

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA
BIOMEDICA

Tesi di Laurea Triennale

STUDIO SPERIMENTALE DEL TRATTAMENTO CON CAMPO
ELETTRICO AD ALTA FREQUENZA PER LA RIDUZIONE
DELLA PROLIFERAZIONE IN VITRO DI CELLULE DI
ASTROCITOMA UMANO

Relatore: Prof. Alfredo Ruggeri
Correlatori: Prof. Stefano Vassanelli
Dott. Stefano Girardi

Laureando: Lea Caramma

Indice

1	Introduzione	3
1.1	Cellule gliali	3
1.2	Neoplasie gliali	7
1.3	Campi elettromagnetici e tessuti biologici	11
1.4	Risonanza quantica molecolare	14
1.4.1	Vesalius	15
1.4.2	Rexon-age	15
1.5	Precedenti sperimentazioni	17
2	Materiali e metodi	19
2.1	Obiettivo della sperimentazione	19
2.2	Cellule H4	20
2.3	Dispositivo Rexon-age	21
2.4	Test svolti	22
2.4.1	Primo test	23
2.4.2	Secondo test	24
2.4.3	Osservazione dei mitocondri	26
3	Risultati	27
3.1	Elaborazione dati	27
3.2	Primo test	30
3.3	Secondo test	32
3.4	Valutazione del tasso di crescita dopo sei stimolazioni	36
3.5	Osservazione dei mitocondri	37
4	Conclusioni e commenti	39
	Bibliografia	41

1

Introduzione

1.1 Cellule gliali

Il tessuto nervoso si compone di due tipi di cellule diverse: neuroni e cellule gliali.

I neuroni sono in grado di ricevere e trasmettere impulsi nervosi; le cellule gliali, che costituiscono il 40% delle cellule del sistema nervoso centrale, sono indispensabili non solo per il sostegno meccanico dei neuroni, ma anche per il loro nutrimento, protezione ed isolamento elettrico.

Secondo alcuni studi, inoltre, le cellule gliali risultano avere un ruolo attivo nello sviluppo e nella maturazione delle sinapsi stesse.

L'insieme delle cellule gliali si definisce nevroglia e può essere distinta in interstiziale, epiteliale e periferica.

La nevroglia interstiziale comprende:

- Microglia;
- Macroglia.

La **microglia** ha la funzione di protezione immunitaria, in quanto nel caso in cui agenti infettivi superino la barriera ematoencefalica, le cellule della microglia si attivano per distruggerli. In realtà sono da considerarsi a parte rispetto alle altre cellule gliali in quanto hanno origine dai monociti e non dal tessuto ectodermico.

Della **macroglia** fanno parte:

- Astrociti;
- Oligodendrociti.

Gli **astrociti**, componente maggiore della nevroglia, sono così denominati per la caratteristica forma stellata. Essi hanno infatti un piccolo soma cellulare da cui si sviluppano numerose estroflessioni, le gliofibrille, che terminano in un “piede terminale” attraverso cui aderiscono al neurone.

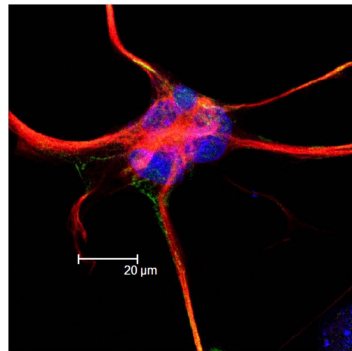


Figura 1.1: Astrocita

A livello morfologico si distinguono in:

- Astrociti fibrosi, i cui prolungamenti sono lunghi e sottili. Maggiormente presenti nella sostanza bianca.
- Astrociti protoplasmatici, con prolungamenti più corti e ramificati, caratterizzati da abbondante citoplasma ed un nucleo voluminoso. Sono più abbondanti nella sostanza grigia.

Queste cellule, oltre alla funzione di sostegno meccanico e di rivestimento dei neuroni, hanno un ruolo importante nella regolazione del metabolismo e dell'eccitabilità del neurone.

Essi costituiscono il tramite attraverso cui i neuroni sono messi in comunicazione con i capillari, impedendo il passaggio di sostanze dannose e lasciando passare le sostanze nutritive; fanno parte infatti della barriera ematoencefalica insieme alle cellule endoteliali. Inoltre hanno la funzione di creare la cicatrice gliale in caso di eventi patologici che portano alla distruzione di tessuto nervoso.

Un altro fondamentale aspetto dell'azione degli astrociti è la regolazione del flusso ionico, in particolare di sodio e potassio, allo scopo di adattare la concentrazione ionica extracellulare dei neuroni. Essi inoltre controllano il riassorbimento dei neurotrasmettitori, regolando ad esempio la concentrazione del glutammato, che se presente in quantità troppo elevate è causa di morte cellulare.

Di recente si è scoperta una partecipazione attiva degli astrociti nella trasmissione nervosa, anche queste cellule sono infatti eccitabili e quindi in grado di trasmettere e ricevere impulsi. Questa eccitabilità permette loro una comunicazione sia tra astrociti che con i neuroni stessi, attraverso le così dette sinapsi tripartite: gli astrociti sembrano essere in grado di rilasciare essi stessi neurotrasmettitori attraverso cui interagiscono con i neuroni coinvolti nelle sinapsi.

Gli **oligodendrociti** sono cellule più piccole rispetto agli astrociti e con meno prolungamenti. Si suddividono in:

- oligodendrociti satelliti perineuronali, con funzioni metaboliche;
- oligodendrociti interfascicolari, i quali producono la guaina mielinica, che forma il rivestimento isolante per gli assoni per permettere una migliore propagazione degli impulsi elettrici. Un singolo oligodendrocita può mielinizzare fino a 50 assoni.

Esistono anche delle cellule dette *precursori degli oligodendrociti*, in quanto in fase di sviluppo del sistema nervoso agiscono come tali, ma in parte rimangono anche nel cervello sviluppato. La loro funzione non è però nota.

Della macroglia fanno parte inoltre le cellule *gliali radiali*, che rappresentano la principale popolazione progenitrici neuronale della corteccia cerebrale. Le cellule gliali radiali sono fondamentali nello sviluppo del sistema nervoso in quanto consentono la migrazione dei neuroni.

La nevroglia epiteliale comprende gli **ependimociti**, cellule con morfologia cubica/cilindrica, che rivestono i ventricoli ed il canale centrale del midollo spinale. Essi non hanno membrana basale e sono dotati di prolungamenti che permettono l'interconnessione con gli astrociti. Gli ependimociti secernono il liquido cerebrospinale ed hanno ciglia e microvilli che ne aiutano la circolazione.

La nevroglia periferica comprende le cellule gliali del tessuto nervoso periferico:

- cellule di Schwann;
- cellule satelliti.

Le **cellule di Schwann** hanno una funzione simile a quella degli oligodendrociti in quanto formano la guaina mielinica degli assoni del sistema nervoso

periferico. A differenza degli oligodendrociti, tuttavia, ogni cellula può ricoprire un tratto di un unico assone. Hanno anche la funzione di ripulire dai residui cellulari per via fagocitaria.

Le **cellule satelliti** nel sistema nervoso periferico delimitano il corpo centrale del neurone e svolgono una funzione di regolazione dell'ambiente extracellulare, analogamente agli astrociti.

1.2 Neoplasie gliali

I tumori cerebrali si distinguono in:

- tumori primari, che si sviluppano nel cervello *ex novo* e raramente metastatizzano,
- tumori secondari, che interessano il cervello a seguito di metastasi di tumori di altri organi.

I tumori primari comprendono due grandi tipologie: tumori gliali (o gliomi) e tumori non gliali. I primi sono i tumori cerebrali più diffusi, in quanto costituiscono circa il 40% dei tumori cerebrali primari.

Tra le neoplasie non gliali, le più comuni sono i Meningiomi, che hanno origine da cellule delle meningi e sono prevalentemente benigni ed i Medulloblastomi, tipici della fossa cranica posteriore, e riscontrati maggiormente in bambini tra i 2 e i 7 anni.

Le diverse tipologie di gliomi sono:

- astrocitomi, i tumori gliali più frequenti;
- oligodendrogliomi, 5-15% dei gliomi;
- ependimomi, 5-10% dei gliomi.

Gli **astrocitomi** sono i tumori che originano a partire dagli astrociti. Possono essere circoscritti o diffusi, i primi, meno frequenti, sono poco infiltranti, mentre i secondi tendono ad infiltrare nella materia bianca e sono quindi più complessi da asportare chirurgicamente.

Le neoplasie astrocitarie vengono distinte a seconda del grado di malignità, in base alla scala di *grading* introdotta nel 1993 dalla OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità); al grado I corrispondono i tumori meno aggressivi ed al grado IV i più maligni.

Ai gradi di maggior malignità sono associate ipercellularità, atipia nucleare e citoplasmatica, proliferazione endoteliale, attività mitotica e necrosi.

La prognosi è legata in modo determinante al grado di tumore diagnosticato.

La classificazione secondo i gradi di malignità distingue:

1. Grado I:

- Astrocitoma Pilocitico

Si tratta un tumore benigno a crescita lenta, ben differenziato e circoscritto. Raramente riscontrato in età adulta, è più frequente in bambini e giovani di età inferiore ai 20 anni. La prognosi è generalmente favorevole, dipendente essenzialmente dalla possibilità o meno di una asportazione chirurgica radicale. Le sedi più frequenti in cui si sviluppa sono lobo temporale e cervelletto. Molto spesso è cistico.

- Astrocitoma subependimale a cellule giganti

Tumore a crescita lenta non infiltrante, origina frequentemente dalla parete dei ventricoli. Ha generalmente prognosi favorevole ed è spesso associato alla sclerosi tuberosa. Insorge solitamente nelle prime due decadi di vita.

- Xantoastrocitoma pleiomorfico

Tumore raro e circoscritto, a localizzazione superficiale nel lobo temporale. È più frequente nell'infanzia ed in pazienti di giovane età. La sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi arriva all'80%.

2. Grado II: Astrocitoma a basso grado

Glioma a crescita lenta, si distingue da quello di grado I per i contorni non nitidi che rendono l'asportazione chirurgica più complessa e difficilmente radicale. Spesso presenta mutazioni nel tempo che lo rendono più aggressivo. La sopravvivenza media è di 5- 6 anni.

3. Grado III: Astrocitoma anaplastico

Una neoplasia che si caratterizza per una crescita rapida ed un'alta recidività. È un tumore infiltrante e quindi la totale escissione chirurgica è impossibile. Può insorgere come degenerazione maligna di tumori di grado inferiore e tendenzialmente vira a glioblastoma multiforme. Si presenta maggiormente in pazienti tra i 50 e i 60 anni. La sopravvivenza è del 50% a due anni e del 18% a cinque anni dalla diagnosi.

4. Grado IV: Glioblastoma multiforme

Può svilupparsi a partire da astrocitomi di grado inferiore ed è altamente maligno ed infiltrante con una sopravvivenza media che va dai 6 ai 12 mesi. È caratterizzato da estremo polimorfismo cellulare, necrosi ed è spesso associato ad una proliferazione vascolare.

Ne esistono due varianti: glioblastoma a cellule giganti e gliosarcoma.

Il primo è caratterizzato da cellule molto grandi, con un diametro che raggiunge anche i $400\ \mu\text{m}$, e multinucleate; il secondo presenta una componente astrocitaria ed una mesenchimale.

Anche con chirurgia e successive terapie (radiante e chemioterapia) la sopravvivenza per un paziente affetto da glioblastoma è bassa, in genere inferiore a 2 anni.



Figura 1.2: Glioblastoma, immagine di RM

Gli **oligodendrogliomi** sono più frequenti in età pediatrica e tra i 50 e i 60 anni, rappresentano circa il 4% dei tumori del sistema nervoso centrale. Essi hanno un decorso sostanzialmente benigno; sono meno infiltranti degli astrocitomi e rispondono meglio alle terapie citotossiche.

Il grado di malignità si attribuisce in base alla presenza di ipercellularità, attività mitotica e necrosi, tipiche di neoplasie con sopravvivenza media inferiore.

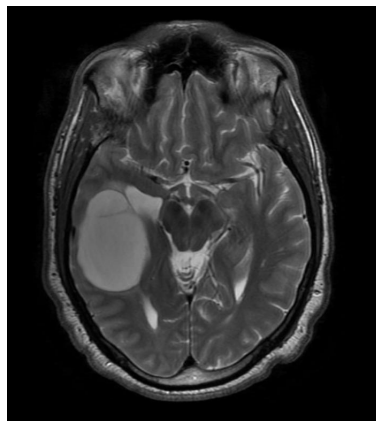


Figura 1.3: Oligodendroglioma, immagine di RM

Si possono presentare forme miste, che contengono cioè una componente oligodendrogliale ed una astrocitaria; il grado di aggressività dipende da quale sia la componente maggioritaria, essendo quella astrocitaria associata ad una maggiore malignità.

Gli **ependimomi** sono gliomi che originano dalle cellule dei ventricoli cerebrali e del canale centrale del midollo spinale. Maggiormente riscontrati nelle prime due decadi di vita, rappresentano il 10% dei tumori cerebrali di infanzia ed adolescenza ed il 2-3% dei tumori del sistema nervoso centrale. Essi sono generalmente a crescita lenta e virano in senso maligno meno frequentemente rispetto agli astrocitomi.

Il grado di malignità dipende dalla tipologia. Si distinguono in ordine crescente di grado:

- ependimoma mixopapillare, origina tipicamente nella regione terminale del cono midollare e della cauda;
- subependimoma, lesione benigna endoventricolare a prognosi favorevole;
- ependimoma di grado II;
- ependimoma anaplastico, maligno, di grado III.

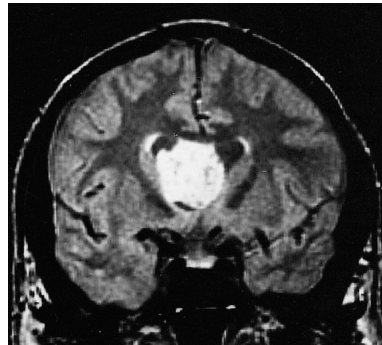


Figura 1.4: subependimoma, immagine di RM

In base alla localizzazione può essere possibile una resezione chirurgica totale che permette una sopravvivenza di 5 anni per l'80% dei casi.

1.3 Campi elettromagnetici e tessuti biologici

Le interazioni bio-elettromagnetiche rivestono un ruolo importante nel funzionamento dei sistemi biologici e assumono un rilievo via via più complesso negli organismi viventi superiori.

L'interazione elettromagnetica è centrale sia nei processi "elementari", come i potenziali d'azione delle membrane cellulari, che in quelli estremamente complessi come le capacità cognitive. Questo meccanismo permette infatti la propagazione di impulsi elettrici nelle cellule ed è quindi funzionale alla cellule nervose, alle fibre muscolari e cardiache.

L'interazione dei campi artificiali con i tessuti umani è stata quindi largamente studiata per comprenderne i meccanismi e i possibili effetti biologici e sanitari. Tali effetti dipendono essenzialmente dall'intensità dei campi applicati ed in modo rilevante anche dalla loro frequenza.

Ad alta intensità le interazioni risultano distruttive, ma anche la frequenza riveste una notevole importanza dal punto di vista dei possibili danni biologici.

È necessario distinguere le radiazioni ionizzanti da quelle che non lo sono.

Le prime hanno una frequenza molto elevata, sopra il limite dell'ultravioletto. La lunghezza d'onda associata è dell'ordine delle dimensioni molecolari ed atomiche, questo implica una interazione con gli elettroni dei legami che può causare la ionizzazione degli atomi, con conseguenti danni alle strutture del DNA.

Le radiazioni non ionizzanti, invece, hanno frequenze molto minori ed i loro effetti sono molteplici ed attualmente oggetto di studio.

In base alla frequenza i campi elettromagnetici non ionizzanti possono essere distinti in:

- Campi elettrici e magnetici statici (0 Hz);
- A bassa e media frequenza (fino a 3MHz);
- Ad alta frequenza (fino a 3 GHz);
- Ad altissima frequenza (fino a 300 GHz).

Per quel che riguarda i campi statici, gli studi mirati ad analizzare gli effetti sui tessuti biologici hanno tendenzialmente portato alla conclusione che tali campi non siano in generale rilevanti per basse intensità.

Un maggiore interesse hanno invece riscontrato le sperimentazioni su campi variabili, le cui interazioni con sistemi biologici sono più evidenti. Tali interazioni possono essere distinte in interazioni di tipo termico e non termico. La prima tipologia è legata alla trasformazione dell'energia elettromagnetica in calore, con conseguente innalzamento della temperatura delle cellule sottoposte al campo. Nel momento dell'interazione l'energia può essere trasmessa agli ioni, certamente presenti nelle cellule in quanto ricche di soluzioni saline. Questi ultimi vengono sollecitati a muoversi con velocità più elevate e conseguente aumento della temperatura.

Altro schema di assorbimento energetico riguarda l'interazione in risonanza fra la frequenza del campo eccitante ed una delle frequenze tipiche di oscillazione delle molecole sottoposte al campo.

Questo processo consente una cessione selettiva di energia elettromagnetica mirata ad alcuni tipi di strutture cellulari preservandone altri, con effetti termici limitati. Di questa seconda tipologia non sono ancora del tutto chiari i meccanismi quantistici che ne stanno alla base.

Gli effetti termici sono stati per molto tempo l'unica tipologia considerata; recentemente, molti studi hanno iniziato ad indagare le interazioni a livello cellulare con limitato scambio termodinamico di energia.

Queste interazioni rivestono interesse nel campo biomedico in quanto gli eventuali utilizzi associati risultano poco invasivi per i tessuti.

Sono numerosi gli studi sperimentali in vitro volti ad analizzare gli effetti di campi elettromagnetici, a diverse frequenze, su vari parametri biologici. In questi studi vengono monitorate le variazioni nella cinetica della proliferazione cellulare, nell'attività enzimatica, nei flussi ionici intermembrana e nel corredo cromosomico.

Per quanto riguarda i campi variabili a basse frequenze, molti studi hanno riscontrato un'influenza di tali campi sulla proliferazione cellulare.

È interessante sottolineare che già da qualche tempo gli effetti biologici dei campi elettromagnetici a bassa frequenza sono sfruttati a livello terapeutico nella stimolazione della ricrescita ossea in alcune tipologie di fratture, con l'obiettivo di aumentare l'osteogenesi.

Largo interesse hanno avuto gli effetti di campi elettromagnetici ad alta frequenza, in particolare associati a microonde (tra i 30 e 300 GHz), frequenze utilizzate per la telefonia mobile (tra 300 MHz e 3 GHz) e frequenze in uso per applicazioni industriali, vista la notevole diffusione di tali campi. In alcune sperimentazioni in vitro sono state riscontrate alterazioni delle

proprietà dei canali ionici di membrana e variazioni di flussi ionici in corrispondenza di alcuni SAR (tasso di assorbimento specifico)[2].

Altri studi hanno rilevato un aumento dell'attività dell'enzima ODC (ornitina decarbossilasi) in colture di fibroblasti di topo [5].

I risultati di test, che prevedevano di sottoporre a campi elettromagnetici cellule di mammifero, hanno evidenziato che a seconda del tipo di cellule e delle condizioni di esposizione, la proliferazione risultava incrementata o diminuita. In questo secondo caso il test fu svolto irradiando con un campo elettromagnetico ad alta frequenza cellule di astrocitoma umano: la proliferazione risultava diminuita a seguito di un'interazione non esclusivamente termica [3].

Altri studi hanno rivelato un'inibizione della proliferazione di cellule tumorali sottoposte a campi elettrici alternati a medie frequenze [4].

Nasce quindi l'ipotesi di un futuro utilizzo di campi elettromagnetici a media ed alta frequenza a scopo terapeutico.

Oltre allo studio degli effetti dei campi elettromagnetici sui tessuti biologici a livello cellulare, si sono sviluppati, in biologia e medicina, vari filoni di ricerca collegati all'esposizione a campi elettromagnetici e riguardanti, ad esempio, lo sviluppo embrionale e fetale e gli effetti sul sistema nervoso centrale e sul sistema immunitario.

Grande importanza riveste infine lo studio di un possibile legame tra insorgenza di tumori e campi elettromagnetici, sia attraverso meccanismi diretti di tipo genotossico, sia per processi indiretti di tipo epigenetico.

Non è tutt'ora confermato che vi sia una diretta relazione tra l'esposizione a campi elettromagnetici, sia a bassa che ad alta frequenza, e lo sviluppo patologie neoplastiche.

1.4 Risonanza quantica molecolare

La base teorica per lo sviluppo dello strumento Rexon-age è la teoria della risonanza quantica molecolare, su cui si basano i brevetti relativi ai dispositivi prodotti da Telea Electronic Engineering s.r.l.

La teoria della risonanza molecolare riguarda gli effetti dei campi elettrici variabili sulle cellule. Essa afferma l'esistenza nelle molecole di particolari frequenze tipiche dei legami molecolari, che, come già dimostrato per gli scambi energetici atomici, permettono un trasferimento energetico con meccanismo di risonanza.

Questo assorbimento energetico può comportare la rottura del legame molecolare. L'intensità necessaria a rompere il legame può essere ottenuta con assorbimenti successivi di intensità minori irradiate sotto forma di quanti con frequenza pari a quella di risonanza molecolare.

I campi utilizzati per la generazione dei quanti energetici devono quindi avere precise frequenze affinché abbia luogo il fenomeno della risonanza.

Lo scambio energetico può avvenire tramite fotoni.

Si ricorda a questo proposito che l'energia associata al fotone è proporzionale alla frequenza dell'onda elettromagnetica, secondo la legge:

$$E = hf, \text{ con } h = \text{costante di Plank.}$$

Affinché ci sia interazione tra il fotone e la molecola bersaglio è necessario che la lunghezza d'onda ($l = c/f$) sia confrontabile con le dimensioni molecolari. Questa condizione richiede di impiegare lunghezze d'onda molto piccole, tipiche della radiazioni ionizzanti. Inoltre, regolare la frequenza dei fotoni in modo da renderla vicina a quella di risonanza risulta complesso, essendo il fotone privo di massa a riposo.

Nei dispositivi elettromedicali della Telea Electronic Engineering s.r.l. per questi trasferimenti energetici si utilizzano allora elettroni, con riferimento alla teoria di De Broglie sulle onde di materia, che associa ad ogni particella una lunghezza d'onda l inversamente proporzionale alla sua quantità di moto:

$$l = h/mv.$$

In tal modo si possono ottenere lunghezze d'onda adatte scegliendo opportunamente la tensione del campo elettrico applicato che farà variare la velocità di movimento degli elettroni.

Per il trasporto dell'energia vengono utilizzate micro correnti, di frequenza elevata e bassa intensità così che il tessuto non subisca danno termico. Gli effetti che si osservano sono dovuti solo all'interazione tra cellule ed elettroni

che oscillano a specifiche frequenze.

Lo spettro di frequenze da utilizzare va da 4 a 64 MHz, ovvero nel campo delle medie-alte frequenze.

Sulla base di tale teoria, Telea Electronic Engineering s.r.l. ha sviluppato il bisturi Vesalius ed in seguito il Rexon-age, due applicazioni della stessa teoria della risonanza quantica molecolare, che, con piccole differenze nello spettro di frequenze utilizzato e nell'intensità del campo elettrico, portano a due risultati molto diversi.

1.4.1 Vesalius

Il bisturi Vesalius è un particolare tipo di bisturi elettronico, in grado di tagliare i tessuti umani senza portarli a necrosi per surriscaldamento, tipico inconveniente dell'elettrobisturi classico.

I danni termici vengono evitati perché la temperatura è mantenuta sotto i 50 gradi, limite di sopravvivenza cellulare, quindi le cellule vicine a quella tagliata non vengono danneggiate. Le cellule infatti non si rompono a seguito del surriscaldamento, ma perché entrano in risonanza ed i legami molecolari si scindono.

L'evidente vantaggio clinico è quello di una guarigione più veloce e meno dolorosa.

1.4.2 Rexon-age

La teoria della risonanza quantica molecolare è stata sfruttata anche per una applicazione con fini molto diversi da quelli del bisturi Vesalius, ossia la rigenerazione tessutale.

Il Rexon-age è infatti un'innovativa tecnologia che mediante l'uso delle piccole correnti generate dall'applicazione del campo elettrico variabile al tessuto biologico stimola un rinnovamento delle cellule. Questo effetto è dovuto all'uso di uno spettro di frequenze leggermente più ampio di quello sfruttato dal Vesalius e di un'intensità del campo elettrico minore.

Sono stati svolti diversi studi in vitro che hanno confermato gli effetti rigenerativi, anche se le cause effettive sono ancora oggetto di studio.

Dalle sperimentazioni su colture di mioblasti e fibroblasti e su proteine in soluzione si è potuto innanzitutto escludere un eventuale danneggiamento della struttura proteica e l'apoptosi [8].

In altri studi si sono potuti osservare i processi rigenerativi su muscoli pelliccioli di topo, e l'ipotesi è che derivino dall'iniziale piccolo danno che le

correnti hanno causato alle cellule. La stimolazione di fibre muscolari murine ha permesso poi di osservare che l'applicazione delle micro correnti su cellule eccitabili è legata ad una depolarizzazione della membrana cellulare ed un rilascio di calcio, non tale da innescare la contrazione, ma indicativo di una aumentata attività cellulare [10].

Il Rexion-age è oggi utilizzato per terapie estetiche di ringiovanimento della pelle e per trattamenti antalgici con buoni risultati curativi del dolore dovuto a infiammazioni, strappi muscolari e dolori articolari. Si sono inoltre riscontrati significativi effetti nel trattamento di acne, cellulite e nella circolazione linfatica.

Dall'osservazione della sua azione a livello cellulare nasce quindi l'ipotesi della possibile influenza di una stimolazione con risonanza molecolare anche nel trattamento di tumori cerebrali: è possibile che l'applicazione del campo elettrico alle particolari frequenze usate dal Rexion-age sia in grado di introdurre una variazione nel tasso di proliferazione delle cellule tumorali.

1.5 Precedenti sperimentazioni

Sono stati svolti alcuni test preliminari dell'applicazione del trattamento su cellule di astrocitoma umano, per verificare se le micro correnti fossero dannose per le cellule e se causassero un aumento di temperatura nel terreno di coltura tale da poter influire sulla loro sopravvivenza.

Da tali test si è potuto appurare che il trattamento con il Rexon-age fino ad una potenza nominale di 70 (corrispondente ad una potenza efficace di 17,88 W) non influisce sulla vitalità cellulare e non ne causa una modificazione morfologica significativa.

I test sulla temperatura inoltre indicano che l'applicazione di potenze nominali da 10 (corrispondente ad una potenza efficace di 0,04 W) a 80 (corrispondente ad una potenza efficace di 25,75 W) causa un incremento di temperatura trascurabile, in quanto abbondantemente inferiore all'escursione termica che le cellule subiscono nel passaggio da temperatura dell'incubatore (36,5 °C) a temperatura ambiente.

Si è successivamente iniziata la sperimentazione finalizzata ad evidenziare un eventuale effetto della terapia sulla riduzione della proliferazione delle cellule tumorali.

I primi test sono stati effettuati con stimolazioni di 3 giorni ed una potenza nominale di 40, che corrisponde a una potenza efficace di 3,47 W.

Dai risultati è emersa una piccola, anche se trascurabile, diminuzione del tasso di crescita delle cellule. Si è deciso dunque di proseguire con nuovi test che prevedono di aumentare la potenza e prolungare il periodo di terapia fino a 15 giorni.

Altro punto importante da considerare è che il trattamento prevede l'inserimento di un elettrodo a diretto contatto con il terreno di coltura, che potrebbe disturbare la proliferazione delle cellule anche al di là del passaggio delle micro correnti. Si è pensato quindi che fosse opportuno svolgere dei test in cui anche nelle capsule di Petri contenenti i controlli venisse inserito l'elettrodo, per lo stesso tempo rispetto alle Petri stimulate, senza che fosse avviata la stimolazione.

2

Materiali e metodi

2.1 Obiettivo della sperimentazione

Questo lavoro si inserisce all'interno di una sperimentazione che ha come fine l'analisi degli effetti del dispositivo Rexon-age su cellule di astrocitoma umano.

La tecnologia su cui si basa il Rexon-age svolge una intensa e dimostrata attività a livello cellulare, che però non è stata ancora completamente studiata ed i cui effetti potrebbero essere più ampi di quelli per cui è attualmente utilizzata. Da questa considerazione è nata l'ipotesi di una possibile influenza del trattamento sulla proliferazione delle cellule tumorali.

Il Rexon-age è stato fino ad ora sfruttato per terapie estetiche ed antalgiche; se la sperimentazione confermasse l'ipotesi fatta, il suo utilizzo potrebbe essere in futuro esteso anche al trattamento di tumori cerebrali.

Si vogliono quindi osservare le conseguenze del trattamento sulla proliferazione in vitro di cellule di glioma umano, valutandone il tasso di crescita a seguito dell'applicazione del campo elettrico con il particolare spettro di frequenze brevettato da Telea Electronic Engineering s.r.l.

In particolare, lo studio qui affrontato è volto a verificare e quantificare la diminuzione del tasso di crescita cellulare dovuto all'applicazione di una potenza efficace di 6,56 W, ossia leggermente superiore a quella dei test precedenti.

2.2 Cellule H4

Per la sperimentazione sono state utilizzate cellule H4, ossia un particolare tipo di astrocitoma umano.

Tali cellule sono caratterizzate da una forma poligonale epiteliale ed una durata del ciclo di divisione cellulare di 48 ore circa.

Il terreno di coltura in cui le cellule sono state disposte per permetterne la sopravvivenza e la crescita è composto da:

- D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, addizionato di L-glutammina (Invitrogen-Gibco))
- FBS 10% (Foetal Bovine Serum, Invitrogen-Gibco)
- antibiotici (Penicillina 10u/ml, Streptomicina 10 μ g/ml)

Il D-MEM è un terreno di coltura liquido con adeguato contenuto di aminoacidi, vitamine, sali e zuccheri. Ad esso si aggiunge siero bovino fetale ricco di proteine plasmatiche, fattori di crescita, ormoni ed altri elementi come transferrina albumina, colesterolo, acidi grassi e glucocorticoidi. Infine gli antibiotici, che sono necessari per evitare la contaminazione delle Petri da parte di batteri.

2.3 Dispositivo Rexion-age

Il Rexion-age è stato adattato alla stimolazione di colture cellulari in vitro, dotandolo di un primo elettrodo di terra e di un secondo elettrodo di forma cilindrica, appositamente creato per l'inserimento in Petri circolari di diametro 35 mm. L'elettrodo permette quindi una stimolazione uniforme del contenuto della Petri.

Le caratteristiche tecniche del Rexion-age sono le seguenti:

Tensione d'alimentazione: 230 V

Frequenza d'alimentazione: 50/60 Hz

Potenza massima assorbita dalla rete: 250VA

Potenza massima in uscita: 40W/1500 Ohm

Frequenza in uscita: spettro in frequenze da 4 MHz a 64 MHz (spettro brevettato)

Grado di protezione contro ingresso di liquidi: IPX0

2.4 Test svolti

Ogni sperimentazione è stata effettuata utilizzando 20 Petri di diametro 35 mm, suddivise in due gruppi: “stimolate”, a cui viene effettivamente applicato il trattamento, e “controlli”, utilizzate come confronto. Ogni stimolazione, applicata una volta al giorno, ha avuto una durata di 10 minuti ed una potenza nominale impostata a 50, corrispondente in valore efficace ad una tensione di 91,1 V, una corrente di 0,072 A, per una potenza efficace di 6,56 W.

Le stimolazioni avvengono all'interno di una cappa a flusso laminare, sterilizzata inizialmente tramite ultravioletti.

La Petri va posizionata sopra l'elettrodo adesivo di terra, mentre all'interno della stessa si posiziona l'elettrodo di stimolazione, direttamente a contatto con il terreno di coltura. Dopo ogni stimolazione, le Petri vengono riposte nell'incubatore, con condizioni ideali per la riproduzione cellulare. Tale incubatore mantiene una temperatura di 36,5 °C ed una concentrazione di anidride carbonica del 5%. Le condizioni delle Petri vengono mantenute costanti per tutta la durata del trattamento. Quando necessario, in generale al terzo giorno, si rinfresca il terreno di coltura.

All'inizio ed alla fine del periodo di stimolazione le cellule vengono fotografate tramite fotocamera CCD applicata ad un microscopio Nikon Eclipse 80i in campo chiaro, che fornisce un ingrandimento di 40x, su tali foto è stato poi effettuato il conteggio delle cellule presenti.

Per ogni test sono quindi necessari:

- 20 Petri da 35 mm di diametro l'una, contenenti cellule H4 e terreno di coltura;
- Dispositivo Rexon-age con opportuni elettrodi;
- Cappa a flusso laminare;
- Incubatore ;
- Microscopio ottico.

2.4.1 Primo test

Il primo test ha previsto un periodo di trattamento di pochi giorni ed è stato ripetuto, su Petri diverse, in due settimane consecutive. Nella prima settimana la stimolazione è proseguita per 3 giorni, nella seconda per 4 giorni. Le due Petri (stimolata e controllo), identificate come coppia, sono state manipolate sempre insieme in modo da essere sottoposte a sbalzi termici equivalenti. Prima e dopo l'intero periodo del trattamento le cellule sono state fotografate, riprendendo per ogni Petri dieci zone casualmente distribuite.

Protocollo sperimentale:

- Allestimento di 20 Petri contenenti le cellule da analizzare ed il rispettivo terreno di coltura, suddivise in 10 coppie “stimolata/controllo”;
- Monitoraggio delle cellule prima della stimolazione;
- Stimolazione giornaliera, con il Rexion-age regolato a 50 e durata di 10 minuti, delle dieci Petri indicate come “stimolate”, per 3 o 4 giorni;
- Al terzo giorno il terreno viene rinfrescato;
- Monitoraggio delle cellule dopo la stimolazione.

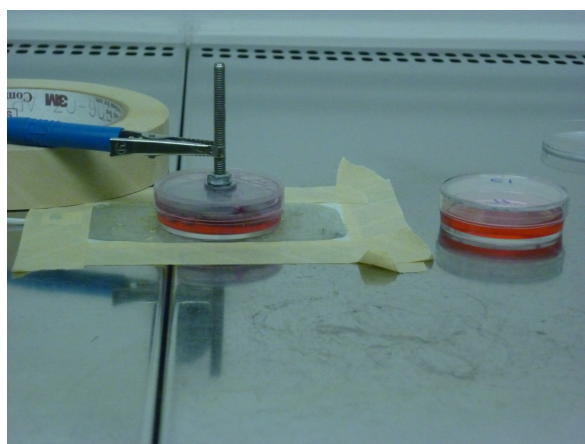


Figura 2.1: Coppia stimolato/controllo sottoposta al trattamento

2.4.2 Secondo test

Il secondo test si è svolto similmente al primo, con la differenza che sono state identificate e segnate sulla Petri 6 zone campione, poi utilizzate per tutte le fotografie ed i relativi conteggi, in modo da poter monitorare lo stesso campo a distanza di 5 giorni. Con questa tipologia di test si ottengono un numero più elevato di campioni da confrontare.

Inoltre, a differenza del precedente test, l'elettrodo viene lasciato giornalmente in immersione per 10 minuti anche nelle Petri segnate come controlli, senza però avviare la stimolazione.

Questo test ha dunque anche lo scopo di verificare se l'eventuale diminuzione del tasso di crescita risulti essere maggiore a causa della presenza di un corpo estraneo, l'elettrodo, che, essendo a contatto col terreno di coltura, potrebbe disturbare la riproduzione delle cellule, al di là dell'applicazione del campo elettrico. Inserendo lo stesso elettrodo anche nei controlli si riduce dunque ulteriormente la differenza tra stimolato e controllo, che resta effettivamente solo il passaggio delle correnti.

Protocollo sperimentale:

- Allestimento di 20 Petri contenenti le cellule da analizzare ed il rispettivo terreno di coltura, suddivise in 10 coppie stimolata/controllo;
- Segnalazione su ognuna delle Petri dei sei campioni scelti;
- Monitoraggio delle cellule nelle 6 zone campione, prima della stimolazione;
- Stimolazione giornaliera, con il Raxon-age regolato a 50 e di durata di dieci minuti, delle dieci Petri indicate come stimolate, per 3 o 4 giorni;
- Immersione giornaliera dell'elettrodo nelle 10 Petri indicate come controlli, dieci minuti l'una per ogni giorno di stimolazione ;
- Al terzo giorno il terreno viene rinfrescato;
- Monitoraggio delle cellule nelle 6 zone campione, dopo la stimolazione.

Tale test viene ripetuto per tre volte con trattamenti della durata di quattro giorni.

La stessa tipologia di test è stata inoltre utilizzata per verificare gli effetti di un trattamento esteso ad un periodo più lungo.

L'obiettivo iniziale era quello di proseguire le stimolazioni per 10 giorni, ma in entrambi i casi le cellule sono risultate quasi completamente a confluenza prima della decima stimolazione. Essendo stato dunque impossibile arrivare a 10 stimolazioni, la stima dei tassi di crescita è stata effettuata dopo 6 giorni di stimolazioni.

2.4.3 Osservazione dei mitocondri

Poiché il trattamento con il Rexon-age agisce sulla struttura delle cellule è possibile che si verifichi in esse un cambiamento morfologico. In particolare una variazione morfologica potrebbe essere riscontrata nei mitocondri, “centrali energetiche” della cellula. Per questo motivo si è ritenuto opportuno osservare eventuali differenze a livello mitocondriale nelle Petri stimolate e nei rispettivi controlli.

Ci si potrebbe aspettare una variazione nella forma dei mitocondri, indicativa di un migliore o peggiore funzionamento degli stessi, oppure un aumento o diminuzione nel numero, indicativo rispettivamente di una aumentata o diminuita attività metabolica della cellula.

Sono state prese 20 immagini per ognuna delle quattro Petri considerate. L’ingrandimento è di 63x ed i mitocondri risultano visibili grazie ad un apposito tracciante per mitocondri.

Si riporta di seguito, a titolo di esempio, un’immagine in cui sono visibili i mitocondri di una cellula in una Petri controllo.

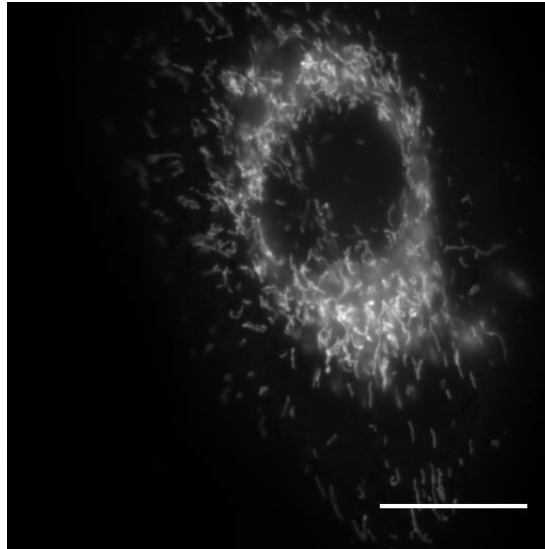


Figura 2.2: Cellula in cui sono visibili i mitocondri (scale bar = 10 μm)

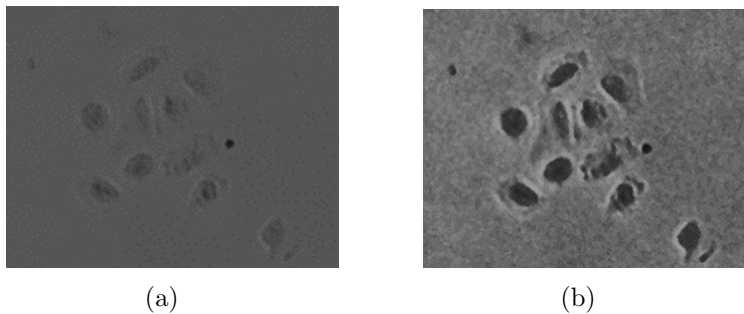
3

Risultati

3.1 Elaborazione dati

Per rendere più semplice ed accurata la conta delle cellule, l'immagine è stata migliorata tramite filtri sw realizzati in *Matlab* volti ad aumentare il contrasto, in modo da poter distinguere più chiaramente i nuclei delle singole cellule.

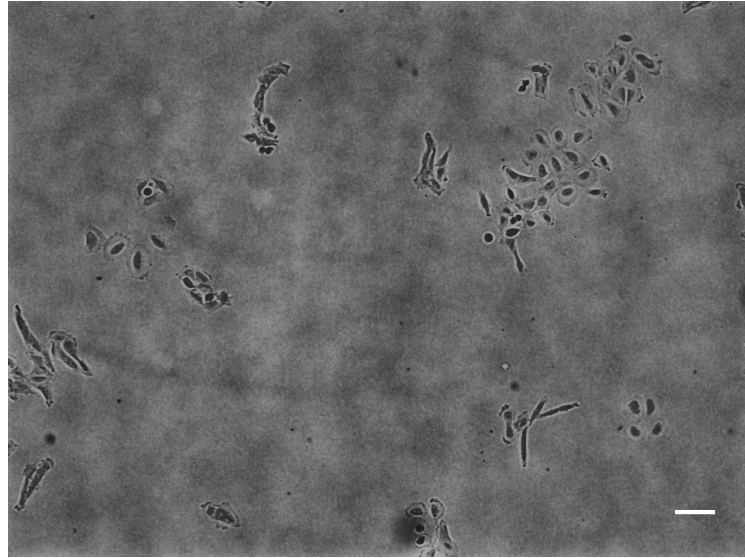
Figura 3.1: Dettaglio prima (a) e dopo (b) l'applicazione del filtro



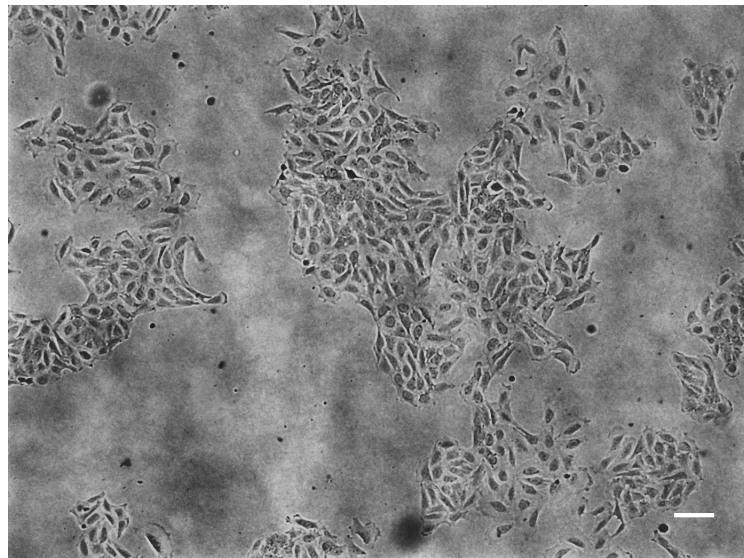
Nelle immagini migliorate si sono poi contate le cellule presenti (prima e dopo i trattamenti), con l'aiuto del programma *ImageJ*.

A titolo di esempio si riportano a pagina seguente due immagini appartenenti alla stessa Petri controllo, prese una all'inizio del trattamento ed una alla fine, cioè dopo 5 giorni. La scala è indicata con la barra in basso a destra, corrispondente a $100 \mu\text{m}$.

Figura 3.2: Dettaglio prima (a) e dopo (b) il trattamento



(a)



(b)

Successivamente sono stati calcolati i tassi di crescita, secondo la formula:

$$T = \frac{N_f - N_i}{N_i}$$

dove N_f indica il numero di cellule presenti dopo il periodo di trattamento ed N_i il numero di cellule presenti prima dell'inizio del trattamento.

Per valutare la variabilità statistica dei risultati, legata alla variabilità dei tassi di crescita degli n campioni considerati intorno al valore medio x_m , si è considerata la deviazione standard, data da:

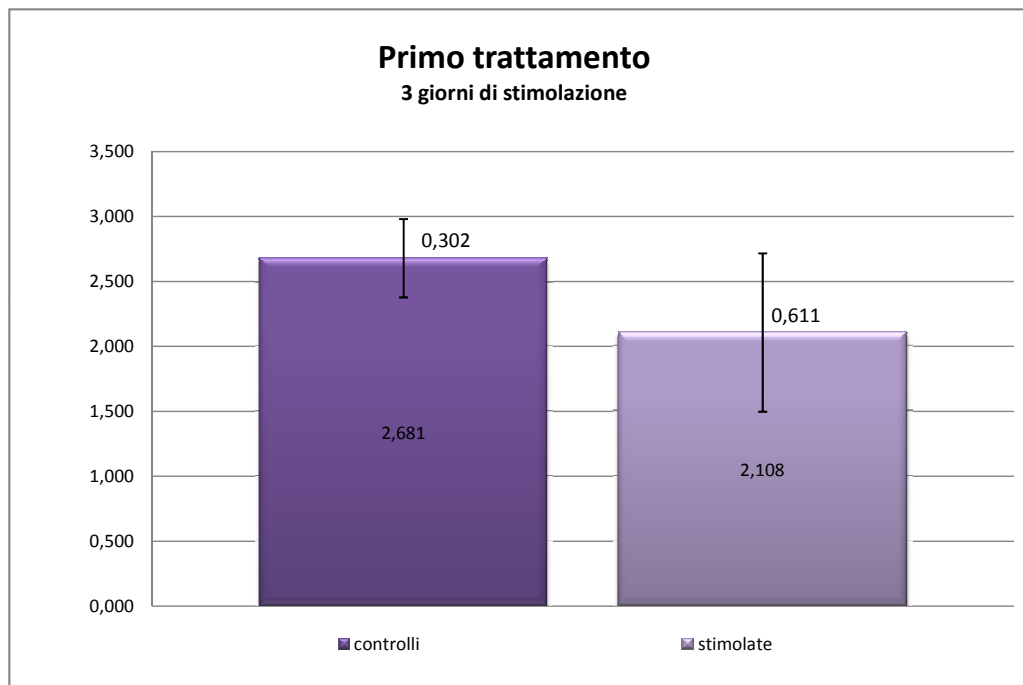
$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_1^n (x_m - x_i)^2}{n}}.$$

3.2 Primo test

Si riportano di seguito gli istogrammi con cui si confrontano i tassi di crescita delle cellule presenti nelle Petri stimolate con quelli delle cellule presenti nelle Petri di controllo.

Nella valutazione dei tassi di crescita alcune Petri sono state escluse in quanto presentavano un livello di accrescimento negativo, che denotava una morte cellulare non collegabile alla sperimentazione in corso.

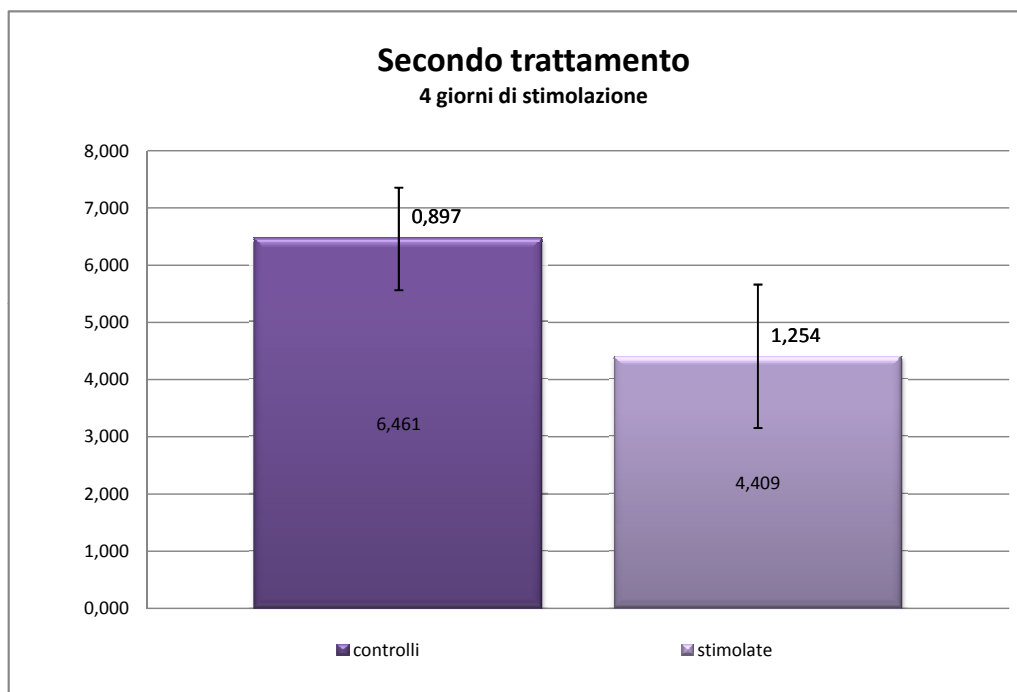
Primo trattamento



Dopo 4 giorni dalla data in cui sono state prese le prime immagini, le cellule presenti nei controlli sono aumentate del 268,1 %, mentre quelle delle Petri stimolate del 210,8 %. Si nota quindi una diminuzione nel tasso di crescita delle Petri stimolate.

La deviazione standard per le stimolate è circa doppia rispetto a quella dei controlli, pari a 0,611 su una media di 2,108, ed associa alla stima un'incertezza abbastanza elevata. La differenza tra i due tassi di crescita pari a 0,573, pur non essendo molto grande, risulta abbastanza significativa, anche rispetto al valore della deviazione standard.

Secondo trattamento

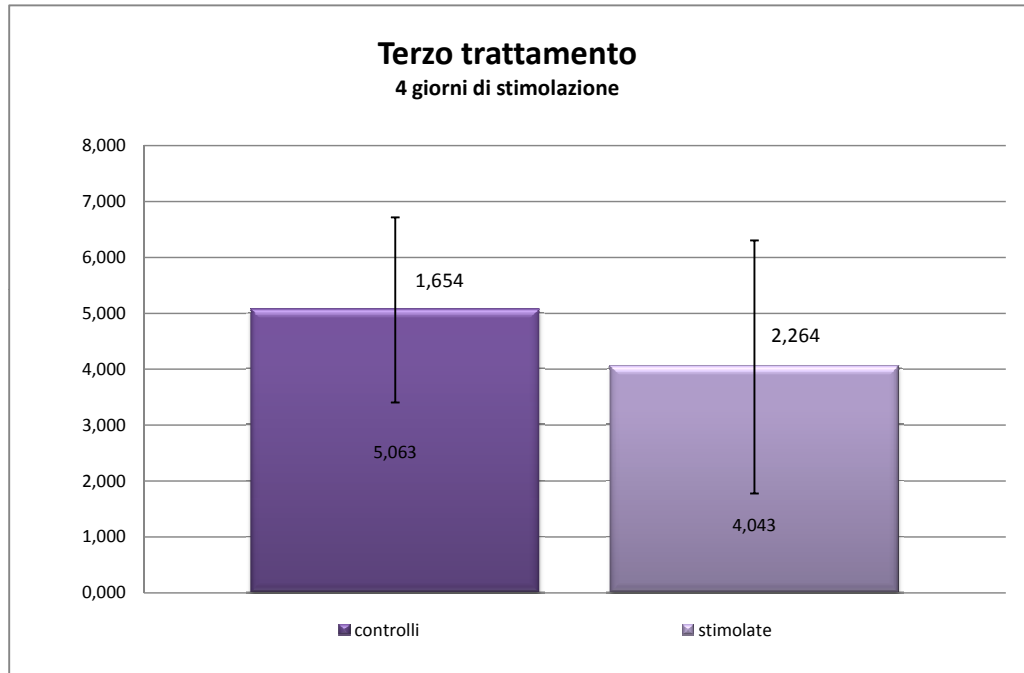


Dopo 5 giorni dalla data in cui sono state prese le prime immagini, le cellule presenti nei controlli sono aumentate del 646,1 %, mentre quelle delle Petri stimulate del 440,9%. Una diminuzione del tasso di crescita è quindi effettivamente presente e risulta maggiore rispetto al precedente trattamento, che prevedeva una stimolazione protratta per un giorno in meno.

Anche in questo caso la deviazione standard risulta maggiore nelle stimulate, ma ancora, pur tenendo presente tale variabilità, la differenza tra i due tassi di crescita, pari a 2,052, è abbastanza significativa.

3.3 Secondo test

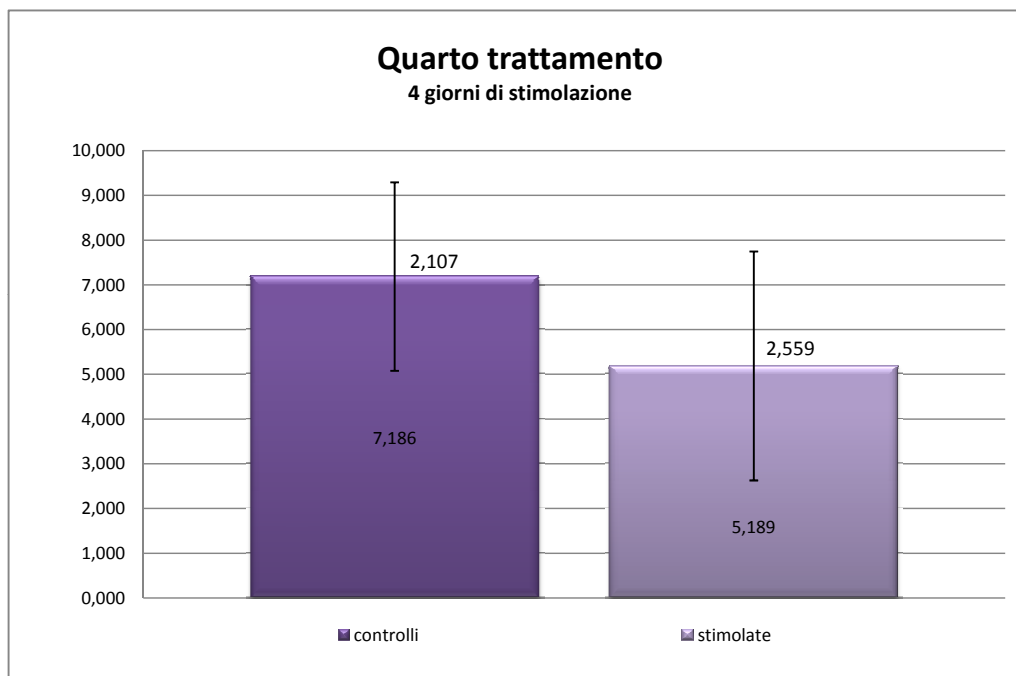
Terzo trattamento



Dopo 5 giorni dalla data in cui sono state prese le prime immagini, le cellule presenti nei controlli sono aumentate del 506,3%, mentre quelle delle Petri stimulate del 404,3%. Si osserva quindi una differenza nei tassi di crescita pari a 1,02.

La deviazione standard risulta però molto elevata, soprattutto nelle stimulate, e questo rende meno significativa tale diminuzione.

Quarto trattamento



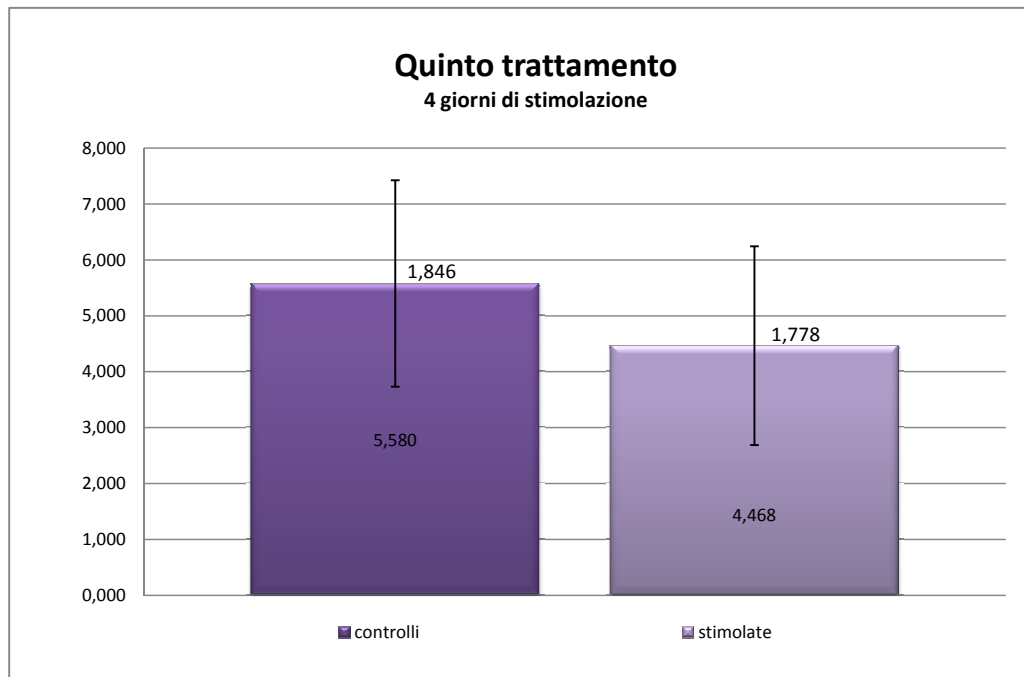
Dopo 5 giorni dalla data in cui sono state prese le prime immagini, le cellule presenti nei controlli sono aumentate del 718,6%, mentre quelle delle Petri stimulate del 518,9%.

Anche in questo caso quindi si osserva una diminuzione nel tasso di crescita delle Petri stimulate rispetto ai controlli e, come nel precedente trattamento, la misura è associata ad un'elevata deviazione standard.

La differenza tra i tassi di crescita è abbastanza grande, essendo pari a 1,997.

Quinto trattamento

In questo test le Petri utilizzate erano in numero inferiore rispetto ai precedenti, in quanto due coppie sono state utilizzate per l'osservazione dei mitocondri.

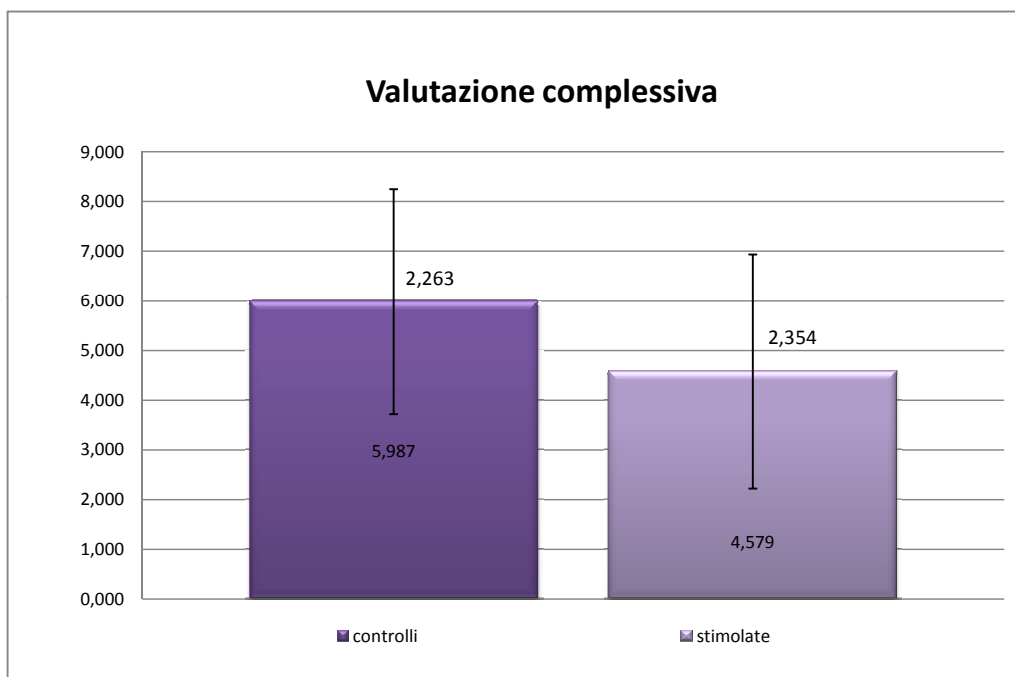


Per la media finale sono stati esclusi alcuni campioni, in particolar modo due campioni che presentavano un tasso di crescita straordinariamente elevato e che se inseriti avrebbero fatto circa raddoppiare la deviazione standard e quindi compromesso e svalutato i risultati.

La deviazione standard resta comunque abbastanza elevata, come nei test precedenti, e si nota una diminuzione del tasso di crescita pari a 1,112, essendo presente una crescita del 558% nei controlli e del 446,8% nelle stimulate.

Valutazione complessiva

Si riporta infine l'istogramma complessivo con la media dei tassi di crescita dei campioni degli ultimi tre trattamenti.



I dati sperimentali evidenziano una diminuzione nei tassi di crescita delle cellule stimulate anche se con una deviazione standard elevata (tipica delle analisi su sistemi biologici).

La deviazione standard di stimulate e controlli risulta simile, grazie al numero elevato di campioni considerati.

3.4 Valutazione del tasso di crescita dopo sei stimolazioni

Una valutazione quantitativa non è stata possibile in quanto le Petri si presentavano a confluenza o quasi a confluenza in tutti i campioni considerati. Si è però potuto notare che, a 9 giorni dalla data delle prime immagini, le basi delle Petri controlli erano ricoperte da uno strato compatto di cellule, mentre una parte delle stimulate, sebbene piccola, non risultava ancora completamente a confluenza.

3.5 Osservazione dei mitocondri

Dall'osservazione delle immagini non è stata rilevata alcuna differenza significativa tra cellule sottoposte al trattamento e controlli, né nella forma né nella quantità di mitocondri presenti.

L'applicazione del campo elettrico non causa dunque variazioni nel metabolismo cellulare, che non risulta infatti né danneggiato né aumentato.

4

Conclusioni e commenti

Dai risultati ottenuti con i test volti a valutare l'effetto del Rexon-age sulla proliferazione cellulare, si osserva una diminuzione nel tasso di crescita delle cellule stimolate in tutti e cinque i trattamenti effettuati.

Tale diminuzione è presente sia nei primi due test che negli ultimi tre, non sembra quindi essere strettamente collegata al disturbo introdotto dalla presenza dell'elettrodo; si deduce dunque che sia dovuta effettivamente dall'applicazione del campo elettrico.

Questa diminuzione è però accompagnata da una variabilità statistica rilevante: la deviazione standard è in generale molto elevata, in particolar modo negli ultimi tre test, che prevedevano di considerare singolarmente i campioni calcolandone i tassi di crescita indipendentemente dagli altri.

La variabilità statistica è legata alla procedura adottata, che non consente una valutazione accurata del numero di cellule. Inoltre bisogna ricordare che l'analisi riguarda un sistema biologico, che è quindi influenzato da numerosi fattori non direttamente controllabili. È normale quindi che i campioni abbiano tassi di crescita anche molto diversi tra loro, e ciò porta ad avere una deviazione standard alta.

La correlazione fra l'applicazione della terapia e la diminuzione del tasso di crescita sembra comunque confermata in tutti i test.

Essendo questa una valutazione statistica sarebbe opportuno effettuare ulteriori test volti a diminuire per quanto possibile, la variabilità. Si potrebbe ad esempio utilizzare la prima tipologia di test su un numero maggiore di campioni, in modo da ricoprire con le foto una maggior superficie della Petri.

Per quanto riguarda gli effetti di una stimolazione prolungata, sarebbe necessaria una valutazione accurata, che, partendo da un numero minore di

cellule iniziali, permetta di calcolare i tassi di crescita dopo 10- 15 giorni di trattamento, prima della confluenza.

Prospettive future

I test svolti fino ad oggi sono solo l'inizio della sperimentazione che ha il fine di valutare l'azione del Raxon-age su cellule di astrocitoma umano, cercando l'eventuale legame tra diminuzione del tasso di proliferazione di tali cellule e loro esposizione a campi elettrici variabili secondo i parametri determinati in base alla teoria della risonanza quantica molecolare.

Questo studio si articolerà dunque con altre sperimentazioni che testeranno potenze efficaci più elevate, fino a 17,88 W (potenza nominale di 70) e periodi più lunghi di terapia.

Bibliografia

- [1] Adey WR (1993), “Biological Effects of Electromagnetic Fields” *Journal of Cellular Biochemistry* 51:410-416.
- [2] Dutta SK, Subramoniam A, Ghosh B, Parshad R (1984): “Microwave Radiation-Induced Calcium Ion Efflux from Human Neuroblastoma Cells in Culture”. *Bioelectromagnetics* 5: 71-78
- [3] French PW, Donnellan M, McKenzie DR (1997), “Electromagnetic radiation at 835 MHz changes the morphology and inhibits proliferation of a human astrocytoma cell line” *Bioelectrochem & Bioenerg.* 43: 13-18
- [4] Kirson ED, Gurvich Z, Schneiderman R, Dekel E, Itzhaki A, Wasserman Y, Schatzberger R, Palti Y, (2004), “Disruption of cancer cell replication by alternating electric fields”
- [5] Litovitz TA, Krause D, Penafiel M, Elson EC, Mullins JM (1993) “The role of coherence time in the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity”
- [6] Frank W. Pfrieder (2002), “ Role of glia in synapse development”
- [7] Prof. Luigi Corti, Ing. Gianantonio Pozzato, “Risonanza Quantica Molecolare e le sue applicazioni cliniche”
- [8] Prof. Carlo Reggiani(2005), “Effetti di correnti ad alta frequenza e bassa intensità: biostimolazione e rigenerazione cellulare”
- [9] Prof. Carlo Reggiani (2007), “Comments on Vesalius and Rexionage, two applications of high frequency electrical fields, and preliminary experimental results”
- [10] Prof. Carlo Reggiani (2009), “Biophysical effects of high frequency electrical field (4-64 MHz) on muscle fibers in culture”, *Basic & Applied Myology*: 49

- [11] Maria Rosaria Scarfi, “Effetti biologici dei campi elettromagnetici nella sperimentazione in vitro”
- [12] “Classificazione Internazionale delle malattie per l’Oncologia”, Terza edizione, copyright 2000, WHO
- [13] “Principi di medicina interna”, Harrison, edizione El sevier
- [14] “Le basi patologiche delle malattie”, Robbins e Cotran, edizione Mcgrow Hill
- [15] Sito dell’azienda: www.rexon-age.it
- [16] Sito dell’azienda: www.vesalius.it