: s. 181–187, doi:10.14639/0392-100X-1262.
- [5] Yao, C.; Sun, C.; Mi, Y.; aj.: Experimental Studies on Killing and Inhibiting Effects of Steep Pulsed Electric Field (SPEF) to Target Cancer Cell and Solid Tumor. *IEEE Transactions on Plasma Science*, ročník 32, č. 4, 2004: s. 1626–1633, ISSN 0093-3813, doi:10.1109/TPS.2004.832621.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/1341530/>
- [6] Davalos, R. V.; Bhonsle, S.; Neal, R. E.: Implications and considerations of thermal effects when applying irreversible electroporation tissue ablation therapy. *The Prostate*, ročník 75, 2015: s. 1114–1118, doi:10.1002/pros.22986.
URL <http://doi.wiley.com/10.1002/pros.22986>
- [7] Bhonsle, S. P.; Arena, C. B.; Sweeney, D. C.; aj.: Mitigation of impedance changes due to electroporation therapy using bursts of high-frequency bipolar pulses. *Biomedical Engineering OnLine*, ročník 14, č. 3, 2015, doi:10.1186/1475-925X-14-S3-S3.
URL <http://biomedical-engineering-online.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-925X-14-S3-S3>
- [8] Bhonsle, S.; Lorenzo, M.; Safaai-Jazi, A.; aj.: Characterization of Nonlinearity and Dispersion in Tissue Impedance during High Frequency Electroporation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, ročník PP, č. 99, 2017: s. 1–12, ISSN 0018-9294, doi:10.1109/TBME.2017.2787038.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/8239712/>
- [9] Arena, C. B.; Sano, M. B.; Rossmeisl, J. H.; aj.: High-frequency irreversible electroporation (H-FIRE) for non-thermal ablation without muscle contraction. *BioMedical Engineering OnLine*, ročník 10, č. 102, 2011: s. 1–21, doi:10.1186/1475-925X-10-102.

- URL <http://biomedical-engineering-online.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-925X-10-102>
- [10] Davalos, R. V.; Mir, L. M.; Rubinsky, B.: Tissue Ablation with Irreversible Electroporation. *Annals of Biomedical Engineering*, ročník 33, č. 2, 2005: s. 223–231, doi:10.1007/s10439-005-8981-8.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s10439-005-8981-8>
- [11] Edd, J. F.; Davalos, R. V.: Mathematical modelling of irreversible electroporation for treatment planning. *Technology in Cancer Research and Treatment*, ročník 6, č. 4, 2007: s. 275–286, ISSN 1533-0346.
- [12] Rubinsky, B.; Davalos, R.: *Tissue ablation with irreversible electroporation*, US2019/0046255 A1. USA, 2019.
- [13] Rubinsky, B.; Maor, E.; Ivorra, A.; aj.: *Balloon catheter method for reducing restenosis via irreversible electroporation*, US2019/0160222 A1. USA, 2019.
- [14] NanoKnife. 2018.
URL <https://nanoknife.com>
- [15] Arean, C.; Davalos, R.; Sano, M.: *High frequency electroporation for cancer therapy*, US2016/0287314 A1. USA, 2016.
- [16] Francischelli, D.; Stewart, M.; Hong, J.; aj.: *Systems and methods for cardiac tissue electroporation ablation*, US2010/0023004 A1. USA, 2010.
- [17] Broderick, K.; Kemmerrer, S.; McCoy, J.: *A minimally invasive dermal electroporation device*, AU2019203517 A1. Austrálie, 2019.
- [18] Šimurda, J.: *Bioelektrické jevy*. Brno: Fakulta Elektrotechniky a komunikačních technologií VUT, první vydání, 2007.
- [19] Structure of the Plasma Membrane. 2007.
URL <https://www.khanacademy.org/science/biology/membranes-and-transport/the-plasma-membrane/a/structure-of-the-plasma-membrane>
- [20] Plazmatická membrána. 2008.
URL <http://galenus.cz/clanky/biochemie/biochemie-bunka-membrana>
- [21] Chen, C.; Smye, S.; Robinson, M.; aj.: Membrane electroporation theories: a review. *Medical and Biological Engineering and Computing*, ročník 44, č. 1-2, 2006: s. 5–14, doi:<https://doi.org/10.1007/s11517-005-0020-2>.
- [22] Weaver, J. C.; Chizmadzhev, Y. A.: Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, ročník 41, č. 2, 1996: s. 135–160, doi:[https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(96\)05062-3](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(96)05062-3).
- [23] Weaver, J.: Electroporation of cells and tissues. *IEEE Transactions on Plasma Science*, ročník 28, č. 1, 2000: s. 24–33, ISSN 00933813, doi:10.1109/27.842820.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/842820/>

- [24] Weaver, J.: Electroporation of biological membranes from multicellular to nano scales. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, ročník 10, č. 5, 2003: s. 754–768, ISSN 1070-9878, doi:10.1109/TDEI.2003.1237325.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/1237325/>
- [25] Daniels, C. S.: Non-Thermal Irreversible Electroporation in Heterogeneous Tissues. 2011.
URL http://digitalassets.lib.berkeley.edu/etd/ucb/text/Daniels_berkeley_0028E_11859.pdf
- [26] Chang, D. C.; Reese, T. S.: Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophysical Society*, ročník 58, 1990: s. 1–12.
- [27] Lee, E. W.; Wong, D.; Prikhodko, S. V.; aj.: Electron Microscopic Demonstration and Evaluation of Irreversible Electroporation-Induced Nanopores on Hepatocyte Membranes. *Journal of Vascular and Intervention Radiology*, ročník 23, č. 1, 2012: s. 107–113, doi:10.1016/J.JVIR.2011.09.020.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1051044311013030>
- [28] Chen, X.; Ren, Z.; Zhu, T.; aj.: Electric Ablation with Irreversible Electroporation (IRE) in Vital Hepatic Structures and Follow-up Investigation. *Scientific Reports*, ročník 5, 2015-11-9: s. 16233–, ISSN 2045-2322, doi:10.1038/srep16233.
URL <http://www.nature.com/articles/srep16233>
- [29] Il, R. C. M.: Use of irreversible electroporation in unresectable pancreatic cancer. *HepatoBiliary Surgery and Nutrition*, ročník 4, č. 3, 2015: s. 211–215, doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2015.01.10.
- [30] Philips, P.; Hays, D.; Martin, R. C.: Irreversible Electroporation Ablation (IRE) of Unresectable Soft Tissue Tumors. *Plos one*, ročník 8, č. 11, 2013: s. 1–9.
- [31] Lipská, L.; Visokai, V.: *Recidiva kolorektálního karcinomu*. Praha: Grada, první vydání, 2009, ISBN 978-80-247-3026-4.
- [32] Stárek, Z.; Eisenberger, M.; Zaoral, L.; aj.: Radiofrekvenční katetrizační ablace supraventrikulárních arytmií, historie a současnost. *Interv Akut Kardiol*, ročník 5, č. 3, 2006: s. 122–130.
- [33] Brace, C. L.: Radiofrequency and Microwave Ablation of the Liver, Lung, Kidney, and Bone. *Curr Probl Diagn Radiol*, ročník 38, č. 3, 2009: s. 135–143, doi:10.1067/j.cpradiol.2007.10.001.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0363018807000771>
- [34] Ellis, L. M.; Curley, S. A.; Tanabe, K. K.: *Radiofrequency Ablation for Cancer: Current Indications, Techniques and Outcomes*. New York: Springer, první vydání, 2004.
- [35] Válek, V.; Kala, Z.; Kiss, I.: *Maligní ložiskové procesy jater: Diagnostika a léčba včetně minimálně invazivních metod*. Praha: Grada, první vydání, 2006, ISBN 80-247-0961-9.
- [36] Anwar, M. A.; Lane, T. R. A.; Davies, A. H.; aj.: Complications of Radiofrequency Ablation of Varicose Veins. *Phlebology*, ročník 1, č. 27, 2012: s. 34–39, doi:10.1258/phleb.2012.012S21.
URL <http://journals.sagepub.com/doi/10.1258/phleb.2012.012s21>
- [37] Simon, C. J.; Dupuy, D. E.; Mayo-Smith, W. W.: Microwave Ablation. *RadioGraphics*, ročník 25, č. special, 2005: s. 69–83, doi:10.1148/rg.25si055501.
URL <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.25si055501>

- [38] Bohlmann, M.; Hoellen, F.; Hunold, P.; aj.: High-Intensity Focused Ultrasound Ablation of Uterine Fibroids – Potential Impact on Fertility and Pregnancy Outcome. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, ročník 74, č. 2, 2014: s. 139–145, doi:10.1055/s-0033-1360311.
URL <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1360311>
- [39] Chan, A. H.; Vaezy, S.; Crum, L. A.: High-intensity focused ultrasound. In *AccessScience*, USA: McGraw-Hill Education, 2003, s. 1–3.
- [40] Čermák, A.: Zhoubné nádory ledvinného parenchymu - aktivní sledování a miniinvazivní možnosti léčby. In *19. ročník sympózia Onkologie v gynekologii a mammologii*, Černá Hora, 2014.
- [41] Stafford, R. J.; Fuentes, D.; Elliott, A. A.; aj.: Laser-Induced Thermal Therapy for Tumor Ablation. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, ročník 38, č. 1, 2010: s. 79–100, doi: 10.1615/CritRevBiomedEng.v38.i1.70.
URL <http://www.dl.begellhouse.com/journals/4b27cbfc562e21b8,41996af914259394,1081342c4e66a8bd.html>
- [42] Kang, J. Y.; Sperling, M. R.: Epileptologist's view: Laser interstitial thermal ablation for treatment of temporal lobe epilepsy. *Elsevier*, , č. 142, 2018: s. 149–152, doi:https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.07.007.
- [43] Cryotherapy. 2018.
URL <https://www.radiologyinfo.org/en/info.cfm?pg=cryo>
- [44] Kuck, K.-H.; Brugada, J.; Fürnkranz, A.; aj.: Cryoballoon or Radiofrequency Ablation for Paroxysmal Atrial Fibrillation. *The new England Journal of Medicine*, ročník 374, č. 23, 2016: s. 2235–2245, doi:10.1056/NEJMoa1602014.
URL <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602014>
- [45] Sharabi, S.; Kos, B.; Last, D.; aj.: A statistical model describing combined irreversible electroporation and electroporation-induced blood-brain barrier disruption. *Radiology and Oncology*, ročník 50, č. 1, 2016: s. 28–38, ISSN 1581-3207, doi:10.1515/raon-2016-0009.
URL <http://content.sciendo.com/view/journals/raon/50/1/article-p28.xml>
- [46] Corovic, S.; Lackovic, I.; Sustaric, P.; aj.: Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. *Biomedical Engineering OnLine*, ročník 12, č. 16, 2013: s. 1–27.
- [47] Sel, D.; Cukjati, D.; Batiuskaite, D.; aj.: Sequential Finite Element Model of Tissue Electroporation. *IEEE transactions on biomedical engineering*, ročník 52, č. 5, 2005: s. 816–827, doi:10.1109/TBME.2005.845212.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/1420703/>
- [48] DeBruin, K. A.; Krassowska, W.: Modeling Electroporation in a Single Cell. I. Effects of Field Strength and Rest Potential. *Biophysical Journal*, ročník 77, č. 3, 1999: s. 1213–1224, ISSN 00063495, doi:10.1016/S0006-3495(99)76973-0.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349599769730>
- [49] Pavselj, N.; Bregar, Z.; Cukjati, D.; aj.: The Course of Tissue Permeabilization Studied on a Mathematical Model of a Subcutaneous Tumor in Small Animals. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, ročník 52, č. 8, 2005: s. 1373–1381, ISSN 0018-9294, doi: 10.1109/TBME.2005.851524.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/1463325/>

- [50] Lackovic, I.; Magjarevic, R.; Miklavcic, D.: Three-dimensional finite-element analysis of joule heating in electrochemotherapy and in vivo gene electrotransfer. *IEEE*, ročník 16, č. 5, 2009: s. 1338 – 1347, ISSN 1070-9878, doi:10.1109/TDEI.2009.5293947.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/5293947/>
- [51] Davalos, R. V.; Rubinsky, B.: Temperature considerations during irreversible electroporation. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, ročník 51, 2008: str. 5617–5622.
URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0017931008002706>
- [52] Maruyama, S.; Okajima, J.; Komiya, A.; aj.: Estimation of temperature distribution in biological tissue by using solutions of bioheat transfer equation. *Heat Transfer-Asian Research*, ročník 37, č. 6, 2008: s. 374–386, ISSN 10992871, doi:10.1002/htj.20210.
URL <http://doi.wiley.com/10.1002/htj.20210>
- [53] Županič, A.; Miklavčič, D.: Tissue heating during tumor ablation with irreversible electroporation. *Elektrotehniški vestnik*, ročník 78, č. 1-2, 2011: s. 42–47.
- [54] O'Brien, T. J.; Bonakdar, M.; Bhonsle, S.; aj.: Effects of internal electrode cooling on irreversible electroporation using a perfused organ model. *International Journal of Hyperthermia*, ročník 35, č. 1, 2018: s. 44–55, ISSN 0265-6736, doi:10.1080/02656736.2018.1473893.
URL <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02656736.2018.1473893>
- [55] Bhutiani, N.; Doughtie, C. A.; Martin, R. C.: Ultrasound validation of mathematically modeled irreversible electroporation ablation areas. *Surgery*, ročník 159, č. 4, 2016: s. 1032–1040, ISSN 00396060, doi:10.1016/j.surg.2015.10.030.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606015009071>
- [56] Pakhomov, A. G.; Miklavcic, D.; Markov, M.: *Advanced electroporation techniques in biology and medicine*. Boca Raton: CRC Press, první vydání, 2010, ISBN 9781439819067.
- [57] Griffiths, D. J.: *Introduction to electrodynamics*. New York, NY: Cambridge University Press, fourth edition vydání, 2018, ISBN 1108420419.
- [58] Lakhssassi, A.; Kengne, E.; Semmaoui, H.: Modified pennes' equation modelling bio-heat transfer in living tissues. *Natural Science*, ročník 02, č. 12, 2010: s. 1375–1385, ISSN 2150-4091, doi:10.4236/ns.2010.212168.
URL <http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/ns.2010.212168>
- [59] Pennes, H. H.: Analysis of Tissue and Arterial Blood temperatures in the Resting Human Forearm. *Journal of Applied Physiology*, ročník 2, č. 1, 1948: s. 93–122, doi:10.1152/jappl.1948.1.2.93.
- [60] Becker, S. M.: Skin Electroporation With Passive Transdermal Transport Theory. *Journal of Heat Transfer*, ročník 133, č. 1, 2010, doi:10.1115/1.4002362.
URL <http://HeatTransfer.asmedigitalcollection.asme.org/article.aspx?articleid=1450101>
- [61] Mandel, Y.; Rubinsky, B.: Treatment of Uveal Melanoma by Nonthermal Irreversible Electroporation. *Journal of Heat Transfer*, ročník 134, č. 11, 2012, doi:10.1115/1.4005203.
URL <http://HeatTransfer.asmedigitalcollection.asme.org/article.aspx?articleid=1484417>
- [62] Kafka, R.: Modelování tepelných účinků elektroporačního procesu na živou tkáň. 2019.

- [63] Huang, H.; Chan, C.; Roemer, R.: Analytical Solutions of Pennes Bio-Heat Transfer Equation With a Blood Vessel. *Journal of Biomechanical Engineering*, ročník 116, č. 2, 1994: s. 208–212.
- [64] Rektorys, K.: *Přehled užití matematiky*. Praha: Prometheus, 7 vydání, 2000, ISBN 80-7196-180-9.
- [65] Chato, J.; Chautherie, M.; Paulsen, K.; aj.: *Thermal dosimetry and treatment planning*. Berlin: Springer-Verlag, 1990, ISBN 9783540509813.
- [66] Tissue properties. 2010.
URL <https://itis.swiss/virtual-population/tissue-properties/database/>
- [67] Duck, F. A.: *Physical Properties of Tissue*. London: Academic press limited, první vydání, 1990, ISBN 0-12-222800-6.
- [68] Bernard, V.; Andrašina, T.; Červinka, D.; aj.: A Thermographic Comparison of Irreversible Electroporation and Radiofrequency Ablation. *IRBM*, ročník 38, č. 1, 2016: s. 26–33, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.irbm.2016.11.001>.
- [69] Yu, H.; Burke, C.: Comparison of Percutaneous Ablation Technologies in the Treatment of Malignant Liver Tumors. *Seminars in Interventional Radiology*, ročník 31, č. 02, 2014: s. 129–137, ISSN 0739-9529, doi:10.1055/s-0034-1373788.
URL <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0034-1373788>
- [70] van Amerongen, M. J.; Jenniskens, S. F.; van den Boezem, P. B.; aj.: Radiofrequency ablation compared to surgical resection for curative treatment of patients with colorectal liver metastases – a meta-analysis. *HPB*, ročník 19, č. 9, 2017: s. 749–756, ISSN 1365182X, doi: 10.1016/j.hpb.2017.05.011.
URL <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1365182X17308055>
- [71] Andrašina, T.; Jaroš, J.; Jůza, T.; aj.: The Accumulation and Effects of Liposomal Doxorubicin in Tissues Treated by Radiofrequency Ablation and Irreversible Electroporation in Liver. *CardioVascular and Interventional Radiology*, ročník 42, č. 5, 2019: s. 751–762, ISSN 0174-1551, doi:10.1007/s00270-019-02175-z.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s00270-019-02175-z>
- [72] Andriyanov, A. V.; Koren, E.; Barenholz, Y.; aj.: Therapeutic Efficacy of Combining PEGylated Liposomal Doxorubicin and Radiofrequency (RF) Ablation. *PLoS ONE*, ročník 9, č. 5, 2014-5-1, ISSN 1932-6203, doi:10.1371/journal.pone.0092555.
URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0092555>
- [73] Goldberg, S. N.; Girnan, G. D.; Lukyanov, A. N.; aj.: Percutaneous Tumor Ablation. *Radiology*, ročník 222, č. 3, 2002: s. 797–804, ISSN 0033-8419, doi:10.1148/radiol.2223010861.
URL <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2223010861>
- [74] Ahmed, M.; Liu, Z.; Lukyanov, A. N.; aj.: Combination Radiofrequency Ablation with Intratumoral Liposomal Doxorubicin. *Radiology*, ročník 235, č. 2, 2005: s. 469–477, ISSN 0033-8419, doi:10.1148/radiol.2352031856.
URL <http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2352031856>
- [75] Ridditid, W.; Rerknimitr, R.: Management of an occluded biliary metallic stent. *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy*, ročník 4, č. 5, 2012: s. 157–161, ISSN 1948-5190, doi:10.4253/

- wjge.v4.i5.157.
URL <http://www.wjgnet.com/1948-5190/full/v4/i5/157.htm>
- [76] Andrašina, T.; Rohan, T.; Jůza, T.; aj.: Irreversible electroporation for treatment of metal stent occlusion in biliary tract - ex vivo experimental model. In *CardioVascular and Interventional Radiology*, ročník 41, CIRSE, 2018, ISSN 0174-1551, s. 51–513, doi:10.1007/s00270-018-2021-1.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s00270-018-2021-1>
- [77] Andrašina, T.; Kuběna, P.: *Katétr k ireverzibilní elektroporaci*. ČR, 2018.
- [78] Andrašina, T.; Grolich, T.; Crha, M.; aj.: The Methodology for Endoluminal Irreversible Electroporation in Porcine Models. *Acta Veterinaria Brno*, ročník 88, č. 2, 2019: s. 201–205, ISSN 0001-7213, doi:<https://doi.org/10.2754/avb201988020201>.
- [79] Andrašina, T.; Panek, J.; Červinka, D.; aj.: Prevention of benign stenosis due to endoluminal irreversible electroporation in bile ducts. In *CardioVascular and Interventional Radiology*, ročník 41, CIRSE, 2018, ISSN 0174-1551, s. 51–513, doi:10.1007/s00270-018-2021-1.
URL <http://link.springer.com/10.1007/s00270-018-2021-1>
- [80] Mali, B.; Jarm, T.; Jager, F.; aj.: An algorithm for synchronization of in vivo electroporation with ECG. *Journal of Medical Engineering & Technology*, ročník 29, č. 6, 2005: s. 288–296, doi:10.1080/03091900512331332591.
URL <https://doi.org/10.1080/03091900512331332591>
- [81] Nohel, M.: Synchronizace elektroporačních pulzů se srdečním rytmem. 2019.
- [82] Ivorra, A.; Rubinsky, B.: In vivo electrical impedance measurements during and after electroporation of rat liver. *Biochemistry*, ročník 70, č. 2, 2007: s. 287–295, doi:10.1016/j.biochem.2006.10.005.
- [83] Caponetto, R.; Dongola, G.; Fortuna, L.; aj.: *Fractional order systems*. Hackensack, NJ: World Scientific, první vydání, 2010, ISBN 978-9814304191.
- [84] Sierociuk, D.; Podlubny, I.; Petras, I.: Experimental Evidence of Variable-Order Behavior of Ladders and Nested Ladders. *IEEE Transactions on Control Systems Technology*, ročník 21, č. 2, 2013: s. 459–466, ISSN 1063-6536, doi:10.1109/TCST.2012.2185932.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/6153039/>
- [85] Pu, Y.-F.: Analog Circuit Realization of Arbitrary-Order Fractional Hopfield Neural Networks. *IEEE Access*, ročník 4, 2016: s. 5417–5435, ISSN 2169-3536, doi:10.1109/ACCESS.2016.2606160.
URL <http://ieeexplore.ieee.org/document/7560671/>
- [86] Freeborn, T. J.; Maundy, B.; Elwakil, A.: Fractional Resonance-Based RLC Filters. *Mathematical Problems in Engineering*, ročník 2013, 2013: s. 1–10, ISSN 1024-123X, doi:10.1155/2013/726721.
URL <http://www.hindawi.com/journals/mpe/2013/726721/>
- [87] Haupt, R. L.; Haupt, S. E.: *Practical genetic algorithms*. Hoboken, N.J.: John Wiley, druhé vydání, 2004, ISBN 04-714-5565-2.

Autorčiny články a ostatní výstupy

K tématu dizertační práce

- [A1] Andrašina, T.; Grolich, T.; Crha, aj.: The Methodology for Endoluminal Irreversible Electroporation in Porcine Models. *Acta Veterinaria Brno*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2019, **88**(2), 201-205. ISSN 0001-7213. DOI: <https://doi.org/10.2754/avb201988020201>.
- [A2] Pesl, M.; Caluori, G.; Wolf, J.; aj.: Epicardial delivery of diversified pulsed field potentials in animal model. In: *3rd World Congress on Electroporation*. France, 2019, s. 1-2.
- [A3] Červinka, D.; Novotná, V.; Folprecht, M.: Vysokonapěťové zdroje pro účely buněčné elektroporace. In: *Sborník XXXVI.konference o elektrických pohonech*. Plzeň: ZCU, 2019, s. 1-6.
- [A4] Novotná, V., Červinka, D.: Current Distribution in The Tissue During Electroporation Process. In: *Proceedings of the 2018 18th International Conference on Mechatronics, Mechatronika (ME)*. 1. Brno: VUT, 2018, s. 1-5. ISBN 978-80-214-5543-6.
- [A5] Novotná, V.; Červinka, D.: Impedance Measurement of Muscular Tissue During Electroporation Procedure. In: *Conference Proceedings 2018 IEEE International Conference on Environmental and Electrical Engineering and 2018 IEEE Industrial and Commercial Power Systems Europe (EEEIC/ICPS Europe)*. Palermo: IEEE, 2018, s. 841-845. ISBN 978-1-5386-5185-8.
- [A6] Červinka, D.; Novotná, V.: High-Voltage Pulse Source for Cell Electroporation. In: *Mechatronics 2017*. Cham: Springer International Publishing, 2018, s. 80-86. Advances in Intelligent Systems and Computing. DOI: 10.1007/978-3-319-65960-2_11. ISBN 978-3-319-65959-6.
- [A7] Novotná, V.; Červinka, D.: The Novel Device for Irreversible Electroporation: Thermographic Comparison with Radiofrequency Ablation. In: *Mechatronics 2017*. Cham: Springer International Publishing, 2018, 2018-08-19, s. 72-79. Advances in Intelligent Systems and Computing. DOI: 10.1007/978-3-319-65960-2_10. ISBN 978-3-319-65959-6.
- [A8] Novotná, V.: Experimental Use of Novel Pulse Generator for Irreversible Electroporation. In: *Proceedings of the 23rd Conference STUDENT EEICT 2017*. [online]. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017, s. 568-572. ISBN 978-80-214-5496-5.
- [A9] Červinka, D.; Procházka, P.; Martiš, J., aj.: Ireverzibilní elektroporace (IRE). In: *VIII. Liberecká konference nelékařských oborů a IX. Studentská vědecká konference*. Liberec: Technická univerzita Liberec, Ústav zdravotnických studií, 2016, s. 57-61. ISBN 978-80-7494-273-0.

- [A10] Červinka, D., Martiš, J., Novotná, V., Folprecht, M.: *Osmikanálový vysokonapětový generátor 3,9MHz pro kosmetické účely*, Brno, 2018. URL: <https://medical.jett.eu/cs/>, funkční vzorek.
- [A11] Červinka, D.; Novotná, V.: *Synchronizační a měřicí modul ke střídavému elektroporačnímu generátoru*. Brno, 2018. URL: <http://www.uvee.feec.vutbr.cz/>, funkční vzorek.
- [A12] Červinka, D., Martiš, J., Novotná, V.: *Vysokonapětový zdroj pro střídavou elektroporaci*, Brno, 2017. URL: <http://www.uvee.feec.vutbr.cz>, funkční vzorek.
- [A13] Červinka, D., Martiš, J., Novotná, V.: *Radiofrekvenční zdroj 3.9MHz pro kosmetické účely*, Brno, 2017. URL: <http://www.uvee.feec.vutbr.cz>, funkční vzorek.
- [A14] Stárek, Z., Pešl, M., Wolf, J., Caluori, G., Červinka, D., Martiš, J., Novotná, V.: *Vysokonapětový střídavý zdroj pro účely elektroporace*. ČR. D19066280, Užiténý vzor, Datum podání: 21.6.2019.
- [A15] Stárek, Z., Pešl, M., Wolf, J., Caluori, G., Červinka, D., Martiš, J., Novotná, V.: *Elektroporační generátor na ablaci srdečních tkání*. ČR. D19066262, Užiténý vzor, Datum podání: 21.6.2019.
- [A16] Stárek, Z., Pešl, M., Wolf, J., Caluori, G., Červinka, D., Martiš, J., Novotná, V.: *Elektroporační generátor*. ČR. D19066175, Patent, Datum podání: 21.6.2019.

Mimo téma dizertační práce

- [A17] Harland, D. P.; Novotna, V.; Richena, M.; aj.: Helical twist direction in the macrofibrils of keratin fibres is left handed. *Journal of Structural Biology*. 2019, **206**(3), 345-348. DOI: 10.1016/j.jsb.2019.04.007. ISSN 10478477.
- [A18] Vaneckova, T.; Bezdekova, J.; Tvrdonova, M.; aj.: CdS quantum dots-based immunoassay combined with particle imprinted polymer technology and laser ablation ICP-MS as versatile tool for protein detection. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2019, **9**, 1-9. ISSN 1944-8244.
- [A19] Chronopoulos, D. D.; Medved, M.; Bloński, P.; aj.: Alkynylation of graphene via the Sonogashira C—C cross-coupling reaction on fluorographene. *Chemical Communications*. 2019, **55**(8), 1088-1091. DOI: 10.1039/C8CC08492K. ISSN 1359-7345.
- [A20] Harland, D. P.; Novotna, V.; Richena, M.; aj.: Hair-Structure Mystery Solved by Datamining Two Decades of Electron Tomograms. *Microscopy and Microanalysis*. 2019, **25**(S2), 1348-1349. DOI: 10.1017/S1431927619007475. ISSN 1431-9276.
- [A21] Neuman, J.; Novacek, Z.; Pavera, M. a Novotna, V.; Correlative Probe and Electron Microscopy CPEM — The Novel Technology for 3D Material Surface Analysis. *Microscopy and Microanalysis*. 2019, **25**(S2), 430-431. DOI: 10.1017/S1431927619002885. ISSN 1431-9276.
- [A22] Novotna, V.; Hrubanova, K.; Nebesarova, J.; aj.: Investigation of Electron Beam Induced Mass Loss of Embedding Media in the Low Voltage STEM. In: *Microscopy and Microanalysis*. 2014, **20**(S3), 1270-1271. DOI: 10.1017/S1431927614008083. ISSN 1431-9276.
- [A23] Krzyzanek, V.; Novotná, V.; Hrubanová, K.; aj.: Beam damage of embedding media sections and their investigations by SEM. In: *18th International Microscopy Congress*. Praha: Czechoslovak Microscopy Society, 2014, s. 120-123. ISBN 978-80-260-6720-7.

- [A24] Novotná, V.: *Electron Beam Induced Mass Loss of Sensitive Materials*. 1. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2014. ISBN 978-3-659-62843-6.
- [A25] Novotná, V.: Investigation Of Electron Beam Induced Mass Loss of Embedding Media in the Low Voltage STEM. In: *Student EEICT - Proceedings of the 20th conference*. 1. Brno: Litera, 2014, s. 139-141. ISBN 978-80-214-4923-7.
- [A26] Novotná, V.: SNOM as a substitute for TEM in the observation of biological samples. In: *Student EEICT - Proceedings of the 18th Conference*. Brno: Litera, 2012, s. 83-85. ISBN 978-80-214-4462-1.
- [A27] Novotná, V.; Knápek, A.; Šafářová, Š.: SNOM as an Extension of Visible- Light Microscopy for Human Cancer Cells Research. In: *New Trends in Physics, NTF 2012*. Brno, 2012, s. 153-156. ISBN 978-80-214-4594-9.
- [A28] Novotná, V., Knápek, A., Tománek, P.; aj.: Scanning Probe Microscopy as a Tool for Investigation of Biomaterials. *Advances in Electrical and Electronic Engineering*. 2012, **10**(5), 350-354. ISSN 1804-3119.

Curriculum Vitae

Jméno: Veronika Novotná

Kontakt: veronika.novotna1@vutbr.cz, vercanovo@seznam.cz

Pracovní zkušenosti:

Čvc. 2018 – současnost	Aplikační specialista NenoVision, Brno
Čvc. 2017 – současnost	Technický pracovník UVEE FEKT VUT v Brně
Čvc. 2016 – led. 2017	Specialista mikroskopie AgResearch, Lincoln, Nový Zéland
Úno. 2016 – dub. 2016	Vědecký pracovník – stážista Malaghan Institute of Medical Research, Wellington, Nový Zéland
Dub. 2015 – pro. 2015	Specialista mikroskopie FNUSA-ICRC, Brno
Lis. 2014 – bře. 2015	Biomedicínský technik Fakultní nemocnice Brno Bohunice
Říj. 2013 – čvn. 2014	Vědecký asistent Ústav přístrojové techniky AV ČR, Brno

Vzdělání:

2015 – 2019	Elektrotechnika a komunikační technologie Doktorské studium, UVEE FEKT VUT v Brně
2012 – 2014	Biomedicínské inženýrství a bioinformatika Magisterské studium, UBMI FEKT VUT v Brně
2012 – 2013	Biomedicínské inženýrství a bioinformatika Magisterské studium, ERASMUS, TUT, Tampere, Finsko
2009 – 2012	Biomedicínská technika a bioinformatika Bakalářské studium, UBMI FEKT VUT v Brně
2005 – 2009	Všeobecné gymnázium T.G. Masaryka, Hustopeče