

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Ingegneria
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Tesi di Laurea

PROVE SPERIMENTALI DI ELETTRODI INNOVATIVI PER L'ELETTROPORAZIONE DI TESSUTI

Relatore: Ch.mo Prof. Fabrizio Dughiero

Correlatore: Ing. Elisabetta Sieni

Laureanda: Fabiana Federica Ferro

Anno Accademico 2013 – 2014

SOMMARIO

1 INTRODUZIONE	5
1.1 Definizioni e concetti base dell'elettrochemioterapia.....	5
1.2 Applicazioni dell'elettroporazione.....	6
2 EFFETTI DEL CAMPO ELETTRICO.....	9
2.1 Effetti sull'uomo.....	9
2.2 Effetti sui vegetali.....	10
2.2.1 Modello circuitale equivalente della cellula vegetale.....	11
2.2.2 Considerazioni sulle variazioni delle proprietà elettriche.....	13
2.3 Effetti sulle patate: reazioni metaboliche.....	15
2.4 Lugol.....	17
2.5 Rosso di Rutenio.....	18
2.6 Blu di Metilene.....	19
3 APPARECCHIATURA UTILIZZATA NEGLI ESPERIMENTI	
.....	19
3.1 Elettrodo a maglia	19
3.2 Periferica di connessione degli elettrodi.....	21
3.3 Generatore di impulsi.....	22
3.3.1 Impulsi di tensione mancanti.....	23
3.4 Schema del trattamento.....	23
4 PROVE SPERIMENTALI.....	25
4.1 Procedimento delle prove.....	25
4.1.1 Prove su tessuto di patata.....	26
4.1.2 Prove al microscopio ottico.....	26
4.1.3 Prova in vitro.....	26
4.2 Risultati sperimentali.....	27
4.2.1 Elettrodo da 1 cm.....	28
4.2.2 Elettrodo da 2 cm.....	32
4.2.3 Elettrodo da 2.5 cm.....	36

4.2.4 Elettrodo da 3 cm.....	42
4.2.5 Considerazioni riassuntive.....	46
4.3 Punto di vista microscopico.....	48
5.2.1 Patata non elettroporata.....	48
4.3.1 Patata elettroporata.....	51
4.3.2 Confronto di tessuto elettroporato e non elettroporato.....	52
4.3.3 Patata elettroporata con 10 impulsi da 1000V e aghi da 1 cm.....	52
1.3.1 Patata elettroporata con 10 impulsi da 2000V e aghi da 2 cm.....	54
1.3.2 Patata elettroporata con 30 impulsi da 1000V e aghi da 2 cm.....	56
4.3.4 Patata elettroporata con 10 impulsi da 3000V e aghi da 3 cm.....	58
5 CONSIDERAZIONI SUI RISULTATI.....	60
5.1 Dati numerici ottenuti tramite il software per elaborazione dati.....	61
5.2 Simulazioni tramite Flux.....	65
5.3 Analisi dei grafici del campo elettrico.....	68
5.3.1 Andamento lungo l'asse delle ascisse.....	70
5.3.2 Confronto elettrodi 1 cm e 2 cm.....	78
5.3.3 Andamento a seconda della profondità.....	82
5.3.4 Considerazioni sulle correnti di dispersione.....	87
6 PROVA IN VITRO.....	91
7 CONCLUSIONI.....	95
8 BIBLIOGRAFIA.....	97

RINGRAZIAMENTI

Un sentito ringraziamento va all'Ing. Elisabetta Sieni per avermi costantemente seguita nello sviluppo di questo elaborato e al prof. Fabrizio Dughiero per avermi dato la possibilità di fare questa tesi.

Ringrazio la dott.ssa Alessia Ongaro e la dott.ssa Agnese Pellati del Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e medicina sperimentale dell'Università di Ferrara per avermi permesso di testare alcuni elettrodi su cellule coltivate in vitro.

Ringrazio Igea S.p.A. per aver fornito un prototipo di generatore per l'ECT a onda quadra necessario per le prove.

Ringrazio la dott.ssa Alessandra Bartolozzi del Dipartimento di Ingegneria Industriale di Padova per avermi permesso di analizzare al microscopio i campioni di patata elettroporati.

Padova, Novembre 2013

Fabiana Federica Ferro

1 INTRODUZIONE

1.1 Definizioni e concetti base dell'elettrochemioterapia

L'elettrochemioterapia (ECT) è una tecnica per il trattamento di alcuni tipi di tumori che combinano l'azione di un farmaco citotossico, che normalmente non riesce a penetrare la membrana cellulare, con degli impulsi elettrici di adeguata intensità e frequenza. La funzione di questi impulsi è di permeabilizzare localmente e temporaneamente la membrana delle cellule così da incrementare il rilascio del farmaco all'interno della cellula, aumentandone la citotossicità. Questa tecnica è particolarmente utile nel caso di farmaci per cui la membrana plasmatica rappresenta una barriera che ne limita l'ingresso all'interno della cellula. Gli impulsi elettrici sono quindi solo un mezzo per il rilascio del farmaco all'interno della cellula, che deve essere già presente nelle vicinanze.

L'elettrochemioterapia fa uso dell'elettroporazione reversibile in quanto gli impulsi devono essere tali da non danneggiare permanentemente le cellule: se l'intensità del campo elettrico è troppo al di sopra del livello di soglia di permeabilizzazione, lo stato di permeabilizzazione è irreversibile e si ha la distruzione delle cellule. A tal proposito la combinazione dei parametri degli impulsi utilizzata normalmente in clinica è quella definita dall'ESOPE (*European Standard Operating Procedures for Electrochemotherapy*), che prevede la scarica di 8 impulsi a 5kHz della durata di 100 μ s ciascuno e dell'ampiezza di 1000 V/cm.

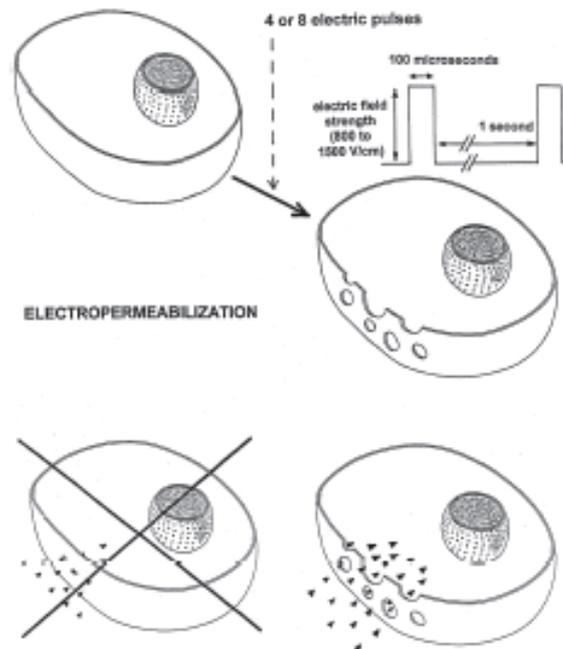


Figura 1.1 meccanismi dell'elettrochemioterapia

Nella parte alta di Figura 1.1 sono messi in evidenza i parametri che rendono possibile la permeabilizzazione della membrana (dai 4 agli 8 impulsi della durata di $100\mu\text{s}$ che generano un campo elettrico d'intensità tra gli 800 e i 1500 V/cm), mentre in basso vi è una schematizzazione dei meccanismi che caratterizzano l'ECT: farmaci come la bleomicina da soli non riescono ad attraversare la membrana plasmatica delle cellule intatte, riescono invece ad entrare all'interno delle cellule se vi sono zone in cui la membrana è stata elettropermeabilizzata.

Va sottolineato il fatto che i cambiamenti che avvengono a livello di membrana non sono ancora ben conosciuti, per cui la comparsa di pori rappresentata in Figura 1.1 è solo un modo puramente schematico di descrivere il fenomeno [1]. Vi sono infatti due teorie:

1. Secondo quella più accreditata vi è la generazione di pori idrofilici responsabili del trasporto di molecole attraverso la membrana,
2. L'altra teoria ritiene invece che l'ordine del doppio strato lipidico viene perso a causa dell'aumento del potenziale di transmembrana. L'acqua può quindi entrare all'interno della cellula, e con essa le molecole idrofiliche come la bleomicina. [2]

1.2 Applicazioni dell'elettroporazione

L'elettroporazione permette quindi di creare dei “fori” nella membrana cellulare che, in base ai parametri del campo elettrico applicato, può essere reversibile (RE), cioè dopo un certo tempo le cellule tornano nel loro stato iniziale, o irreversibile (IRE), in cui la cellula permane nel suo stato di permeabilità alterata.

L'elettroporazione reversibile, in combinazione con un farmaco che la membrana non riesce ad assorbire, viene utilizzata nell'elettrochemioterapia.

Altre applicazioni terapeutiche dell'elettroporazione reversibile sono:

- L'elettrotrasferimento di grandi molecole, come DNA o RNA, per la terapia genica,
- La vaccinazione mediante DNA,
- L'induzione di una risposta immunitaria nel trattamento delle cellule tumorali durante la ricaduta della malattia,
- La somministrazione *in vivo* di piccoli pezzi di RNA per indurre un meccanismo di silenziamento genico [3].

L'elettroporazione irreversibile viene invece utilizzata nell'ablazione di tessuti superficiali e nella sterilizzazione di alimenti.

In Tabella 1.1 sono riassunte le principali applicazioni del fenomeno dell'elettroporazione, suddivise in base alla reversibilità o irreversibilità del fenomeno stesso.

REVERSIBILE	IRREVERSIBILE
Assorbimento di piccole o grandi molecole, come ad esempio la bleomicina	Ablazione, cioè la rimozione di una parte (di solito superficiale) di tessuti biologici
Nanoporazione, cioè l'applicazione di intensi impulsi elettrici della durata di nanosecondi tramite i quali vengono elettroporate sia la membrana esterna della cellula, sia le membrane degli organelli interni alla cellula	Sterilizzazione, soprattutto in ambito alimentare

Tabella 1.1 Principali applicazioni dell'elettroporazione reversibile e irreversibile.

In Figura 1.2 sono riassunte alcune applicazioni che fanno uso del fenomeno dell'elettroporazione.

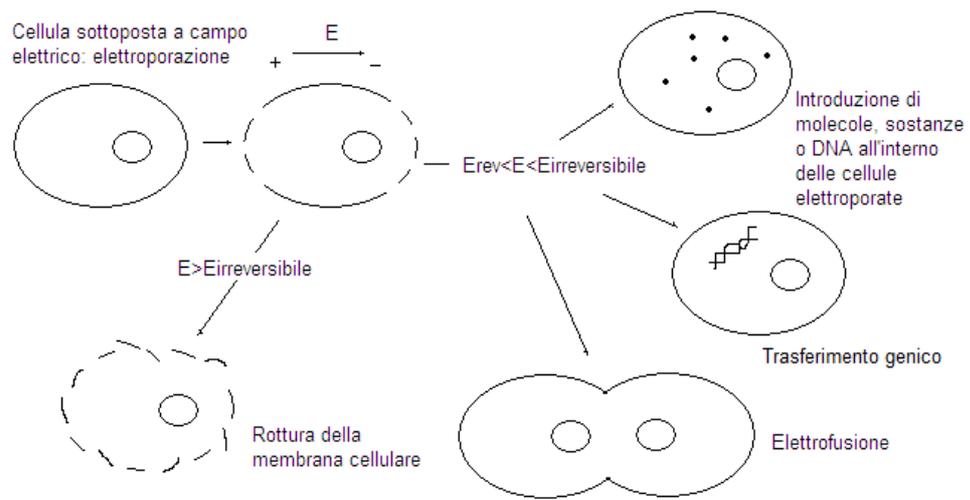


Figura 1.2 Fenomeni che si possono verificare a seguito dell'applicazione di un campo elettrico esterno.

2 EFFETTI DEL CAMPO ELETTRICO

2.1 Effetti sull'uomo

In seguito a studi aventi come obiettivo una più chiara identificazione dei meccanismi patogeni che portano alla distruzione dei tessuti in seguito a lesioni elettriche, si è visto che campi elettrici molto intensi possono danneggiare le cellule. Si suppone che questo danneggiamento possa avvenire attraverso almeno due meccanismi:

- riscaldamento per effetto Joule;
- elettroporazione della membrana.

Nonostante si ritenga che il riscaldamento per effetto Joule sia la causa principale dei danni ai tessuti, esperti del settore hanno osservato delle differenze sostanziali tra tessuti sottoposti a danni termici e tessuti sottoposti a danni elettrici.

L'osservazione dei sintomi dei pazienti che hanno avuto contatti con campi elettrici molto elevati (come la presenza d'intensi spasmi muscolari ed il rilascio di mioglobina nel sistema circolatorio) ha portato a concludere che le cellule dei

muscoli scheletrici e nervosi sono più suscettibili ai danni elettrici. Inoltre, mentre studi sui meccanismi dei danni termici non dimostrano che le cellule più grandi (come quelle scheletriche e nervose) sono più vulnerabili ai danni termici rispetto a quelle più piccole, prove teoriche suggeriscono che questo tipo di cellule sono maggiormente soggette alla rottura della membrana per cause elettriche. Si è quindi preso in considerazione il meccanismo dell'elettroporazione.

L'elettroporazione delle cellule avviene quando si formano dei pori acquosi nel doppio strato lipidico della membrana e se i pori diventano abbastanza larghi, questa si rompe. Il raggio dei pori dipende dall'ampiezza della variazione del potenziale di membrana (normalmente è dell'ordine delle decine di mV) e la rottura è probabile per differenze di potenziale maggiori di 1 V.

La maggior parte dei contatti elettrici producono nei tessuti campi elettrici fino a 100 kV/m d'intensità. Per un dato campo, l'ampiezza della variazione del potenziale di membrana indotto dipende dalla grandezza e l'orientazione della cellula rispetto al campo. Si è verificato che cellule grandi, come quelle dei muscoli scheletrici e quelle nervose, sono particolarmente suscettibili ai danni provocati da lesioni elettriche, mentre le piccole cellule nei tessuti connettivi adiacenti sono molto meno danneggiate. In particolare, studi sulle cellule di topo condotte da Raphael C. Lee ed altri hanno permesso di concludere che i danni prodotti da traumi elettrici possono essere stati causati dall'elettroporazione, spiegando così i cambiamenti nelle proprietà elettriche del muscolo. Si è, infatti, riscontrato che, quando il tessuto muscolare viene esposto a campi elettrici capaci di danneggiare la membrana delle singole cellule, si verifica una riduzione permanente della resistenza longitudinale del muscolo. Questo fenomeno non è inatteso in quanto la membrana cellulare è altamente resistiva se confrontata coi fluidi intracellulari ed extracellulari, aventi proprietà conduttive. La membrana blocca quindi il passaggio di corrente attraverso la cellula e quando la membrana viene distrutta, l'area in cui la corrente può scorrere aumenta e la resistenza diminuisce. [4]

2.2 Effetti sui vegetali

L'elettroporazione è usata anche per il trattamento di tessuti vegetali. Questa tecnica è utilizzata per:

- L'uccisione di microorganismi presenti negli alimenti;
- Migliorare la resistenza dei prodotti ortofrutticoli ai danni provocati dal congelamento;
- Il trasferimento di geni.

Infatti, l'applicazione di campi elettrici pulsati (PEF) a cellule viventi causa l'aumento transitorio della differenza di potenziale della membrana, modificando l'organizzazione plasmatica della membrana e portandola localmente ad uno stato di permeabilizzazione. L'applicazione di PEF può causare danni letali alle cellule o

indurre uno stress permeabilizzandone temporaneamente la membrana producendo quindi un movimento di cariche tra i vari comparti cellulari.

Di norma i processi a cui vengono sottoposti gli alimenti dopo essere stati raccolti riguardano la disattivazione o diminuzione dei processi metabolici. A tal proposito si è visto che sottoporre gli alimenti a stress esterni accresce i livelli antiossidanti del tessuto vegetale.

Lo stress può essere indotto attraverso trattamenti chimici o fisici. I primi però non sono adatti per avere un prodotto alimentare sano, mentre i secondi, caratterizzati da metodi che puntano ad indurre lo stress tramite la variazione di pressione e temperatura, hanno dei procedimenti difficili da essere condotti. L'induzione di stress attraverso l'applicazione di PEF rappresenta un'alternativa industriale per la stimolazione metabolica, essendo l'unica tipologia di stress che induce i suoi effetti primari nella membrana cellulare e che porta ad effetti omogenei nel tessuto trattato.

Molti studi riguardanti la scienza degli alimenti si sono quindi concentrati sugli effetti di trattamenti con impulsi di campi elettrici ad alta intensità (HELP) per la disattivazione di microorganismi presenti nei cibi e per migliorare la rendita o il livello di essiccazione. La permeabilizzazione irreversibile delle membrane cellulari nei tessuti vegetali offre inoltre un ampio spettro di applicazioni in cui è necessaria la distruzione della membrana, tra cui l'espressione, estrazione o diffusione di metaboliti oppure modificare il trasferimento di massa e calore nei prodotti alimentari.

2.2.1 Modello circuitale equivalente della cellula vegetale

La membrana cellulare intatta può essere considerata come un isolante separato da due conduttori in fase acquosa, ovvero può essere modellizzata come un dielettrico tra le facce di un condensatore piano. Considerando un circuito equivalente la membrana può, quindi, essere rappresentata come una capacità connessa in parallelo ad un resistore. Le due fasi acquose all'interno e all'esterno della cellula possono essere introdotte nel circuito come due resistori serie aggiuntivi.

Un'approssimazione di una cellula elementare in un tessuto costituita dai compartimenti extracellulari, la membrana citoplasmatica, il citoplasma, il tonoplasto¹ e il vacuolo produce il circuito equivalente più complesso è mostrato in Figura 2.3.

¹ Sottile membrana, presente nelle cellule vegetali, posta attorno al vacuolo centrale.

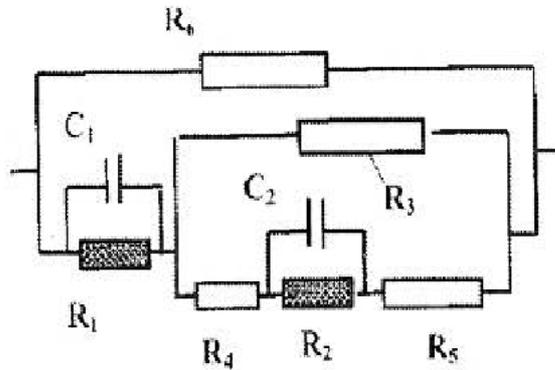


Figura 2.3 Modello circuitale equivalente di una cellula vegetale intatta. R_1 = resistenza della membrana plasmatica, R_2 = resistenza del tonoplasto, C_1 = capacità della membrana plasmatica, C_2 = capacità del tonoplasto, R_3 = resistenza del citoplasma che circonda il vacuolo nella direzione della corrente, R_4 = resistenza del citoplasma nella direzione del vacuolo, R_5 = resistenza interna del vacuolo, R_6 = resistenza dei compartimenti extracellulari.

La rottura completa della membrana citoplasmatica e del tonoplasto riduce il circuito alla connessione in parallelo di tre resistori, che rappresentano gli elettroliti del citoplasma, il vacuolo e i compartimenti extracellulari. Andrebbero poi aggiunte ulteriori resistenze dovute alle disomogeneità del tessuto.

Espandendo poi la modellizzazione all'intero campione di tessuto, quest'ultimo può essere visto come la connessione in serie e parallelo di numerose unità base (cellule) e può essere schematizzato come in Figura 2.4, in cui è rappresentato un campione di lunghezza l composto di n strati in serie di spessore d . Ciascuno strato è costituito da m cellule in parallelo di area media $A_c = ba$, che sono nell'area totale $A = HL$ esposta ad un campo elettrico perpendicolare alla sua superficie [5].

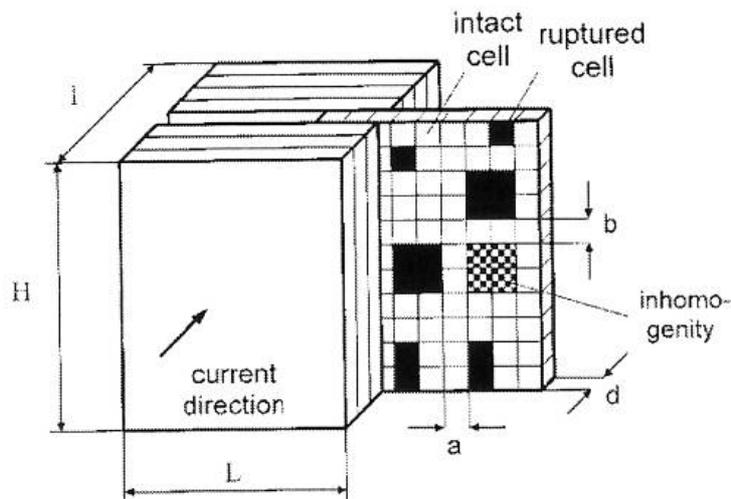


Figura 2.4 Diagramma schematico di strati elementari nei sistemi di tessuti cellulari.

2.2.2 Considerazioni sulle variazioni delle proprietà elettriche

L'applicazione di un campo elettrico esterno può far aumentare il potenziale di membrana delle cellule fino ad un livello critico, che può essere la causa dei cambiamenti locali della struttura di membrana con l'apertura dei pori nella membrana della cellula. Vi è un drastico aumento della permeabilità del tessuto, e questo si riflette in un grande cambiamento della conduttività delle membrane cellulari e, di conseguenza, dei tessuti o delle cellule in sospensione. Infine il processo di carica che avviene alle due facce della membrana è caratterizzato dalla costante di tempo τ , che indica il tempo impiegato da un sistema precedentemente turbato per tornare nel suo stato di equilibrio, e dipende dalla dimensione e conduttività delle cellule, dalla capacità di membrana e dagli elettroliti all'esterno della cellula.

Per capire più nel dettaglio i meccanismi che avvengono in seguito all'elettroporazione A. Angersbach, V. Heinz e D. Knorr eseguirono vari esperimenti su campioni di patata, mela, pesce e colture di cellule in sospensione. In questi studi si è valutata la conducibilità dei tessuti al variare dell'intensità del campo elettrico applicato. Negli esperimenti in cui è stato applicato un campo elettrico non sufficientemente alto da causare l'elettropermeabilizzazione della membrana, la conduttività è rimasta al suo valore più basso e conseguentemente la densità di corrente e la forza del campo elettrico hanno seguito un andamento esponenziale decrescente con costante di tempo τ più elevato rispetto ai casi in cui l'intensità del campo elettrico applicato era tale da causare l'elettropermeabilizzazione della membrana.

Per impulsi sufficientemente forti da causare la rottura permanente della membrana cellulare si è invece riscontrato che il campo elettrico E decade esponenzialmente con costante di tempo molto piccola ($200 \mu\text{s}$ invece dei 3 s calcolati nel caso in cui l'elettropermeabilizzazione non avveniva) e che la conduttività totale del campione è aumentata come risultato della permeabilizzazione delle membrane cellulari.

In particolare, in Figura 2.5 è messo in evidenza l'andamento temporale nei primi $8 \mu\text{s}$ della densità di corrente in un campione di patata in seguito all'applicazione di un campo elettrico di 66 V/cm .

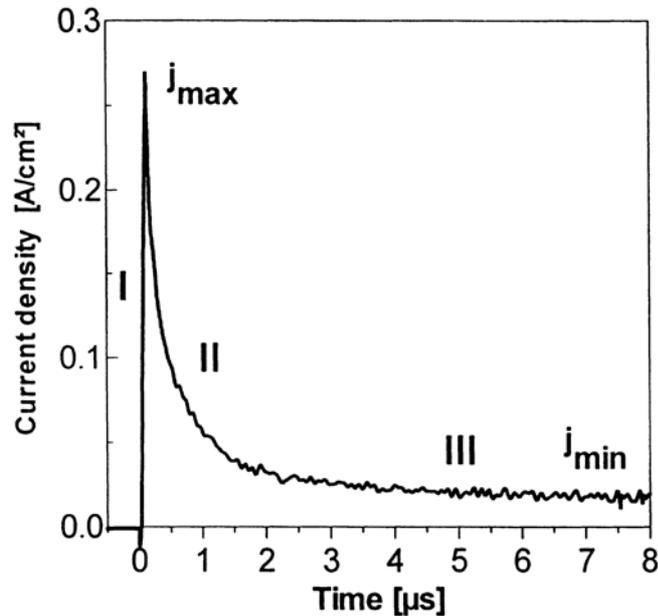


Figura 2.5 andamento temporale della densità di corrente in un campione di patata cilindrico nei primi 8 μs di un impulso dell'intensità di 66 V/cm.

Nel caso in esame l'elettroporazione non avviene e si può notare che, attraverso l'applicazione di campi elettrici al di sotto della soglia critica, le proprietà dielettriche della membrana vengono chiaramente evidenziate dall'andamento esponenziale decrescente della corrente nelle cellule entro i primi microsecondi. Questo andamento può essere diviso in tre periodi, che sono evidenziati in Figura 2.5 coi numeri romani:

1. nel primo periodo la polarizzazione elettrica e la carica della pseudo-capacità causa una rapida formazione della corrente di picco j_{max} (periodo I),
2. durante il secondo periodo (II) gli effetti di polarizzazione derivano dall'accumulazione di carica nell'interfaccia delle membrane intatte (effetto Maxwell-Wagner),
3. nel terzo periodo (III) il processo di polarizzazione è terminato, la densità di corrente elettrica decresce fino al valore minimo j_{min} e quando E_0 è costante rimane costante anche j_{min} .

Applicando invece un campo elettrico intenso abbastanza da causare l'elettroporazione irreversibile delle cellule ($E_0 = 880\text{V/cm}$ nel caso di Figura 2.6), la corrente che attraversa i campioni presenta una deviazione dal decadimento esponenziale a $0.4\mu\text{s}$ a testimonianza dell'avvenuto crollo elettrico nella membrana cellulare.

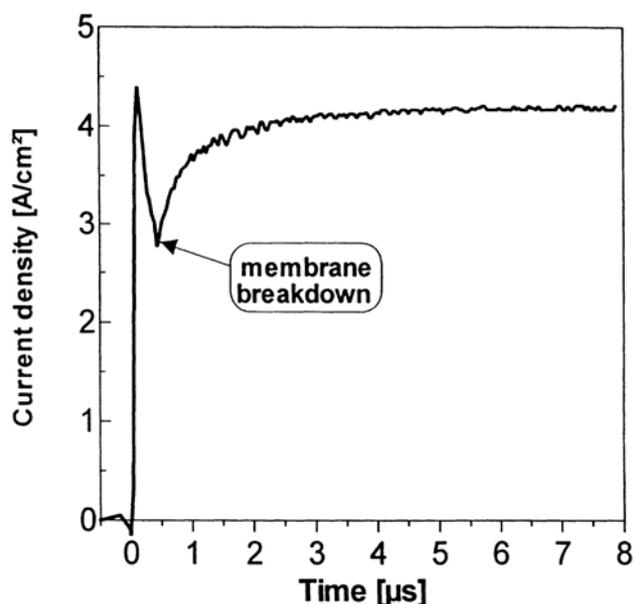


Figura 2.6 andamento temporale della densità di corrente in un campione di patata cilindrico nei primi 8 μs di un impulso dell'intensità di 880 V/cm.

Il processo di carica è seguito da una rapida crescita della corrente di membrana che è causata dalla rottura e la formazione di membrane dalla conduttanza molto elevata, avviata dal campo elettrico critico e sopra critico. Con l'aumento del campo elettrico applicato, il tempo di carica che porta alla rottura della membrana si riduce e la velocità di ingrandimento e l'area totale dei pori nella membrana aumenta. Tutto ciò si riflette nell'aumento della conduttività dei campioni dopo l'apparente permeabilizzazione della membrana.

In questo studio si è poi osservato che, nonostante la teoria classica sull'elettroporazione assuma che la caduta di potenziale avvenga nell'intervallo critico o sopra critico, aumentando il campo elettrico esterno vi è la tendenza ad un aumento della tensione di breakdown, ovvero del massimo potenziale elettrico di transmembrana, oltre il quale si ha la rottura della membrana [6].

2.3 Effetti sulle patate: reazioni metaboliche

Da un punto di vista biologico, i trattamenti industriali a cui vengono sottoposti i tessuti vegetali, come l'affettare, il congelare, seccare e shock termici, sono fonte di stress e possono portare a cambiamenti della composizione e struttura delle cellule. In particolare l'azione di elicitore² o il taglio meccanico provocano una rapida reticolazione ossidativa delle proteine di membrana mediata dalla molecola H_2O_2 .

Da molti studi sugli effetti provocati dall'applicazione di impulsi di campi elettrici si è riscontrato che questi inducono stress ed influenzano i processi metabolici nelle

² agenti in grado di indurre nella pianta la biosintesi di metaboliti implicati nelle risposte difensive.

cellule superstiti. Trattamenti con PEF causano, infatti, un aumento transitorio del potenziale di transmembrana, modificando l'organizzazione della membrana plasmatica e portandola localmente ad uno stato permeabilizzato. Per capire meglio i meccanismi in gioco, sono stati condotti esperimenti su campioni di patate a cui era stato applicato il colorante fluorescente FM1-43.

FM1-43 è una molecola anfipatica³, ha una coda lipofila e una testa carica positivamente e si distribuisce in maniera reversibile nel lato esterno della membrana cellulare. La caratteristica più importante di questa molecola è la coda perché è ciò che permette al colorante di entrare nella membrana plasmatica e l'interazione della coda è ciò che causa il cambiamento della luminosità della molecola opportunamente stimolata. Quest'ultima è debole in ambienti acquosi ed aumenta di due ordini di magnitudine interagendo con lo strato lipidico della membrana.

Si è potuto notare una riduzione della fluorescenza nella membrana plasmatica già 30 secondi dopo l'applicazione di impulsi tra i 200 e i 500 V/cm, e dopo tre minuti la riduzione era già del 60%. Quando il campo elettrico era di 100 V/cm, la riduzione nell'assorbimento da parte della membrana cellulare di FM1-43 era meno pronunciato. Questi risultati suggeriscono che, dopo l'elettroporazione, è diminuita la diffusione del colorante verso la membrana cellulare. Il meccanismo molecolare che porta a questo fenomeno potrebbe coinvolgere l' H_2O_2 prodotta dalle perossidasi⁴ e ad accreditare questa teoria è la rapida esplosione nella produzione di H_2O_2 riscontrata nelle cellule vegetali dopo trattamenti con elicitatori o reazioni al taglio.

Nell'intervallo di impulsi tra i 200 e i 500 V/cm l'intensità del colorante FM1-43 dopo l'elettropulsazione è indipendente dalla forza del campo elettrico, suggerendo una saturazione del meccanismo con campi maggiori di 100 V/cm. Più in generale si sono notate reazioni diverse nei campioni di patata a seconda delle varie combinazioni di durata, intensità e numero di impulsi [7].

³ contiene cioè gruppi sia idrofobi che idrofili.

⁴ enzimi che utilizzano accettori di elettroni

1 LE VARIE TIPOLOGIE DI COLORANTI

Per comprendere i meccanismi che avvengono nei tessuti elettroporati si possono utilizzare dei coloranti che, a seconda della loro composizione chimica e delle loro caratteristiche, mettono in luce aspetti diversi della cellula. Nei paragrafi sottostanti è riportato un elenco che descrive brevemente alcuni coloranti.

2.4 Lugol

Il reattivo di Lugol è una soluzione utilizzata nei laboratori di biologia come colorante per marcare alcune strutture cellulari durante l'osservazione microscopica o

per il riconoscimento della presenza di amido.

Lo ione I_3^- presente nel colorante reagisce con una delle specie molecolari presenti nell'amido, legandosi alla parte interna della catena elicoidale dello stesso. Il complesso risultante assorbe la luce, producendo una colorazione verso il blu scuro⁵.

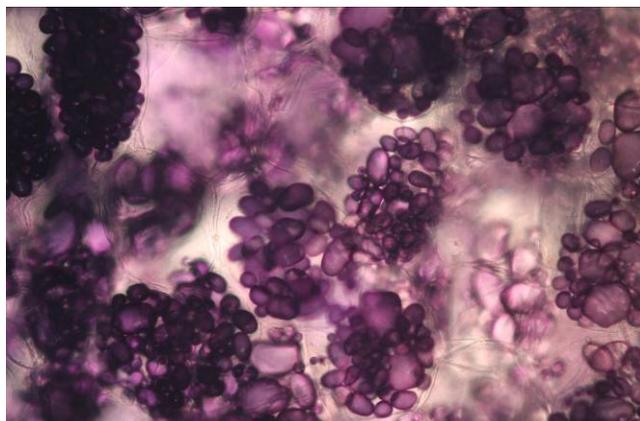


Figura 2.7 Immagine al microscopio di una patata elettroporata e poi trattata con Lugol, in cui si può notare una colorazione molto più intensa dell'amido.

2.5 Rosso di Rutenio

Il Rutenio Rosso è un colorante inorganico cationico⁶ che marca qualsiasi sito carico negativamente con cui entra in contatto. Viene usato in biologia per evidenziare la presenza di emicellulose (polisaccaridi) e pectine (eteropolissaridi) colorando la parete cellulare vegetale di rosa⁷.

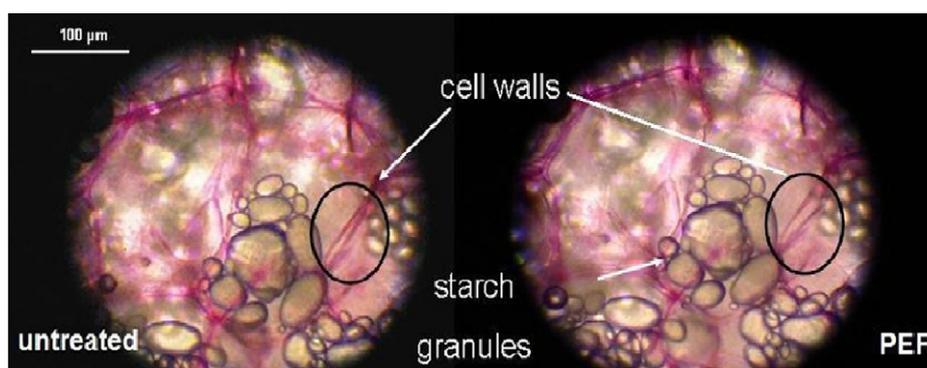


Figura 3.2 Confronto tra il tessuto di una patata elettroporata e una non, colorati col rosso di rutenio [8].

⁵ http://it.wikipedia.org/wiki/Reattivo_di_Lugol

⁶ Un catione è uno ione carico positivamente.

⁷ http://it.wikipedia.org/wiki/Rosso_di_Rutenio

2.6 Blu di Metilene

Il Blu di Metilene è un composto organico che trova impiego in molti campi differenti. In chimica viene utilizzato come indicatore nelle reazioni di ossidazione mentre in istologia viene utilizzato per colorare la membrana, il nucleo e nucleolo delle cellule.

3 APPARECCHIATURA UTILIZZATA NEGLI ESPERIMENTI

3.1 Elettrodo a maglia

L'elettrodo a maglia è un dispositivo che rende più pratico il trattamento di elettrochemioterapia su tumori cutanei e sottocutanei localizzati. Attualmente vengono infatti utilizzati elettrodi ad aghi disposti ad esagono distanti fra loro 7.3 mm adatti a trattare tumori di area di 1-2 cm². Nel caso il tumore sia più esteso, il medico deve spostare ripetutamente l'elettrodo elettroporando piccole porzioni di tessuto alla volta. Con l'elettrodo a maglia si è così pensato di accostare opportunamente più gruppi di elettrodi in configurazione esagonale per evitare continue iterazioni del procedimento.

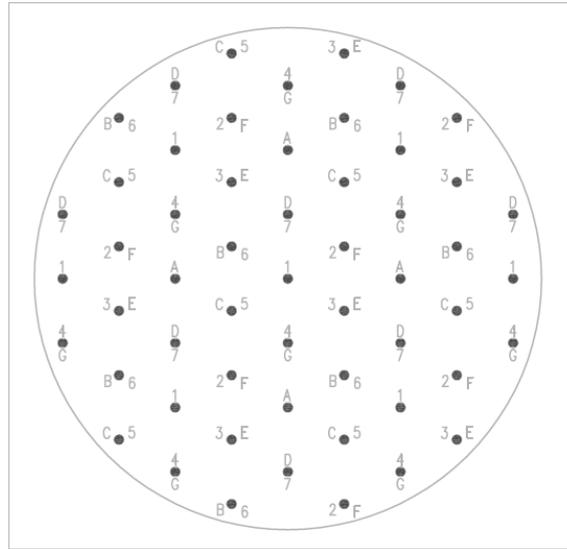


Figura 4.8 esempio di elettrodo a maglia con aghi distanti 1 cm.

In Figura 4 .8 è riportato lo schema di un elettrodo a maglia con aghi distanti 1 cm tra loro in cui si può notare l'accostamento di più gruppi di esagoni.

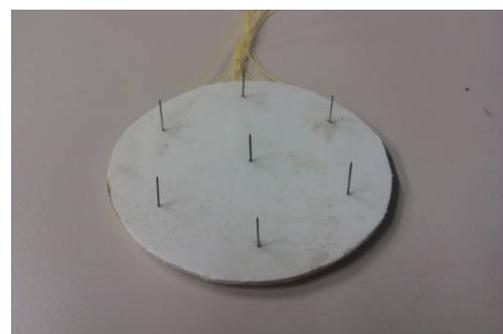
Nelle prove sono stati utilizzati elettrodi con aghi distanti tra loro 1 cm, 2 cm, 2.5 cm e 3 cm realizzati da F.Scandola per la sua tesi di laurea magistrale [10]. Per realizzarli sono stati impiantati degli spilli in acciaio lunghi 15 mm dal diametro di 0.5 mm su una base circolare, del diametro tra i 75 mm e gli 80 mm, di plastica rigida spessa 3 mm. I collegamenti sono stati fatti avvolgendo un filo per wire wrapping a delle pagliette con fori da 4 mm collegate tramite un saldatore a stagno.

In Figura 4 .9 sono riportate le foto dei quattro tipi di elettrodi utilizzati nelle prove.

a.



b.



b.

d.



Figura 4.9 a. Foto degli elettrodi da 3 cm, b. elettrodi da 2.5 cm, c. da 2 cm, d. da 1 cm.

3.2 Periferica di connessione degli elettrodi

In Figura 4.10 è riportata la foto della periferica di connessione seguita da una sua rappresentazione schematica in Figura 4.11.



Figura 4.10 foto della periferica di connessione utilizzata nelle prove

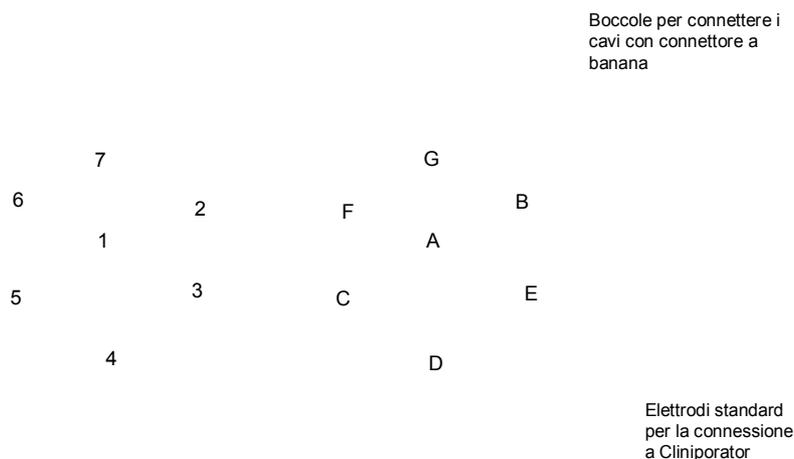


Figura 4.11 schema della piattaforma di connessione degli elettrodi

La periferica di connessione degli elettrodi è interposta tra il generatore e l'elettrodo a maglia ed ha la funzione di alimentare con gli impulsi le diverse coppie di aghi connesse in parallelo.

La sequenza di impulsi applicata è riportata nella Tabella 4.2.

n° impulso	Sequenza impulsi	n° impulso	Sequenza impulsi
1	1 – 2	13	A – B
2	1 – 3	14	A – C
3	1 – 4	15	A – D
4	1 – 5	16	A – E
5	1 – 6	17	A – F
6	1 – 7	18	A – G
7	2 – 3	19	B – C
8	3 – 4	20	C – D
9	4 – 5	21	D – E
10	5 – 6	22	E – F
11	6 – 7	23	F – G
12	7 – 2	24	G – B

Tabella 4.2 sequenza degli impulsi applicata

3.3 Generatore di impulsi

Il generatore d'impulsi utilizzato nelle sperimentazioni è un prototipo fornito da Igea S.p.A. che crea da 10 a 100 impulsi di tensione ad onda quadra fino a 3000V. Nell'utilizzo del generatore si sono identificati alcuni problemi, uno dei quali si è

ripetutamente presentato durante gli esperimenti e viene quindi descritto nel paragrafo che segue.

3.3.1 Impulsi di tensione mancanti

In alcuni casi può accadere che il generatore non riesca a fornire tutti gli impulsi desiderati (Figura 4.12). Questo effetto è più evidente man mano che il numero di impulsi cresce.

Per tenere conto del fatto che possono mancare degli impulsi nelle tabelle riassuntive delle prove degli elettrodi a maglia testati è stato specificato il numero dell'ultimo impulso di tensione che è stato applicato in modo corretto dall'elettroporatore e da cui sono poi stati ricavati i corrispondenti valori di corrente.

Durante le prove la maggior parte dei problemi si sono riscontrati applicando 30 impulsi all'elettrodo con aghi distanti 2 cm ed abbiamo in seguito notato che questo fenomeno era intensificato a causa degli aghi che si erano ossidati.

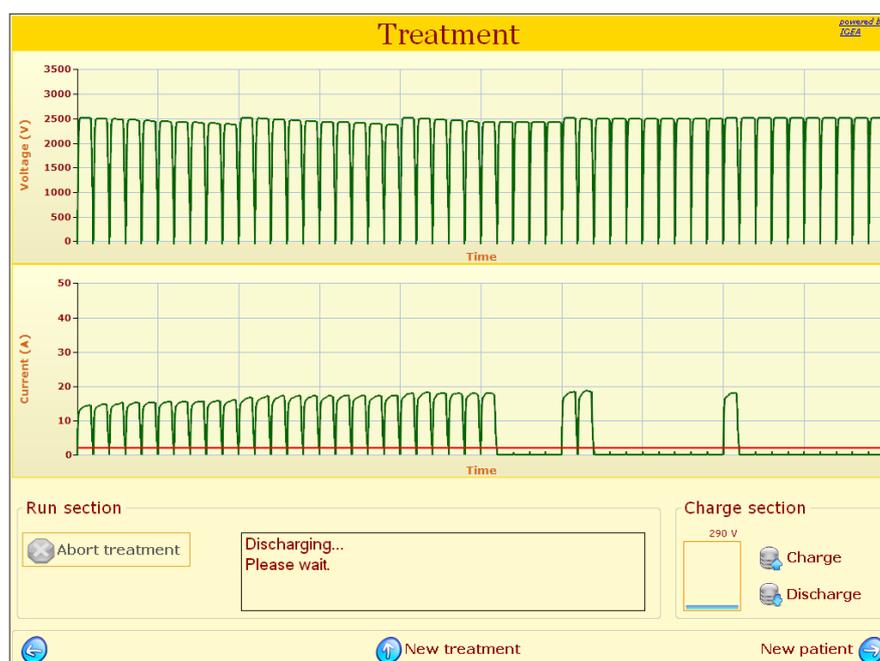


Figura 4.12 Impulsi di tensione mancanti applicando 50 impulsi ad una tensione di 2500 V.

3.4 Schema del trattamento

Il sistema per poter applicare impulsi tramite gli elettrodi a maglia da testare è formata dai seguenti blocchi:

- Generatore d'impulsi,
- Periferica di collegamento degli elettrodi,
- Elettrodo a maglia.

Come si può notare dalla Figura 4.13 il generatore di impulsi è collegato alla periferica di controllo, che a sua volta è collegata all'elettrodo.

periferica di collegamento elettrodo a maglia generatore

Figura 4.13 Apparecchiatura utilizzata negli esperimenti.

4 PROVE SPERIMENTALI

4.1 Procedimento delle prove

In questo paragrafo si descrivono le prove effettuate per verificare l'efficacia dei nuovi elettrodi. Queste prove sono state principalmente effettuate su tessuto di patata, in quanto esso assume un colore scuro se viene elettroporato, a causa

dell'ossidazione dell'amido contenuto nelle cellule. Come prima cosa si è verificata la colorazione del tessuto di patata applicando:

- La tensione nominale pari a 1000V/cm e 10 impulsi,
- Una tensione dimezzata e N ($N > 10$) impulsi.

Si è poi osservato al microscopio ottico lo stato della membrana delle cellule ed infine, per alcuni casi, si è verificata l'efficacia degli elettrodi sviluppati su delle culture cellulari.

4.1.1 Prove su tessuto di patata

La procedura per questo tipo di prova consiste nel tagliare il tubero, impiantare l'elettrodo e connetterlo alla periferica di controllo. Quest'ultima permette di collegare l'elettrodo ad un prototipo di generatore di impulsi progettato da Igea s.p.a. mediante due cavi. Durante le prove sono stati registrati, mediante il generatore, i valori di tensione e corrente degli impulsi ai capi di ciascuna coppia di elettrodi o gruppi di elettrodi connessi in parallelo. Dai valori di tensione e corrente è stato poi ricavato il valore della resistenza corrispondente. Per ogni prova è stato fotografato l'effetto sul tessuto di patata dopo 24 e 30 ore dall'applicazione degli impulsi valutando anche la profondità a cui è penetrato il campo elettrico. In alcuni casi si è poi osservato il tessuto elettroporato al microscopio ottico.

4.1.2 Prove al microscopio ottico

In alcuni casi i tessuti sottoposti a elettroporazione sono stati analizzati al microscopio ottico confrontandoli con tessuti che non hanno subito il trattamento. Le cellule sono state visualizzate utilizzando ingrandimenti 20x e 40x e le fotografie sono state acquisite mediante una macchina fotografica digitale Casio. Il colorante utilizzato è il blu di metilene, che ha permesso di mettere in luce i danni subiti dalla membrana cellulare.

4.1.3 Prova in vitro

Per verificare l'effetto che l'elettrodo a maglia ha sulla permeabilizzazione delle membrane cellulari, sono stati testati gli elettrodi da 1 cm e da 2 cm su una coltura cellulare monostrato coltivata in vitro. L'efficienza dell'elettroporazione è stata visualizzata tramite due coloranti a fluorescenza: il propidio e la calceina. Il propidio oltrepassa la membrana delle sole cellule permeabilizzate e diventa fluorescente dopo essersi legato alle proteine e agli acidi nucleici presenti all'interno del nucleo delle cellule mentre la calceina riesce ad oltrepassare la membrana delle cellule vive,

permettendo quindi di capire quali cellule sono sopravvissute all'elettroporazione e quali no.

Per questa esperienza sono state utilizzate cellule di osteosarcoma (MG63) coltivate su una piastra Petri di diametro di 80 mm. La prova sulle cellule in vitro è stata condotta applicando 8 impulsi elettrici ad onda quadra da 1000V della durata di 100 μ s tramite il generatore d'impulsi CliniporatorTM.

Prima di effettuare il trattamento di elettroporazione è stato aggiunto alla soluzione tampone utilizzata durante il trattamento con gli impulsi elettrici del propidio. Dopo il trattamento di elettroporazione la Petri è stata mantenuta alla temperatura ambiente per 2 minuti per annullare lo stress meccanico della coltura cellulare. Successivamente, dopo averla lavata dal propidio, è stata applicata la calceina ed è stata messa in incubazione per 5 minuti a 37°C [3].

4.2 Risultati sperimentali

In Tabella 5.3 è riportato un riassunto delle prove effettuate sulle patate. In particolare è indicata:

- V: la tensione applicata ai capi degli elettrodi,
- # impulsi: il numero di impulsi,
- D: la distanza tra elettrodi adiacenti e
- H: la lunghezza degli aghi.

Le foto riportate per ciascun esperimento riportano la superficie del tubero e la sezione in cui viene visualizzata la profondità di elettroporazione con un metro (Figura 5.14).



Figura 5.14 foto di esempio per la visualizzazione della profondità dell'elettroporazione.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
-------	-----------	--------	--------

1000 V	10	1 cm	0.6 cm
650 V	30	1 cm	1.2 cm
1000 V	10	1 cm	1.2 cm
1000 V	30	1 cm	1.2 cm
1000 V	10	2 cm	1.2 cm
1000 V	30	2 cm	1.2 cm
2000 V	10	2 cm	1.2 cm
2000 V	30	2 cm	1.2 cm
2500 V	10	2.5 cm	1.2 cm
2500 V	30	2.5 cm	1.2 cm
2000 V	10	2.5 cm	1.2 cm
2000 V	30	2.5 cm	1.2 cm
1250 V	10	2.5 cm	1.2 cm
1250 V	30	2.5 cm	1.2 cm
3000 V	10	3 cm	1.2 cm
1500 V	10	3 cm	1.2 cm
1500 V	30	3 cm	1.2 cm
1000 V	30	3 cm	1.2 cm

Tabella 5.3 elenco dei parametri di tensione, numero d'impulsi, distanza tra gli elettrodi e lunghezza degli aghi utilizzati nei vari esperimenti.

Per ciascuna prova si riportano i valori dei parametri utilizzati e la foto del tubero dopo 24 e 30 ore.

4.2.1 Elettrodo da 1 cm

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
1000 V	10	1 cm	1.2 cm

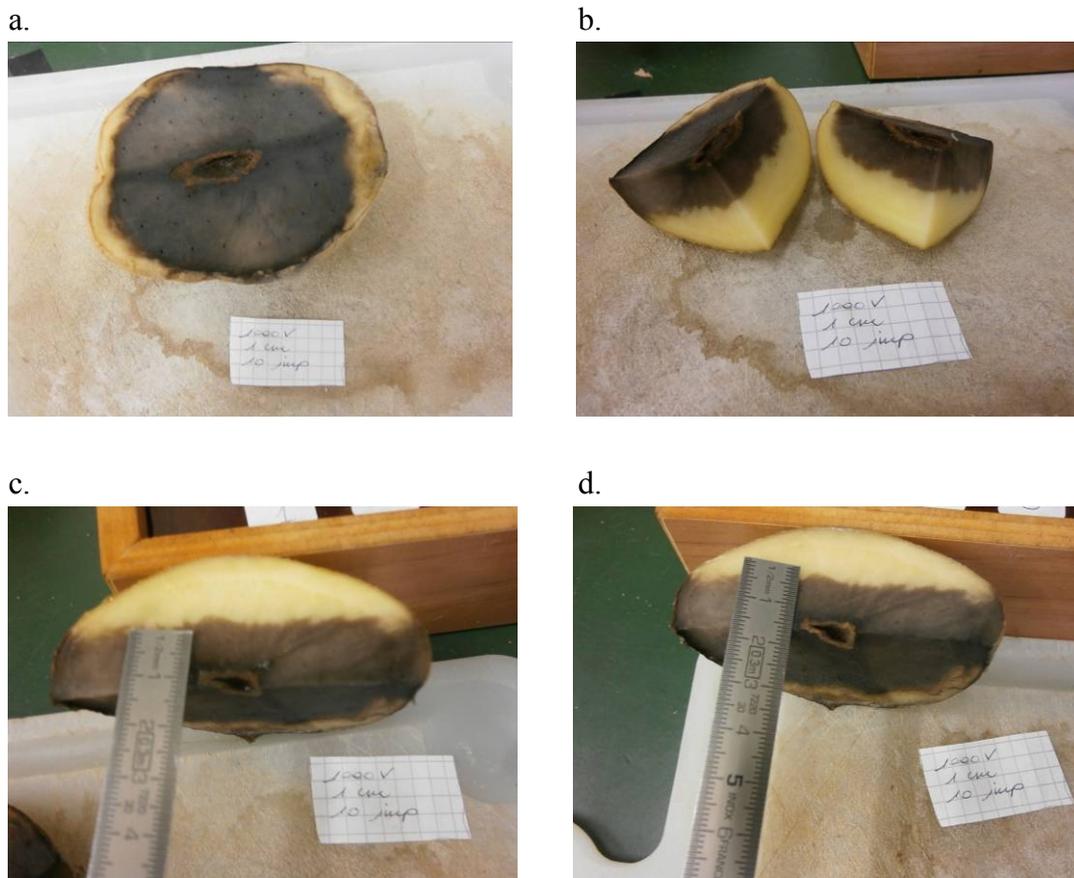


Figura 5.15

In Figura 5 .15 è riportata la foto di una patata elettroporata con 10 impulsi di tensione 1000V ed elettrodi con aghi distanti 1 cm e lunghi 1.2 cm acquisita dopo 24 ore (foto a., b., c.) e dopo 30 ore (foto d.) dal trattamento.

La superficie dopo il trattamento appare scura: una volta tagliato il tubero si vede che la parte di tessuto danneggiato dall'elettroporazione è ben definita. Si può inoltre osservare che dopo 30 ore la colorazione della sezione elettroporata non si è modificata (Figura 5 .15 d.).

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
-------	-----------	--------	--------

650 V	30	1 cm	1.2 cm
-------	----	------	--------

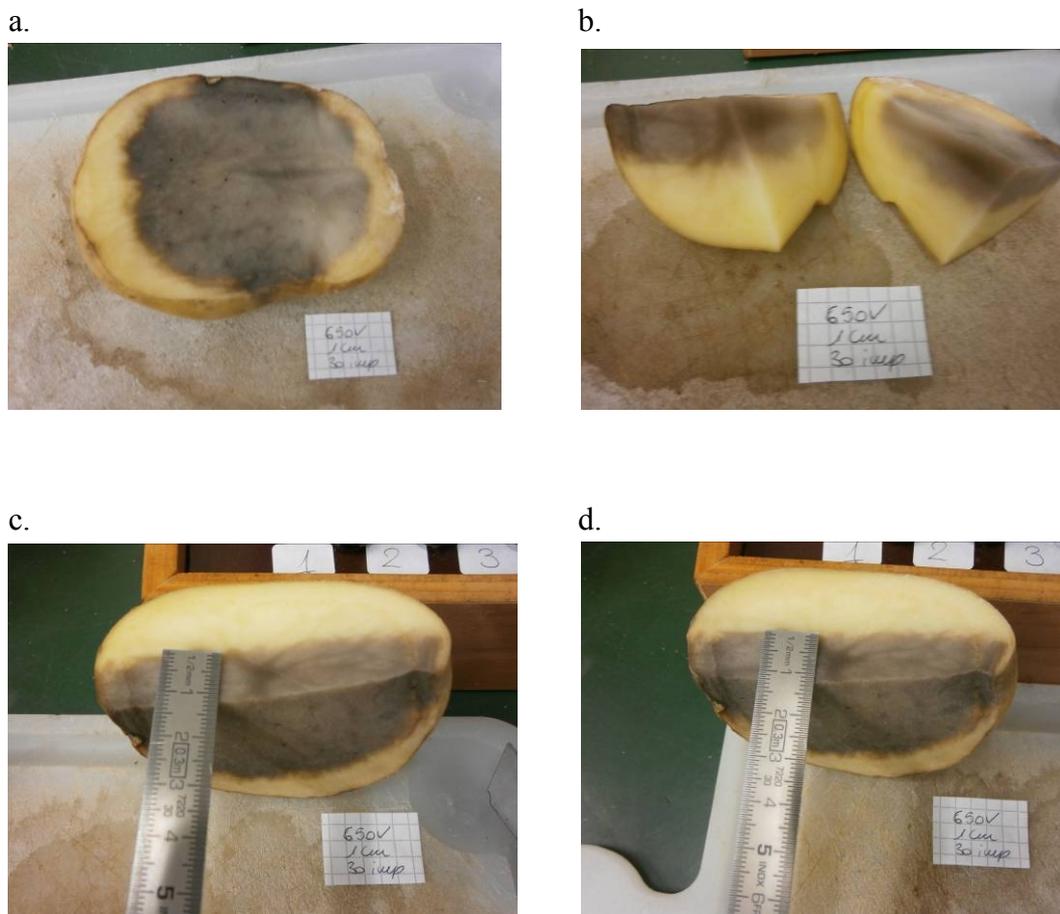


Figura 5.16

In Figura 5.16 a., b., c. sono riportate le foto di un tubero dopo 24 ore dall'applicazione di 30 impulsi di tensione 650 V con elettrodi distanti 1 cm mentre in Figura 5.16 d. è rappresentato lo stesso tubero dopo 30 ore.

Nonostante la tensione applicata sia molto inferiore rispetto ai normali valori usati negli esperimenti, si è raggiunto un buon livello di elettroporazione del tessuto, con la parte scura che si ferma a livello della lunghezza degli aghi (~1.2 cm).

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
1000 V	10	1 cm	0.6 cm

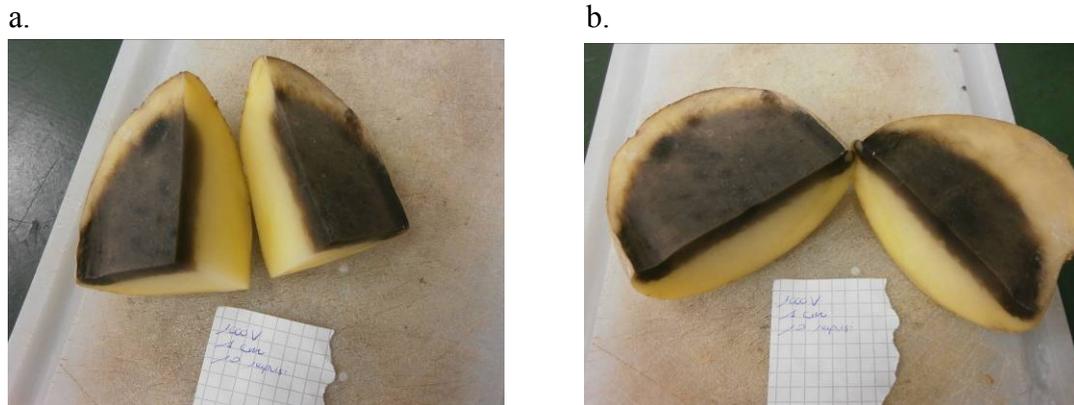


Figura 5.17

Per capire se era possibile ottenere l'elettroporazione dei tessuti con aghi più corti è stato condotto un esperimento riducendone la lunghezza a 6 mm. Ciò è stato reso possibile utilizzando dei fogli di sughero spessi 2 mm.

In particolare, in Figura 5.17 sono visibili le foto di patata dopo 24 ore dall'applicazione di 10 impulsi di intensità 1000V con aghi distanti 1 cm e lunghi 6 mm. Il fatto di avere aghi così ravvicinati fa sì che la profondità dell'elettroporazione sia limitata dalla lunghezza dell'ago e che vi sia un brusco passaggio dalla zona nera (elettroporata) a quella gialla (sana).

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
1000 V	30	1 cm	1.2 cm

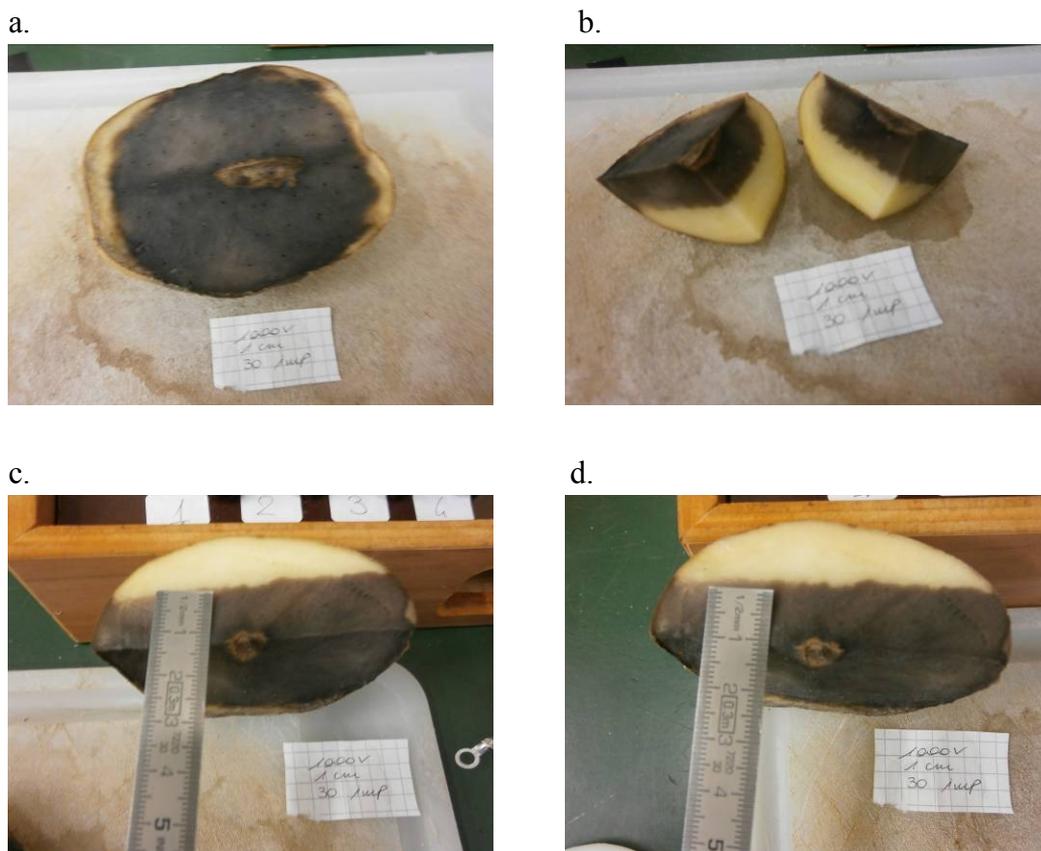


Figura 5.18

In Figura 5.18 è riportata la foto di una patata elettroporata con 30 impulsi di tensione 1000V ed elettrodi con aghi distanti 1 cm e profondi 1.2 cm dopo 24 ore (foto a., b., c.) e dopo 30 ore (foto d.) dal trattamento.

Anche in questo caso si può osservare una netta differenza tra zona chiara e scura: la zona scura (elettroporata) non si espande in profondità, cioè la zona elettroporata si estende fino ad una profondità pari alla lunghezza degli aghi. Non si riscontrano inoltre differenze tra la zona elettroporata del tubero dopo 24 ore e dopo 30 ore dall'applicazione degli impulsi.

4.2.2 Elettrodo da 2 cm

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
2000 V	10	2 cm	1.2 cm

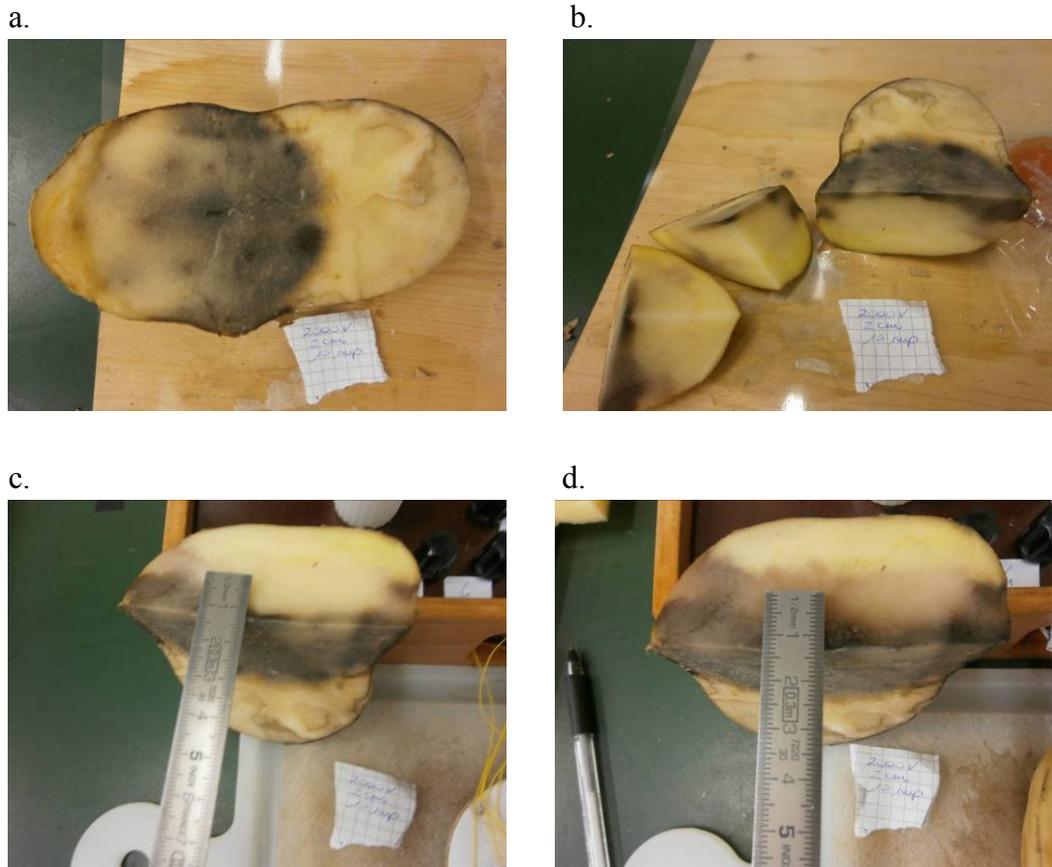


Figura 5.19

In Figura 5.19 è riportata la foto di una patata elettroporata con 10 impulsi di tensione 2000V ed elettrodi con aghi distanti 2 cm e profondi 1.2 cm dopo 24 ore (foto a., b., c.) e dopo 30 ore (foto d.) dal trattamento. Dopo 30 h dall'applicazione degli impulsi si vede che la zona scura è aumentata.

Diversamente da quanto ci si aspetta, il livello dell'elettroporazione in questo caso è visibilmente inferiore a quello mostrato in Figura 5.20, in cui la tensione applicata ai capi degli elettrodi è dimezzata. Questo fenomeno potrebbe probabilmente essere dovuto alla diversa varietà di tuberi procurati per gli esperimenti. Osservando la colorazione del tubero dopo 30 h si vede che la zona scura si estende ad una profondità maggiore rispetto alla lunghezza degli aghi.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
1000 V	10	2 cm	1.2 cm

a.

b.



c.



d.



Figura 5.20

In Figura 5.20 è riportata la foto di una patata elettroporata con 10 impulsi di tensione 1000V ed elettrodi con aghi distanti 2 cm e profondi 1.2 cm dopo 24 ore (foto a., b., c.) e dopo 30 ore (foto d.) dal trattamento.

Il tessuto elettroporato non è più così omogeneo come nel caso degli elettrodi a 1 cm e la zona elettroporata si spinge leggermente oltre la profondità degli aghi (~1.2 cm). Si può inoltre osservare come la zona scura sulla superficie del tubero appaia “a fiore”. Il fatto che in questo caso, in cui gli elettrodi sono stati alimentati a tensione inferiore rispetto al caso precedente di Figura 5.19, il tessuto del tubero si presenti scuro fa pensare che nel caso precedente la ridotta colorazione scura della zona che dovrebbe essere elettroporata sia legata al tubero utilizzato.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
1000 V	30	2 cm	1.2 cm

a.

b.



c.



d.



Figura 5.21

In Figura 5.21 è riportata la foto di una patata elettroporata con 30 impulsi di tensione 1000V ed elettrodi con aghi distanti 2 cm e profondi 1.2 cm dopo 24 ore (foto a., b., c.) e dopo 30 ore (foto d.) dal trattamento.

Rispetto al caso precedente si può osservare una colorazione più intensa del tessuto danneggiato ed una variazione netta del colore del tubero tra zona elettroporata e non elettroporata. Come nel caso degli aghi distanti 1 cm, anche con questa configurazione dei parametri non vi è propagazione in profondità della zona elettroporata, oltre il livello degli aghi. Anche in questo caso, come in quello precedente, si osserva un contorno “a fiore” che delimita la zona elettroporata.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
2000 V	30	2 cm	1.2 cm

a.

b.

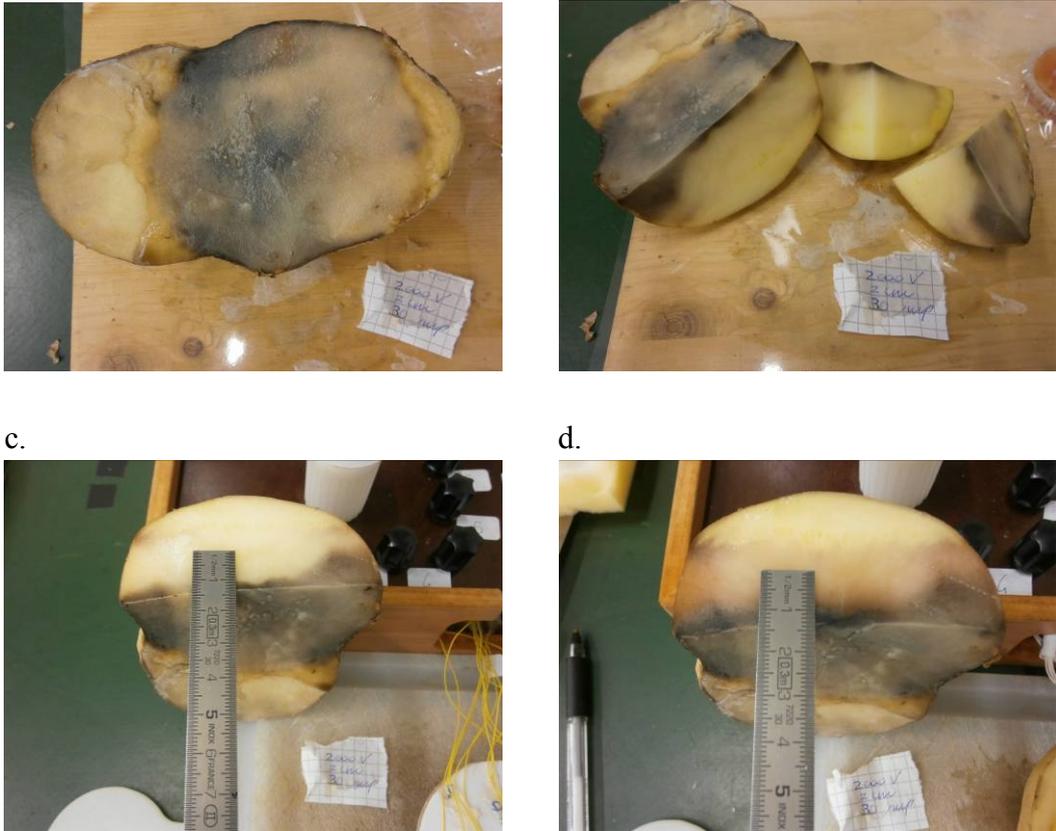


Figura 5.22

In Figura 5.22 a., b., e c. sono riportate le foto di una patata dopo 24 ore dall'applicazione di 30 impulsi di tensione 2000V con elettrodi distanti 2 cm e profondi 1.2 cm mentre in Figura 5.22 d. vi è la stessa patata dopo 30 ore dall'elettroporazione.

Anche in questo caso non si è raggiunto il livello elettroporativo desiderato, avendo utilizzato l'altra metà di patata dell'esperimento descritto precedentemente, in cui si erano mandati 10 impulsi di tensione 2000V con elettrodi da 2 cm e le cui foto sono riportate in Figura 5.19.

Si nota però che dopo 30 ore la parte elettroporata è andata oltre la profondità degli elettrodi (~1.2 cm).

4.2.3 Elettrodo da 2.5 cm

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
2500 V	10	2.5 cm	1.2 cm

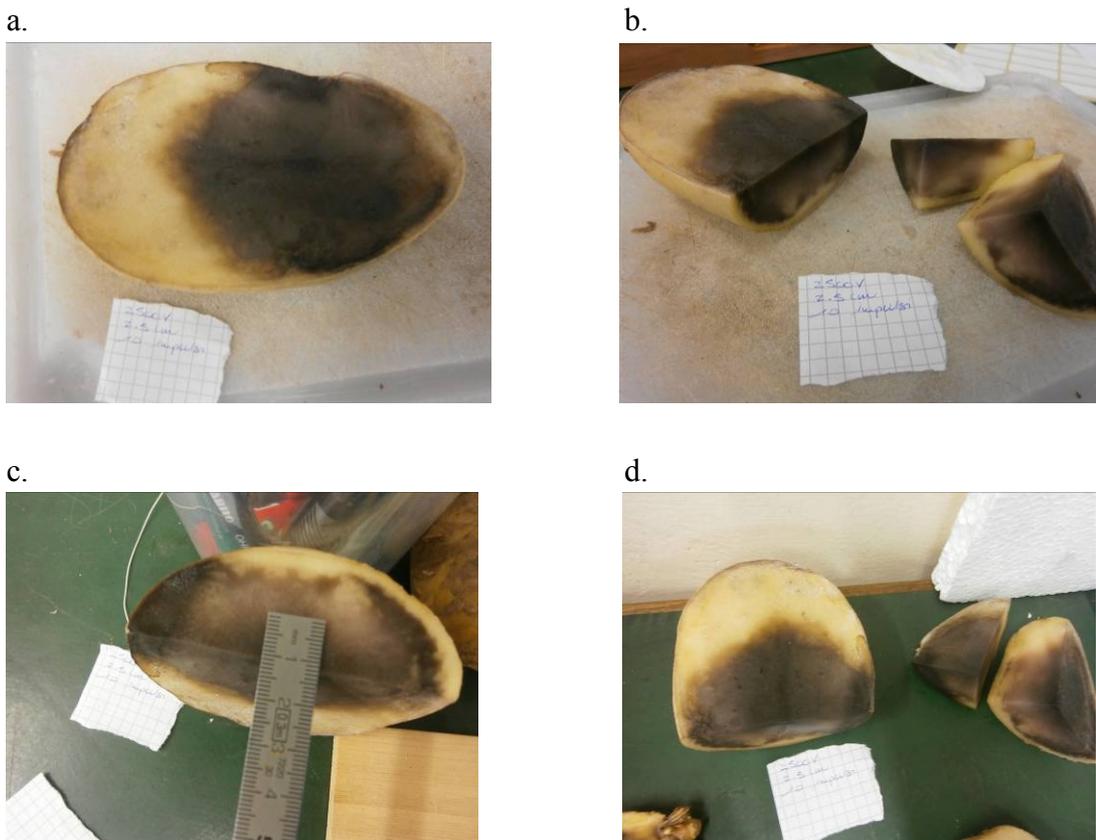


Figura 5.23

In Figura 5.23 a., b., c. sono riportate le foto acquisite dopo 24 ore dall'applicazione di 10 impulsi di tensione a 2500V con elettrodi distanti 2.5 cm e lunghi 1.2 cm mentre Figura 5.23 d. è una foto della stessa patata dopo 29 ore dall'elettroporazione. In queste immagini si può notare come l'utilizzo di un'intensità maggiore rispetto ai casi precedenti provochi un maggiore effetto di elettroporazione in quanto al taglio la parte scura è molto più marcata.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
2500 V	30	2.5 cm	2.5 cm

a.

b.



c.



d.



Figura 5.24

Le quattro foto di Figura 5.24 rappresentano una patata elettroporata con 30 impulsi di tensione a 2500V attraverso elettrodi distanti tra loro 2.5 cm e lunghi 1.2 cm dopo 24 ore per le prime tre e dopo 30 ore per l'ultima.

Rispetto alle foto di Figura 5.23, il livello di elettroporazione risulta inferiore, probabilmente a causa della varietà di tubero utilizzata che necessita di più tempo per ossidarsi.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
2000 V	10	2.5 cm	1.2 cm

a.

b.



c.



Figura 5.25

Figura 5.25 a. e b. sono riportate le foto di patata dopo 24 ore dall'applicazione di 10 impulsi di tensione a 2000V con elettrodi distanti 2.5 cm e lunghi 1.2 cm mentre Figura 5.25 c. è la foto della stessa patata una volta trascorse 29 ore dall'elettroporazione.

L'aumentata distanza tra gli elettrodi fa sì che la profondità della zona elettroporata sia maggiore, andando oltre la lunghezza degli elettrodi. Si nota inoltre che il passaggio tra zona scura e chiara è ancora abbastanza brusco e che non vi è una sostanziale differenza tra la patata dopo 24 e 29 ore dall'applicazione degli impulsi.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
2000 V	30	2.5 cm	1.2 cm

a.

b.



c.

d.



Figura 5.26

Figura 5.26 a., b., c. mostrano una patata dopo 24 ore dall'applicazione di 30 impulsi di tensione a 2000V con elettrodi distanti 2.5 cm e lunghi 1.2 cm mentre in Figura 5.26 d. vi è la stessa patata dopo 29 ore dall'elettroporazione. Qui la profondità è maggiore rispetto al caso precedente, in cui sono stati applicati solo 10 impulsi, ed inoltre si osserva un passaggio leggermente più graduale tra zona chiara e scura.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
1250 V	10	2.5 cm	1.2 cm

a.

b.

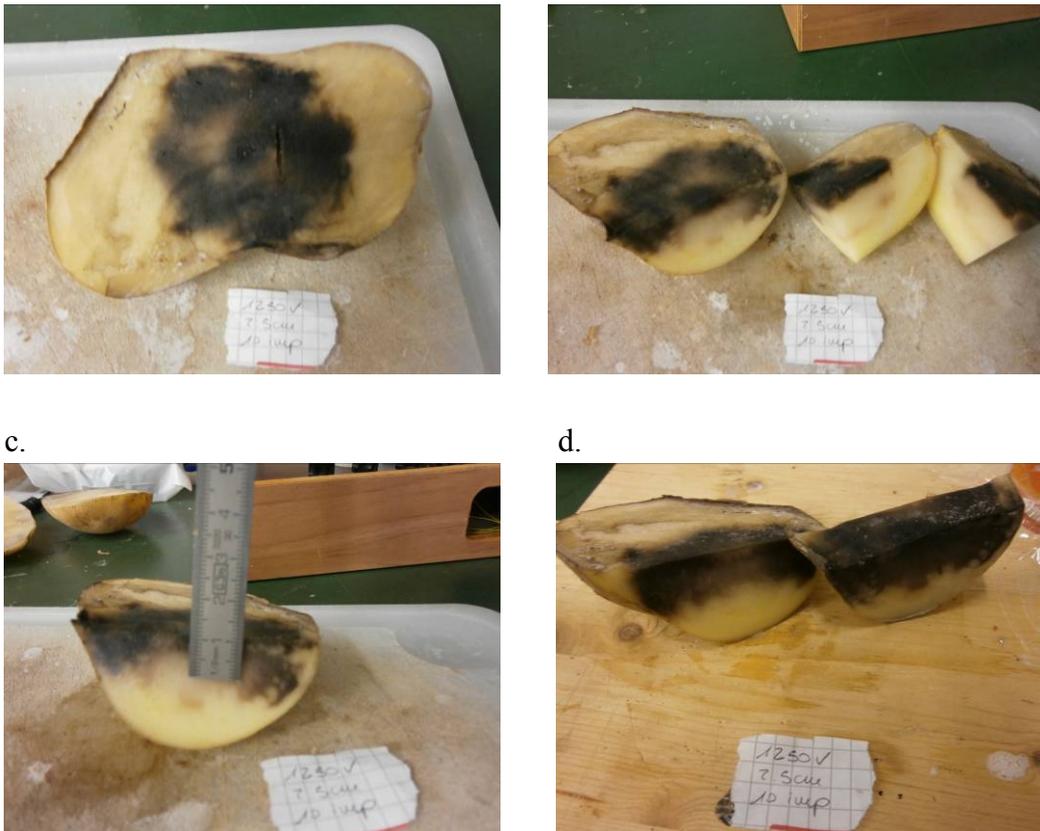


Figura 5.27

Le foto di Figura 5.27 a., b., c. sono state scattate dopo 24 ore dall'applicazione di 10 impulsi di tensione a 1250V con elettrodi distanti tra loro 2.5 cm e lunghi 1.2 cm, mentre la foto di Figura 5.27 d. è stata scattata dopo 30 ore.

Rispetto alle prime tre foto, nell'ultima si nota una maggiore profondità della zona elettroporata. L'immagine della sezione del tubero dopo 30 ore è riportata in Figura 5.27 d. e mette in evidenza come il livello di elettroporazione sia visibile dopo che la sezione è stata a contatto con l'aria. In questo caso la profondità di elettroporazione supera la lunghezza degli elettrodi.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
1250 V	30	2.5 cm	1.2 cm

a.

b.

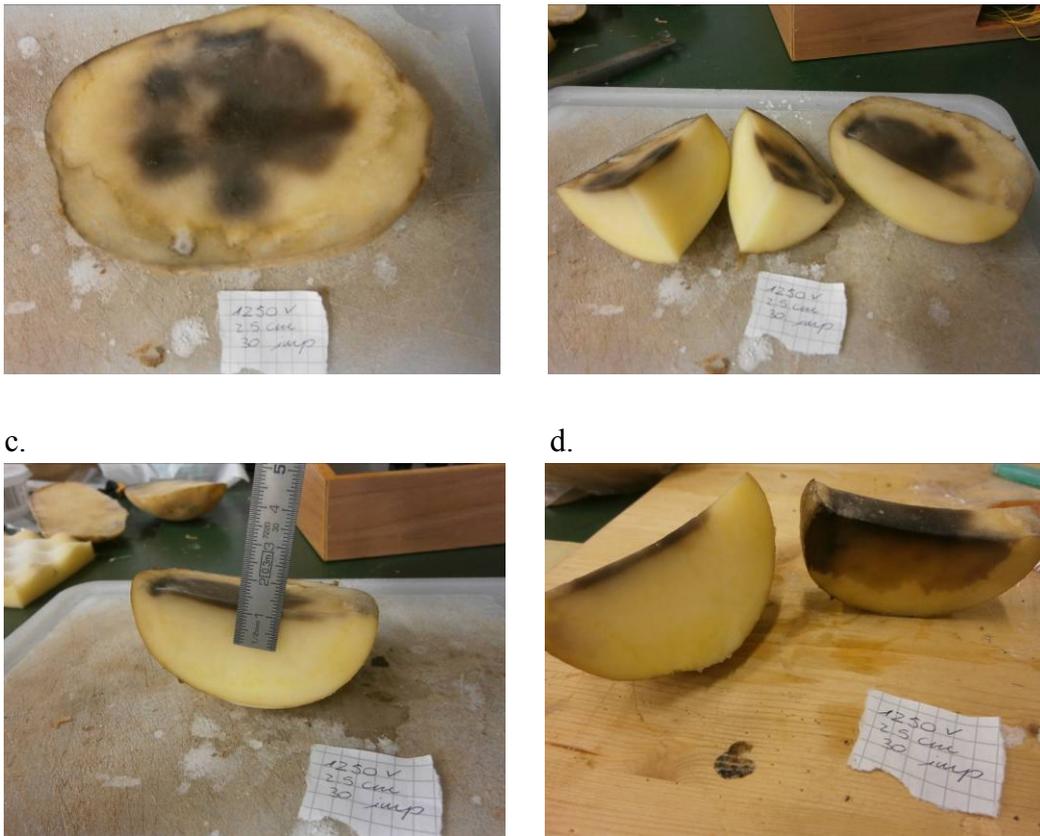


Figura 5.28

Le foto di Figura 5.28 a., b., c. sono state scattate dopo 24 ore dall'applicazione di 30 impulsi di tensione a 1250V con elettrodi distanti tra loro 2.5 cm e lunghi 1.2 cm, mentre la foto di figura Figura 5.28 d. è stata scattata dopo 30 ore.

Anche in questo caso la varietà di tubero utilizzata non permette di raggiungere un buon livello elettroporativo: la zona scura è infatti limitata solo a pochi millimetri dopo 24 ore e dopo 30 ore il propagarsi della zona elettroporata a profondità maggiori è avvenuta esclusivamente nelle zone a contatto con l'aria.

4.2.4 Elettrodo da 3 cm

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
3000 V	10	3 cm	1.2 cm

a.

b.



c.



d.



Figura 5.29

Le foto di Figura 5.29 a., b., c. sono state scattate dopo 24 ore dall'applicazione di 10 impulsi di tensione a 3000V con elettrodi distanti tra loro 3 cm e lunghi 1.2 cm, mentre la foto di Figura 5.29 d. è stata scattata dopo 30 ore.

Qui è evidente come la patata sia ben elettroporata a livello superficiale, mentre bisogna attendere un tempo maggiore perché la patata si annerisca anche a profondità maggiori. Inoltre il fatto di avere elettrodi distanti 3 cm fa sì che, aumentando la profondità, il livello di elettroporazione diminuisca in maniera graduale, e che raggiunga profondità maggiori rispetto ad elettrodi con aghi meno distanziati.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
1500 V	10	3 cm	1.2 cm

a.

b.



c.



d.



Figura 5.30

Figura 5.30 a., b., c. sono foto di una patata dopo 24 ore dall'applicazione di 10 impulsi di tensione a 1500V con elettrodi distanti 3 cm e profondi 1.2 cm mentre in Figura 5.30 d. vi è la stessa patata dopo 30 ore dall'elettroporazione.

In Figura 5.30 a. si può notare la forma “a fiore” della zona elettroporata, che segue la posizione degli elettrodi mentre per tutte le prime tre immagini valgono le stesse considerazioni fatte nel caso precedente, secondo cui dopo 24 ore l'effetto dell'elettroporazione è visibile solo a livello della profondità degli elettrodi. Aspettando poi un tempo maggiore (30 ore nella Figura 5.30 d.) il tubero si annerisce anche più in profondità e si può osservare una variazione graduale, che segue le linee di campo, del suo colore.

Rispetto al caso in cui l'intensità era di 3000V si notano però toni più lievi, che rispecchiano il minor livello di elettroporazione raggiunto.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
1500 V	30	3 cm	1.2 cm

a.

b.



c.



d.



Figura 5.31

Le quattro foto di Figura 5.31 rappresentano una patata elettroporata con 30 impulsi di tensione a 1500V attraverso elettrodi distanti tra loro 3 cm e lunghi 1.2 cm dopo 24 ore per le prime tre e dopo 30 ore per l'ultima.

Un'osservazione evidente è che nella Figura 5.31 a. la forma "a fiore" è scomparsa. La parte nera del tubero è molto più marcata e dopo 30 ore il fatto che la parte elettroporata si sia estesa anche a profondità maggiori è evidenziato da un colore grigio molto più scuro.

V [V]	# IMPULSI	D [cm]	H [cm]
1000 V	30	3 cm	1.2 cm

a.

b.



c.



d.



Figura 5.32

In Figura 5.32 a., b., c. sono riportate le foto di patate dopo 24 ore dall'applicazione di 30 impulsi di tensione a 1000V con elettrodi distanti 3 cm e lunghi 1.2 cm mentre in Figura 5.32 d. vi è la stessa patata dopo 30 ore dall'elettroporazione.

Da queste immagini si vede come la bassa intensità degli impulsi e l'aumentata distanza degli elettrodi rendano il livello di elettroporazione del tubero molto basso.

4.2.5 Considerazioni riassuntive

La Tabella 5.4 riassume quantitativamente i risultati degli esperimenti esposti nei paragrafi precedenti, in quanto sono riportati i valori di profondità a cui si è spinta l'elettroporazione dopo 24 ore e 30 ore con associate le informazioni riguardanti la distanza tra gli elettrodi, il numero d'impulsi e la tensione applicata.

D [cm]	# IMPULSI	V [V]	H - EP (24h) [cm]	H - EP (30h) [cm]
1	10	1000	0.6	0.6
1	30	650	1.2	1.2

1	10	1000	1.4	1.6
1	30	1000	1.3	1.3
2	10	1000	1.4	1.4
2	30	1000	1.4	1.45
2	10	2000	0.3	1.8
2	30	2000	0.3	1.8
2.5	10	2000	1.85	1.85
2.5	30	2000	2.2	2.2
2.5	10	2500	2	2
2.5	30	2500	0.3	2.4
2.5	10	1250	0.8	1.7
2.5	30	1250	0.3	2.2
3	10	3000	0.6	2.3
3	10	1500	0.6	1.3
3	30	1500	1.1	1.85
3	30	1000	0.3	1.5

Tabella 5.4 la tabella mette in evidenza fino a che profondità si spinge la zona elettroporata dopo 24 e 30 ore dall'applicazione degli impulsi.

Dall'analisi effettuata si vede che mediante elettrodi con aghi distanti tra loro 2 o 3 cm è possibile ottenere l'elettroporazione del tessuto del tubero di patata applicando impulsi alla tensione nominale che risulta pari, rispettivamente, a 2000 e 3000 V. In questi casi la profondità dell'elettroporazione è maggiore rispetto a quella che si ottiene utilizzando elettrodi con aghi a distanza di 1 cm.

La diminuzione della tensione ai capi degli elettrodi porta ai seguenti risultati:

- caso elettrodi distanti 1cm: si ha elettroporazione del tessuto in entrambi i casi per tutta la lunghezza dell'elettrodo.
- caso elettrodi distanti 2-3 cm: la parte elettroporata si estende per una profondità inferiore rispetto al caso in cui gli elettrodi siano stati alimentati con tensione maggiore.

4.3 Punto di vista microscopico

Alcune delle prove descritte nel paragrafo precedente sono state poi eseguite nuovamente ed analizzate al microscopio ottico dopo aver trattato i campioni col blu di metilene per mettere in risalto le alterazioni della membrana.

Il protocollo di colorazione del campione è il seguente:

- Dal tubero a disposizione è stata prelevato una fettina quanto più possibile sottile tagliandola mediante un cutter;
- il pezzetto di tubero è stato trattato con blu di metilene oppure con Lugol immergendolo nel colorante puro per 1 minuto;
- dopo la colorazione il pezzetto di tubero è stato lavato ripetutamente con acqua deionizzata, mediante immersione, per eliminare l'eccesso di colorante;
- dopo il lavaggio il pezzetto di tubero è stato posto su un vetrino porta oggetti e coperto con un vetrino copri oggetti;
- infine il pezzetto posto sul vetrino è stato ripetutamente lavato (per capillarità) con acqua per asportare il colorante in eccesso.

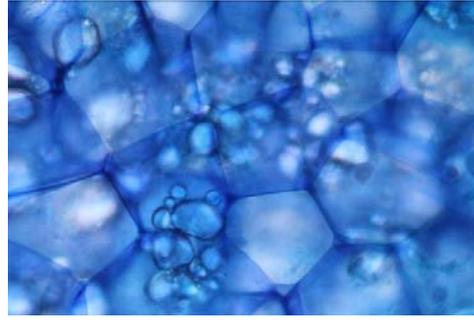
Nel seguito si riportano alcune immagini che mostrano come ci si aspetta di visualizzare lo stato della membrana delle cellule del tubero elettroporato oppure non elettroporato utilizzando i due coloranti a disposizione, Lugol e Blu di Metile, e i filtri ottici a disposizione.

5.2.1 Patata non elettroporata

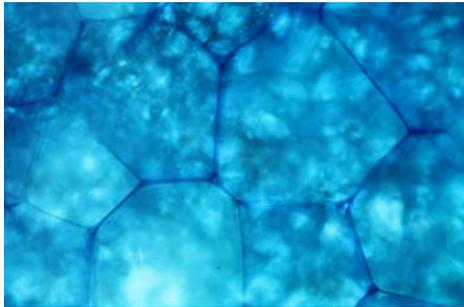
In Figura 5.33 a. è riportata l'immagine di un tubero tagliato acquisita dopo 24 ore dal taglio e conservata a temperatura ambiente. Si nota che mantiene il colore chiaro per cui il solo taglio del tubero e il suo mantenimento a temperatura ambiente non altera il colore della superficie come riscontrato dopo l'applicazione degli impulsi di tensione utilizzati per elettroporare il tessuto.

a.

b.



c.



d.

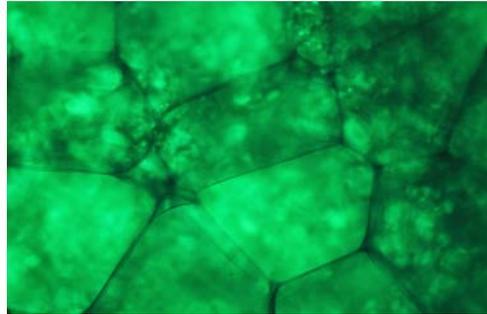


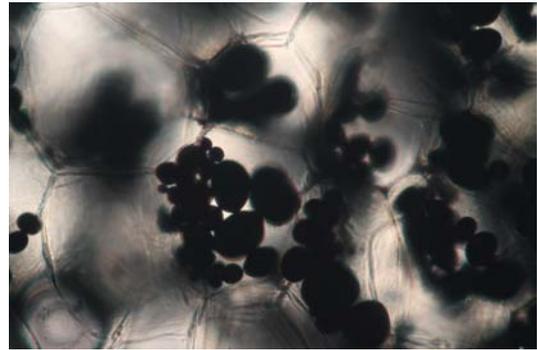
Figura 5.33 a. patata sana, b., c., d. campione al microscopio

In Figura 5 .33 b., c., d. sono riportate le foto acquisite al microscopio ottico di un campione di tubero prelevato dal tubero sano in Figura 5 .33 a.

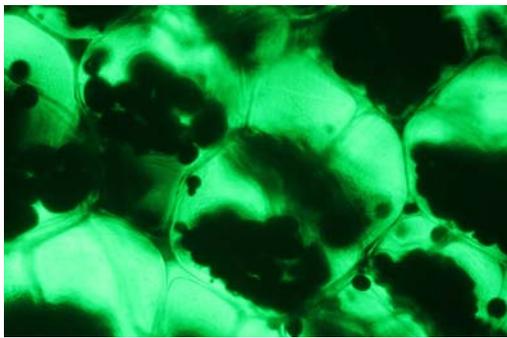
Il campione preparato seguendo la procedura descritta all'inizio del paragrafo è stato osservato con un microscopio ottico con obiettivo 40x e fotografato con una macchina digitale Casio e per il caso di Figura 5 .33 d. è stato inoltre utilizzato un filtro verde. Dall'immagine ottenuta si può notare come la membrana delle cellule sia caratterizzata da contorni ben marcati e definiti e da forme ben squadrate.

a.

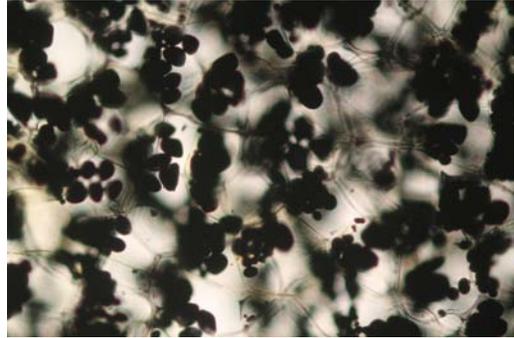
b.



c.



d.



e.



Figura 5.34 a. patata sana, b., c., d., e. campione di tubero sano visualizzato al microscopio dopo essere stato trattato con il colorante Lugol con ingrandimento 40x per le prime due foto e ingrandimento 20x per le ultime due.

In Figura 5.34 a. è riportata la foto di un tubero non trattato mentre in Figura 5.34 b., c., d., e. sono riportate le foto di campioni di patata non elettroporata e trattati con il colorante Lugol. Le foto in Figura 5.34 b., c. sono state scattate con ingrandimento 40x, e nel caso della Figura 5.34 c. è stato utilizzato un filtro che permette la visualizzazione in verde mentre le foto in Figura 5.34 d., e. sono state scattate con ingrandimento 20x. Anche con l'uso di questo colorante, nonostante abbia la tendenza a marcare più nettamente l'amido presente nelle cellule e non la membrana cellulare, si può osservare che quest'ultima è caratterizzata da contorni ben marcati e definiti e le cellule hanno forme regolari e squadrate.

4.3.1 Patata elettroporata

Nel seguito si riportano le immagini ottenute osservando al microscopio ottico la parte elettroporata dei campioni di patata trattata con i diversi elettrodi testati in questo lavoro.

I campioni prelevati dai tuberi sono stati colorati con Lugol o Blu di metilene seguendo la stessa procedura descritta all'inizio del paragrafo per il caso del campione prelevato dal tubero non elettroporato.

In Figura 5.35 sono riportate altre foto della membrana cellulare di patate elettroporate, visualizzate al microscopio ottico con ingrandimento 40x e colorate con Blu di Metilene. Si vede che la membrana è danneggiata (frastagliata e non ben definita), con delle zone in cui appare “scollata” da quella limitrofa.

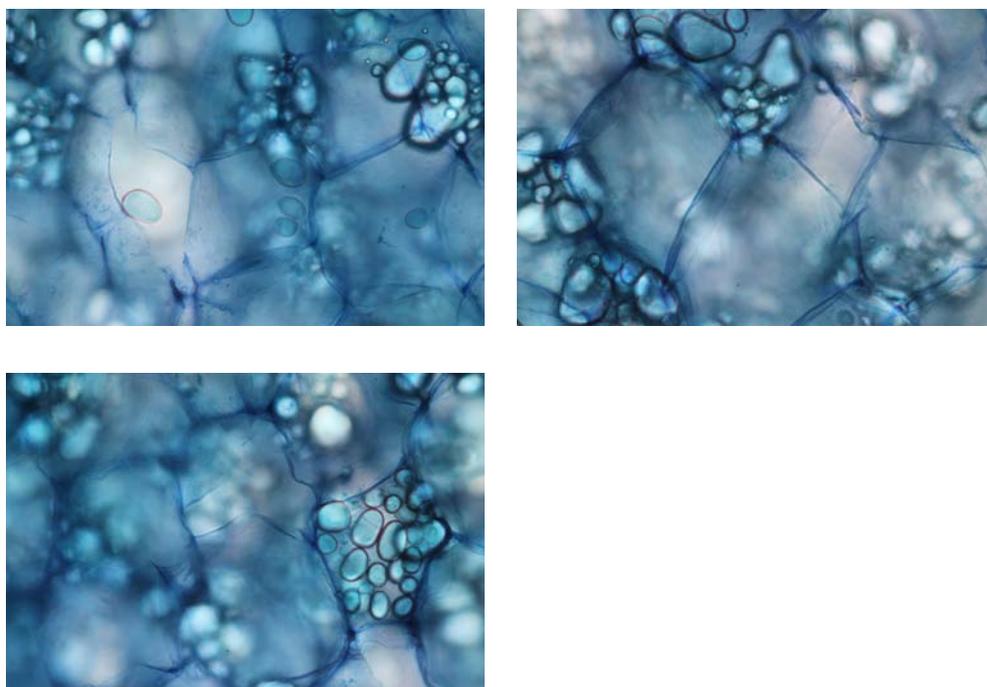


Figura 5.35 foto al microscopio ottico con ingrandimento 40x di membrane elettroporate trattate con il colorante Blu di metilene.

4.3.2 Confronto di tessuto elettroporato e non elettroporato

In Figura 5.36 sono accostate le foto al microscopio ottico con ingrandimento 40x di un tubero non elettroporato e di uno che invece ha subito l'elettroporazione. Il primo (Figura 5.36 a.) è caratterizzato da membrane cellulare ben squadrate e definite mentre il secondo (Figura 5.36 b.) presenta membrane cellulari danneggiate e dai contorni poco definiti. In Figura 5.36 c. è invece riportata la foto con ingrandimento 20x del tessuto di un tubero elettroporato in corrispondenza dell'ago, in cui è evidente il danno provocato da quest'ultimo alle cellule.

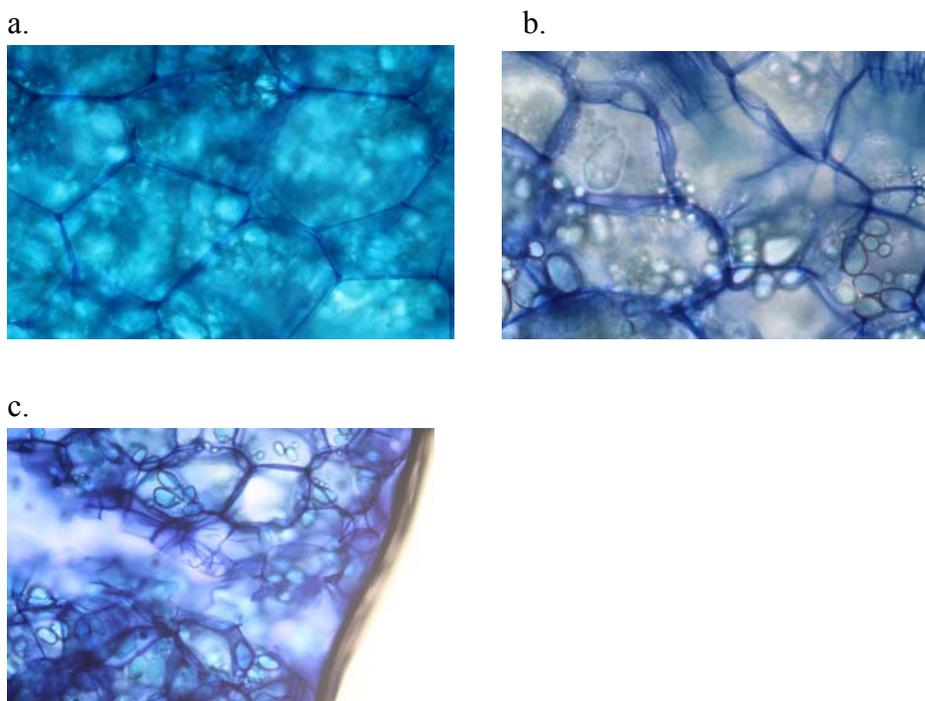


Figura 5.36 accostamento di foto al microscopio ottico con ingrandimento 40x di una patata non elettroporata (a.), di una patata elettroporata (b.) e di una patata elettroporata visualizzata con ingrandimento 20x in corrispondenza dell'ago (c.), tutte trattate col Blu di metilene.

4.3.3 Patata elettroporata con 10 impulsi da 1000V e aghi da 1 cm

La Figura 5.37 rappresenta una patata sottoposta a 10 impulsi da 1000V con aghi distanti 1 cm. Il campione di patata è stato colorato con il Blu di Metilene e visualizzato al microscopio ottico con ingrandimento 20x per la Figura 5.37 c., 40x per la Figura 5.37 d. e con un filtro che permette la visualizzazione in verde nel caso di Figura 5.37 e. Nelle immagini di Figura 5.37 f., g. il campione di patata è stato invece trattato con il colorante Lugol. Dalle foto ottenute dal campione colorato con blu di Metilene si nota che la membrana presenta lacerazioni e non è ben

definita. Nella foto del campione colorato con il Lugol sono messi in evidenza i granuli di amido, mentre la membrana non risulta ben evidenziata da questo tipo di colorante.

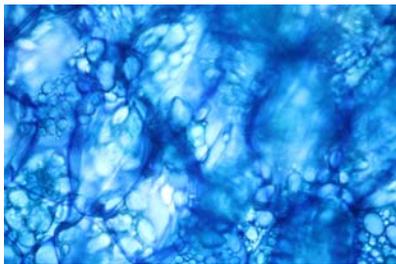
a.



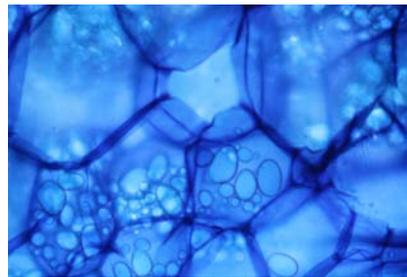
b.



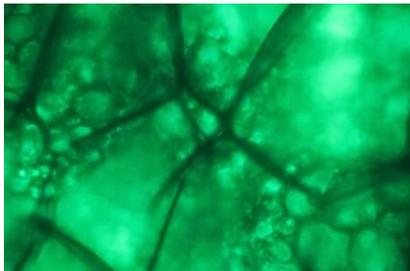
c.



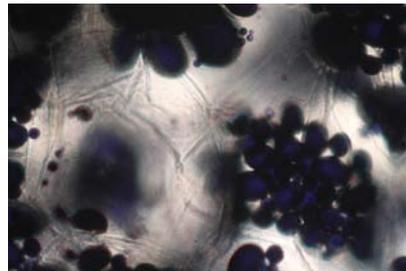
d.



e.



f.



g.

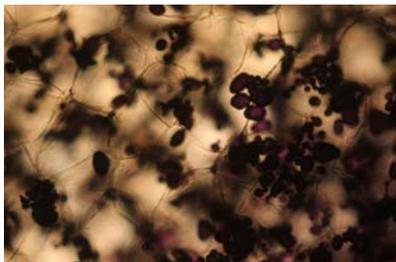


Figura 5.37 patata dopo 24 ore dall'elettroporazione (a., b.), campione della stessa patata trattata col Blu di Metilene e vista al microscopio con ingrandimento 20x (c.),40x (d.) e 40x con

un filtro verde (e.), campione della stessa patata trattata con Lugol e vista al microscopio con ingrandimento 40x (f.) e 20x (g.).

1.3.1 Patata elettroporata con 10 impulsi da 2000V e aghi da 2 cm

La Figura 5.38 rappresenta una patata sottoposta a 10 impulsi da 2000V con un elettrodo avente gli aghi distanti 2 cm.

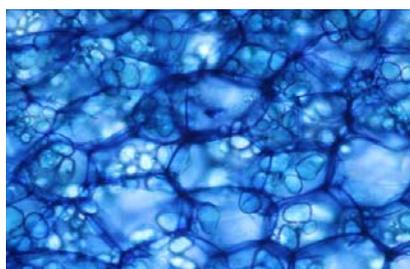
a.



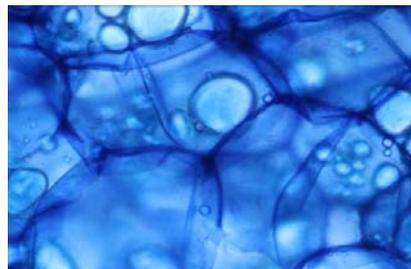
b.



c.



d.



e.

f.

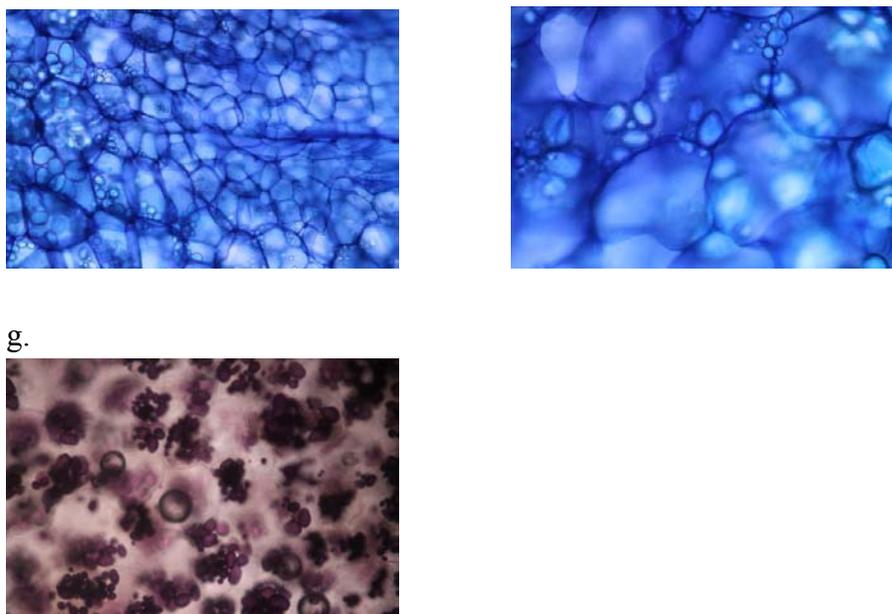


Figura 5.38 patata dopo 24 ore dall'elettroporazione (a., b.), campione della stessa patata vicino all'ago dell'elettrodo con ingrandimento 20x (c.) e 40x (d.), campione più distante dall'ago con ingrandimento 20x (e.) e 40x (f.), campione trattato con Lugol (g.).

Nelle foto c., d., e., f. sono riportate le immagini acquisite con il microscopio ottico di campioni di tubero prelevati dalla parte elettroporata. Già osservando le figure e., f., in cui le foto sono state acquisite in zone del campione più distanti dagli aghi, si può notare che la membrana non è più squadrata come nel caso del tubero non elettroporato (Figura 5.33) e che i contorni sono meno definiti. Questo fenomeno è intensificato nella parte di tessuto in prossimità degli aghi, in cui si può anche osservare che la membrana appare danneggiata (frastagliata e non ben definita) con delle zone in cui appare “scollata” da quella limitrofa. Dalla Figura 5.38 g., in cui è riportata l'immagine di un campione di tubero trattato con il colorante Lugol dopo essere stato sottoposto a 10 impulsi da 2000V con un elettrodo avente gli aghi distanti 2 cm, si può notare che sono messi ben in evidenza i granuli di amido, mentre la membrana non risulta evidenziata.

In Figura 5.39 è riportata una sequenza d'immagini che evidenzia lo stato della membrana cellulare a seconda del punto in cui la si è andata ad osservare rispetto alla posizione degli aghi. Il tubero esaminato è stato sottoposto a 10 impulsi da 2000V con un elettrodo avente gli aghi distanti 2 cm. La prima e la terza foto rappresentano la membrana delle cellule di un tubero sottoposto a 10 impulsi da 2000V con un elettrodo avente gli aghi distanti 2 cm in prossimità degli aghi (punti A e C) mentre la seconda foto rappresenta la membrana di cellule della stessa patata situate in un punto in mezzo agli aghi (punto B). Dalla Figura 5.39 si nota che la membrana cellulare è stata elettroporata in tutti e tre i punti considerati.

ago

A

B $d=2\text{ cm}$

C

ago

Figura 5.39 sequenza di foto al microscopio ottico con ingrandimento 40x della membrana cellulare di una patata sottoposta a 10 impulsi da 2000V con aghi distanti 2 cm visualizzata vicino ai due aghi (punti A e C) e in mezzo (punto B).

1.3.2 Patata elettroporata con 30 impulsi da 1000V e aghi da 2 cm

La Figura 5.40 rappresenta una patata sottoposta a 30 impulsi da 1000V con un elettrodo avente gli aghi distanti 2 cm.

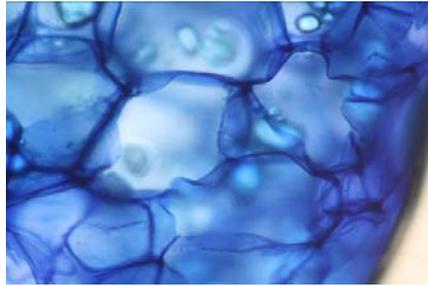
a.



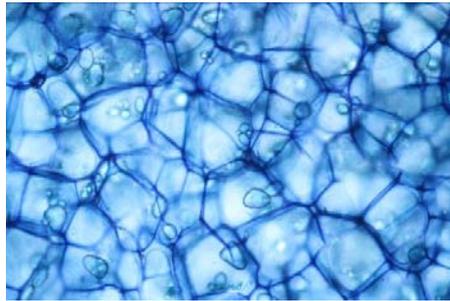
b.



c.



d.



e.

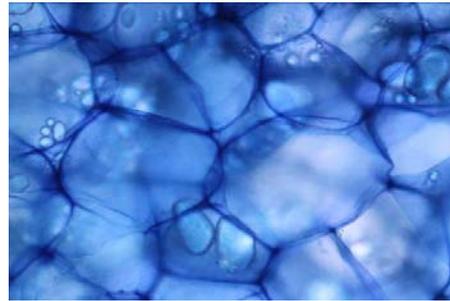


Figura 5.40 patata dopo 24 ore dall'elettroporazione (a., b.), campione della stessa patata vicino all'ago dell'elettrodo con ingrandimento 40x (c.), campione più distante dall'ago con ingrandimento 20x (d.) e 40x (e.).

Nelle foto di Figura 5.40 c., d., e., f. sono riportate le immagini acquisite con il microscopio di campioni di tubero prelevati dalla parte elettroporata.

Anche in questo caso valgono le considerazioni fatte nel paragrafo precedente. È infatti ben evidente come le membrane cellulari risultino ingrossate, staccate tra loro e meno definite, con la presenza di lacerazioni.

In Figura 5.41 è riportata una sequenza d'immagini che evidenzia lo stato della membrana cellulare a seconda del punto in cui la si è andata ad osservare rispetto alla posizione degli aghi. La prima immagine rappresenta una foto al microscopio ottico con ingrandimento 40x della zona del campione in cui era stato impiantato un ago dell'elettrodo (punto A), riconoscibile dalla presenza di una zona chiara, non colorata dal Blu di Metilene, in cui si vede il danno provocato dall'ago. La seconda immagine è una foto della zona del campione vicina all'ago con ingrandimento 40x (punto B) mentre la terza è una foto della zona del campione più distante dall'ago (punto C). Dalla sequenza di immagini di Figura 5.41 si può notare che la membrana di cellule situate nei pressi dell'ago (punti A e B) presenta forme molto più irregolari e molte più lacerazioni rispetto alla membrana di cellule più distanti dall'ago (punto C.).

A ago
B
C d=2cm

ago

Figura 5.41 sequenza di foto al microscopio ottico con ingrandimento 40x della membrana cellulare di una patata sottoposta a 30 impulsi da 1000V con aghi distanti 2 cm visualizzata esattamente in corrispondenza dell'ago (punto A), vicino all'ago (punto B) e in mezzo (punto C).

4.3.4 Patata elettroporata con 10 impulsi da 3000V e aghi da 3 cm

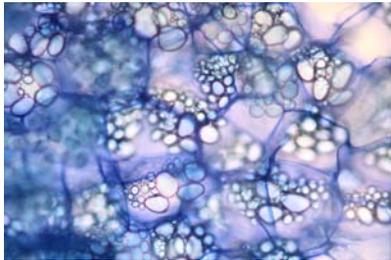
In Figura 5.42 sono riportate le foto di un tubero dopo 24 ore dall'applicazione di 10 impulsi da 3000V con aghi distanti 3 cm.. Il campione di patata è stato colorato con il Blu di Metilene e visualizzato al microscopio ottico con ingrandimento 20x per la Figura 5.42 c., 40x per la Figura 5.42 d. e con un filtro che permette di vedere l'immagine in verde nel caso di Figura 5.42 e. Nelle immagini di Figura 5.42 f., g., h. il campione di patata è stato invece trattato con il colorante Lugol. Anche in questo caso si può notare che la membrana cellulare ha assunto una forma irregolare, presenta dei pori e non è ben definita.

a.

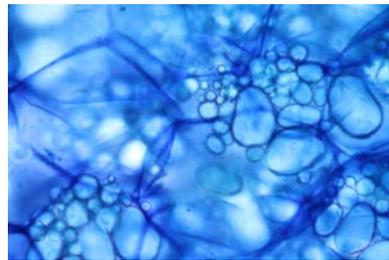
b.



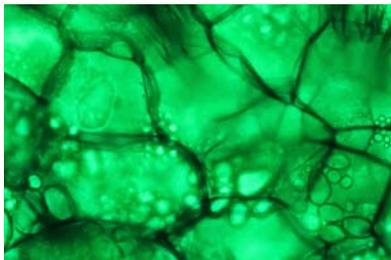
c.



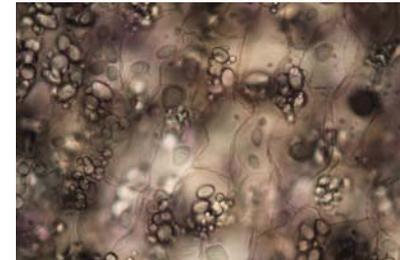
d.



e.



f.



g.



h.

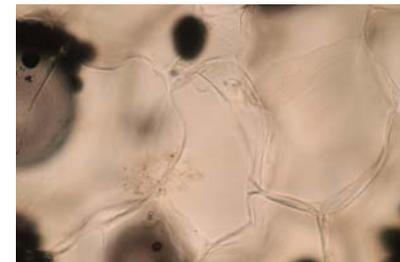


Figura 5.42 patata dopo 24 ore dall'elettroporazione (a., b.), campione della stessa patata trattata col Blu di Metilene e vista al microscopio con ingrandimento 20x (c.) e 40x (d.), campione della stessa patata trattata con Lugol e vista al microscopio con ingrandimento 40x (e.).

5 CONSIDERAZIONI SUI RISULTATI

In questo capitolo si riportano alcune considerazioni relative ai risultati ottenuti nei test sperimentali.

5.1 Dati numerici ottenuti tramite il software per elaborazione dati

In questo paragrafo sono riportate quattro tabelle con i dati numerici di tensione e corrente relativi a ciascun impulso generato per alimentare ciascuna coppia di aghi dell'elettrodo a maglia, ricavati utilizzando un software per elaborazione di dati prodotti dalla macchina per ECT sviluppato nell'ambito di alcune tesi di laurea ([9], [10]). Conoscendo tensione e corrente, è poi stata ricavata la resistenza media, R_{med} , vista ai capi del generatore di impulsi, e conoscendo il numero di paralleli relativi ad ogni coppia di aghi presenti nell'elettrodo sono stati ricavati i valori di resistenza e corrente medi di una generica coppia di aghi ($R_{el,med}$ e $I_{el,med}$).

In Tabella 6.5 è riportato il valore al decimo impulso della tensione, corrente e resistenza vista ai capi del generatore, il numero di paralleli relativi alla coppia di aghi considerata ed i valori di resistenza e corrente tra una delle x coppie di aghi, con x = "numero di coppie in parallelo a cui sono stati applicati in contemporanea 10 impulsi di tensione da 1000V con aghi distanti tra loro 1 cm".

coppia aghi	V med	I med	R Med	#paralleli	R_{el med}	I_{el med}
1-2	741,5	22,8	32,5	6	195	3,8
1-3	741,1	23,7	31,3	6	187,8	3,9
1-4	723,7	25,2	28,8	7	176,4	3,6
1-5	724,8	26,1	27,8	6	156,6	4,3
1-6	732,3	25,7	28,5	6	171	4,3

1-7	707,9	27,4	25,8	7	191,8	3,9
2-3	716,6	27,5	26,1	6	156,6	4,6
3-4	710,3	27,8	25,5	7	178,5	4
4-5	707,7	29	24,4	7	170,8	4,1
5-6	710,9	28,4	25,1	6	150,6	4,7
6-7	698,7	29,2	24	7	168	4,2
7-2	687,6	30	22,9	7	160,3	4,3
A-B	772,3	22,9	33,7	4	134,8	5,7
A-C	762,1	23,9	31,8	4	127,2	6
A-D	756,8	24,5	30,9	4	123,6	6,1
A-E	759,6	24,7	30,8	4	123,2	6,2
A-F	754,7	24,7	30,6	4	122,4	6,2
A-G	764,9	24,1	31,7	4	126,8	6
B-C	713,8	28,3	25,2	6	151,2	4,7
C-D	699,2	29,5	23,7	6	142,2	4,9
D-E	693,3	30,7	22,6	6	135,6	5,1
E-F	692,2	30,1	23	6	138	5
F-G	698,3	29,6	23,6	6	141,6	4,9
G-B	707,7	28,7	24,6	6	147,6	4,8

Tabella 6.5 tensione, corrente e resistenza del decimo impulso ottenuti da un tubero elettroporato con 10 impulsi da 1000V e aghi distanti 1 cm.

In Tabella 6.6 è riportato il valore al trentesimo impulso della tensione, corrente e resistenza vista ai capi del generatore, il numero di paralleli ed i valori di resistenza e corrente tra una delle x coppie di aghi, con $x=$ “ numero di coppie in parallelo a cui sono stati applicati in contemporanea 30 impulsi di tensione da 1000V con aghi distanti tra loro 1 cm”. Poiché nella maggior parte dei casi il generatore d’impulsi non riusciva a mandarne 30, è stato specificato in tabella il numero dell’ultimo impulso generato, a cui si riferiscono i valori riportati nella riga in considerazione.

coppia aghi	V med	I med	R Med	#impulso	#paralleli	R_{el} med	I_{el} med
1-2	774,9	26,9	28,8	29	6	172,8	4,5
1-3	750,9	25,8	29,1	30	6	154,8	4,3
1-4	758	27,7	27,4	29	7	191,8	4
1-5	747,1	26,8	27,9	30	6	167,4	4,5
1-6	766	27,4	28	29	6	168	4,6
1-7	731,3	27,6	26,5	30	7	185,5	3,9

2-3	929,2	35,7	26	22	6	156	6
3-4	746,5	29,4	25,4	29	7	177,8	4,2
4-5	924,8	36,7	25,2	22	7	176,4	5,2
5-6	903,2	34,1	26,5	23	6	159	5,7
6-7	813,9	31,8	25,6	26	7	179,2	4,5
7-2	958,2	38,5	24,9	21	7	174,3	5,5
A-B	967,9	29,2	33,1	21	4	132,4	7,3
A-C	967,5	29,8	32,5	21	4	130	7,5
A-D	967,3	29,8	32,5	21	4	130	7,5
A-E	964,9	29,8	32,4	21	4	129,6	7,5
A-F	961,7	30,1	31,9	21	4	127,6	7,5
A-G	963,6	30,6	31,5	21	4	126	7,7
B-C	959,8	37,4	25,6	21	6	153,6	6,2
C-D	926,4	37,2	24,9	22	6	149,4	6,2
D-E	926,7	37,3	24,8	22	6	148,8	6,2
E-F	955,6	37,9	25,2	21	6	151,2	6,3
F-G	956,6	38,9	24,6	21	6	147,6	6,5
G-B	960,7	38,4	25	21	6	150	6,4

Tabella 6.6 tensione, corrente e resistenza del trentesimo impulso ottenuti da un tubero elettroporato con 30 impulsi da 1000V e aghi distanti 1 cm.

In Tabella 6.7 è riportato il valore al decimo impulso della tensione, corrente e resistenza vista ai capi del generatore, il numero di paralleli ed i valori di resistenza e corrente tra una delle x coppie di aghi, con x = “ numero di coppie in parallelo a cui sono stati applicati in contemporanea 10 impulsi di tensione da 1000V con aghi distanti tra loro 2 cm”

coppi a aghi	V med	I med	R Med	#paraleli	R_{el} med	I_{el} med
1-2	963,7	4,3	226	1	226	4,3
1-3	958,4	4,5	215,1	1	215,1	4,5
1-4	966,5	4,1	237,9	1	237,9	4,1
1-5	952,1	4,8	199,6	1	199,6	4,8
1-6	952,1	4,8	197,1	1	197,1	4,8
1-7	966,5	3,7	262,5	1	262,5	3,7
2-3	946,5	5,8	164,1	1	164,1	5,8
3-4	952	4,8	197,4	1	197,4	4,8

4-5	954,6	5	192,9	1	192,9	5
5-6	945,2	6,2	153	1	153	6,2
6-7	962,4	4,5	214,4	1	214,4	4,5
7-2	958,3	4,4	216	1	216	4,4
A-B	950,2	6,1	154,9	1	154,9	6,1
A-C	950,6	6	158,4	1	158,4	6
A-D				0		
A-E	939,9	6,2	151,2	1	151,2	6,2
A-F	937,9	6,1	152,7	1	152,7	6,1
A-G				0		
B-C	923,5	8,3	111,9	2	223,8	4,2
C-D	952	5,2	184,9	1	184,9	5,2
D-E	950,6	6	158,4	1	158,4	6
E-F	924,9	8,2	112,8	2	225,6	4,1
F-G	937,7	6,3	148,2	1	148,2	6,3
G-B	948,8	6,1	155,6	1	155,6	6,1

Tabella 6.7 tensione, corrente e resistenza del decimo impulso ottenuti da un tubero elettroporato con 10 impulsi da 1000V e aghi distanti 2 cm.

In Tabella 6.8 è riportato il valore al trentesimo impulso della tensione, corrente e resistenza vista ai capi del generatore, il numero di paralleli ed i valori di resistenza e corrente tra una delle x coppie di aghi, con x = “ numero di coppie in parallelo a cui sono stati applicati in contemporanea 30 impulsi di tensione da 1000V con aghi distanti tra loro 2 cm”. Poiché nella maggior parte dei casi il generatore d’impulsi non riusciva a mandarne 30, è stato specificato in tabella il numero dell’ultimo impulso generato, a cui si riferiscono i valori riportati nella riga in considerazione.

coppi a aghi	V med	I med	R Med	#impulso	#paralleli	R_{el} med	I_{el} med
1-2	947,4	3,8	247,9	30	1	247,9	3,8
1-3	962,4	3,8	253,7	29	1	253,7	3,8
1-4	965,8	3	322,5	30	1	322,5	3
1-5	952	4,4	216,4	29	1	216,4	4,4
1-6	974,2	4	242,5	25	1	242,5	4
1-7	963,8	3,7	263,7	30	1	263,7	3,7
2-3	951,8	4,8	196,9	30	1	196,9	4,8
3-4	964,1	3,6	266	30	1	266	3,6
4-5	980,9	3,7	264,4	24	1	264,4	3,7
5-6	948,3	5,3	178,1	30	1	178,1	5,3

6-7	969,1	4,4	220,7	26	1	220,7	4,4
7-2	995,3	4,4	227,9	21	1	227,9	4,4
A-B	991,3	5,9	168,8	21	1	168,8	5,9
A-C	993,9	5,5	181,5	21	1	181,5	5,5
A-D					0		
A-E	993,6	6,2	161,4	21	1	161,4	6,2
A-F	995,3	5,7	175,5	21	1	175,5	5,7
A-G					0		
B-C	995,3	6,6	150,8	21	2	301,6	3,3
C-D	995,5	5,1	195,6	21	1	195,6	5,1
D-E	994,6	5,5	181,5	21	1	181,5	5,5
E-F	995,5	7,3	136	21	2	272	3,7
F-G	995,5	4,4	225,9	21	1	225,9	4,4
G-B	995,7	4	251,5	21	1	251,5	4

Tabella 6.8 tensione, corrente e resistenza del trentesimo impulso ottenuti da un tubero elettroporato con 30 impulsi da 1000V e aghi distanti 2 cm.

Dai dati riportati si nota che:

- Nelle prove con 30 impulsi non si è quasi mai riusciti a raggiungere il numero di impulsi desiderato, a causa dei problemi descritti nel paragrafo 3.3.1
- Aumentando la distanza degli aghi la resistenza aumenta, ma non di molto perché di conseguenza aumenta anche l'area della sezione attraversabile dalle linee di campo elettrico.
- Si nota anche un piccolo aumento della corrente che scorre negli elettrodi all'aumentare della distanza degli aghi.

5.2 Simulazioni tramite Flux

Per valutare l'andamento del campo elettrico prodotto da una coppia di aghi al variare della loro distanza si è utilizzato un simulatore numerico ad elementi finiti (Flux 3D prodotto da Cedrat [11]). Il modello utilizzato è composto da un parallelepipedo che simula il tessuto da elettroporare con resistività elettrica uniforme ($60 \Omega \text{ m}$) e due cilindri che simulano i due elettrodi. Le superfici dei due elettrodi sono state alimentate a potenziale costante con tensioni rispettivamente di $V_0=V_i/2$ e $V_1=-V_i/2$. In Figura 6.43 è riportata la geometria del modello utilizzato.

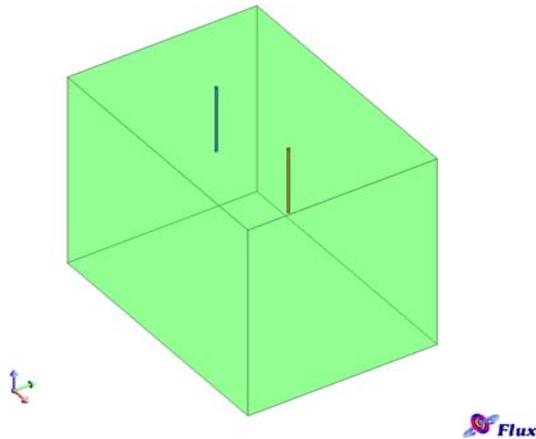


Figura 6.43 modello 3D utilizzato nelle simulazioni.

Il campo elettrico nel tessuto è stato ricavato risolvendo un problema di conduzione di corrente applicando per ciascuna distanza tra gli elettrodi una differenza di potenziale, $V_0 - V_1$, pari a V_a o a $V_b = V_a/2$, con $V_a = d \cdot 1000$ V, $d = 1, 2$ o 3 cm.

La Figura 6.44 rappresenta la mappa del campo elettrico in una sezione verticale nel piano degli elettrodi. Si vede che il campo elettrico, a parità d'intensità, si distribuisce fino a strati più profondi del campione nel caso degli aghi distanziati 3 cm. Da ciò consegue che la densità di corrente nel caso di aghi distanziati 3 cm a parità di profondità è più elevata rispetto al caso di aghi distanziati 1 cm perché esiste un rapporto di proporzionalità diretta fra campo elettrico e densità di corrente. Queste assunzioni sono confermate dalle immagini di Figura 6.45, in cui è riportata la mappa della densità di corrente in una sezione verticale del piano degli elettrodi.

In Figura 6.46 è inoltre messo in evidenza l'andamento della corrente attraverso delle frecce.

Per ciascuna distanza degli elettrodi e differenza di potenziale si è poi campionato il campo elettrico ottenuto con la simulazione in piani ortogonali agli elettrodi e situati alle profondità $z = 0, 6, 12$ e 18 mm.

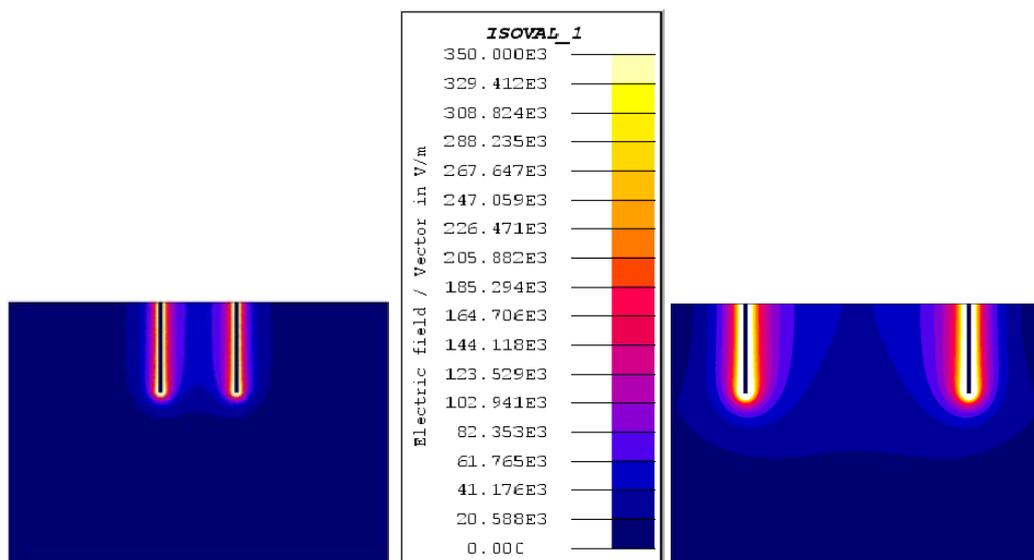


Figura 6.44 confronto del campo elettrico applicato da due aghi posti alla distanza di 1 cm (a sinistra) e 3 cm (a destra).

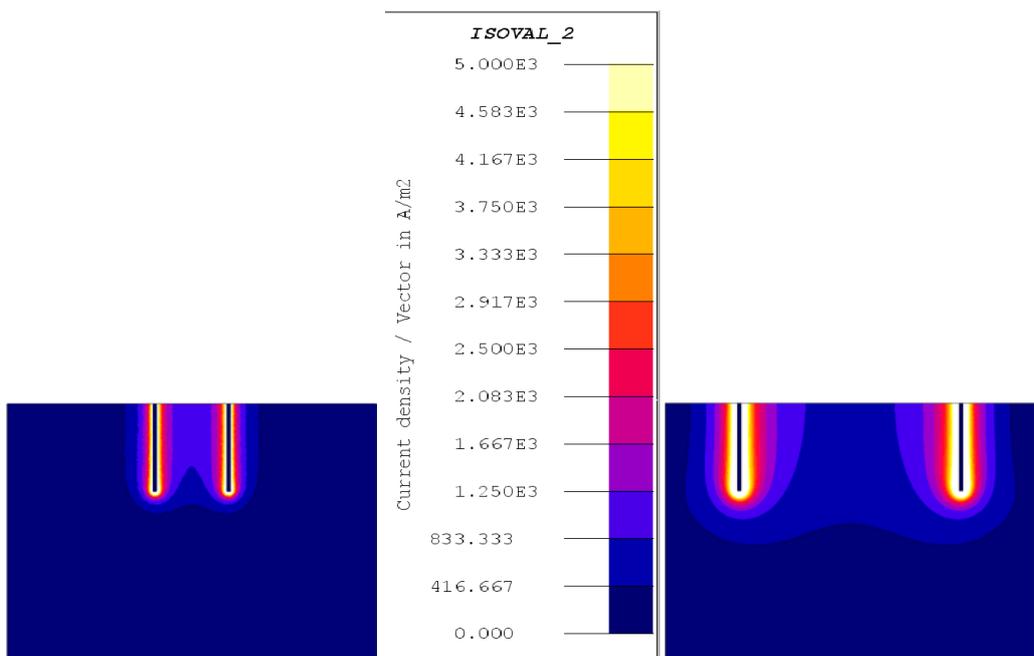


Figura 6.45 confronto della densità di corrente presente tra aghi distanti 1 cm (a sinistra) e 3 cm (a destra).

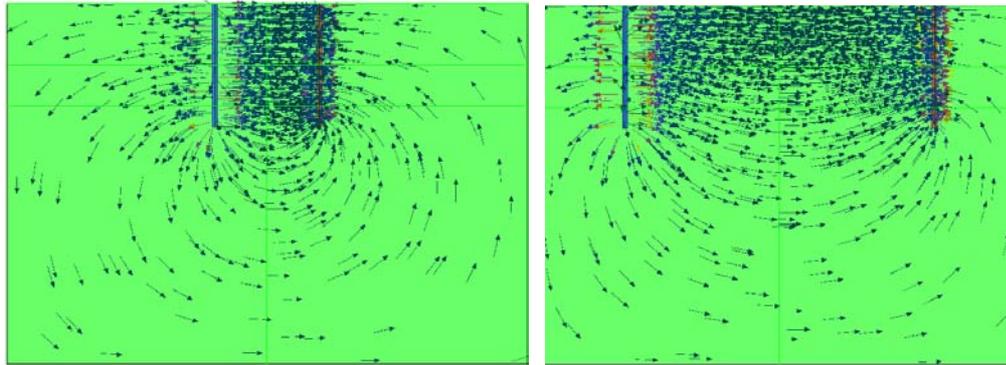


Figura 6.46 andamento delle linee di corrente in elettrodi distanti 1 cm (a sinistra) ed elettrodi distanti 3 cm (a destra).

5.3 Analisi dei grafici del campo elettrico

Per capire l'andamento del campo elettrico in funzione dei parametri variati nelle prove sperimentali si è preso in considerazione il modello del campione di patata a parallelepipedo con dimensioni $5 \times 3.5 \times 1.8$ cm utilizzato nella simulazione numerica in cui gli elettrodi sono stati rappresentati come una coppia di cilindri posizionati ad una distanza d tra loro, con d tra 1 cm e 3 cm. In Figura 6.47 è riportato uno schema 2D del modello visto dall'alto con rappresentate le posizioni delle coppie di aghi utilizzati.



Figura 6.47 rappresentazione schematica del campione di tessuto di patata di cui sono stati elaborati i dati con riportati i punti in cui sono stati applicati gli aghi degli elettrodi da 1 cm (blu), 1.5 cm (rosso), 2 cm (verde) e 3 cm (viola).

Attraverso il simulatore numerico a Elementi Finiti è stato calcolato il campo elettrico applicando alla coppia di elettrodi una differenza di potenziale proporzionale alla distanza degli elettrodi (1 cm → 1000V, 3 cm → 3000V). Il campo elettrico così ottenuto è stato campionato su griglie di punti ortogonali agli elettrodi e posizionate a diverse profondità (0 cm, 0.6 cm, 1.2 cm, 1.8 cm). Nei paragrafi successivi verranno messi in relazione i valori del campo ottenuti:

- tenendo fissa la profondità e le ordinate e variando le ascisse,
- tenendo fissa la profondità e le ascisse e variando le ordinate,
- tenendo fisse le ascisse e le ordinate e variando la profondità.

In Figura 6.48 è rappresentato il modello di tessuto già visto in Figura 6.47 con evidenziate le linee lungo le quali si è andati a calcolare il campo elettrico alle varie profondità.

D =0.0294m

C =0.0238m

B =0,0189m

A =0,0175m

E =0.025m F =0.028m G =0,031m

Figura 6.48 rappresentazione schematica del campione di tessuto di patata di cui sono stati elaborati i dati con riportati i punti in cui sono stati applicati gli aghi degli elettrodi da 1 cm (blu), 1.5 cm (rosso), 2 cm (verde) e 3 cm (viola) e le linee lungo le quali si è andati a calcolare il campo elettrico.

5.3.1 Andamento lungo l'asse delle ascisse

In Figura 6.49 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0175$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera A, valutato sulla griglia di punti posizionata alla profondità di 0 m ed ottenuto applicando agli elettrodi una tensione adeguata alla distanza degli elettrodi (cioè se $d=1$ cm si sono applicati 1000 V, mentre se $d=3$ cm la tensione applicata era di 3000V).

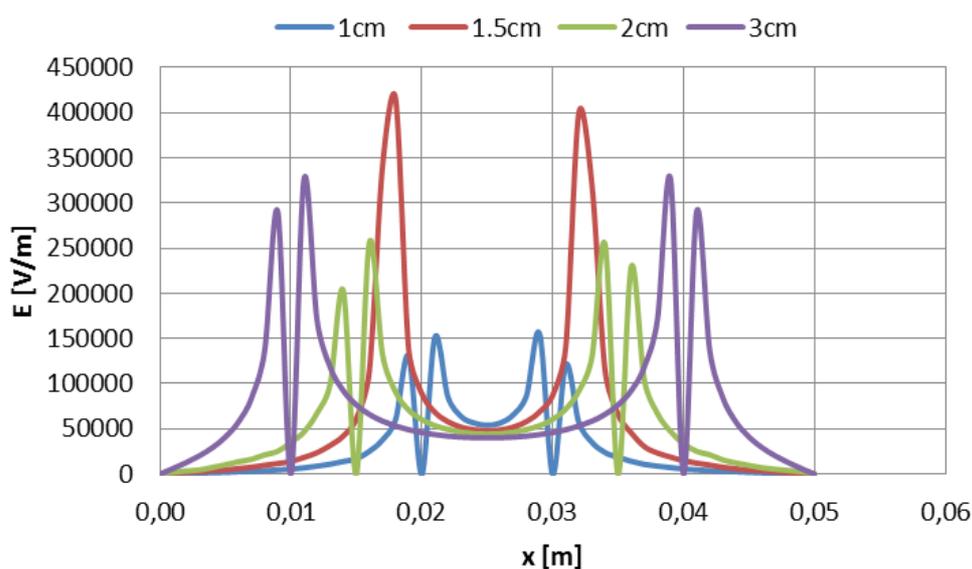


Figura 6.49 campo elettrico considerato per $y=0.0175$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 0 m.

In Figura 6.50 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0189$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera B, valutato sulla griglia di punti posizionata alla profondità di 0 m ed ottenuto applicando una tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi.

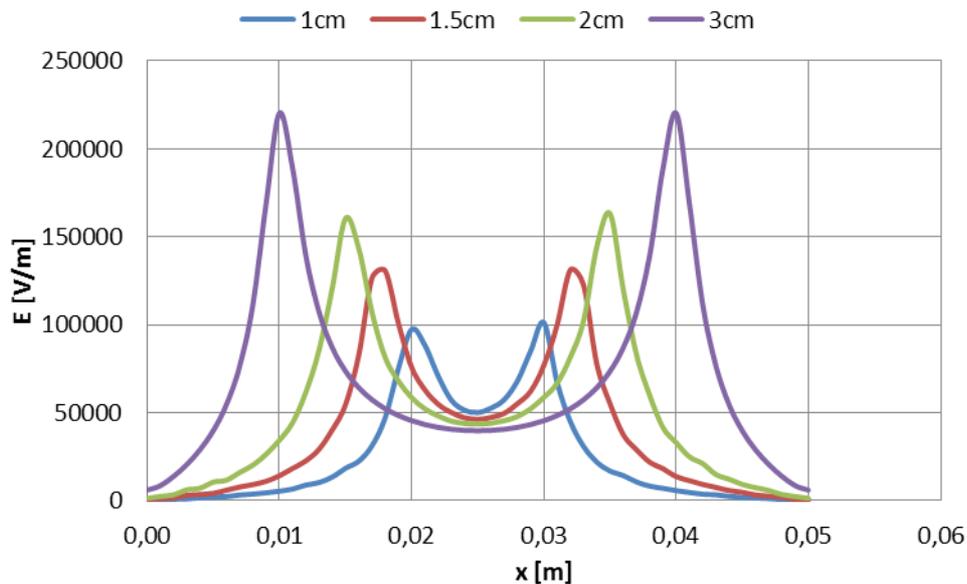


Figura 6.50 campo elettrico considerato per $y=0.0189$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 0 m.

In Figura 6.51 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0294$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera D, posizionato alla profondità di 0 m ed ottenuto applicando agli elettrodi una tensione adeguata alla loro distanza.

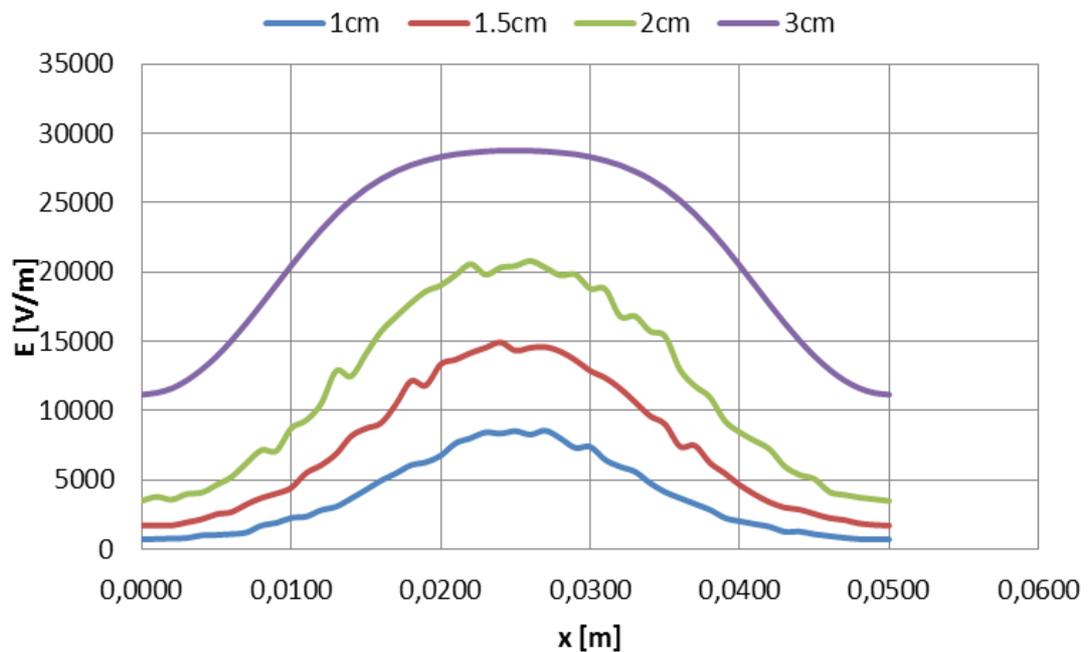


Figura 6.51 campo elettrico considerato per $y=0.0294$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 0 m.

Dalle tre figure sovrastanti (Figura 6 .49, Figura 6 .50, Figura 6 .51), in cui è rappresentato il campo elettrico alla profondità di 0 cm, si può notare come l'intensità del campo nei punti in prossimità degli aghi cresca se si aumenta la distanza degli elettrodi, mentre nella zona centrale si assesta a valori paragonabili per le diverse distanze degli elettrodi. Si nota che in questa zona il valore di campo elettrico più alto si ha per gli elettrodi a distanza minore.

In Figura 6 .52 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0175$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera A, posizionato alla profondità di 6 mm ed ottenuto applicando una tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi.

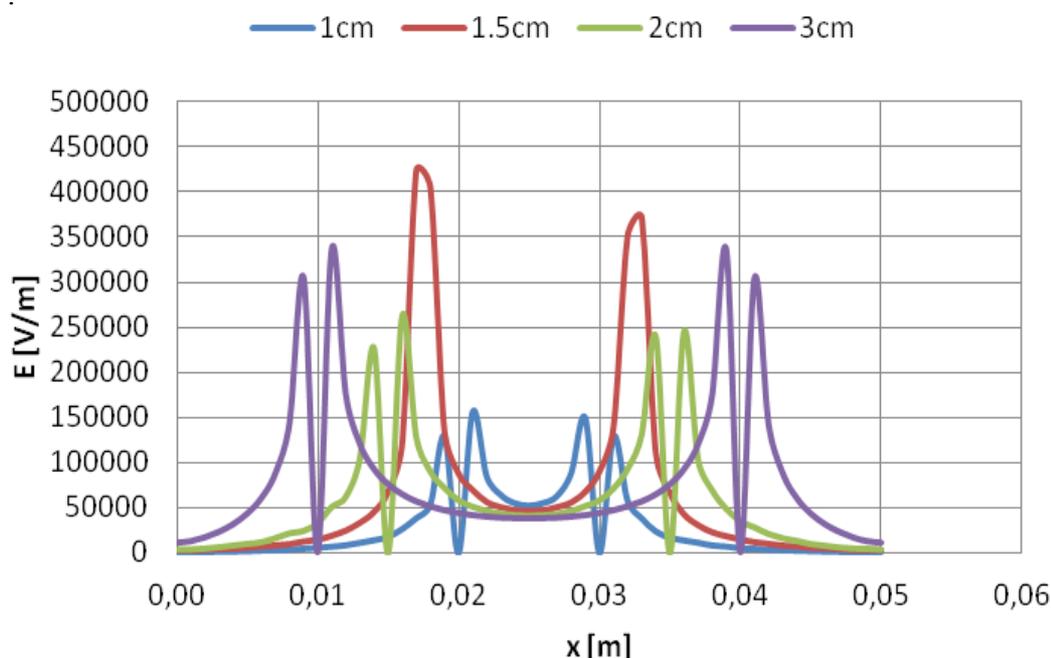


Figura 6.52 campo elettrico considerato per $y= 0.0175$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 6 mm.

In Figura 6 .53 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0238$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera C, posizionato alla profondità di 6 mm ed ottenuto applicando una tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi.

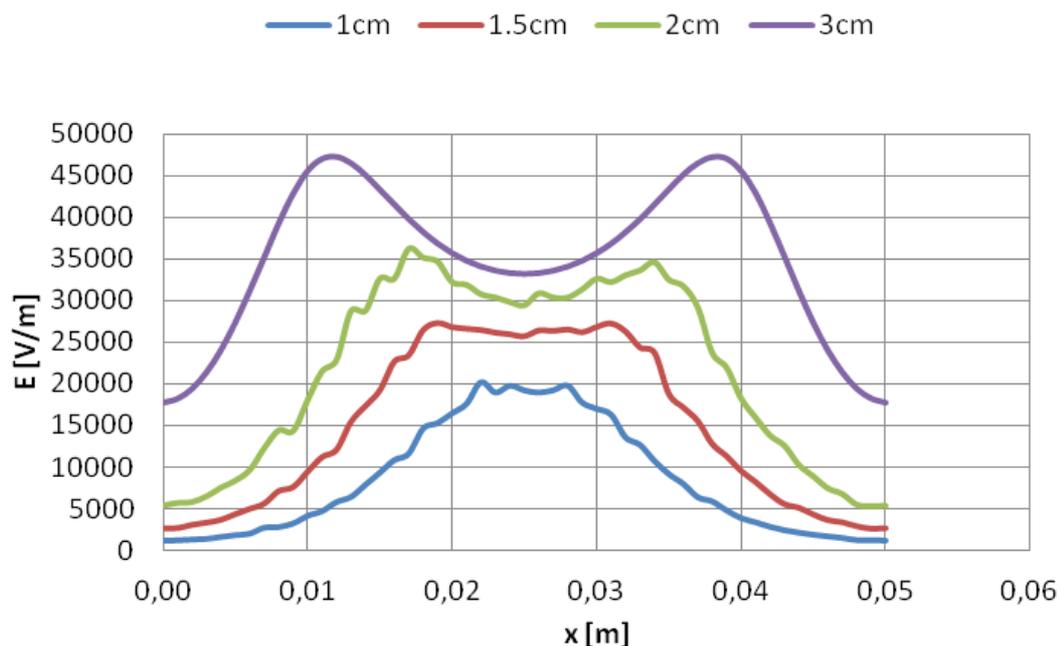


Figura 6.53 campo elettrico considerato per $y = 0.0238$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 6 mm.

In Figura 6.54 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m] = 0.0294$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera D, posizionato alla profondità di 6 mm ed ottenuto applicando una tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi.

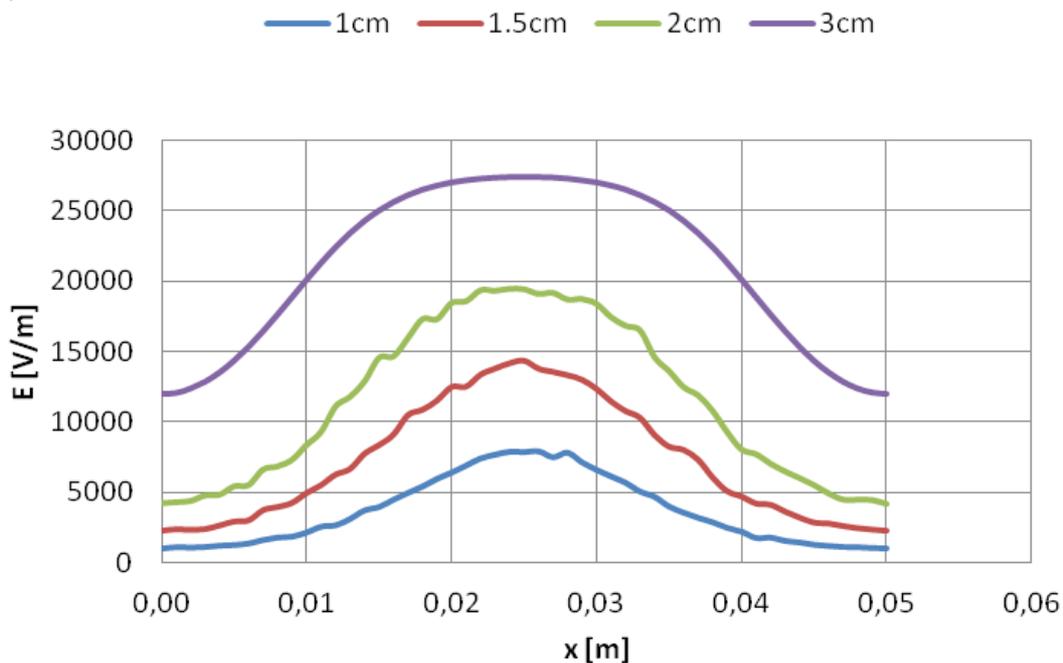


Figura 6.54 campo elettrico considerato per $y = 0.0294$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 6 mm.

Dalle tre figure sovrastanti (Figura 6.52, Figura 6.53, Figura 6.54) si osserva che il campo elettrico diminuisce prendendo in considerazione zone di tessuto campione più distanti dagli aghi (lungo le linee C e D di Figura 6.48) e che il campo elettrico lungo la coordinata $y=0.0175$ m è maggiore per gli elettrodi distanti 1.5 cm in punti molto vicini agli elettrodi (questo risultato è dovuto al campionamento) mentre in $y=0.0294$ l'intensità del campo aumenta all'aumentare della distanza degli aghi dell'elettrodo, ed è quindi maggiore nel caso dell'elettrodo da 3 cm.

In Figura 6.55 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0238$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera C, posizionato alla profondità di 0.012 m ed ottenuto applicando una tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi.

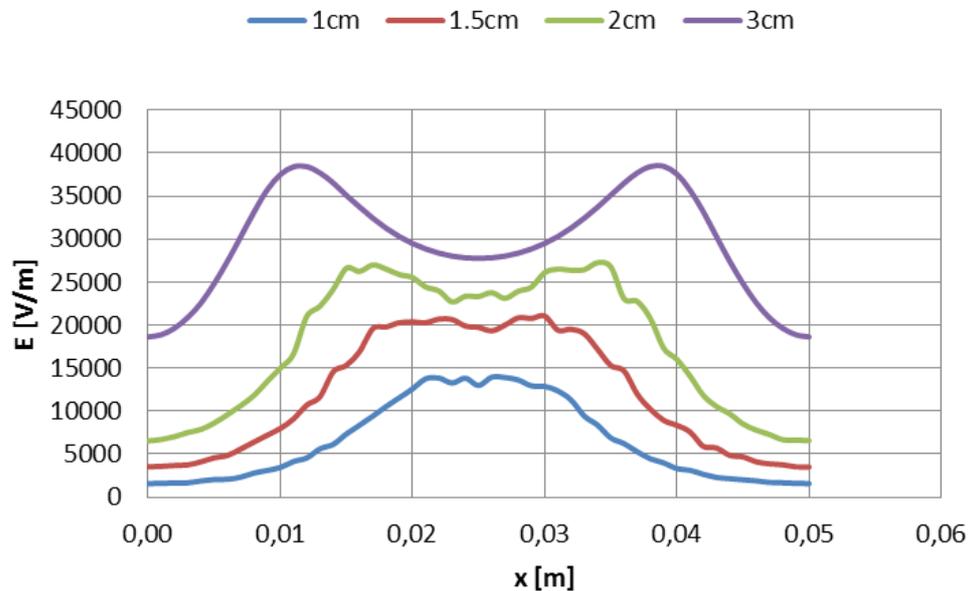


Figura 6.55 campo elettrico considerato per $y=0.0238$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 0.012 m.

In Figura 6.56 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0294$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera D, posizionato alla profondità di 0.012 m ed ottenuto applicando una tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi.

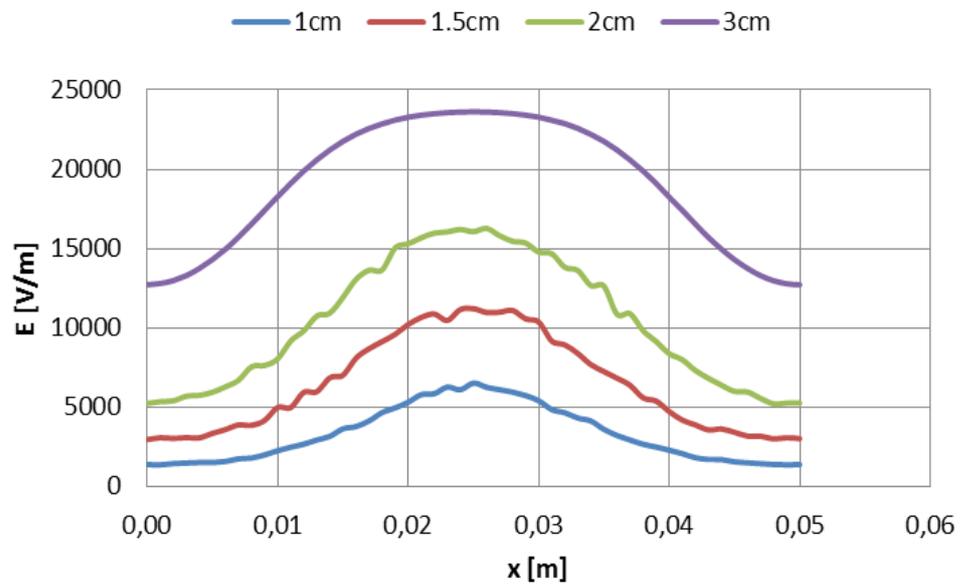


Figura 6.56 campo elettrico considerato per $y = 0.0294$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 0.012 m.

Dalle due figure sovrastanti (Figura 6 .55, Figura 6 .56) si può notare come il campo, allontanandosi dagli elettrodi, tenda a raggiungere un andamento più omogeneo e con picchi più smussati.

In Figura 6 .57 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0175$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera A, posizionato alla profondità di 0.018 m ed ottenuto applicando una tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi.

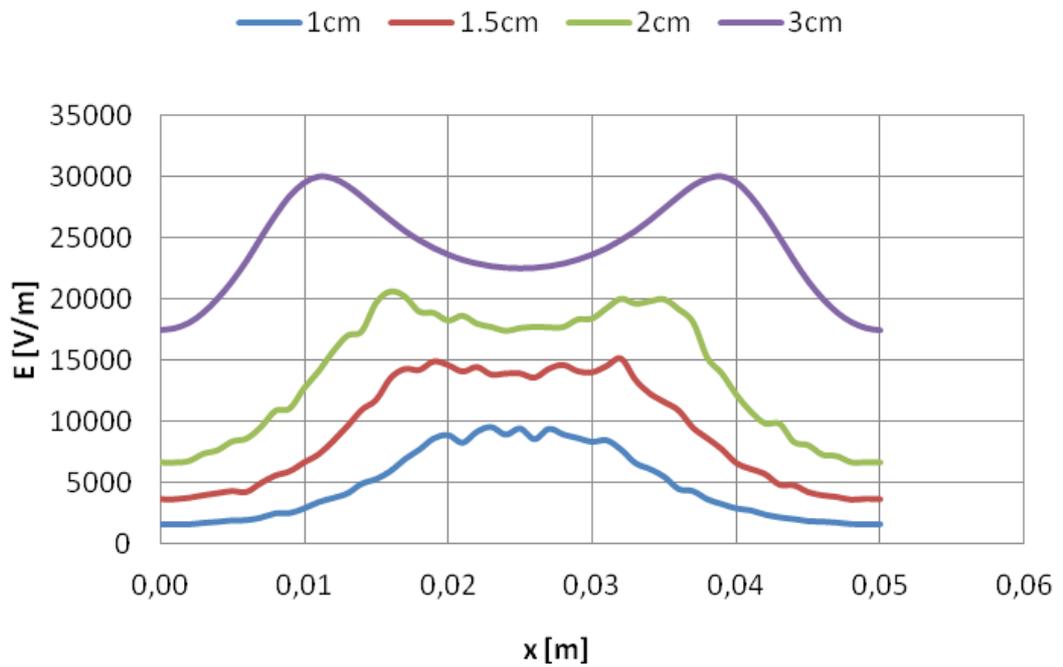


Figura 6.57 campo elettrico considerato per $y=0.0175$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 1.8 cm.

In Figura 6.58 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0189$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera B, posizionato alla profondità di 0.018 m ed ottenuto applicando una tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi.

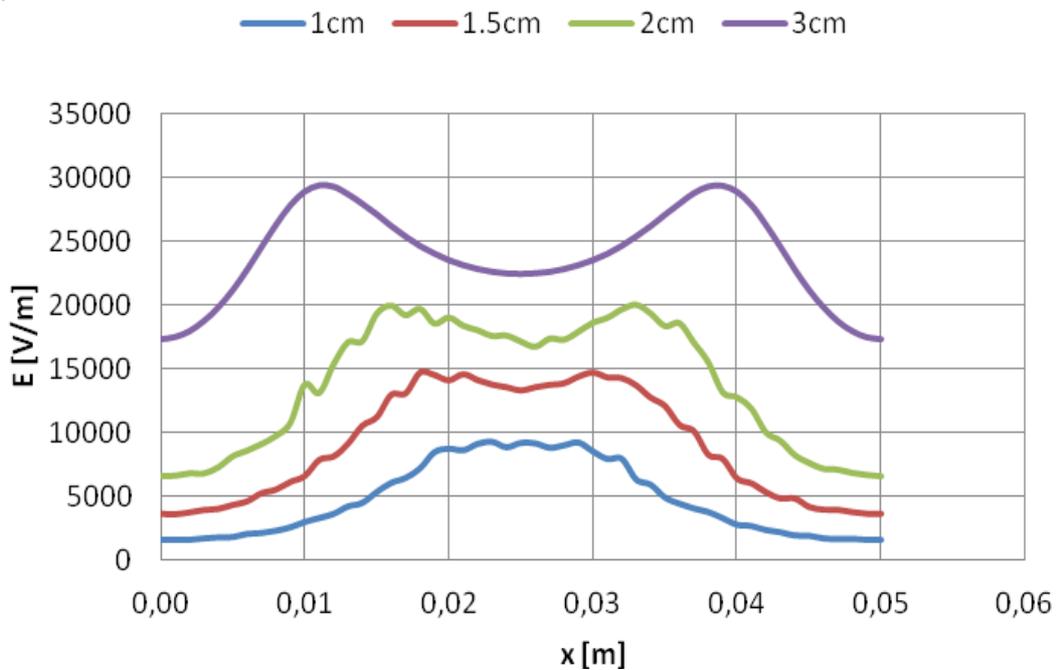


Figura 6.58 campo elettrico considerato per $y=0.0189$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 1.8 cm.

In Figura 6.59 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0238$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera C, posizionato alla profondità di 0.018 m ed ottenuto applicando una tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi.

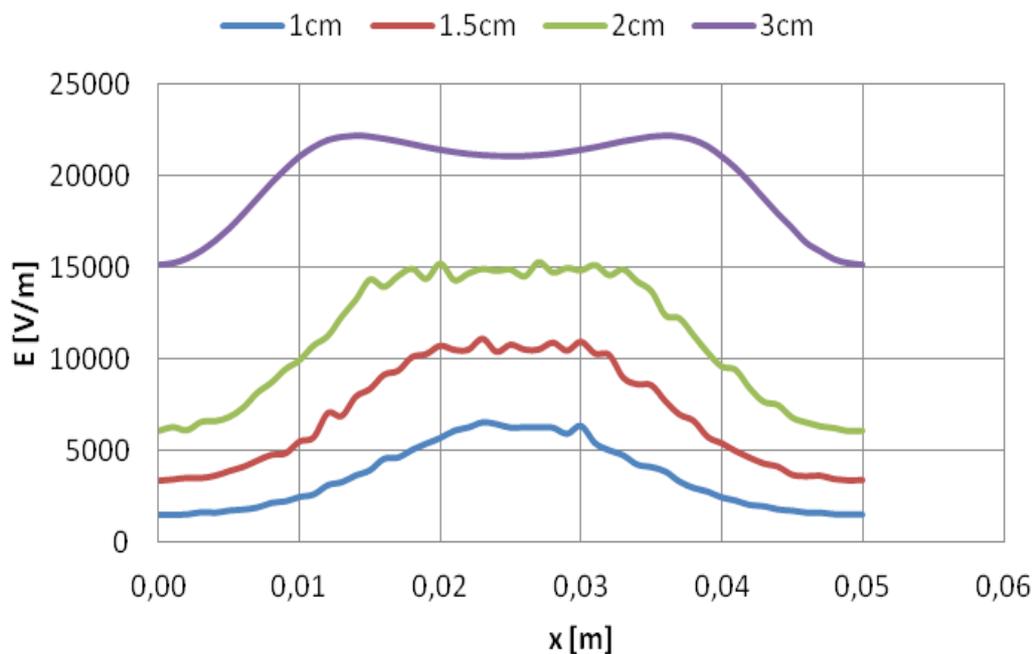


Figura 6.59 campo elettrico considerato per $y=0.0238$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 1.8 cm.

In Figura 6.60 è riportato il campo elettrico lungo la linea indicata da $y[m]=0.0294$ m rappresentata in Errore: sorgente del riferimento non trovata con la lettera D, posizionato alla profondità di 0.018 m ed ottenuto applicando una tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi.

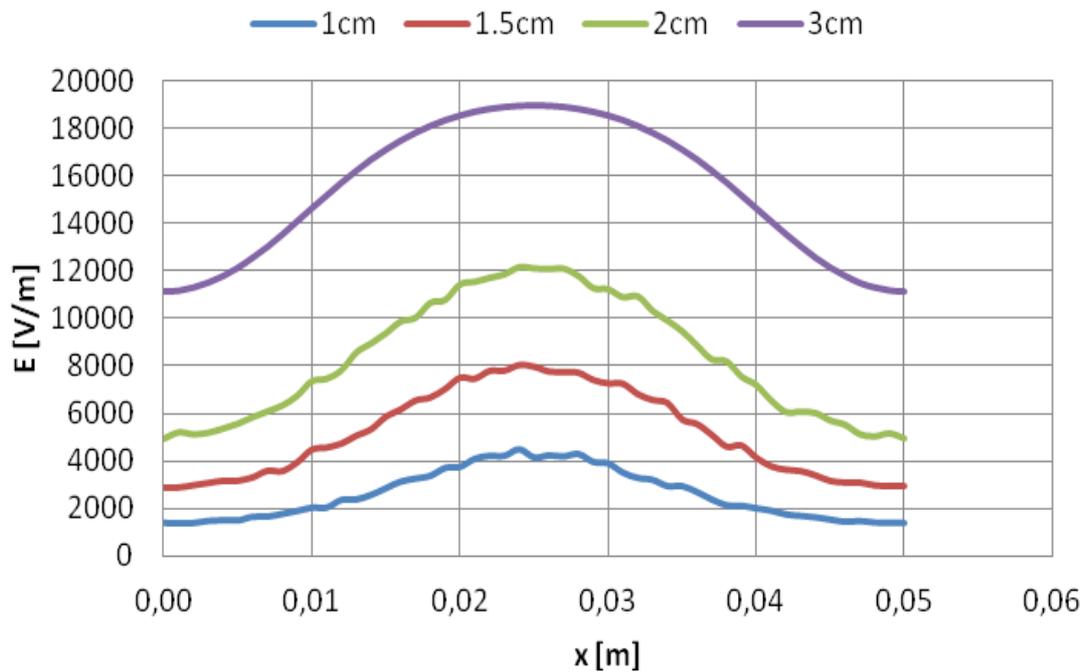


Figura 6.60 campo elettrico considerato per $y=0.0294$ m con tensione adeguata alla distanza tra gli elettrodi alla profondità di 1.8 cm.

Da queste ultime 4 figure (Figura 6.57, Figura 6.58, Figura 6.59, Figura 6.60) si nota che l'intensità del campo elettrico alla profondità di 1.8 cm è minore di quella che si osserva nei corrispondenti casi precedenti, in cui il campo è stato valutato su griglie di punti a livelli di profondità più vicini agli aghi. Si osserva inoltre che la profondità a cui si è andati a valutare il campo elettrico è tale per cui in qualsiasi punto della griglia di Figura 6.48 il campo d'intensità maggiore si ha sempre per gli elettrodi con aghi distanti 3 cm e diminuisce al diminuire della distanza tra gli aghi.

5.3.2 Confronto elettrodi 1 cm e 2 cm

In questo paragrafo sarà confrontato il campo elettrico, ottenuto mediante la simulazione numerica, prodotto da una coppia di elettrodi distanti d , con $d=1$ cm o 2 cm. La coppia di elettrodi è stata alimentata con tensione V e $V/2$. In particolare sono stati analizzati i seguenti casi:

- $d=1$ cm, $V=1000V$,
- $d=1$ cm, $V=500V$,
- $d=2$ cm, $V=2000V$,
- $d=2$ cm, $V=1000V$.

La Figura 6.61 rappresenta uno schema degli elettrodi e dei punti in cui sono stati campionati i valori del campo elettrico nel modello del campione di patata utilizzato nella simulazione numerica. In questa figura sono riportati sia i

punti in cui si è andato a calcolare il campo (i rombi colorati) sia la posizione degli elettrodi (cerchi grossi).

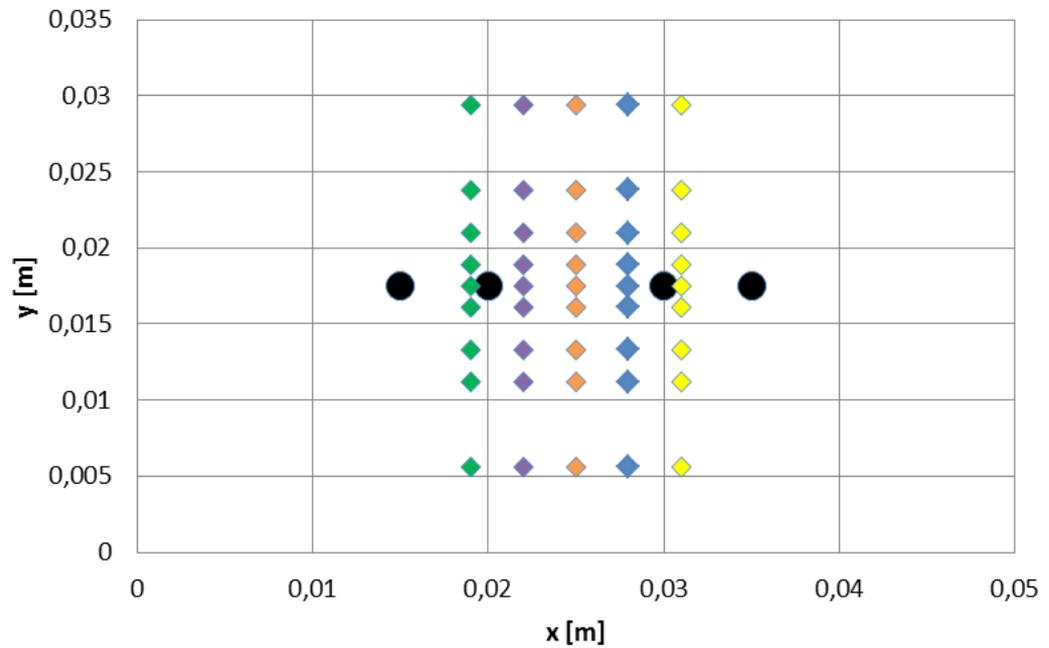


Figura 6.61 grafico che evidenzia i punti in cui si è andato a calcolare il campo. In particolare, ogni istogramma che si presenterà nel capitolo, riguarderà punti dello stesso colore.

I grafici successivi riportano il valore del campo elettrico alla profondità di z cm, con $z = 0, 1.2, 1.8$ cm ottenuti in ciascuno dei punti in Figura 6.61 per i quattro casi analizzati.

In Figura 6.62 sono rappresentati i valori di campo elettrico dei punti con ascissa $x=0.025$ m per lo strato a profondità 0 m (rombi arancioni in Figura 6.61).

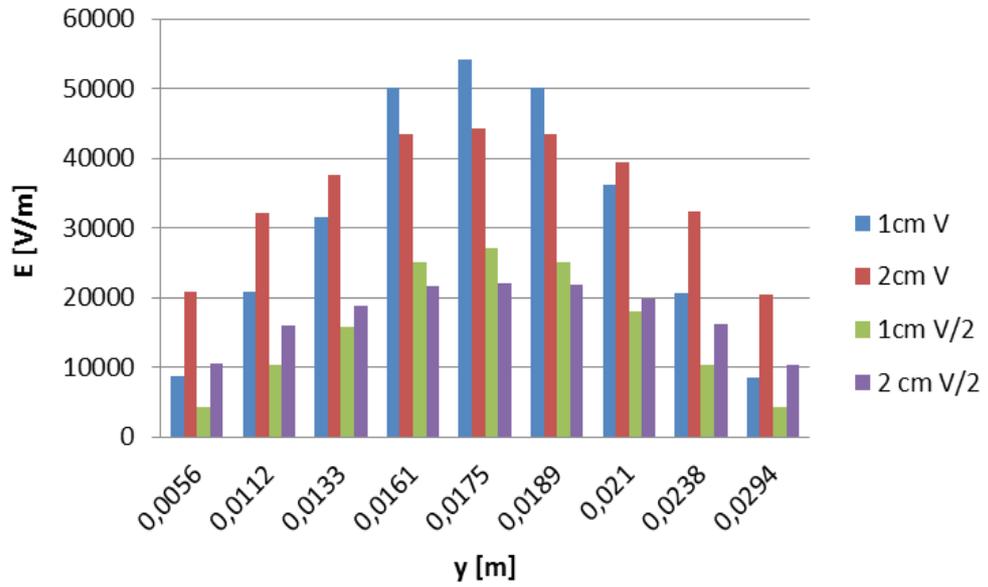


Figura 6.62 confronto del campo elettrico per elettrodi da 1cm e 2 cm alla tensione $V=2000V$ e $V/2=1000V$ per $x=0.025$ alla profondità 0 (punti arancioni).

In Figura 6.63 sono rappresentati i valori di campo elettrico dei punti con ascissa $x=0.031$ m per lo strato a profondità 0 m (rombi gialli in Figura 6.61).

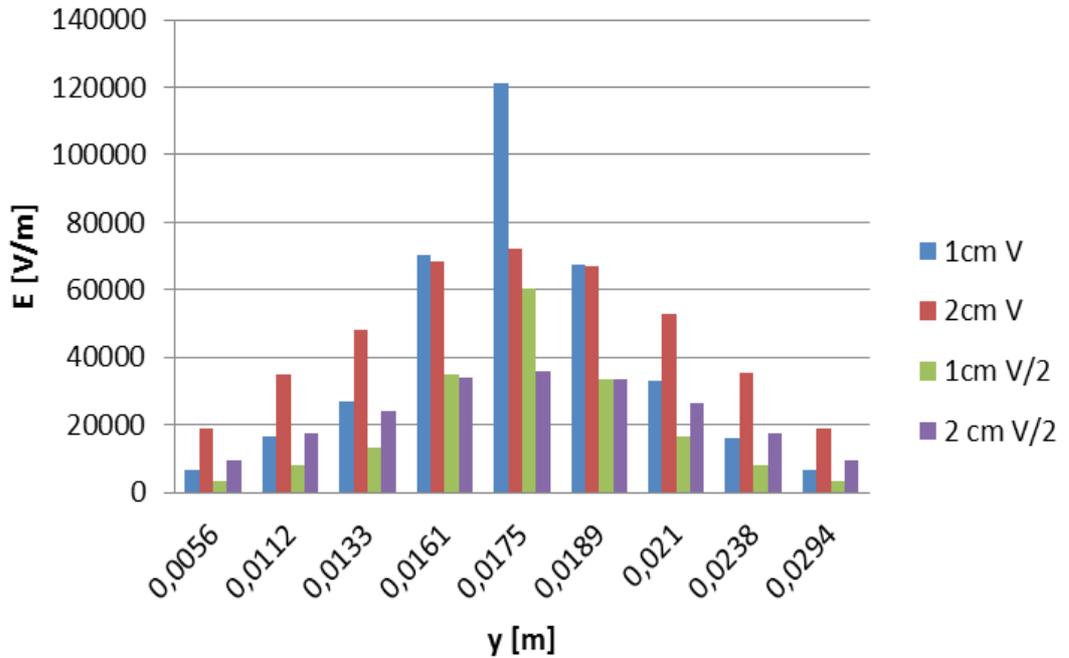


Figura 6.63 confronto del campo elettrico per elettrodi da 1cm e 2 cm alla tensione $V=2000V$ e $V/2=1000V$ per $x=0.031$ alla profondità 0 (punti gialli).

In Figura 6.64 sono rappresentati i valori di campo elettrico dei punti con ascissa $x=0.025$ m per lo strato a profondità 1.2 cm (rombi arancioni in Figura 6.61).

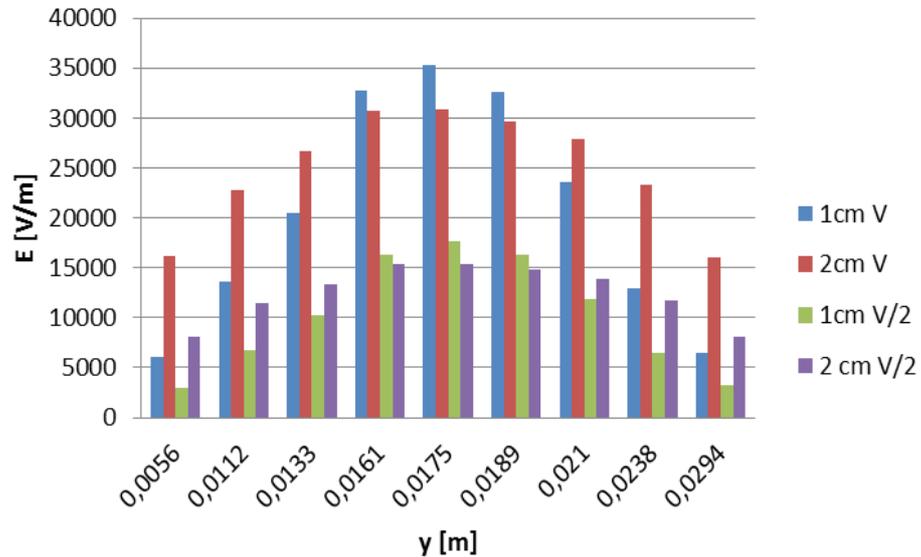


Figura 6.64 confronto del campo elettrico per elettrodi da 1cm e 2 cm alla tensione $V=2000V$ e $V/2=1000V$ per $x=0.025$ alla profondità di 1.2 cm (punti arancioni).

In Figura 6.65 sono rappresentati i valori di campo elettrico dei punti con ascissa $x=0.031$ m per lo strato a profondità 1.2 cm (rombi gialli in Figura 6.61).

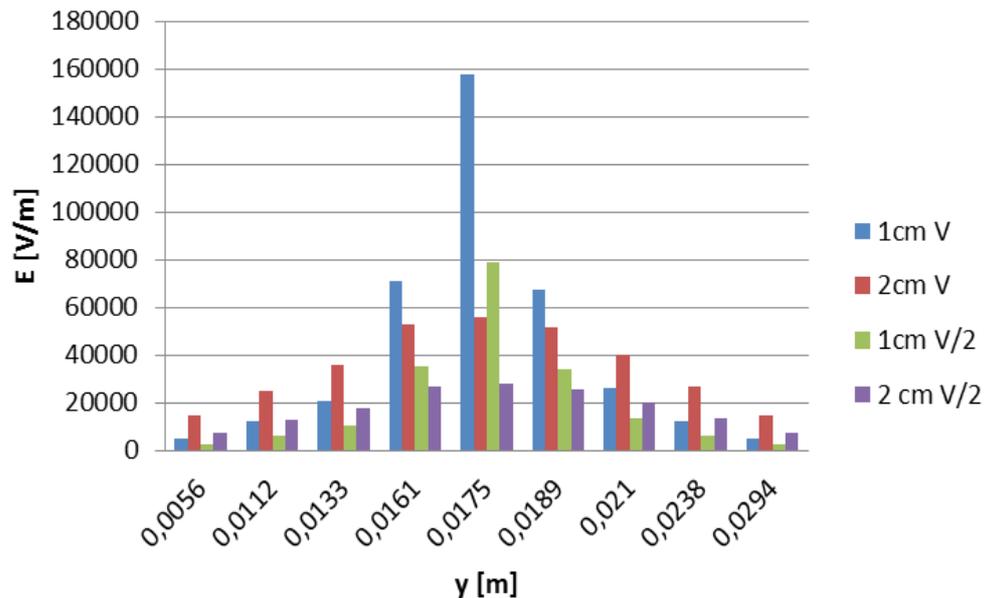


Figura 6.65 confronto del campo elettrico per elettrodi da 1cm e 2 cm alla tensione $V=2000V$ e $V/2=1000V$ per $x=0.031$ m alla profondità di 1.2 cm (punti gialli).

Dagli istogrammi di Figura 6.62, Figura 6.63, Figura 6.64 e Figura 6.65 si evidenzia come il campo elettrico generato con elettrodi da 1 cm sia maggiore di quello generato con elettrodi distanti 2 cm nelle zone vicino a dove sono stati impiantati gli aghi ($x=2$ e 3 cm per gli aghi distanti 1 cm e $x=1.5$ e 3.5 cm per gli aghi distanti 2 cm), mentre si vede che il valore del campo elettrico generato con elettrodi distanti 2 cm è superiore a quello ottenuto per $d=1$ cm per le ascisse $x=0.0133$ m. In particolare l'inversione di tendenza si riscontra per $y \geq 0.021$ m (e simmetricamente per $y \leq 0.0133$ m).

In Figura 6.66 sono rappresentati i valori di campo elettrico dei punti con ascissa $x=0.025$ m per lo strato a profondità 1.8 cm (rombi arancioni in Figura 6.61).

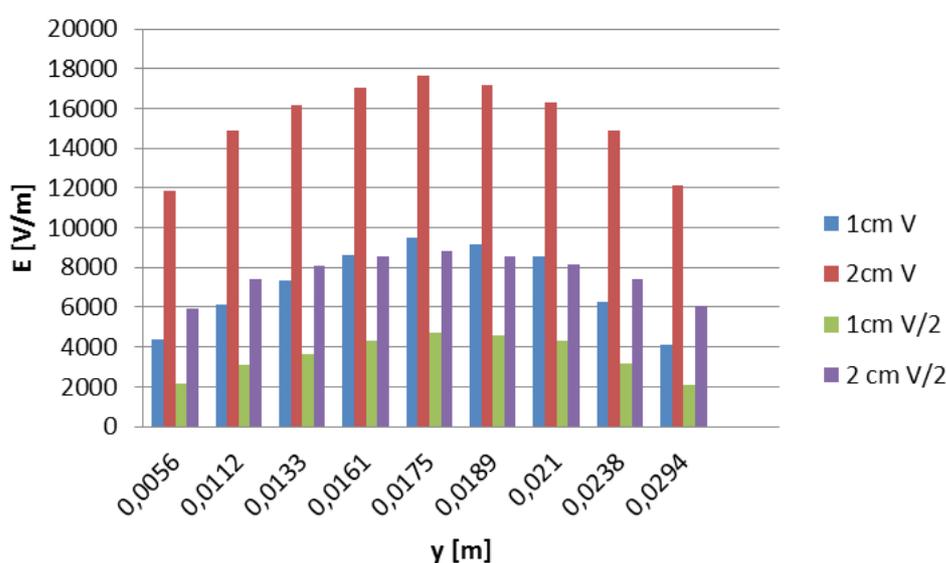


Figura 6.66 confronto del campo elettrico per elettrodi da 1cm e 2 cm alla tensione $V=2000V$ e $V/2=1000V$ per $x=0.025$ alla profondità di 1.8 cm (punti arancioni).

Dalla Figura 6.66 si può invece osservare come, alla profondità di 1.8 cm, il campo sia nettamente maggiore per elettrodi con aghi distanti 1 cm in qualsiasi valore delle y lo si vada ad esaminare. Questo è dovuto al fatto che siamo ad una profondità molto maggiore rispetto al livello degli aghi, e quindi il grado di elettroporazione a questo livello è maggiore per aghi più distanziati tra di loro.

5.3.3 Andamento a seconda della profondità

In questo paragrafo viene analizzato il campo elettrico prodotto da una coppia di elettrodi distanti d , con $d=1$ cm o 2 cm e campionato in alcuni dei punti indicati in Figura 6.61 e a varie profondità. Come nel paragrafo precedente, anche qui la

coppia di elettrodi è stata alimentata con tensione V e $V/2$ e sono stati analizzati i casi:

- $d=1$ cm, $V=1000V$,
- $d=1$ cm, $V=500V$,
- $d=2$ cm, $V=2000V$,
- $d=2$ cm, $V=1000V$.

In Figura 6.67 è riportato una sezione del modello del campione di tessuto di patata utilizzato nella simulazione numerica descritta nel paragrafo 5.2. Il tessuto sottoposto al campo elettrico mediante elettrodi ad ago è schematizzato come un parallelepipedo con dimensioni $5 \times 3.5 \times 1.8$ cm. In questa figura sono riportati sia i punti nei quali si è andati a calcolare il campo (stelle colorate) sia i punti in cui sono stati applicati gli aghi (cerchi neri).

D = 0.0294m

C = 0.0238m

B = 0.0189m

A = 0.0175m

E = 0.025m F = 0.028m G = 0.031m

Figura 6.67 schema del campione di tessuto di patata utilizzato nella simulazione con riportati i punti (stelle colorate) in cui si è andati a calcolare il campo elettrico alle varie profondità.

Dalla Figura 6.68, in cui è riportato il campo nel punto $x=0.025$ m e $y=0.0189$ m di (stella rossa) al variare della profondità in cui il campo elettrico è stato campionato, si nota che, per ogni gruppo di elettrodi, il campo diminuisce all'aumentare della profondità. Si vede inoltre che per $h=18$ il campo prodotto dagli aghi distanti 2 cm supera quello prodotto dagli aghi distanti 1 cm, mentre questo non avviene per $h=12$.

Figura 6.68 confronto del campo elettrico al variare della profondità per elettrodi da 1cm e 2 cm in $x=0.025$ m e $y=0.0189$ m

Anche dalla Figura 6.69, in cui è riportato il campo nel punto $x=0.025$ m e $y=0.0238$ m di (stella verde) al variare della profondità in cui il campo elettrico è stato campionato, si nota che, per ogni gruppo di elettrodi, il campo diminuisce all'aumentare della profondità. In questo caso però il campo generato dagli elettrodi con aghi distanti 2 cm è maggiore rispetto a quello generato da elettrodi da 1 cm per qualsiasi profondità.

Figura 6.69 confronto del campo elettrico al variare della profondità per elettrodi da 1cm e 2 cm in $x=0.025$ m e $y=0.0238$ m

In Figura 6.70 è riportato il campo nel punto $x=0.028$ m e $y=0.0175$ m di (stella viola) al variare della profondità in cui il campo elettrico è stato campionato. Osservando questi istogrammi si nota invece che, per gli aghi distanti 1 cm, il campo elettrico maggiore è a profondità 6 mm, a differenza dei casi precedenti in cui il campo maggiore si aveva per $h = 0$. Inoltre per $h=18$ il campo degli aghi distanti 2 cm supera quello degli aghi distanti 1 cm.

Figura 6.70 confronto del campo elettrico al variare della profondità per elettrodi da 1cm e 2 cm in $x= 0.028$ m e $y= 0.0175$ m.

Dalla Figura 6.71, in cui è riportato il campo nel punto $x=0.025$ m e $y=0.0175$ m di (stella blu) al variare della profondità in cui il campo elettrico è stato campionato si nota che, per ogni gruppo di elettrodi, il campo diminuisce all'aumentare della profondità e, osservando gli istogrammi relativi a $h=12$ a $h=18$, questa diminuzione è molto meno marcata rispetto a quella riscontrata per $h=12$ e $h=6$, e per $h=6$ e $h=0$. Si vede inoltre che, a parità di profondità, il campo elettrico maggiore è sempre quello prodotto dagli aghi distanti tra loro 1 cm, a parte il caso di $h=18$, in cui il campo prodotto dagli aghi distanti 2 cm supera quello prodotto dagli aghi distanti 1 cm.

Figura 6.71 confronto del campo elettrico al variare della profondità per elettrodi da 1cm e 2 cm in $x=0.025$ m e $y=0.0175$ m.

In Figura 6.72 è riportato il campo nel punto $x=0.025$ m e $y=0.0294$ m di (stella gialla) al variare della profondità in cui il campo elettrico è stato campionato. Da questi istogrammi si osserva che, nel punto in considerazione, il campo elettrico maggiore a qualsiasi profondità è quello degli elettrodi con aghi distanti 2 cm. Si osserva inoltre che per ogni tipo di elettrodo il valore del campo elettrico cala all'aumentare della profondità.

Figura 6.72 confronto del campo elettrico al variare della profondità per elettrodi da 1cm e 2 cm in $x=0.025$ m e $y=0.0294$ m.

5.3.4 Considerazioni sulle correnti di dispersione

L'elettrodo a maglia è formato da una disposizione di aghi che copre un'area più ampia rispetto a quella coperta dall'elettrodo standard a sette aghi. Per ridurre il tempo di applicazione degli impulsi si sono alimentate più coppie di aghi in parallelo. Quindi, poiché gli elettrodi utilizzati hanno un certo numero di coppie di aghi connesse in parallelo, ci si è chiesti se si potevano presentare delle correnti di dispersione tra le varie coppie.

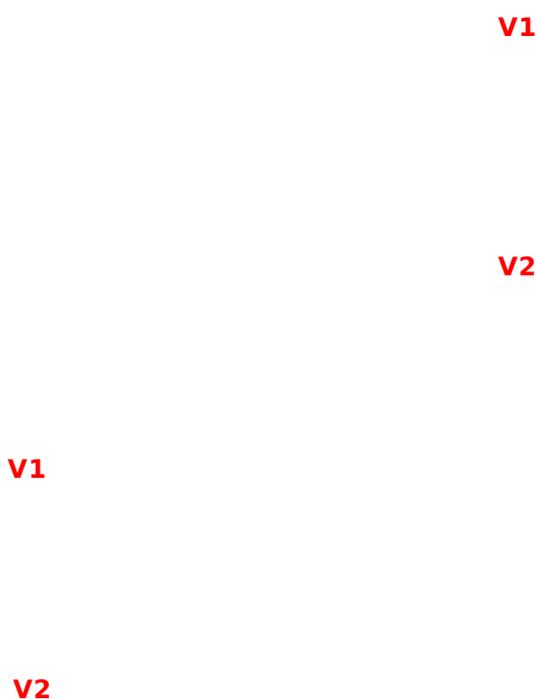


Figura 6.73 elettrodo a maglia da 2 cm.

Osservando la Figura 6.73, alimentando le due coppie di aghi C-F evidenziate con le linee continue con la differenza di potenziale V1-V2 si vede che la stessa differenza di potenziale V1-V2 sussiste anche tra le coppie di aghi C-F evidenziate nelle righe tratteggiate. Gli aghi di queste ultime coppie, che saranno delle “secondarie”, sono però a distanza maggiore di quelli che formano le coppie principali, per cui il campo elettrico generato dalla differenza di potenziale ai loro capi è inferiore rispetto a quello ai capi delle coppie di aghi principali. Per verificare l'entità delle correnti di dispersione, cioè per verificare se fossero in grado di elettroporare il tessuto di patata, si è utilizzato l'elettrodo da 2 cm che, come si nota dalla Figura 6.73, presenta due coppie C-F connesse tra loro in parallelo. In Figura 6.73 sono inoltre riportate delle frecce indicanti la tensione instaurata tra le coppie

C-F (linea rossa continua) e la tensione che si crea a causa della corrente di dispersione (freccette tratteggiate). Nel test sperimentale ciascuna delle due coppie di aghi è stata alimentata in successione applicando 10 impulsi da 2000V. Dai dati di tensione e corrente è stata ricavata la resistenza. Cambiando poi il pezzo di patata, sono state alimentate le due coppie di aghi contemporaneamente. In Tabella 6.9 sono riportate le correnti registrate per le tre prove e si può notare che la somma delle due correnti delle coppie di aghi C-F isolati tra di loro è inferiore al valore di corrente ottenuto mandando 10 impulsi da 2000V alle due coppie contemporaneamente.

	I med [A]
x = C-F in alto	8,17
y = C-F in basso	5,36
z = C-F insieme	19,25
w = x+y	13,53
v = z-w	5,72

Tabella 6.9

Dalla differenza tra i due valori (z e w nella tabella) si ottiene l'entità della corrente di dispersione, che in questo caso è pari a circa 5,72 A. I campioni di tessuto così trattati sono stati osservati dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi.

Come si nota dalla Figura 6.74, la zona elettroporata più scura corrisponde alla zona in cui erano impiantate le due coppie di aghi C-F e queste due aree sono collegate da una striscia annerita, che attraversa il tubero diagonalmente. Questa striscia è stata causata dalla corrente di dispersione.



Figura 6.74 patata dopo 24 ore dell'applicazione di 10 impulsi da 2000V agli aghi C-F.

In Figura 6.75 a. e b. è schematizzata la geometria di una maglia di elettrodi.

In Figura 6.76, è riportata la distribuzione della densità di corrente ottenuta alimentando contemporaneamente le coppie di aghi evidenziate in Figura 6.75 a.: si

osserva la presenza di una corrente, seppur minima, che collega tra di loro le varie coppie di aghi (area color blu chiaro), e che rappresenta la corrente di dispersione.

a.

b.

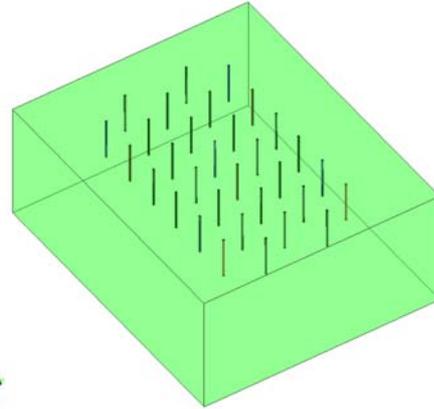


Figura 6.75 schema ottenuto tramite Flux di una maglia vista dall'alto (a.), posizionamento all'interno di un campione schematizzato come un parallelepipedo di una maglia (b.).

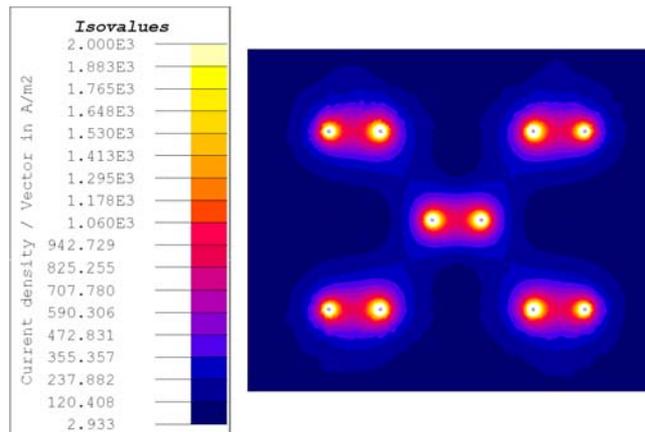


Figura 6.76 densità di corrente ottenuta alimentando coppie di aghi.

Si è infine provato a verificare se questa corrente di dispersione fosse in grado di elettroporare le cellule in vitro. Questo test è stato eseguito utilizzando l'elettrodo a maglia con aghi distanti 1 cm e applicando 10 impulsi di tensione a 1000V e si è osservato che tale corrente non è sufficientemente alta da causare l'elettroporazione delle cellule.

6 PROVA IN VITRO

In questo capitolo vengono analizzate le fotografie delle cellule ottenute con il microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse TE 2000-E prima e dopo l'elettroporazione di cellule di osteosarcoma (MG63) coltivate in vitro in piastre di Petri con diametro 8 cm attraverso il procedimento descritto nel paragrafo 4.1.3.

In Figura 7.77 è riportata la foto delle cellule sottoposte ad una tensione di 1000V con aghi distanti 1 cm e osservate in contrasto di fase. Si nota la presenza delle cellule sulla piastra di Petri.



Figura 7.77 coltura cellulare prima dell'elettroporazione con gli elettrodi da un centimetro, situata a sinistra dell'ago.

Nelle foto seguenti sono mostrate le cellule trattate con l'elettrodo con aghi distanti 1 cm e alimentati con tensione di 1000 V e cellule trattate con l'elettrodo con aghi distanti 2 cm e alimentati con tensione di 1000 V. In questo caso gli impulsi per l'elettroporazione delle cellule sono stati generati con il dispositivo commerciale Cliniporator fornito da Igea S.p.A. presente presso il laboratorio del Dipartimento di Morfologia, Chirurgia e Medicina sperimentale dell'Università di Ferrara. Nei casi esaminati in questo esperimento, per ciascuno elettrodo analizzato, veniva alimentata un unico gruppo di coppie di aghi connesse in parallelo.

In Figura 7.79 sono riportate le foto delle cellule a sinistra dell'ago e che erano state trattate con propidio (in alto) e calceina (in basso), dopo aver applicato una tensione di 1000V con elettrodi da 1 cm.

Le cellule in questo caso sono state osservate interponendo gli opportuni filtri per visualizzare la fluorescenza dei coloranti utilizzati.

Il propidio, utilizzando un opportuno filtro ottico, mostra le cellule di colore rosso se le loro membrane sono state elettroporate, mentre la calceina, applicata dopo

l'elettroporazione, mostra le cellule di colore blu se esse sono vive. La combinazione dei due coloranti permette di valutare l'effetto di elettroporazione sulle cellule.

Le foto seguenti mostrano l'effetto dell'elettroporazione attorno a uno degli aghi di una delle coppie alimentate con gli impulsi di tensione (schema in Figura 7.78).

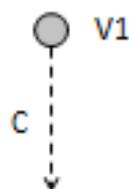
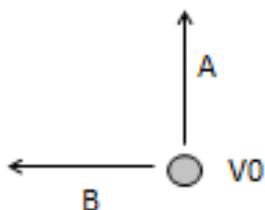


Figura 7.78

In Figura 7.79 sono riportate le immagini al microscopio a fluorescenza ottenute lungo la linea B in Figura 7.78.

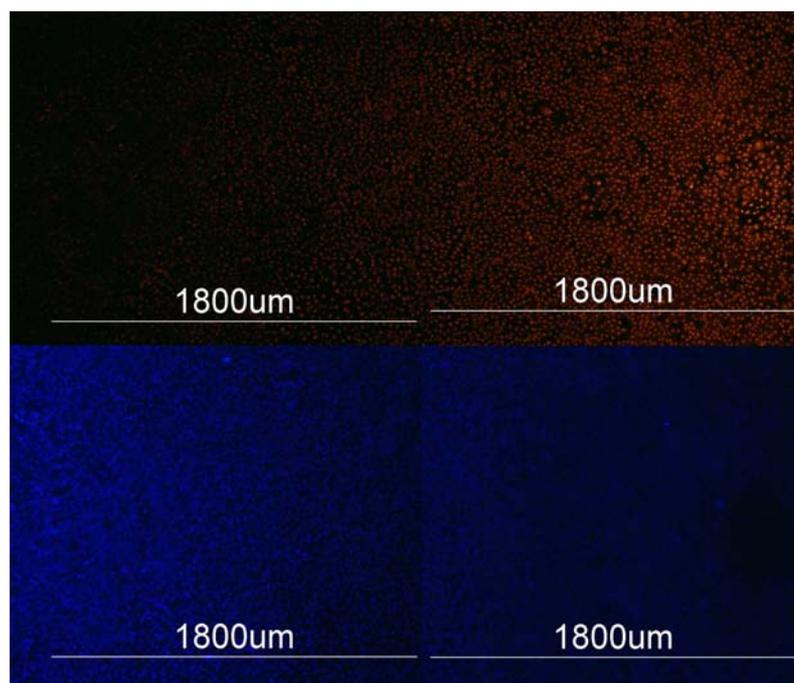


Figura 7.79 cellule trattate con propidio (rosso) e calceina (blu) dopo aver applicato una tensione di 1000V con elettrodi da 1 cm, situate a sinistra dell'ago (linea B).

In Figura 7.80 sono riportate le foto di cellule a situate sopra l'ago (direzione A in Figura 7.78) trattate col propidio (in alto) e la calceina (in basso), dopo aver applicato una tensione di 1000V con elettrodi da 1 cm.

Da queste foto, osservando la parte dell'immagine relativa al propidio, si vede che la zona elettroporata al 100 % si estende per circa 2400 μm a sinistra dell'ago e per circa 1500 μm al di sopra dell'ago.

Osservando invece la parte dell'immagine relativa alla calceina, e confrontandola con quella del propidio che mette in evidenza le cellule elettroporate, si può notare se le cellule sono rimaste vive dopo l'applicazione degli impulsi di tensione. In particolare in Figura 7.79 e in Figura 7.80 si vede che le cellule attorno all'ago (zona rosso più intenso a destra nell'immagine relativa al propidio e nera nell'immagine relativa alla calceina) risultano elettroporate, ma morte in una zona ampia circa 450 μm . Le cellule presentano poi un blu meno intenso in una zona ampia circa 720 μm .

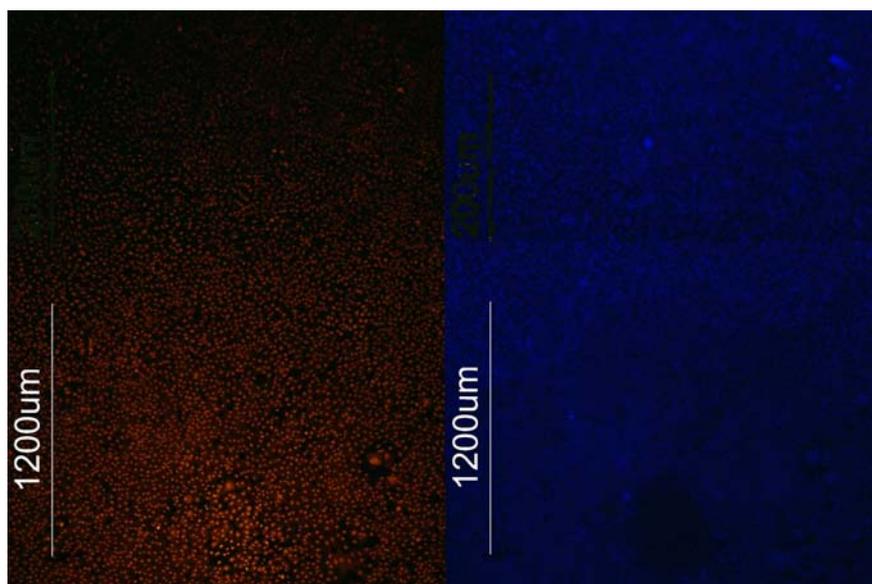


Figura 7.80 cellule trattate con propidio (rosso) e calceina (blu) dopo aver applicato una tensione di 1000V con elettrodi da 1 cm, situate sopra l'ago (linea A).

In Figura 7.81 è riportata la foto del monostrato cellulare sottoposto ad una tensione di 1000V con aghi distanti 2 cm e osservate in contrasto di fase.



Figura 7.81 coltura cellulare prima dell'elettroporazione con aghi distanti 2 cm.

In Figura 7.82 sono riportate le foto di cellule a situate sotto l'ago (direzione C in Figura 7.78) trattate col propidio (in alto) e la calceina (in basso).

In questo caso si vede che la zona elettroporata al 100 % (colore rosso) si estende fino a circa 2100 μm dal centro dell'ago e in questo caso risulta elettroporata una zona più ampia rispetto al caso dell'elettrodo con aghi distanti 1 cm in cui l'elettroporazione del 100 % delle cellule arrivava a circa 1500 μm . In questo caso la zona attorno all'ago in cui le cellule sono morte ha un'ampiezza di circa 840 μm e quindi risulta più ampia rispetto al caso precedente (elettrodo con aghi distanti 1 cm).

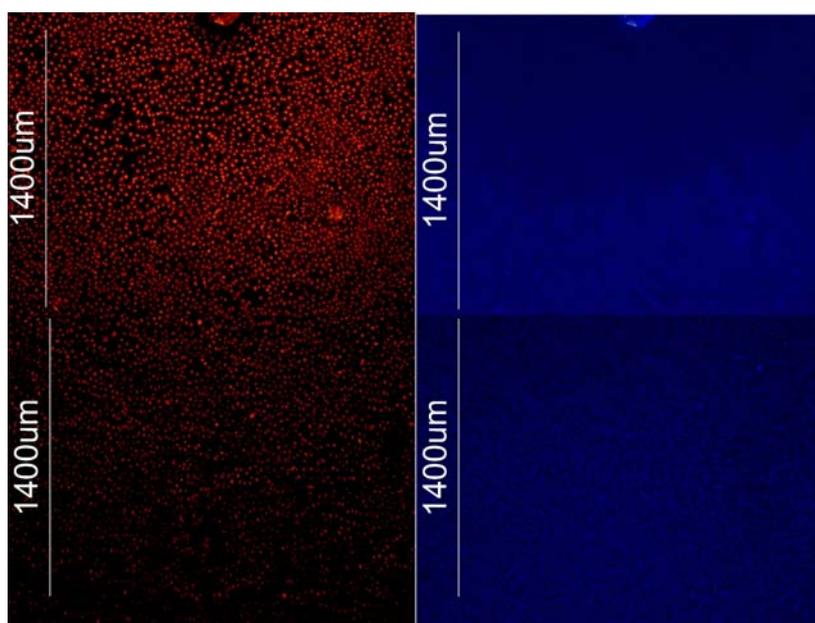


Figura 7.82 cellule trattate con propidio (rosso) e calceina (blu) dopo aver applicato una tensione di 1000V con elettrodi da 2 cm, situate sopra l'ago (linea C).

7 CONCLUSIONI

L'elettroporazione della membrana cellulare aumenta la permeabilità delle cellule aprendo dei canali nella membrana stessa. L'apertura di questi canali è ottenuta applicando al tessuto biologico degli impulsi di tensione con intensità e durata adeguati.

In questa tesi sono stati testati alcuni prototipi di elettrodo a maglia, realizzati nell'ambito di una tesi magistrale, per l'applicazione di trattamenti di ECT in aree estese. Per verificare l'efficacia degli elettrodi sono state condotte varie prove su tessuto di patata. Infatti è noto che questo vegetale ha la caratteristica di assumere un colore scuro entro le 24-30 ore dall'elettroporazione a causa del processo di ossidazione che subisce l'amido fuori uscita dalle membrane cellulari a seguito dell'applicazione di impulsi. Dopo aver osservato la colorazione assunta dalle patate elettroporate e dopo aver estrapolato i valori di tensione, corrente e resistenza di ogni impulso, alcuni campioni di tessuto sono stati trattati con i coloranti Blu di metilene e

Lugol e osservati al microscopio ottico. Le prove condotte al microscopio ottico hanno permesso di visualizzare l'effetto dell'elettroporazione sulle cellule: si è osservato il danno provocato dagli impulsi di tensione a livello della membrana cellulare.

- Nelle zone più distanti dagli aghi il livello di elettroporazione diminuisce rispetto alle zone in prossimità degli aghi;
- Aumentando la distanza tra gli aghi l'elettroporazione avviene per profondità maggiori rispetto agli elettrodi con aghi più ravvicinati;
- A parità di tensione, aumentando il numero d'impulsi applicati aumenta il livello di elettroporazione;
- L'elettroporazione del tessuto ha avuto luogo con tutti gli elettrodi testati, mandando impulsi a tensione nominale V e $V/2$.

I dati di campo elettrico ottenuti mediante simulazione ad elementi finiti hanno permesso di verificare le osservazioni sperimentali: nel caso in cui gli elettrodi erano a distanza maggiore ($d \geq 2\text{cm}$) l'elettroporazione avveniva più in profondità rispetto a quella ottenuta con gli elettrodi a distanza 1 cm. In effetti, confrontando, a parità di punti di campionamento, il livello di campo elettrico ottenuto dal modello di simulazione in cui gli aghi erano a distanza $d=1\text{ cm}$ o $d=2\text{ cm}$ si è visto che il livello di campo elettrico, in quei punti era maggiore nel caso di elettrodi con $d=2\text{cm}$ confermando il colore scuro assunto dal tubero in quella zona.

Le prove con cellule in vitro hanno infine mostrato le differenze di elettroporazione ottenute in prossimità degli elettrodi al variare della distanza degli aghi (elettrodi con aghi distanti 1 cm o 2 cm) a parità di tensione di alimentazione ($V_1=1000\text{ V}$). In particolare si è visto che il campo elettrico nei due casi esaminati provocava effetti diversi attorno agli aghi: con elettrodi più distanti la zona di elettroporazione irreversibile è risultata più estesa

Nonostante alcune prove siano state caratterizzate da risultati diversi da quelli attesi a causa della grande varietà delle proprietà elettriche delle patate utilizzate, i risultati ottenuti hanno permesso di dimostrare l'efficacia degli elettrodi sviluppati. Tramite le esperienze svolte nell'ambito di questa tesi si è inoltre dedotto che aumentando la distanza tra gli aghi ed aumentando il numero d'impulsi applicati è possibile ottenere una buona efficacia nell'elettroporazione.

8 BIBLIOGRAFIA

- [1] Lluís M. Mir, Stéphane Orlowski, *Mechanisms of electrochemotherapy*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 35 (1999) 107-118.
- [2] Lluís M. Mir, *Bases and rationale of the electrochemotherapy*. *Ejc supplements* 4 (2006) 38-44.
- [3] A. Ongaro, A. Pellati, A. Caruso, M. Battista, F. De Terlizzi, M. De Mattei, M. Fini, *Identification of in Vitro Electroporation Equivalent Pulse Protocols*, *Technology in Cancer Research and Treatment*, Vol 10, Number 5, Ottobre 2011.
- [4] Raphael C. Lee, M.D., Sc. D., Diane C. Gaylor; S.M., Deepak Bhatt, David A. Israel, M.D., *Role of Cell Membrane Rupture in the Pathogenesis of Electrical Trauma*. *Journal of surgical research* 44, 709-719 (1988).
- [5] Alexander Angersbach, Volker Heinz, Dietrich Knorr, *Electrophysiological Model of Intact and Processed Plant Tissues: Cell Disintegration Criteria, ???*

[6] Alexander Angersbach, Volker Heinz, Dietrich Knorr, *Effects of pulsed electric fields on cell membranes in real food systems*, Innovative Food Science & Emerging Technologies 1 (2000) 135-149.

[7] Federica Gómez Galindo, P. Thomas Vernier, Petr Dejmek, António Vicente, Martin A. Gundersen, *Pulsed Electric Field Reduces Permeability of Potato Cell Wall*, Bioelectromagnetics 29:296-301 (2008).

[8] A.Janositz, A.-K. Noack, D. Knorr, *Pulsed Electric Fields and their impact on the diffusion characteristics of potato slices*, LWT - Food Science and Technology 44 (2011) 1939-1945.

[9] D.Corradini, *Software per l'analisi dei dati nei trattamenti di elettroporazione*, 2011.

[10] F.Scandola, *Prototipo di elettrodo per l'elettrochemioterapia: aspetti costruttivi e prime prove*, 2013.

[11] www.cedrat.com