

温度开环和闭环反馈在高压脉冲电场消融中的对照研究

张科^{1,2}, 王杰²

1. 南京医科大学医学影像学院, 江苏 南京 210029; 2. 江苏省人民医院介入放射科, 江苏 南京 210029

【摘要】目的:对比温度开环和闭环反馈在高压脉冲电场消融中的区别。**方法:**温度开环组应用高压方波脉冲发生器以场强 1.5 kV/cm、频率 1 Hz、脉宽 100 μ s、脉冲数 20 个的条件对细胞悬液、3D 细胞模型和离体猪肝组织 3 种不同负载施加高压脉冲电场。闭环组在相同脉冲条件下增加温度闭环算法对微控制器及温度传感器编程控制脉冲发放。分别从电场消融后的电极温度、细胞悬液电导率和细胞死亡率, 3D 细胞模型消融截面积以及猪肝组织消融区病理特点进行定量比较和定性分析。**结果:**消融后开环组电极温度、细胞悬液电导率、细胞死亡率和 3D 细胞模型消融截面积分别为 $(53.2 \pm 5.5)^\circ\text{C}$ 、 $(1.43 \pm 0.03) \text{ S/m}$ 、 $(86.8 \pm 5.5)\%$ 和 $(0.46 \pm 0.15) \text{ cm}^2$, 均高于闭环组对应的 $(38.5 \pm 1.6)^\circ\text{C}$ 、 $(1.21 \pm 0.02) \text{ S/m}$ 、 $(73.6 \pm 10.2)\%$ 和 $(0.37 \pm 0.08) \text{ cm}^2$, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 开环组消融区猪肝组织 H-E 染色可见热损伤导致的凝固性坏死区, 闭环组表现为肝血窦增宽、细胞质脱水丢失和核聚集。**结论:**该实验条件下, 温度开环和闭环反馈高压脉冲电场消融存在差异。传统温度开环高压脉冲电场消融效果略强于温度闭环, 这可能与电导率增加和热效应介导的电场杀伤效应增强有关。温度闭环反馈能避免热损伤效应, 实现真正意义上的非热性消融。

【关键词】高压电; 脉冲电场; 消融; 温度; 闭环

【中图分类号】R318

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2021)07-0850-06

Comparison of temperature open-loop and closed-loop feedbacks in high-voltage pulsed electric field ablation

ZHANG Ke^{1,2}, WANG Jie²

1. School of Medical Imaging, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Department of Interventional Radiology, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To compare the differences between temperature open-loop and closed-loop feedbacks in high-voltage pulsed electric field ablation. **Methods** Three different loads, namely cell suspension, 3D cell model and swine liver tissue *ex vivo* both in temperature open-loop group and temperature closed-loop group were exposed to high-voltage square-wave pulsed electric field with a field strength of 1.5 kV/cm, frequency of 1 Hz, pulse width of 100 μ s and pulse number of 20. Moreover, a temperature closed-loop algorithm was added in closed-loop group to control pulse delivery of temperature sensor to the microcontroller. Electrode temperature, cell suspension conductivity and cell death rate, 3D cell model ablation area and pathological characteristics of swine liver tissue ablation zone after electric field ablation were quantitatively compared and qualitatively analyzed. **Results** The electrode temperature, cell suspension conductivity, cell death rate and 3D cell model ablation area in open-loop group after ablation were $(53.2 \pm 5.5)^\circ\text{C}$, $(1.43 \pm 0.03) \text{ S/m}$, $(86.8 \pm 5.5)\%$ and $(0.46 \pm 0.15) \text{ cm}^2$, respectively, higher than $(38.5 \pm 1.6)^\circ\text{C}$, $(1.21 \pm 0.02) \text{ S/m}$, $(73.6 \pm 10.2)\%$ and $(0.37 \pm 0.08) \text{ cm}^2$ in closed-loop group, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). Through hematoxylin-eosin staining, coagulation necrosis caused by thermal injury was found in swine liver tissue ablation zone in open-loop group, while widening in hepatic sinusoids, cytoplasmic dehydration and loss, and nuclear accumulation were observed in closed-loop group. **Conclusion** Under the experimental conditions, there are differences between temperature open-loop and closed-loop feedbacks groups. The traditional temperature open-loop high-voltage pulsed electric field has a slightly stronger ablation effect than temperature closed-loop ablation, which may be related to the increase in electrical conductivity and the enhancement of the lethal

【收稿日期】2021-04-08

【基金项目】国家自然科学基金 (31930020)

【作者简介】张科, 博士, 研究方向: 肿瘤高压脉冲电场消融, E-mail: zhang0ke@126.com

【通信作者】王杰, 博士生导师, 研究方向: 肝癌介入治疗, E-mail: wangjie1963nmu@126.com

effects of electric field mediated by thermal effects. Temperature closed-loop feedback can avoid thermal damage effects and achieve real non-thermal ablation.

Keywords: high-voltage; pulsed electric field; ablation; temperature; closed-loop

前言

高压脉冲电场消融是近年来由电气与临床生物物理学家提出并完成临床医学转化的新技术^[1],其消融原理是利用高压脉冲电场击穿细胞膜引起不可逆穿孔造成细胞凋亡^[2]。由于间断式电流和超短脉宽的缘故,理想状态下热积累小于组织散热效率,不会造成消融区重要结构的热损伤^[3-4]。高压脉冲电场消融作为一种非热性消融方式被用于胰腺癌、肝门部胆管癌、前列腺癌等热消融禁区,疗效显著^[5-7]。

已经投入临床用的高压脉冲电场电穿孔治疗系统如 Nanoknife® (Angiodynamics 公司, 美国) 和 Cliniporation® (IGEA 公司, 意大利) 皆采用温度开环协议, 即不监测消融区温度, 一旦设定好脉冲条件, 将按照厂家预设参数完成所有脉冲的发放^[8]。然而在实际手术过程中, 病变区可能存在大血管或骨骼干扰, 术者不能保证布针完全平行, 亦或术中患者肌肉收缩或呼吸移动引起电极移位, 造成场强不均和电流异常引发热效应产生, 电极周围组织炭化导致电极和组织间隙增大引起电弧效应, 导致设备保护停机, 不但影响治疗也失去了其非热消融的优势^[9]。最近有国外学者初步提出了温度闭环反馈来解决以上问题^[10-11], 目前尚无系统性的对照研究。为此, 本研究设计了温度闭环反馈算法对多种负载进行了高压电场消融实验, 并与传统温度开环技术进行比较研究, 探讨两者区别, 具体如下。

1 材料与方法

1.1 消融负载

细胞溶液: 37℃、5%CO₂ 环境下体外培养人肺癌细胞株 A549, 适时传代, 待测试时用培养基重悬, 消融后继续培养 24 h。3D 细胞模型: 将鼠尾胶原蛋白 I 型和 A549 细胞按照试剂说明混合制成 3D 细胞凝胶模型, 培养环境同细胞悬液, 消融后继续培养 24 h。组织: 取新鲜离体猪肝组织洗净, 取材适中均匀, 消融后即刻 10% 甲醛固定。

1.2 硬件连接

整个硬件电路由脉冲检测、脉冲发生、脉冲控制、温度检测和数据输出部分组成(图 1)。脉冲检测电路由示波器检测和记录连接负载后的高压脉冲发生器电极两端产生的电压、电流、脉宽、脉冲频率、波

形和个数等数据, 保证脉冲有效施加于负载。脉冲发生电路由一台电容储能加 IGBT 开关式结构的高压方波脉冲发生器(高压 1 200~1 500 V、低压 600~900 V, 最大电流输出 65 A)和两根 22G 电极针(头端导电长度 3 mm, 其余绝缘涂层覆盖)组成。脉冲控制电路由 Arduino 微控制器通过定时 5 V 高电平信号触发脉冲释放。温度检测电路由外围热敏温度传感器探头和模块组成。温度数据输出部分由计算机和串口通讯软件 Serialplot 监测。

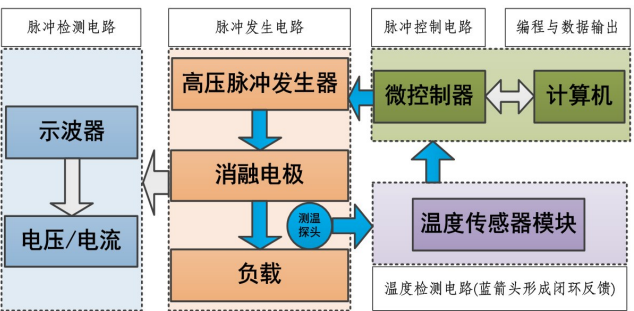


图 1 硬件电路连接示意图
Fig.1 Hardware circuit connection diagram

1.3 温度闭环反馈算法的实现

编写温度闭环反馈算法程序, 写入微控制器协同微控制器控制脉冲发放和停止。设置反馈阈值 37℃, 温度传感器实时检测温度模拟值, 微控制器 A/D 转换成数字信号, 再经 Steinhart-Hart 方程转换温度数值并循环和阈值比较。大于阈值时暂停脉冲释放, 并继续闭环比较, 待低于阈值后重新释放(图 2)。传统温度开环算法无温度采集模块和反馈算法。

1.4 电场消融

按上述步骤将各功能电路连接部署和调试完成后, 分别对温度开环组和闭环组的 3 种负载各施以场强 1.5 kV/cm (电极间距 5 mm, 电压 750 V)、频率 1 Hz、脉宽 100 μs、脉冲数为 20 的脉冲。每组重复测试 10 次。

1.5 消融指标检测和评估方法

采用电导率仪测量两组消融后的即时溶液电导率, CytoFLEX 流式细胞仪定量检测溶液内细胞状态。LEICA DMi8 全景扫描荧光显微镜拍摄 3D 细胞模型荧光染色图片。H-E 染色观察组织病理学改变, 观察范围包括消融中心区、电极周围区和过渡区。

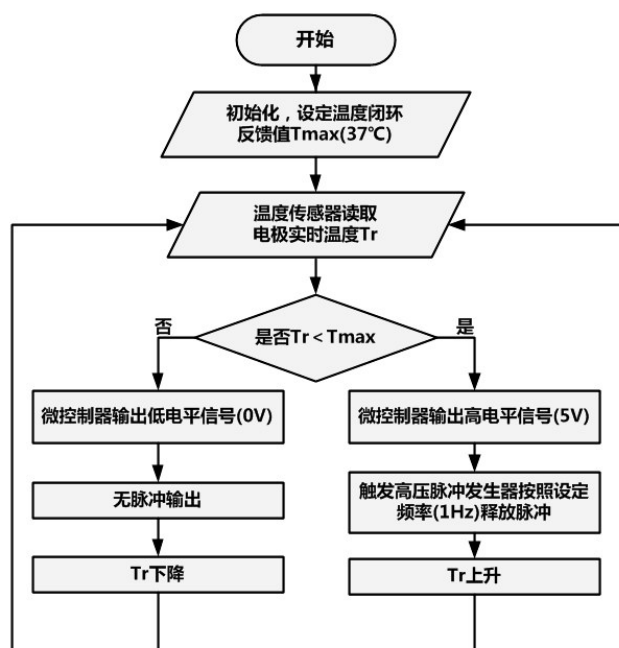


图2 温度闭环反馈算法流程图

Fig.2 Flowchart of temperature closed-loop feedback algorithm

1.6 数据处理和统计学分析

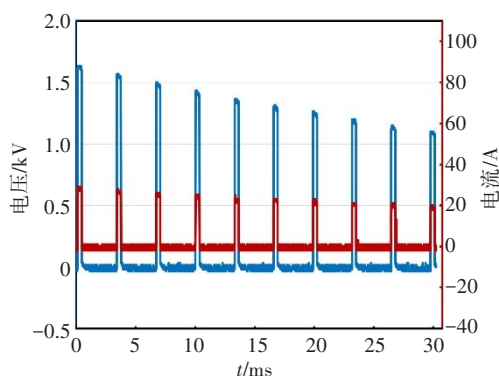
将示波器和温度传感器采集的原始CSV格式数据导入至Excel中作图,绘制电压、电流参数和温度

曲线。3D细胞模型荧光染色图片导入Photoshop CS2软件勾画消融区并根据原始比例尺进行像素计算和截面积换算。细胞计数、温度数值、电导率值、消融截面积等定量数据比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为结果有统计学差异。组织病理学结果定性比较。

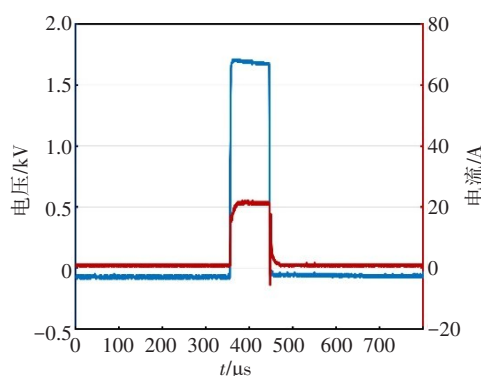
2 结果

2.1 硬件和算法运行结果

在细胞溶液负载条件下(电导率1.2 S/m,等效电阻约70 Ω),脉冲发生装置输出高压方波波形,高频300 Hz连续释放时有轻微压降趋势,但压降小于500 V(图3a)。经微控制器控制释放频率后,高压脉冲发生器以1 Hz的频率触发单个脉冲,电压电流波形恒定,上升沿较陡(图3b)。温度传感器数据采集传输至计算机观察分析温度曲线波形,温度开环组消融电极温度曲线均呈锯齿状、阶梯状上升(图4a)。温度闭环组未达阈值温度前波形也呈锯齿状上升,在达到阈值反馈后,脉冲发放间隔自适应延长,消融温度稳定在阈值附近上下波动(图4b)。以上结果表明各硬件电路运行稳定,触发程序和温度反馈算法运行良好,无明显电磁干扰。



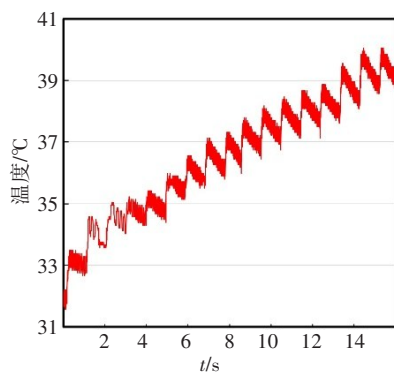
a: 频率300 Hz、脉宽400 μ s的连续脉冲



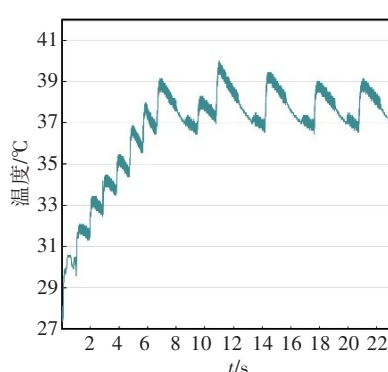
b: 微控制器触发的频率1 Hz、脉宽100 μ s的单个脉冲

图3 高压脉冲输出波形图

Fig.3 Waveforms of high-voltage pulse output



a: 开环组



b: 闭环组

图4 消融温度曲线

Fig.4 Ablation temperature curves

2.2 消融指标结果

在保证硬件和算法稳定运行的前提下,连接3种实验负载进行消融实验后,分别获得开环组和闭环组消融结果的定量和定性指标,具体如下。

2.2.1 定量指标 开环组消融结束时即刻电极温度为 $(53.2\pm5.5)^{\circ}\text{C}$,细胞悬液电导率为 $(1.43\pm0.03)\text{ S/m}$,细胞死亡率为 $(86.8\pm5.5)\%$,3D细胞模型消融截面积为 $(0.46\pm0.15)\text{ cm}^2$;均高于闭环组对应的电极温度 $(38.5\pm1.6)^{\circ}\text{C}$,细胞悬液电导率 $(1.21\pm0.02)\text{ S/m}$,细胞死亡率 $(73.6\pm10.2)\%$ 和3D细胞模型消融截面积 $(0.37\pm0.08)\text{ cm}^2$ 。差异均有统计学意义($P<0.05$)(图5)。经流式细胞分析结果早期凋亡和晚期凋亡亚组,开环组晚期凋亡细胞多于闭环组(图6,右上象限),闭环组细胞早期凋亡数目多于开环组(图6,右下象限)。3D肿瘤细胞模型消融后的荧光染色可见两电

极间电场作用后的红色死细胞区和绿色活细胞区;但闭环组消融区域染色更均匀,消融边界更清晰(图7)。

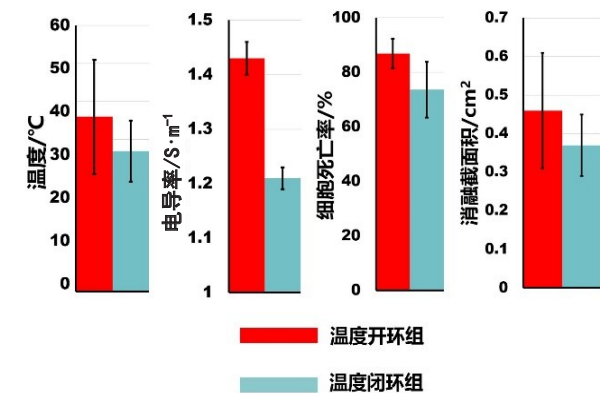


图5 消融后定量指标对比
Fig.5 Comparison of quantitative indexes after ablation

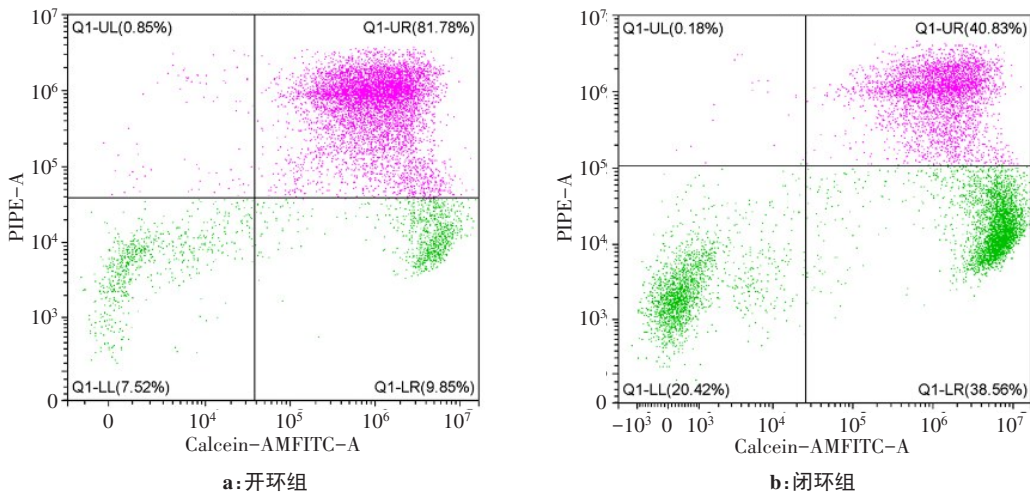


图6 溶液负载消融细胞状态分布对比
Fig.6 Comparison of solution-loaded ablation cell state distributions

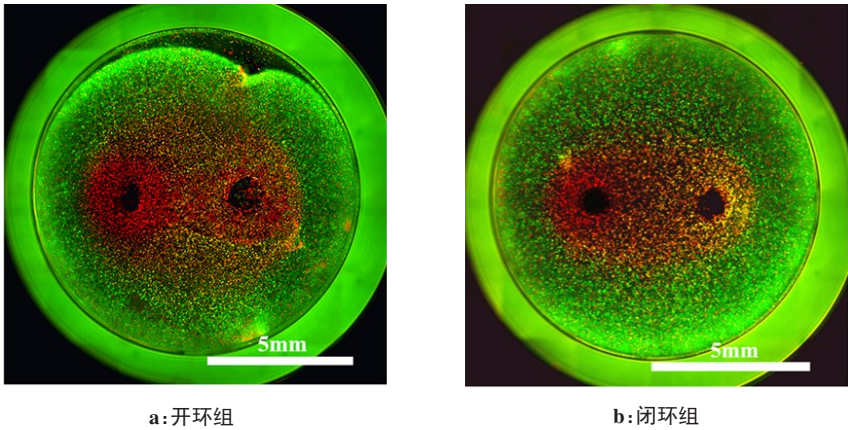


图7 3D细胞模型负载消融面积对比
Fig.7 Comparison of the ablation area of 3D cell model

2.2.2 定性指标 非消融区正常猪肝组织(阴性对照)H-E染色肝小叶完整,细胞核清晰,细胞质饱满、排列

紧密(图8a)。开环组和闭环组消融后即刻病理结果显示,两组消融中心区仅表现为肝血窦增宽(图8b)。

开环组电极周围区可见细胞核溶解、减少,胞质丢失、脱染以及大片热损伤导致的嗜酸性凝固性坏死区(图8c)。闭环组电极周围无凝固性坏死区。两组消融中心和电极之间的过渡区主要表现为肝小叶纤维间隔断裂、小叶结构不清、细胞质脱水丢失、核质比增加,偶可见核固缩和核聚集(图8d)。

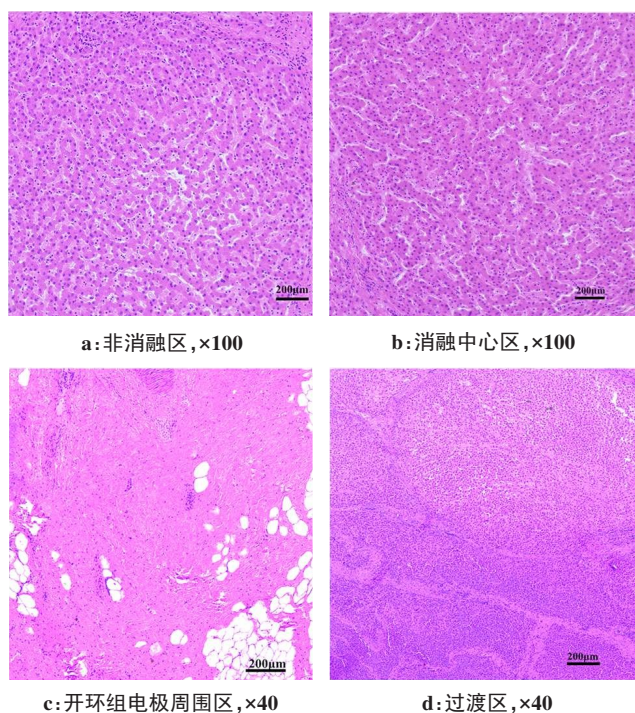


图8 离体猪肝负载消融后H-E染色对比

Fig.8 Comparison of H-E staining of swine liver *ex vivo* after ablation

3 讨论

本文对传统温度开环式高压脉冲电场消融和温度闭环反馈式消融进行了比较研究。目前国内外大部分对于高压脉冲电场消融中热效应的研究仅停留在消融区温度的监测^[12],没有采用温度闭环反馈算法控制进行相关研究。直到2020年,Petrella等^[10]提出温度闭环反馈的概念并对3D肿瘤细胞模型进行初步研究,指出传统温度开环算法和闭环反馈算法消融存在差异。该研究在此基础上,采用细胞溶液、3D肿瘤细胞模型和离体猪肝组织3种负载进行了实验,是因为二维细胞悬液和3D细胞模型消融后可继续培养再检测,可排除细胞凋亡滞后性和可逆性的穿孔造成的结果误差,且便于得出定量数据进行统计分析比较。但细胞学研究始终不能替代实体组织的细胞排列和连接,因此增加组织负载实验,以便更真实准确地模拟和还原临床真实消融环境。

硬件和算法的可靠运行是保证消融结果准确性的前提。该实验设备硬件部分采用了和商业化临床

高压脉冲消融系统电路原理相同的小型电容储能和IGBT开关控制式结构方波高压脉冲发生器作为脉冲发生电路^[13],这也是国内高压脉冲电场消融基础研究常用的脉冲发生结构^[14]。基于Arduino微控制器和平台作为脉冲控制电路和数据输出电路,便于编程、算法调试和原始数据输出。采用引线带有双层绝缘涂层的环氧塑封热敏电阻传感器作为温度监测和反馈电路,而没有采用更精确的光纤测温系统^[15],一是便于和控制单元接入,二是可大大减少设备体积成本。实验结果显示,脉冲发生电路工作可靠(图3);温度探头能够耐高压和抗电磁干扰,温度输出延迟性低,呈现和脉冲频率一致的温度波动,闭环反馈温度曲线达到阈值后在阈值上下波动(图4)。

消融结束时,开环组电极在3种负载内温度平均值显著高于闭环组。开环组溶液负载电导率、细胞死亡率均大于闭环组(图5)。开环组3D肿瘤模型负载消融区面积大于闭环组,这一点和Petrella等^[10]和Fesmire等^[16]的研究一致。开环组离体组织负载电极周围区出现凝固性坏死区,而闭环组没有出现(图8)。这证明开环组消融中出现了热效应,热效应和电导率的提升进一步增强了电场消融的效果。对流式细胞结果和3D细胞模型染色结果进一步剖析可以发现,开环组溶液细胞死亡以晚期凋亡为主,闭环组同时存在早期凋亡和晚期凋亡(图6);开环组虽然消融面积大于闭环组,但是消融区不如闭环组均匀(图7a)。可以推断,传统温度开环高压电场消融并非完全非热性消融,而是少量热效应和高压电效应于一体的消融,热量介导又进一步增强高压脉冲的杀伤效应。而温度闭环消融则是温度可控的纯粹电场消融,排除了热效应致死,因此消融区荧光染色更加均匀(图7b)。

由于高压电场消融后组织凋亡具有滞后性,往往开始于术后24 h以后^[17-18]。因此离体标本消融处理固定后无法评估有效消融区范围。该实验有效场强中心的非热消融区(图8b、图8d)仅表现为肝血窦增宽、局部细胞质脱水致核质比增加、少量核固缩和核聚集偶可见,这种电场消融术后即刻病理结果和Chen等^[19]、Kim等^[20]研究结果一致。该研究之所以只用离体组织实验,主要侧重于比较温度开环和闭环组消融的即刻效应区别,即有无热凝固性坏死的病理区别。因此,本着医学动物伦理学“3R”原则该研究没有进行不必要的在体动物实验进行动态观察。当然,由于离体组织不具备血液流动,因此散热情况和活体组织不同,离体和在体组织消融起始温度不同,可能对消融效果存在影响。如需进一步专

门深入研究温度闭环反馈消融的病理改变,则需要进一步动物实验动态病理评估。

综上,传统温度开环高压脉冲电场消融和温度闭环反馈消融存在差别。在该实验条件下,温度开环消融效果均略强于温度闭环,这可能与热效应介导的电场效应增强有关。温度闭环反馈能避免热损伤效应,实现真正意义上的非热性消融。

【参考文献】

- [1] BERTACCHINI C, MARGOTTI P M, BERGAMINI E, et al. Design of an irreversible electroporation system for clinical use[J]. Technol Cancer Res Treat, 2007, 6(4): 313-320.
- [2] DAVALOS R V, MIR I L, RUBINSKY B. Tissue ablation with irreversible electroporation[J]. Ann Biomed Eng, 2005, 33(2): 223-231.
- [3] DEWITT M R, LATOUCHE E L, KAUFMAN J D, et al. Simplified non-thermal tissue ablation with a single insertion device enabled by bipolar high-frequency pulses[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2020, 67(7): 2043-2051.
- [4] AGNASS P, VAN VELDHUISEN E, VAN GEMERT M J, et al. Mathematical modeling of the thermal effects of irreversible electroporation for *in vitro*, *in vivo*, and clinical use: a systematic review[J]. Int J Hyperthermia, 2020, 37(1): 486-505.
- [5] CHARALAMBOUS P, MORIS D, KARACHALIOU G S, et al. The efficacy and safety of the open approach irreversible electroporation in the treatment of pancreatic cancer: a systematic review[J]. Eur J Surg Oncol, 2020, 46(9): 1565-1572.
- [6] BELFIORE M P, REGINELLI A, MAGGIALETTI N, et al. Preliminary results in unresectable cholangiocarcinoma treated by CT percutaneous irreversible electroporation: feasibility, safety and efficacy[J]. Med Oncol, 2020, 37(5): 45.
- [7] MARTIN R C, DURHAM A N, BESSELINK M G, et al. Irreversible electroporation in locally advanced pancreatic cancer: a call for standardization of energy delivery[J]. J Surg Oncol, 2016, 114(7): 865-871.
- [8] LOPEZ-ALONSO B, SARNAGO H, LUCIA O, et al. Real-time impedance monitoring during electroporation processes in vegetal tissue using a high-performance generator[J]. Sensors (Basel), 2020, 20(11): 3158.
- [9] O'BRIEN T J, BONAKDAR M, BHONSLE S, et al. Effects of internal electrode cooling on irreversible electroporation using a perfused organ model[J]. Int J Hyperthermia, 2018, 35(1): 44-55.
- [10] PETRELLA R A, FESMIRE C C, KAUFMAN J D, et al. Algorithmically controlled electroporation: a technique for closed loop temperature regulated pulsed electric field cancer ablation[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2020, 67(8): 2176-2186.
- [11] SANO M B, PETRELLA R A, KAUFMAN J D, et al. Electro-thermal therapy: microsecond duration pulsed electric field tissue ablation with dynamic temperature control algorithms[J]. Comput Biol Med, 2020, 121: 103807.
- [12] RUARUS A H, VROOMEN L G, PUIJK R S, et al. Conductivity rise during irreversible electroporation: true permeabilization or heat?[J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2018, 41(8): 1257-1266.
- [13] RAO X, CHEN X D, ZHOU J, et al. A digital controlled pulse generator for a possible tumor therapy combining irreversible electroporation with nanosecond pulse stimulation[J]. IEEE Trans Biomed Circuits Syst, 2020, 14(3): 595-605.
- [14] 单纯玉. 一种高频不可逆电穿孔仪: CN201720297729.9[P]. 2018-02-09.
SHAN C Y. A high-frequency irreversible electroporation instrument: CN201720297729.9[P]. 2018-02-09.
- [15] 芮少琴. 高频纳秒脉冲串作用下生物组织热效应的仿真及实验研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2016.
RUI S Q. Simulation and experimental study of biological tissue thermal effects under high-frequency nanosecond pulse bursts[D]. Chongqing: Chongqing University, 2016.
- [16] FESMIRE C C, PETRELLA R A, KAUFMAN J D, et al. Irreversible electroporation is a thermally mediated ablation modality for pulses on the order of one microsecond[J]. Bioelectrochemistry, 2020, 135(10): 107544.
- [17] VOGEL J A, VAN VELDHUISEN E, ALLES L K, et al. Time-dependent impact of irreversible electroporation on pathology and ablation size in the porcine liver: a 24-hour experimental study[J]. Technol Cancer Res Treat, 2019, 18: 1-9.
- [18] PARTRIDGE B R, O'BRIEN T J, LORENZO M F, et al. High-frequency irreversible electroporation for treatment of primary liver cancer: a proof-of-principle study in canine hepatocellular carcinoma[J]. J Vasc Interv Radiol, 2020, 31(3): 482-491.
- [19] CHEN X H, REN Z R, ZHU T Y, et al. Electric ablation with irreversible electroporation (IRE) in vital hepatic structures and follow-up investigation[J]. Sci Rep, 2015, 5: 16233.
- [20] KIM H B, SUNG C K, BAIK K Y, et al. Changes of apoptosis in tumor tissues with time after irreversible electroporation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 435(4): 651-656.

(编辑: 薛泽玲)