



Università degli studi di Padova
Dipartimento di Ingegneria

Ingegneria dell'informazione

Elettroporazione: set up sperimentale per la verifica della distribuzione del campo elettrico

Candidato:
Alvise Mason

Relatore:
Ch. mo Prof. Fabrizio Dughiero

Correlatore:
Ing. Elisabetta Sieni

Anno Accademico 2012-2013

A Giulia, alla mia famiglia ed ai miei amici

*“Sai perché cadiamo Bruce?
Per imparare a rialzarci”
(Thomas Wayne)*

Sommario

In questo elaborato è stato realizzato un set up di elettrodi sperimentale e dei modelli di tessuto biologico che potessero simulare un tumore e del tessuto sano circostante per la verifica della distribuzione del campo elettrico in seguito ad elettroporazione. Sono stati eseguiti dei test applicando il trattamento di elettroporazione su questi modelli vegetali utilizzando un set up sperimentale costruito ad hoc. I modelli vegetali sono stati costruiti con patate e melanzane, due materiali caratterizzati da diversa conducibilità. Il tessuto di patata ha simulato la massa tumorale ed il tessuto di melanzana ha simulato il tessuto sano circostante. Durante i test sono stati registrati i valori di corrente e tensione ed è stata calcolata la resistenza ai capi di ciascuna coppia di elettrodi. La variazione di colore nel tessuto di patata, che diventa scuro se elettroporato, è stata utilizzata per verificare la distribuzione del campo elettrico all' interno del tessuto biologico trattato. Il risultato sperimentale è stato confrontato con la distribuzione di campo ottenuta al calcolatore con la stessa configurazione di aghi. Infine sono state inoltre valutate le caratteristiche elettriche dei tessuti usati per la realizzazione dei modelli.

Indice

Introduzione	iii
1 Concetti generali	1
1.1 Elettroporazione (EP)	1
1.2 Electrochemioterapia (ECT)	2
2 Aspetti tecnici del trattamento di Electrochemioterapia	5
2.1 Generatori di impulsi	5
2.2 Elettrodi	8
2.3 Caratteristiche elettriche dei tessuti biologici	10
2.3.1 Conducibilità e permittività	11
2.3.2 Campo Elettrico	11
2.3.3 Effetto dell' elettroporazione sulla conducibilità dei tessuti	13
2.3.4 Disomogeneità del tessuto biologico	14
2.3.5 Il circuito equivalente	15
2.3.6 Il circuito RC parallelo	16
3 Esperimento per la valutazione della distribuzione del campo elettrico	19
3.1 Descrizione dell' esperimento	19
3.2 Il set up di elettrodi sperimentale	22
3.3 I modelli di tessuto vegetale	24
3.3.1 I modelli di test	24
3.4 La strumentazione	26
3.4.1 Generatore di Impulsi per ECT	26
3.4.2 L' acquisizione dei dati di resistenza	26
3.5 I dati dell' esperimento	29
3.6 Modellino #1	33
3.6.1 Dati di resistenza e resistività dei tessuti del Modello #1	33
3.6.2 Dati di resistenza e corrente durante l' elettroporazione del Modello #1	36

3.7	Modellino #2	41
3.7.1	Dati di resistenza e resistività dei tessuti del Modello #2	41
3.7.2	Dati di resistenza e corrente durante l' elettroporazione del Modello #2	44
3.8	Modellino #3	49
3.8.1	Dati di resistenza e resistività dei tessuti del Modello #3	49
3.8.2	Dati di resistenza e corrente durante l' elettroporazione del Modello #3	52
4	Confronto dei dati dei test sui tre modelli	57
4.1	Resistività	58
4.1.1	Tessuto di patata	58
4.1.2	Tessuto di melanzana	59
4.2	Corrente media per il 10° impulso di tensione	60
4.2.1	Coppie di aghi con $d = 10mm$	60
4.2.2	Coppie di aghi con $d = 18mm$	60
4.2.3	Coppie di aghi con $d = 26,5mm$	61
4.3	Resistenza media per il 10° impulso di tensione	62
4.3.1	Coppie di aghi con $d = 10mm$	62
4.3.2	Coppie di aghi con $d = 18mm$	62
4.3.3	Coppie di aghi con $d = 26,5mm$	63
4.4	Distribuzione del campo elettrico simulata al calcolatore e sperimentale	64
	Conclusioni	67

Introduzione

Circa il 4% della popolazione italiana ha una diagnosi di tumore. Tale dato è statisticamente in continuo aumento, si è infatti passati dai 235 000 nuovi casi conteggiati in pazienti tra gli 0 e 84 anni di età nel 2000, ai 255 000 stimati nel 2010.

La probabilità di ammalarsi nel corso della vita è stimata intorno al 32.6% per gli uomini, che tendono in prevalenza a contrarre tumore della prostata (22% delle diagnosi), ed attorno al 22.9% per le donne, le quali invece dimostrano un' elevata predisposizione per il tumore della mammella (oltre 500 000 casi). La maggior parte dei tumori maligni può inoltre condurre alla formazione di metastasi, che secondo recenti studi, sono cutanee nel 3-10% dei casi.

Le terapie tradizionali quali la chirurgia, la radioterapia, la chemioterapia, talvolta risultano inefficaci. In alcune situazioni, una terapia di recente sviluppo, l' elettrochemioterapia (ECT), può aiutare il medico a controllare la malattia e a migliorare la qualità di vita del paziente oncologico [1]. Attualmente l' ECT è usata per trattare melanomi, tumori superficiali e recidive di cancro alla mammella quando le terapie convenzionali non danno i risultati attesi. In genere l' ECT è applicata utilizzando elettrodi ad ago equispaziati e fissati su di un supporto rigido e solitamente sono trattate lesioni della cute di dimensioni limitate. Questa terapia sfrutta il fenomeno dell' elettroporazione (EP) per facilitare l'assorbimento di farmaci chemioterapici da parte delle cellule all' interno della propria membrana. Il fenomeno di permeabilizzazione della membrana cellulare mediante impulsi elettrici è detto elettroporazione (EP). In questo tipo di terapia, il farmaco chemioterapico viene iniettato nel paziente e successivamente le cellule "bersaglio" sono elettroporate applicando degli impulsi di tensione di elevata intensità (1000 V/cm) e breve durata (100 μ s), che danno origine a dei pori su di esse. L' EP a sua volta è distinguibile in EP reversibile ed EP irreversibile. Tale distinzione avviene sulla base dell' intensità del campo elettrico che viene applicato alla cellula bersaglio durante il trattamento: nell' EP reversibile si ha che i pori creati dopo un determinato intervallo temporale saranno in grado di richiudersi, portando la membrana cellulare nello stato precedente il processo elettroporativo, mentre l' EP irreversibile porta alla lisi della membrana.

L' EP reversibile dei tessuti viventi costituisce la base su cui poggiano diverse applicazioni terapeutiche in ambito clinico, come l' introduzione di geni e di farmaci anti-tumorali nelle cellule (ECT). L' EP irreversibile, porta alla lisi della membrana. L' EP irreversibile ha trovato impiego come procedura chirurgica minimamente invasiva per l'ablazione dei tessuti indesiderati con considerevoli vantaggi rispetto alle tecniche di ablazione termica [2].

In alcuni casi l' ECT é utilizzata per il trattamento di tumori di dimensioni maggiori e non superficiali. In questo caso sono utilizzati degli elettrodi che vengono posizionati dal medico in modo opportuno.

In questo elaborato è stato sviluppato un set up sperimentale per verificare la distribuzione del campo elettrico di una configurazione di elettrodi precedentemente simulata al calcolatore.

Capitolo 1

Concetti generali

1.1 Elettroporazione (EP)

L' elettroporazione, od elettropermeabilizzazione, permette di aumentare la permeabilità della membrana cellulare a ioni e macromolecole attraverso l' esposizione della cellula a brevi (da μs a ms) impulsi di campo elettrico di elevata intensità (1000 V/cm).

L' elettroporazione reversibile di tessuti viventi costituisce la base per differenti soluzioni terapeutiche ad uso clinico o di ricerca, come l' introduzione di geni all' interno delle cellule (elettrogeneterapia), l' introduzione di farmaci anti-tumorali all' interno di cellule malate (elettrochemioterapia) e l' introduzione di fotosintetizzatori all' interno di cellule tumorali per terapia fotodinamica [3].

L' elettroporazione irreversibile ha invece trovato applicazione come procedura minimamente invasiva per l' ablazione di tessuti indesiderati senza l' uso di farmaci ulteriori.

L' elettroporazione è un fenomeno dinamico che dipende dalla tensione di transmembrana presente ai capi di ciascuna membrana cellulare della cellula alla quale si intende applicare il trattamento. E' stato infatti provato che, per un impulso di durata e forma note, esiste una specifica tensione di transmembrana di soglia per la manifestazione del fenomeno elettroporativo (da 0.5 V a 1 V): ciò conduce alla definizione del valore di campo elettrico di soglia per l' elettroporazione E_{th} . Ovvero, solo le cellule all' interno delle regioni in cui il campo elettrico vale $E \geq E_{th}$ vengono elettroporate. Se un secondo valore di soglia E_{irr} viene raggiunto o sorpassato, l' elettroporazione provocherà la lisi della membrana.

Risulta chiaro, quindi, che il controllo del campo elettrico applicato ai tessuti è fondamentale per la riuscita dei trattamenti di elettroporazione. Ad esempio, nell' elettroporazione reversibile è desiderabile generare un campo elettrico omogeneo, tale che $E_{th} \leq E \leq E_{irr}$, nella regione d' interesse ed un campo elettrico nullo nelle regioni da non coinvolgere nel trattamento.

Attualmente, l' omogeneizzazione della distribuzione del campo elettrico nei processi di elettroporazione è ottenuta attraverso la progettazione di set ups di elettrodi ottimali [3].

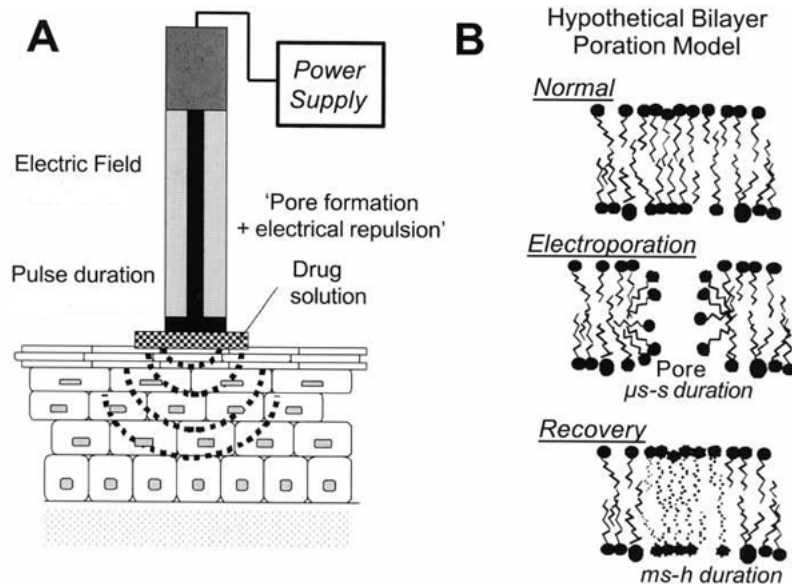


Figura 1.1: A) Schematico del trattamento di elettrochemioterapia. B) Schematico degli effetti sulla membrana cellulare del trattamento di elettroporazione [4].

1.2 Elettrochemioterapia (ECT)

L' elettrochemioterapia permette il potenziamento a livello locale, per mezzo di impulsi elettrici permeabilizzanti, dell' azione curativa di un farmaco anti-tumorale non-permeante caratterizzato da un' elevata citotossicità intrinseca.

I due punti chiave che costituiscono le basi su cui si fonda l' elettrochemioterapia e che ne spiegano l' efficacia sono:

- L' elettroporazione delle cellule malate
- L' uso di una sostanza anti-tumorale non permeante (come la *bleomicina*) o scarsamente permeante (come il *cisplatino*)

Recenti studi hanno rivelato interessanti conseguenze sul tipo di morte cellulare causato dalla bleomicina associata ad elettroporazione nelle cellule

bersaglio. Questa terapia, infatti, sembra provocare una risposta immunitaria di carattere antitumorale da parte dell'organismo in terapia, che sfocia nell'uccisione selettiva delle cellule malate. Inoltre, si registra una reazione fisiologica nei tessuti esposti agli impulsi elettrici che consiste in una temporanea contrazione dei vasi sanguigni provocata da effetti vasocostrittori dovuti agli impulsi elettrici.

Attraverso l'azione combinata della somministrazione di bleomicina e dell'applicazione di impulsi elettrici, è stato scoperto *in vitro* un aumento della tossicità di questa sostanza antitumorale di centinaia di migliaia di volte. Precedentemente a questa scoperta, per far penetrare all'interno della membrana cellulare una molecola non-permeante (come la bleomicina, che non riesce ad attraversare la membrana a causa delle proprie dimensioni e delle proprie caratteristiche fisico-chimiche), era necessario il legame della stessa con una proteina di membrana (endocitosi regolata). Questo tipo di penetrazione della membrana è limitato dal numero di proteine trasportatrici presenti sulla superficie cellulare e ciò limita l'effetto terapeutico della bleomicina [2].

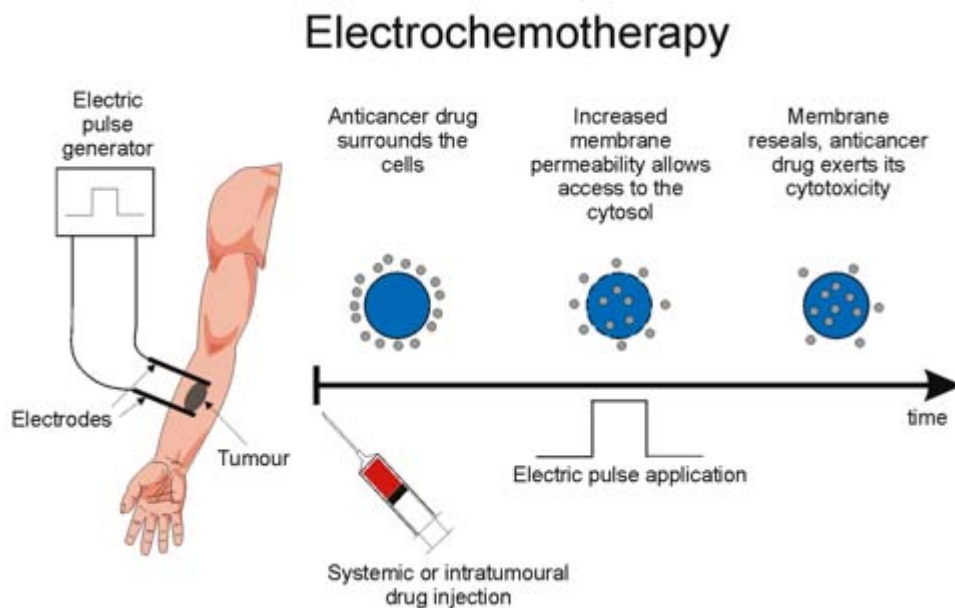


Figura 1.2: Descrizione schematica delle fasi in cui si svolge il trattamento di Elettrochemioterapia [5].

Dopo l'elettroporazione, le molecole di bleomicina si diffondono pressoché liberamente all'interno della cellula. È stato dimostrato che queste molecole

penetrano all' interno della cellula e svolgono la propria azione curativa sul DNA della cellula malata in appena 30 s [2].

L'ECT offre inoltre importanti vantaggi rispetto alle terapie tradizionali:

- Efficacia indipendente dall'istologia del tumore;
- Trattamento effettuabile in una singola seduta e, se necessario, può essere ripetuto;
- Possibile impiego concomitante con altre terapie (e.g. radioterapia e terapia genica);
- Utilizzo di piccole dosi di farmaco, che in condizioni ordinarie non porterebbero ad alcun effetto;
- Rispetto del tessuto sano e della funzionalità d'organo;
- Minimi effetti collaterali [6][7][8].

In uno studio relativo a tumori sulla pelle di varie istologie è stata registrata un' ottima efficienza di questo trattamento, la percentuale di cellule tumorali scomparse in seguito ad una sola applicazione del trattamento si avvicina al 90% del totale delle cellule malate [9].

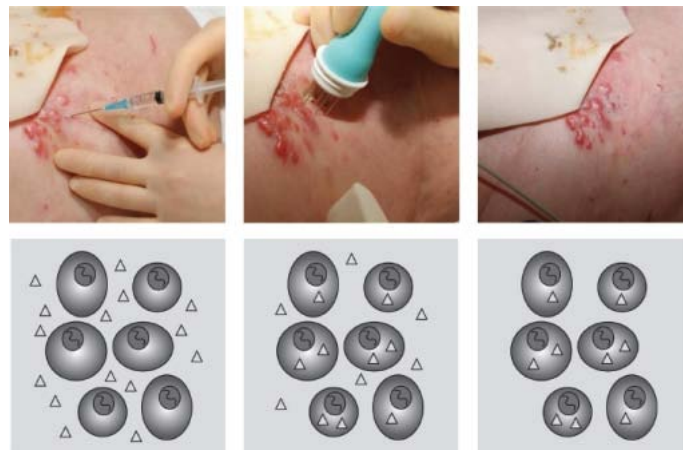


Figura 1.3: In alto, le tre fasi dell' ECT: iniezione del farmaco antitumorale (sinistra), elettroporazione del tessuto malato (centro), assorbimento del farmaco attraverso i pori della membrana (destra). In basso, le tre fasi schematizzate a livello cellulare [10].

Capitolo 2

Aspetti tecnici del trattamento di Elettrochemioterapia

2.1 Generatori di impulsi

Il dispositivo usato per l'ECT è composto da un generatore di impulsi di tensione e da appositi elettrodi. Il generatore di impulsi deve rispondere a specifiche esigenze, in quanto l'efficacia del trattamento di elettroporazione dipende dal tipo di impulso (durata, ampiezza, forma) che viene applicato al tessuto biologico. Gli impulsi necessari per ottenere l'elettroporazione si possono dividere in:

- Impulsi elettroporativi: sono in grado di creare dei canali nella membrana cellulare. Si tratta di impulsi caratterizzati generalmente da una durata attorno ai $100 \mu s$ e ampiezza che va da poche centinaia di Volt fino a qualche kV. La forma di questi impulsi è quella di un'onda quadra o a caduta esponenziale
- Impulsi per elettroforesi: sono in grado di facilitare il passaggio delle molecole dentro la cellula attraverso i pori precedentemente aperti dagli impulsi elettroporativi. Questi impulsi hanno un'ampiezza minore rispetto ai precedenti e durata dell'ordine dei ms .

Allo scopo di ottenere un trattamento elettroporativo efficace, è richiesto di poter variare l'ampiezza e la durata dell'impulso. E' necessario inoltre avere un adattamento di impedenza tra l'uscita dell'elettroporatore e il tessuto sottoposto al trattamento, in modo da assicurare che l'impulso non si deformi. Esistono varie tipologie di generatori:

- Generatore a scarica di condensatore (cfr. Figura 2.1): è costituito da una sorgente variabile di alta tensione continua (V), un condensatore (C), un interruttore (S), un resistore operazionale (R). Il generatore

lavora a due fasi, di carica e di scarica del condensatore, generando impulsi con andamento esponenziale decrescente;

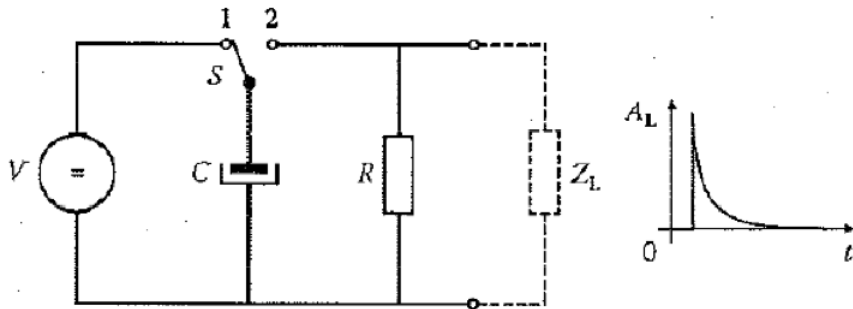


Figura 2.1: Schema elettrico del generatore a scarica di condensatore (sinistra), con il corrispondente segnale generato (destra)

- Generatore ad onda quadra (cfr. Figura 2.2): è costituito da una sorgente variabile di alta tensione (V), un condensatore (C), un interruttore (S). Il sistema di controllo dell' interruttore S è tipicamente realizzato da un dispositivo di potenza a semiconduttore (*mosfet/igbt*);

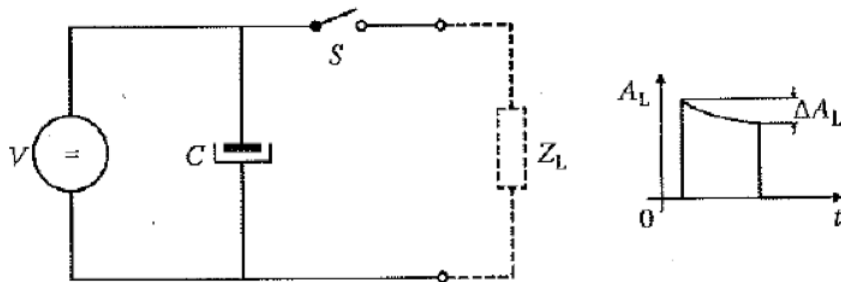


Figura 2.2: Schema elettrico del generatore ad onda quadra (sinistra), con il corrispondente segnale generato (destra)

- Generatore modulare ad onda quadra (cfr. Figura 2.3): è costituito da N generatori ad onda quadra collegati in serie, ciascuno controllabile singolarmente. L'impulso risultante è formato dai contributi dei singoli generatori ad onda quadra attivi in uno specifico intervallo temporale;

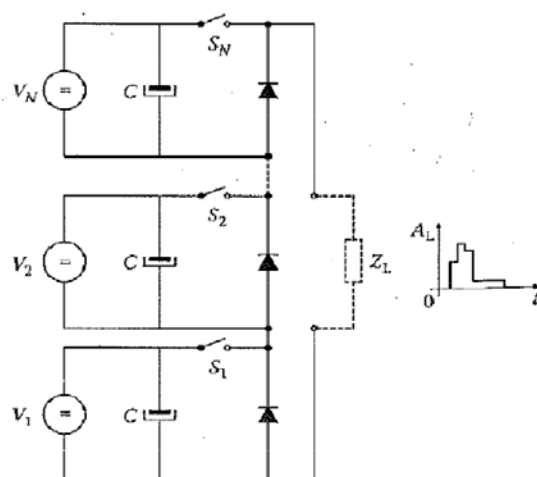


Figura 2.3: Schema elettrico del generatore modulare ad onda quadra (sinistra), con il corrispondente segnale generato (destra)

- Generatore analogico (cfr. Figura 2.4): è costituito da un generatore di tensione, un condensatore di uscita, un generatore di segnale (F_g), uno switch lineare (Q), una coppia di resistenze (R_1 e R_2). La forma dell' impulso viene generata da F_g , tale segnale viene poi amplificato di un fattore $\frac{R_1 + R_2}{R_1}$.

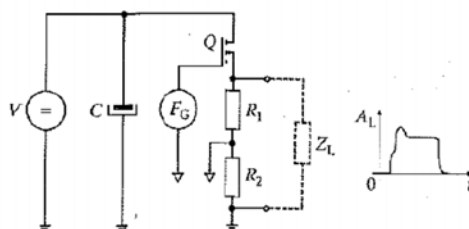


Figura 2.4: Schema elettrico del generatore analogico (sinistra), con il corrispondente segnale generato (destra)

Un' ulteriore distinzione può essere fatta in base all' uso per il quale gli elettroporatori sono destinati:

- Elettroporatori per uso “*in vitro*”: vengono usati per lo studio e la ricerca su cellule o su tessuti asportati e mantenuti in laboratorio;
- Elettroporatori per uso “*in vivo*”: vengono usati sulle cellule del paziente che viene sottoposto al trattamento;

2.2 Elettrodi

Il generatore di impulsi impone una tensione agli elettrodi di materiale metallico i quali generano a loro volta il campo elettrico nel tessuto. La distribuzione del campo elettrico all’ interno del tessuto oggetto del trattamento è influenzata da vari fattori, quali:

- Caratteristiche elettriche del tessuto stesso;
- Tipo e posizionamento degli elettrodi sulla superficie da elettroporare.

Per questo motivo, esiste una larga varietà di elettrodi ideati a seconda delle specifiche del trattamento da effettuare. Tra tutti i possibili tipi di elettrodi impiegati, i più diffusi sono quelli piatti e quelli ad aghi. Questi ultimi vengono inseriti direttamente nelle lesioni tumorali, mentre quelli piatti o a piastra vengono applicati sulla superficie della pelle. Nella pratica clinica si distinguono i seguenti tipi di elettrodi (cfr. Figura 2.5):

- Elettrodi a piastra: sono dotati di distanza variabile fra le piastre, sono adatti a piccoli tumori superficiali, poichè non sono funzionali a penetrare la pelle;
- Elettrodi che consistono in due gruppi di quattro aghi ciascuno con una distanza di 4 *mm* tra loro: sono utilizzati per il trattamento di noduli di piccole dimensioni;
- Elettrodi con aghi disposti secondo una configurazione esagonale: sono adatti a lesioni tumorali di dimensioni più estese (maggiori di 1 *cm* di diametro);
- Elettrodi a dito: sono usati nel trattamento di cavità del corpo non accessibili dagli altri elettrodi perché troppo strette.
- Elettrodi ad aghi lunghi (cfr. Figura 2.6): sono usati per trattare aree tumorali situate più in profondità. Sono stati recentemente impiegati nella cura della metastasi del fegato da Sersa et al. [11].

Successivamente sarà approfondita la tipologia ad aghi. Esistono diverse configurazioni implementabili per elettrodi di questo tipo. Essi infatti, possono essere formati semplicemente da una coppia di aghi o più, aventi una distribuzione geometrica tale da coprire in modo quanto più uniforme



Figura 2.5: Da sinistra a destra le 4 tipologie di elettrodo presentate a pg. 10, nell'ordine corrispondente alla descrizione [12]

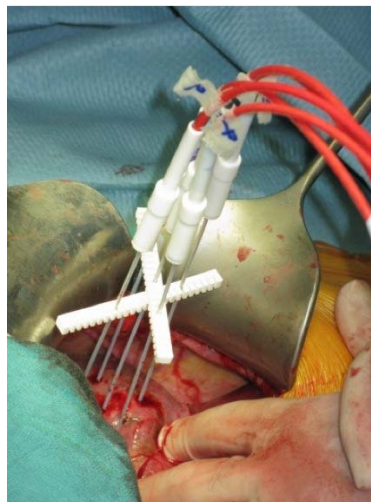


Figura 2.6: Trattamento di elettrochemioterapia di una metastasi del fegato. Gli elettrodi usati sono ad aghi lunghi [11]

possibile una zona di tessuto più ampia. Questo è il caso della configurazione di elettrodi esagonale, in cui gli aghi sono equidistanti tra loro su un cerchio, con l'aggiunta di un ago centrale. Gli impulsi sono applicati in modo consecutivo a ciascuna possibile coppia di elettrodi. In Figura 2.6 è rappresentato un esempio di sequenza usata per attivare singole coppie di aghi negli elettrodi esagonali.

Come anticipato, è comune la configurazione esagonale con l'ago centrale addizionale. Un trattamento di ECT con questo tipo di elettrodi è effettuato inserendo i sette aghi, per una superficie di circa 3 cm^2 , spostando poi l'elettrodo in modo da trattare tutta la zona interessata dalla lesione, estesa anche decine di cm^2 . Per ogni coppia di elettrodi, il generatore genera quattro o otto impulsi di intensità pari a 730 V e durata $100 \mu\text{s}$ ciascuno. Gli impulsi elettrici vengono applicati al paziente, dopo 8-28 minuti rispetto

all' iniezione endovenosa di bleomicina o subito dopo (2-5 minuti) l'iniezione intratumorale del farmaco citotossico.

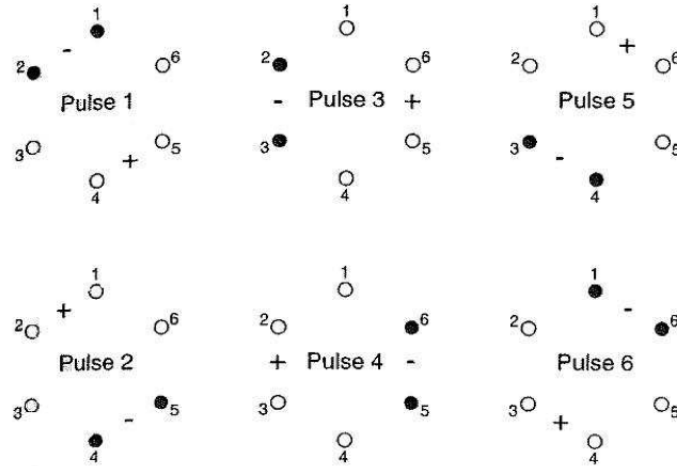


Figura 2.7: Esempio di una sequenza di attivazione degli aghi adiacenti nell'elettrodo ad aghi esagonale.

2.3 Caratteristiche elettriche dei tessuti biologici

Le cellule che formano un tessuto biologico sono delle strutture complesse che scambiano continuamente ioni tra l'ambiente esterno e quello interno alla cellula. Questi scambi avvengono grazie a specifici canali esistenti nella struttura della membrana cellulare, che regolano il flusso di ioni in entrata e in uscita dalla cellula. A causa di questi continui flussi si può notare come localmente si creino dei gradienti di concentrazione degli ioni fra il citoplasma e l'ambiente esterno alla cellula. Questo fatto dà così origine a delle differenze di potenziale elettrico a livello locale.

Si può modellare elettricamente il sistema "ambiente esterno - membrana cellulare - citoplasma" come un condensatore a facce piane la cui carica immagazzinata dipende dal gradiente di concentrazione ionica. Attraverso la membrana cellulare, in condizioni fisiologiche, la differenza di potenziale varia tra -90 e -40 mV.

Sottoponendo la cellula ad un campo elettrico esterno sufficientemente elevato, si induce una differenza di potenziale a ridosso della membrana cellulare, differente da quella normalmente presente, fatto che può causare la formazione di pori nella membrana cellulare.

Per poter analizzare la risposta di un tessuto biologico agli stimoli di ti-

po elettrico, sono necessari dei dati sugli specifici valori di conduttività e permittività relativa dei tessuti [13].

2.3.1 Conducibilità e permittività

I materiali, dal punto di vista elettrico possono essere conduttori ed isolanti. In un conduttore, le cariche elettriche si muovono liberamente all' interno del mezzo in risposta all' applicazione di un campo elettrico, mentre in un isolante (dielettrico), le cariche sono fisse e non libere di muoversi.

I tessuti biologici presentano caratteristiche sia da conduttore sia da dielettrico. Essi possono essere quindi caratterizzati attraverso la loro permittività dielettrica ε , ovvero la loro capacità di immagazzinare carica elettrica, e la loro conducibilità σ , cioè la loro capacità di trasportare cariche elettriche. Secondo le proprietà dei dielettrici, è possibile approssimare un tessuto biologico di spessore d e sezione A ad un condensatore caratterizzato da capacità

$$C = \frac{\varepsilon A}{d} \quad (2.1)$$

Stando invece alle proprietà dei conduttori, lo stesso tessuto biologico è approssimabile ad un resistore di conduttanza

$$G = \frac{\sigma A}{d} \quad (2.2)$$

La conduttività di un materiale è una misura dell' abilità delle sue cariche di essere trasportate attraverso il proprio volume sotto l' effetto di un campo elettrico applicato. Similmente, la permittività è una misura dell' abilità dei dipoli di ruotare o della carica di rimanere immagazzinata per effetto di un campo elettrico applicato.

A basse frequenza, il materiale si comporterà come un conduttore, ma gli effetti capacitivi si faranno sempre più rilevanti man mano che la frequenza aumenta. Per la maggior parte dei materiali, quindi, queste proprietà non sono costanti, ma variano in funzione della frequenza del segnale applicato (cfr. Figura 2.8) [13].

Di fatto, le caratteristiche elettriche di un materiale possono essere riassunte in un unico valore complesso, l' ammettenza Y , funzione della pulsazione ω :

$$Y = G + j\omega C = \frac{A}{d}(\sigma + j\omega\varepsilon) \quad (2.3)$$

2.3.2 Campo Elettrico

Il campo elettrico viene generato da una differenza di potenziale V applicata ai capi di un materiale di spessore d . Nel caso, ad esempio, di due piastre

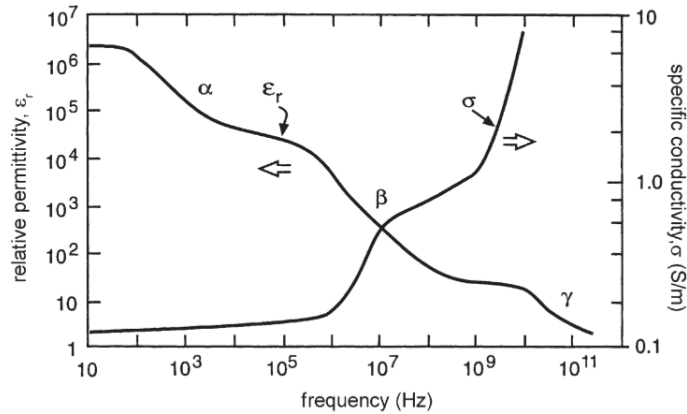


Figura 2.8: Il grafico mostra la dipendenza tipica dell' ammettenza (cfr. (2.3)) dalla frequenza in un tessuto biologico [13].

di sezione infinita rispetto alla distanza d , il campo elettrico è dato dalla relazione:

$$E_0 = \frac{V}{d} \quad (2.4)$$

In (2.4) si nota come il campo elettrico sia direttamente proporzionale alla differenza di potenziale ed inversamente proporzionale alla distanza alla quale la stessa viene applicata. Nei trattamenti di elettroporazione, quindi, si produce un campo elettrico funzione della distanza fra gli elettrodi. I tessuti biologici sono caratterizzati da una costante dielettrica relativa ϵ_r che varia a seconda del tipo di tessuto ed in funzione della frequenza.

I tessuti che vengono sottoposti ai trattamenti di ECT sono generalmente costituiti da più strati, ciascuno dei quali è caratterizzato da una costante dielettrica relativa differente. Questo fatto implica che all' applicazione degli elettrodi nel tessuto e successiva generazione degli impulsi di tensione (cfr. Capitolo ...), vengono generati più campi elettrici, ciascuno caratterizzato dalla relazione:

$$E = \frac{E_0}{\epsilon_r} \quad (2.5)$$

Si consideri, ad esempio, un materiale composto di tre strati a , b , c (cfr. Figura 2.9), il quale viene sottoposto all' azione di impulsi di tensione simili a quelli impiegati nei trattamenti di elettroporazione. Ciascuno strato è caratterizzato da una propria costante dielettrica (rispettivamente ϵ_a , ϵ_b , ϵ_c).

Allora il campo elettrico totale presente nel tessuto sarà dato dalla somma dei fattori E_a , E_b , E_c , ovvero i campi elettrici esistenti rispettivamente in ciascuno strato a , b , c , secondo la relazione:

$$E = \frac{V}{d} = E_a + E_b + E_c = \frac{E_0}{\epsilon_a} + \frac{E_0}{\epsilon_b} + \frac{E_0}{\epsilon_c} \quad (2.6)$$

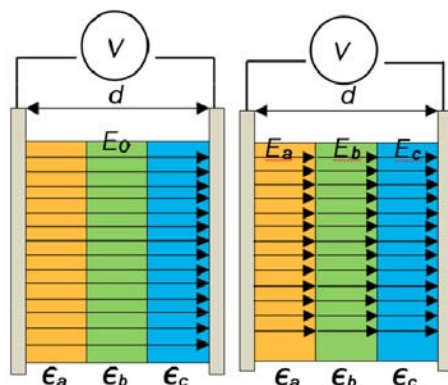


Figura 2.9: Schematico della distribuzione del campo elettrico all'interno di un materiale costituito da 3 strati diversi.

Nel caso in cui ci sia passaggio di corrente continua all'interno del materiale, come ad esempio accade durante i trattamenti di elettroporazione, il campo elettrico E viene espresso come grandezza vettoriale dalla relazione:

$$\vec{E} = \rho \vec{J} \quad (2.7)$$

In (2.7), \vec{E} è il vettore campo elettrico, ρ è una grandezza scalare che misura la resistività del materiale [Ωm], \vec{J} è il vettore densità di corrente.

2.3.3 Effetto dell'elettroporazione sulla conducibilità dei tessuti

Come già discusso nel paragrafo 1.1, l'elettroporazione è un fenomeno elettrico in grado di aumentare la permeabilità della membrana cellulare. Ciò comporta sia un maggiore trasporto di molecole e di ioni all'interno della cellula sia un aumento della conducibilità elettrica. Come anticipato nel paragrafo 2.3.1, la risposta del tessuto biologico durante l'applicazione degli impulsi per l'elettroporazione varia in funzione della frequenza e dell'intensità dell'impulso applicato.

Dopo la scarica di un impulso elettrico, si osserva un aumento temporaneo

della conducibilità. In Figura 2.10, viene mostrato l'andamento della conducibilità durante un trattamento di 8 impulsi di tensione della durata di $1000 \mu s$ ciascuno alla frequenza di 0.03 Hz . Si osservi come, all'applicazione di ogni impulso, la conducibilità del materiale aumenta rispetto al valore precedente [14].

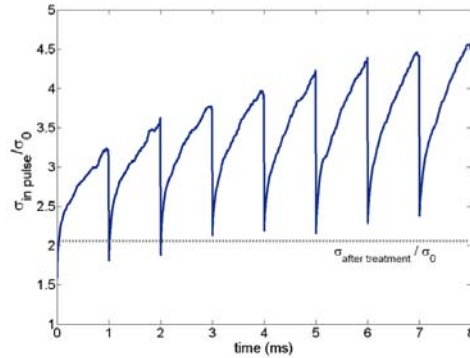


Figura 2.10: Andamento della conducibilità dinamica relativa di un materiale sottoposto ad 8 impulsi della durata di $1000 \mu s$ ciascuno, alla frequenza di 0.03 Hz [14]

Questo aumento progressivo della conducibilità è un effetto registrato durante l'applicazione di campi elettrici relativamente elevati. D'altronde, nel caso dell'applicazione di campi elettrici minori, si può notare un aumento solo transitorio della conducibilità. Al termine di ogni singolo impulso infatti, la conducibilità si riassume al valore dell'impulso precedente [14].

2.3.4 Disomogeneità del tessuto biologico

Un tessuto biologico è formato da più strati di cellule, ciascuno dei quali è caratterizzato da costanti dielettriche diverse (cfr. paragrafo 2.3.2). Queste differenze sono dovute alla conformazione delle cellule stesse, infatti ognuna di esse ha caratteristiche sensibilmente differenti. Queste si differenziano per il contenuto di acqua, per il loro stato fisiologico e per molti altri motivi. Il tessuto si può approssimare ad un composto di vari strati di materiale omogeneo, ciascuno dei quali è dotato di un valore di conducibilità particolare. La distribuzione in strati porta ad una disomogeneità del tessuto biologico: la stessa singola cellula è di per sé poco omogenea, poichè formata da una membrana lipidica contenente il citoplasma [13]. Uno dei problemi che incontra l'applicazione dell'ECT è, appunto, la disomogeneità del tessuto da trattare, che modifica l'impedenza ai capi degli elettrodi (cfr. paragrafo 1.1). I tumori, in particolare, possono essere caratterizzati da un contenuto

d'acqua e da una pressione interstiziale maggiore rispetto al tessuto normale. Essi sono formati da cellule molto irregolari e inoltre possono presentare regioni fibrose o sacche di liquido [13].

2.3.5 Il circuito equivalente

Le caratteristiche biologiche dei tessuti vegetali si possono ricondurre a quelle dei tessuti umani. Dal punto di vista elettrico, entrambe le cellule di patata e melanzana possono essere approssimate al modello elettrico proposto da Hayden [15] e mostrato in Figura 2.11.

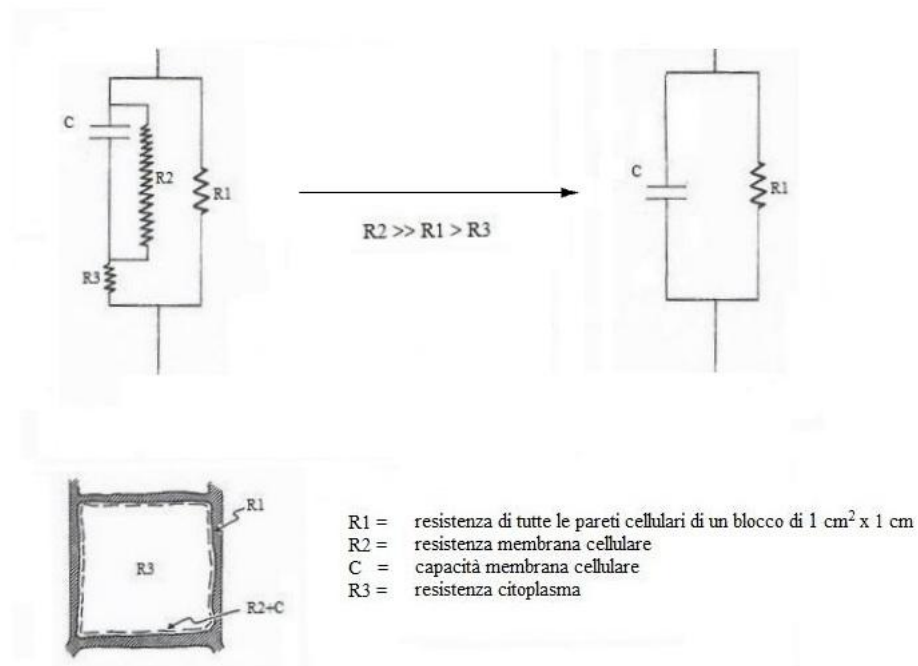


Figura 2.11: Schematizzazione elettrica e semplificazione del modello elettrico proposto da Hayden per la cellula di patata [15].

Il modello elettrico proposto descrive il tessuto biologico in cui sono inseriti due elettrodi mediante le formule relative alle serie ed ai paralleli di resistenze. Ciò che ne risulta è il parallelo di una resistenza ed una capacità (circuito RC parallelo). L'articolo di Hayden [15] fornisce l'ordine di grandezza delle resistenze del modello, che è formato da tessuto vegetale e una coppia di elettrodi ai capi dei quali si misura la R . È importante tener conto che i valori di impedenza in un tessuto vegetale variano in funzione

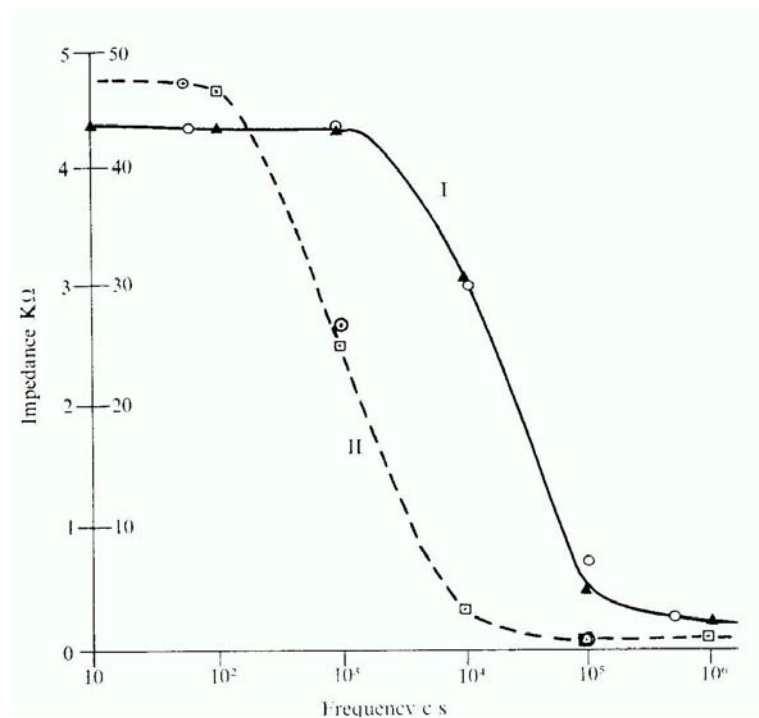


Figura 2.12: Il grafico mostra l'andamento dei valori di impedenza di una patata considerata isotropa (*I*) e di una radice di erba medica (*II*) in funzione della frequenza (espressa in scala logaritmica). I pallini vuoti rappresentano i dati sperimentali, mentre i triangolini pieni quelli teorici [15].

della frequenza (cfr. paragrafo 2.3.1). Un esempio di tale variazione è fornito dalla Figura 2.12, che mostra i valori di impedenza sperimentali e derivati dal modello elettrico in una patata considerata isotropa (le sue caratteristiche elettriche non dipendono dall'orientazione del materiale [13]) e in una radice di erba medica.

2.3.6 Il circuito RC parallelo

Dal precedente paragrafo si è visto come il modello elettrico di una patata (ma anche quello di una melanzana) si possa ricondurre ad una resistenza R in parallelo con una capacità C . Ai capi di questo bipolo sarà collegato un generatore di impulsi di tensione ad onda quadra (cfr. paragrafo 3.4.1), che è la stessa impiegata nel trattamento di elettroporazione. Le impedenze di una resistenza e una capacità sono rispettivamente:

$$Z_R = R \quad (2.8)$$

$$Z_C = jX_C = j\frac{1}{\omega C} \quad (2.9)$$

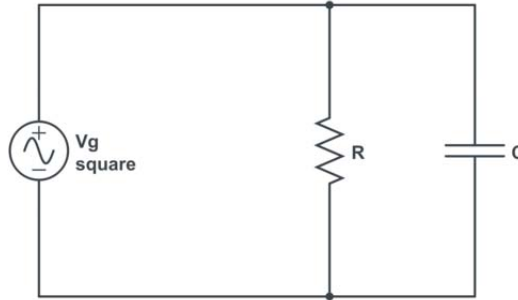


Figura 2.13: Circuito RC parallelo collegato ad un generatore di tensione ad onde quadre.

Si consideri Figura 2.13, l'impedenza del circuito è pari a:

$$Z = \frac{Z_R Z_C}{Z_R + Z_C} \quad (2.10)$$

Per lo studio di circuiti in parallelo conviene usare per un'altra grandezza, l'ammettenza Y , ovvero il reciproco dell'impedenza:

$$Y = \frac{1}{Z} = \frac{1}{V} = G + jB \quad (2.11)$$

La parte reale G è detta conduttanza, mentre la parte immaginaria B è detta suscettanza.

Si procede ora allo studio del circuito in Figura 2.13:

$$Y = Y_R + Y_C = \frac{1}{R} + j\frac{1}{X_C} \quad (2.12)$$

Le correnti passanti nei due rami del parallelo sono date da:

$$I_R = V_g Y_R = \frac{V_g}{R} \quad (2.13)$$

$$I_C = V_g Y_C = \frac{V_g}{X_C} \quad (2.14)$$

In cui V_g è la tensione erogata dal generatore, I_R è la corrente passante nella resistenza R , I_C quella passante nel condensatore C .

Per la I legge di Kirchhoff, la corrente totale è la somma delle due correnti sopracitate:

$$I = I_R + I_C \quad (2.15)$$

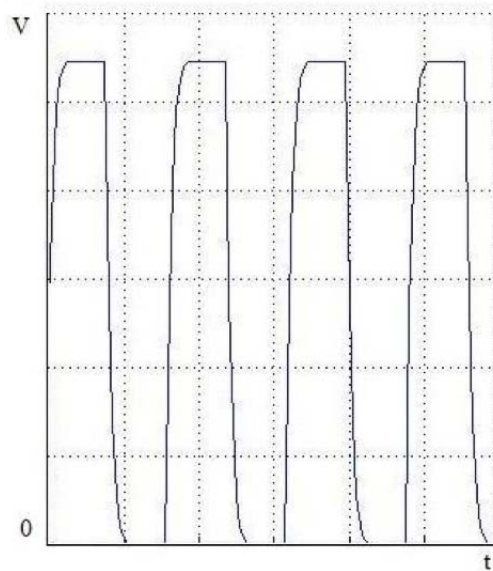


Figura 2.14: Tensione misurata ai capi del condensatore

Tralasciando il funzionamento del circuito durante il transitorio (che corrisponde ai tempi di salita e di discesa dell' onda), è noto dalla letteratura che in regime stazionario un condensatore si comporta come un lato aperto. Quindi, in regime stazionario, la corrente passante per il condensatore C varrà:

$$I_C = 0 \quad (2.16)$$

Dunque, per (2.15), la corrente totale che circola nel circuito in regime stazionario sarà espressa dalla relazione:

$$I = I_R = \frac{V_g}{R} \quad (2.17)$$

Capitolo 3

Esperimento per la valutazione della distribuzione del campo elettrico

La distribuzione del campo elettrico nei tessuti ottenuta con una disposizione di elettrodi che ricopra l' area tumorale e alimentati con impulsi di intensità adeguata alla distanza tra due elettrodi adiacenti è stata valutata utilizzando un modello sperimentale che comprendeva 2 tessuti con diversa conducibilità elettrica.

Il tessuto tumorale è stato simulato con tessuto di patata che è noto diventare scuro se viene elettroporato [16], mentre il tessuto sano circostante è stato simulato con del tessuto di melanzana.

- Scopo 1: Confrontare la distribuzione di campo elettrico ottenuta sperimentalmente con quella simulata al computer con la stessa distribuzione di elettrodi in presenza di tessuti con diversa conducibilità elettrica.
- Scopo 2: Valutare come il trattamento di elettroporazione sia in grado di, sulla base dei dati di impedenza registrati, modificare la permeabilità elettrica del tessuto interessato dal trattamento, mutandone quindi la sua capacità di poter assorbire molecole di dimensioni più o meno elevate attraverso la membrana cellulare.

3.1 Descrizione dell' esperimento

L' esperimento è stato ripetuto più volte utilizzando dei modelli sperimentali che, come quello usato per la simulazione, comprendessero due tessuti con conducibilità elettriche diverse. L' idea alla base è stata quella di realizzare

diversi modelli sperimentali che fossero in grado di rappresentare una massa tumorale ed il tessuto sano circostante. In Figura 3.1 è riportato uno schema 2D usato per simulare la distribuzione del campo elettrico ottenuta con i 9 elettrodi indicati dai pallini.

Dato il modello in Figura 3.1 si è realizzata la disposizione di elettrodi utilizzata nella simulazione montando degli spilli in acciaio, che fungono da elettrodi, su di un supporto plastico e rigido. Gli spilli sono stati forniti di apposite connessioni elettriche in modo da essere collegate al generatore di impulsi. La massa tumorale ed il tessuto sano sono stati simulati mediante del tessuto vegetale, in particolare si sono utilizzate melanzane per simulare il tessuto sano circostante la massa tumorale e patate per simulare quest'ultima.

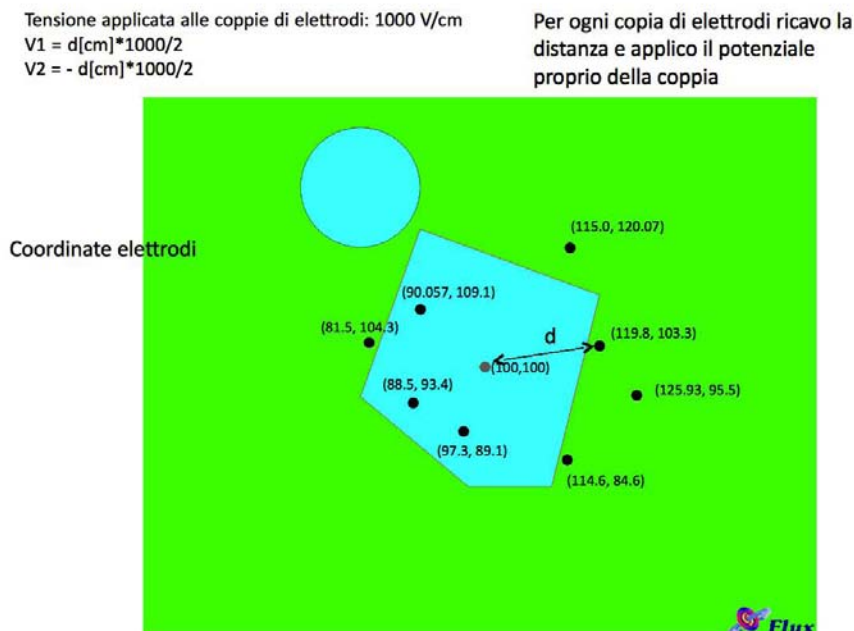


Figura 3.1: La mappa del tumore (poligono verde acqua) e del tessuto sano circostante (area verde acido). Segnata con dei punti neri spessi è riconoscibile la topologia degli aghi dell' elettrodo.

Tagliando sezioni di questi ortaggi in modo da incastrarle vicendevolmente, sono stati creati dei solidi che potessero approssimare le masse tumorali e altri che potessero rappresentare il tessuto sano circostante. Effettuato l' incastro delle singole parti ricavate, si è poi convenuto nell' adottare delle strategie per migliorare la discontinuità dei materiali utilizzati, costituita

dall' eventuale presenza di qualche fessura nella regione di confine fra tessuto sano e tessuto tumorale. In particolare, si è scelto di praticare delle iniezioni di acqua in entrambi i tessuti e quindi di circondare l' intero modellino con del nastro isolante e del filo di rame smaltato costringente per diminuire considerevolmente le fessure sopracitate.

Una volta prodotti elettrodi e modellini da utilizzare nel trattamento di elettroporazione, è stato necessario misurare i valori di resistenza di ciascun campione di tessuto vegetale coinvolto nell' esperimento (in modo da avere un dato di riferimento sul valore di resistività di partenza, così da poterne fare un confronto successivo con il valore che si valuta post trattamento).

Per la valutazione delle proprietà elettriche dei singoli tessuti, sono state tagliate sezioni a forma di parallelepipedo di materiale vegetale proveniente dagli stessi ortaggi con i quali sono stati realizzati i modellini; questi son stati inseriti in un dispositivo per la rilevazione (cfr. paragrafo 3.4.2) simile ad un condensatore a facce piane. Collegando questo dispositivo ad un multimetro è stato possibile misurare la resistenza ai suoi capi. Note le dimensioni geometriche del sistema di test, è stato possibile derivarne i valori di resistività di partenza (cfr. (3.1)). Questo procedimento andrà ripetuto successivamente all' applicazione degli impulsi di tensione, in modo da avere una misura della variazione di conducibilità verificatasi al termine del trattamento. Non va dimenticato che il test dell' impedenza pre e post trattamento è stato effettuato per ogni tessuto (patata o melanzana che fosse) coinvolto nella costruzione di un modellino, poiché il valore di resistenza varia (seppur non di molto) da patata a patata e da melanzana a melanzana, dipendentemente dalla quantità di acqua presente nel campione.



Figura 3.2: Un modellino pre-elettroporazione (visione dall' alto)

Al termine di tutti questi preparativi è stato, finalmente, possibile avviare il processo di elettroporazione sui vari modelli. Il set di aghi è stato piantato in modo opportuno e seguendo lo schema di Figura 3.1. Ciascuna

possibile coppia di aghi adiacenti è stata alimentata con un generatore di impulsi rettangolari per applicazioni di elettrochemioterapia. Per ogni coppia di elettrodi è stata applicata una tensione che desse origine ad un campo elettrico di circa 1000 V/cm . Una volta attivate tutte le coppie di aghi adiacenti, il trattamento è terminato: si lascia in posa il modello a temperatura ambiente e a contatto con l'aria. Dopo qualche ora, nella patata sono visibili segni di colore nero in prossimità del punto di impianto di ciascun ago (cfr Figura 3.2). Il colore nero è dovuto alla fuoriuscita di amido nel caso delle patate, il quale in condizioni normali è contenuto all'interno della membrana cellulare [16]. Questo effetto evidenzia che è avvenuta l'elettroporazione del tessuto di patata. Infatti, una volta prodotto il poro tramite elettroporazione, questo amido tende a sortire verso l'esterno e, a contatto con l'aria, va in contro ad ossidazione, assumendo il colore scuro precedentemente citato.



Figura 3.3: Lo stesso modellino post-elettroporazione (visione dall'alto)

3.2 Il set up di elettrodi sperimentale

Come già anticipato, tutta l'esperienza si è sviluppata attorno ad una serie di test su dei modelli che potessero simulare in maniera soddisfacente una massa tumorale e del tessuto sano circostante. Tali modelli sono stati realizzati basandosi su di una mappa indicante la topologia della massa tumorale e la distribuzione spaziale degli aghi che avrebbero costituito l'elettrodo atto ad applicare il trattamento di elettroporazione.

La realizzazione fisica dell'elettrodo è stato un processo svoltosi in più fasi. Dapprima, è stato necessario ricavare una base su cui montare tutti gli aghi: a tal fine si è ricorsi a del materiale plastico, particolarmente resistente, duraturo ed al contempo forabile.

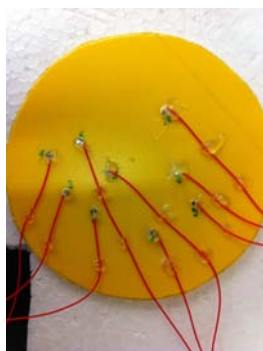


Figura 3.4: Retro dell' elettrodo. Riconoscibili in giallo la forma circolare della base di materiale plastico, in rosso i filamenti che terminano nel contatto. Le bolle protettive trasparenti sui contatti e sulla base sono risultato delle applicazioni della colla a caldo.

La base di materiale plastico è stata ritagliata di forma circolare (circa 6 *cm* di diametro), in modo tale da poter piantare tutti gli aghi coinvolti nel modello, ma anche permettere il controllo visivo dell' ambiente sottostante, cosa particolarmente utile nel momento dell' impianto dell' elettrodo sul modello.

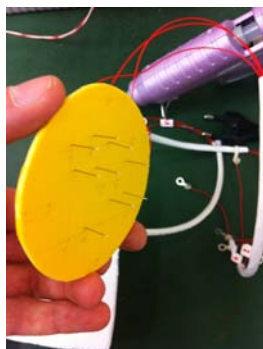


Figura 3.5: Fronte dell' elettrodo: riconoscibili in uscita dalla base gialla gli aghi per il trattamento

Successivamente, si è provveduto a tracciare una riproduzione in scala della topologia dell' elettrodo sulla base di plastica. Quindi, ogni posizione così segnata è stata forata con degli spilli metallici (dimensioni: $L = 1.5\text{cm}$, $\phi = 0.5\text{mm}$) che avrebbero successivamente costituito gli aghi

con cui trattare il tessuto. Prima di impiantare totalmente ogni ago nel materiale plastico, si è provveduto a creare il contatto elettrico cingendo ciascuno spillo con del filo di materiale conduttore particolarmente sottile (*AWG 30 per wire wrapping*). Posti quindi a fine corsa tutti gli aghi, si è fissato ogni contatto così creato con della colla a caldo, anche in modo da poterlo proteggere da eventuali danneggiamenti. Il passo finale, precedente il collaudo dell' elettrodo, è stato quello di realizzare la sua interfaccia con il generatore di impulsi di tensione. Sono stati creati, quindi, dei terminali di contatto (dal lato opposto dei fili conduttori rispetto agli aghi) che fossero in grado di accedere ad una contattiera preventivamente fornita e configurata. I terminali di contatto sono stati prodotti usando delle pagliette (connettori con anello passante), ciascuna fissata al proprio filo per mezzo di una saldatura a stagno. Infine, onde evitare possibili danneggiamenti dei terminali, sono state fatte piccole applicazioni di colla a caldo sopra ogni saldatura.



Figura 3.6: I terminali di contatto dell' elettrodo, permettono di accedere alla contattiera

Nella tabella di Figura 3.7 sono riportate nel dettaglio le distanze fra le coppie di aghi adiacenti del set up sperimentale e le ampiezze degli impulsi di tensione applicati durante i test.

3.3 I modelli di tessuto vegetale

3.3.1 I modelli di test

La mappa di Figura 3.1 ha fornito indicazioni esaurienti sulla struttura richiesta per la realizzazione dei modelli di tessuto vegetale, tanto in termini di topologia, quanto di dimensioni. Il metodo scelto per la realizzazione di

	Coppia di aghi	Distanza (cm)	Ampiezza Impulso di Tensione (V)
	(4,3)	1,25	1250
	(4,6)	1	1000
	(4,5)	1,8	1800
	(3,5)	1,3	1300
	(3,2)	1	1000
	(2,5)	1,2	1200
	(2,1)	1,8	1800
	(1,9)	1,5	1500
	(5,9)	2,65	2650
	(8,9)	1	1000
	(8,5)	2,05	2050
	(5,7)	2,45	2450
	(8,7)	1,8	1800
	(6,7)	2,65	2650

Figura 3.7: Tabella riassuntiva delle distanze fra le coppie di aghi adiacenti del set up sperimentale e le ampiezze degli impulsi di tensione applicati.

questi modelli, prevede la costruzione di una sagoma di materiale plastico (basata ovviamente sulla mappa fornita), la quale verrà poi utilizzata come stampo per la creazione della massa tumorale. E' stato invece adottato un certo grado di libertà sulle dimensioni dell' area di tessuto sano, in quanto queste non sono determinanti ai fini dell' esperimento.

Come materiale di base con cui realizzare i modelli, si sono scelti due tipi di ortaggi: melanzana e patata. Questi sono caratterizzati da una intrinseca differenza di resistività in condizioni normali, cosa che ha permesso di simulare al meglio la variazione di resistività esistente in natura fra tessuto tumorale e tessuto sano. Data la proprietà del tessuto di patata di assumere un colore scuro qualora le sue cellule siano elettroporate, la patata è stata utilizzata per simulare il tessuto affetto da tumore, mentre la melanzana è stata usata per il tessuto sano (si vuole visualizzare il campo elettrico nella massa tumorale).

La tecnica di taglio dei solidi è stata quella di utilizzare un semplice coltello da cucina, si tenga presente che il lato più lungo del poligono di base del tumore misura circa 3.35 cm , mentre quello più breve appena 1.4 cm . Ricavato sia il solido di patata che simulerà la massa tumorale, sia l' avvalimento all' interno della sezione di melanzana che lo ospiterà (simulando quindi il tessuto sano circostante il tumore), si è proceduto all' incastro delle due parti, evitando quanto più possibile la creazione di fessure nella regione di confine fra i due tessuti. In tale direzione, è stato necessario lo studio di una strategia di compressione del modello. La soluzione è poi ricaduta su delle iniezioni di acqua applicate in più punti dello stesso, coadiuvata dall' utilizzo di nastro isolante e filo metallico smaltato elettricamente isolato sulla superficie con funzione costringente (cfr. Figura 3.8).



Figura 3.8: Un modellino, visto di lato. Il solido rappresentante la massa tumorale è visibile solo superficialmente, il resto del suo volume è incastrato all'interno dell'avvallamento appositamente creato per ospitarlo nella melanzana.

3.4 La strumentazione

3.4.1 Generatore di Impulsi per ECT

L'applicazione del trattamento di elettroporazione sui modelli realizzati è stato possibile grazie ad un generatore di impulsi per Elettrochemioterapia (ECT). Si tratta di un prototipo fornito da Igea (cfr. Figura 1.9). È utilizzato come generatore di impulsi di tensione ad onda quadra in cui è possibile impostare il numero e l'ampiezza degli impulsi. In questo esperimento l'intensità di questi impulsi è stata impostata in modo da avere 1000 V per ogni cm di distanza fra gli aghi del dispositivo descritto al paragrafo 3.2 di questo capitolo. Il periodo dell'onda è stato invece impostato a $200 \mu s$. Infine, sono stati applicati 10 impulsi di tensione per ogni coppia di aghi adiacenti.

La gestione delle impostazioni riguardanti le onde generate, il loro monitoraggio, nonché la registrazione dei dati di tensione e corrente dei modelli durante i test è stata possibile grazie al software di controllo del macchinario. Per l'avvio del trattamento è stato necessario l'uso di un'apposita pedalina di comando (cfr. Figura 3.9).

3.4.2 L'acquisizione dei dati di resistenza

L'acquisizione dei dati di resistenza dei campioni dei modellini impiegati nei test è stata fatta utilizzando un Data Acquisition/Switch Unit (modello HP 34970A), il software *BenchLink Data Logger* ed una struttura per la rilevazione costituita da due piastre conduttive fissate su un piano di supporto rigido di materiale isolante (cfr. Figura 3.11, 3.12).

Dai vegetali utilizzati per le prove ai paragrafi 3.6, 3.7 e 3.8 sono stati ricavati dei campioni di tessuto che sono stati tagliati a forma di parallelepipedo,



Figura 3.9: Un altro modellino, di dimensioni minori in termini di tessuto sano rispetto a quello della Figura 3.7 (visto dall'alto). E' possibile notare come a cingere i bordi della melanzana ci sia del filo metallico, stretto quanto più possibile, con funzione costringente: si cerca di minimizzare eventuali fessure fra i due tessuti.

di dimensioni note, in modo tale da poter aderire alle piastre di materiale conduttivo. Questa struttura per la rilevazione è stata poi collegata all'unità di acquisizione dati, la quale, opportunamente gestita dal software, si è occupata di campionare i dati di resistenza ai capi di appositi contatti del campione di tessuto vegetale analizzato. Sfruttando *BenchLink Data Logger* è stato finalmente possibile registrare i valori di resistenza campionati dall'unità di acquisizione dati. Tutto il processo è stato sufficientemente lungo (almeno 10 minuti) da poter esaurire il transitorio temporale necessario ad estinguere il contributo capacitivo nell'impedenza equivalente del circuito *RC* che modella elettricamente i campioni in esame (cfr. paragrafo 2.3.6).

Per ogni modellino realizzato, sono stati ricavati due campioni solidi di tessuto a forma di parallelepipedo: uno di patata e uno di melanzana. Per la misura della resistenza di questi campioni di tessuto (sia di melanzana che di patata) pre e post trattamento elettroperativo, è stata seguita la seguente procedura:

- Il campione solido (parallelepipedo) è stato collocato fra le piastre conduttive della struttura per la rilevazione dei dati di resistenza di Figura 3.12;
- La struttura per la rilevazione (cfr. Figura 3.12) è stata collegata all'unità acquisizione dati (cfr. Figura 3.11) mediante gli appositi connettori;
- Il programma *BenchLink Data Logger* ha registrato per una durata superiore a 10 minuti i valori di resistenza del campione di tessuto (registrazione dati di resistenza pre trattamento);



Figura 3.10: Il generatore di Impulsi per ECT

- La struttura per la rilevazione è stata scollegata dall' unità acquisizione dati e collegata al generatore di impulsi per ECT (cfr. paragrafo 3.4.1).
- Con il generatore di impulsi per ECT si è applicato il trattamento di elettroporazione al campione solido di tessuto. Sono stati usati 10 impulsi ad onda quadra di modulo pari a 2750 V e semi periodo 100 μs .
- La struttura per la rilevazione (cfr. Figura 3.12) è stata scollegata dal generatore di impulsi per ECT e nuovamente collegata all' unità acquisizione dati.
- *BenchLink Data Logger* ha registrato per una durata superiore a 10 minuti i valori di resistenza del campione di tessuto (registrazione dati di resistenza post trattamento di elettroporazione).



Figura 3.11: L' HP 34970A Data Acquisition/Switch Unit (a sinistra) e la struttura per la rilevazione (a destra)

3.5 I dati dell' esperimento

Per ogni modellino costruito secondo le modalità descritte al paragrafo 3.3.1, si è applicato il seguente protocollo di attivazione per ciascuna coppia di elettrodi:

- Le coppie di elettrodi adiacenti sono state attivate una per volta;
- Per ogni coppia di aghi adiacenti sono stati applicati 10 impulsi di tensione di modulo dipendente dalla loro distanza reciproca (onde quadre con semi periodo di $100 \mu s$);
- L' ampiezza di ciascuna onda quadra è stata di circa 1000 V per ogni centimetro di distanza fra gli aghi attivati;
- Per il dettaglio delle ampiezze degli impulsi di tensione applicati nel test per ciascuna coppia di elettrodi, si veda la tabella in Figura 3.7.

Successivamente (cfr. paragrafi 3.5.1, 3.5.2, 3.5.3) verranno presentati:

- Le dimensioni geometriche dei campioni solidi (parallelepipedi) di tessuto (cfr. paragrafo 3.1), sia di patata sia di melanzana ricavati da ciascun modello;
- I grafici dell' andamento in funzione del tempo dei valori di resistenza misurati pre (*bt*) e post (*at*) trattamento dei tessuti usati in ciascun modello (cfr. punto precedente), mediante le modalità di acquisizione descritte al paragrafo 3.4.2;

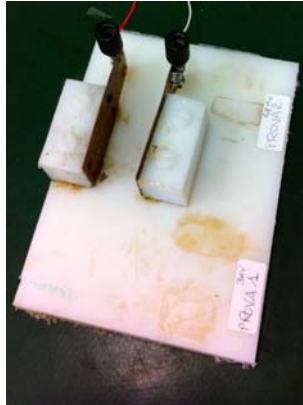


Figura 3.12: La struttura per la rilevazione dei dati di resistenza

- I valori di resistenza misurati dopo un transitorio temporale di almeno una decina di minuti attraverso le modalità di acquisizione descritte al paragrafo 3.4.2 dei tessuti usati in ciascun modello (pre e post trattamento);
- i dati di resistività ricavati dai dati di resistenza misurati al punto precedente, attraverso la relazione:

$$\rho = R \frac{A}{d} \quad (3.1)$$

dove R è la resistenza misurata, d è la distanza dei punti tra i quali è misurata la tensione (misurata in $[m]$, nel caso dell' esperimento è la distanza fra le piastre conduttive del dispositivo per la rilevazione dei dati di impedenza, cfr. paragrafo 3.4.2) ed A è l'area della sezione del campione perpendicolare alla direzione della corrente (misurata in $[m^2]$). La resistività ρ viene misurata in $[\Omega m]$ ed è definita come l' inverso della conducibilità σ menzionata al Capitolo 2.3.1. La distanza fra le piastre conduttive è fissa e verrà indicata in ciascuna tabella delle dimensioni geometriche dei campioni solidi di tessuto dalla voce *Length* ($[cm]$). L' area A sarà data in ciascun campione dal prodotto fra la voce *Width* ($[cm]$) e la voce *Height* ($[cm]$) della stessa tabella. In Figura 3.12 sono raffigurati degli esempi di campioni solidi di melanzana e patata per la misura della resistenza secondo le modalità descritte al paragrafo 3.4.2., mentre in Figura 3.13 sono illustrate le misure di interesse per l' esperimento di un parallelepipedo (forma dei campioni solidi di tessuto).

- Le immagini di ciascun modello, prima e dopo il trattamento di elettroporazione. Nel caso delle immagini del modello post trattamento saranno indicati i punti di applicazione degli elettrodi;
- I dati di corrente media misurati dal generatore di impulsi per ECT (cfr. paragrafo 3.4.1) per ogni modellino realizzato, registrati per il primo ed il decimo impulso di tensione per ogni coppia di aghi adiacenti;
- I dati di resistenza calcolati a partire dai valori di tensione e corrente registrati dal generatore di impulsi per ECT. Questa valutazione è stata fatta per ogni modellino realizzato ad ogni impulso di tensione applicato e per ogni coppia di aghi adiacenti;
- I dati di resistenza minima, massima e media. Questa valutazione è stata fatta per ogni modellino realizzato per ciascuno dei dieci impulsi di tensione applicati e per ogni coppia di aghi adiacenti;



Figura 3.13: Esempi di campioni solidi utilizzati per la misura della resistenza pre e post treatment secondo le modalità descritte al paragrafo 3.4.2, entrambi sono ricavati da modelli che hanno già subito il trattamento di elettroporazione. Quello di colore più scuro proviene da un' area del modello costituita dalla patata, l' altro dalla melanzana dello stesso modello.

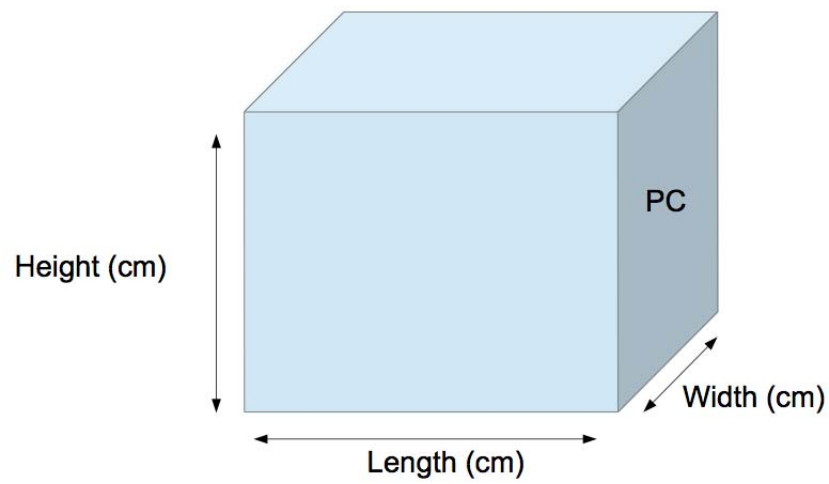


Figura 3.14: Un parallelepipedo. Indicate con le frecce le dimensioni geometriche di interesse per il calcolo della resistività. La sigla PC indica sulla facciata in vista il punto di contatto con le piastre conduttive della struttura per la rilevazione dei dati di resistenza di Figura 3.12. Dunque $Length(cm)$ sarà la distanza (fissa) fra le piastre conduttive.

3.6 Modellino #1

3.6.1 Dati di resistenza e resistività dei tessuti del Modello #1

In Tabella 3.1 sono riportate le caratteristiche geometriche dei campioni solidi di tessuto a forma di parallelepipedo utilizzati per la misura della resistenza pre (*bt*) e post (*at*) trattamento (cfr. Tabella 3.2) nel modello #1, secondo le modalità di acquisizione introdotte nel paragrafo 3.4.2. Da tali misure è stato possibile ricavare i valori di resistività dei campioni solidi di tessuto attraverso la (3.1).

Tabella 3.1: Caratteristiche geometriche dei campioni di tessuto usati per la misura della resistenza pre e post trattamento. Entrambi i parallelepipedo sono ricavati dai vegetali usati per il modellino #1

	Width (cm)	Length (cm)	Height (cm)
Potato	2,85	2,75	2,85
Aubergine	1,9	2,75	3,8

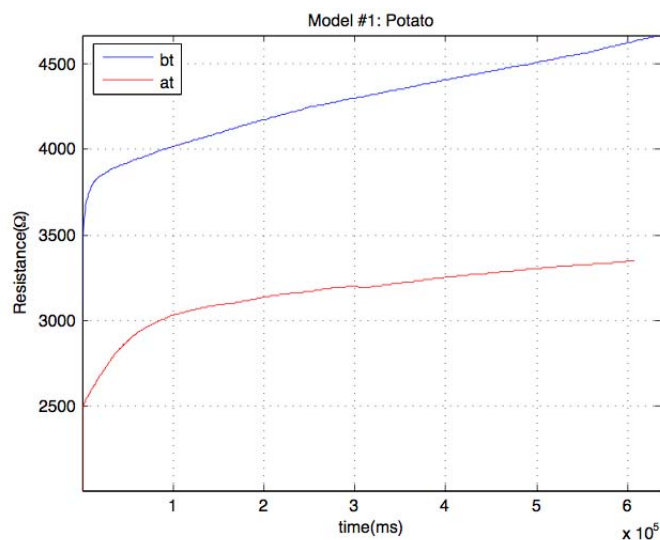


Figura 3.15: Andamento temporale dei valori di resistenza registrati mediante le modalità descritte al Capitolo 3.4.2 nel campione solido (parallelepipedo) di patata usato nel Modello #1, prima del trattamento di elettroporazione (*bt*, linea blu) e dopo (*at*, linea rossa).

La figura 3.15 riporta l'andamento dei valori di resistenza in funzione del tempo misurati del campione solido (parallelepipedo) di tessuto di patata utilizzato nel Modello #1, rispettivamente prima (bt , linea blu) e dopo (at , linea rossa) il trattamento di elettroporazione ricavati come descritto al paragrafo 3.4.2. E' possibile notare come, con il passare del tempo, sia prima sia dopo l'elettroporazione i valori di resistenza del campione di patata tendano ad aumentare con andamento simile. In generale nel grafico in Figura 3.15 si vede che la resistenza prima dell'elettroporazione assume valori maggiori rispetto a quelli ottenuti dopo l'elettroporazione come ci si aspetta.

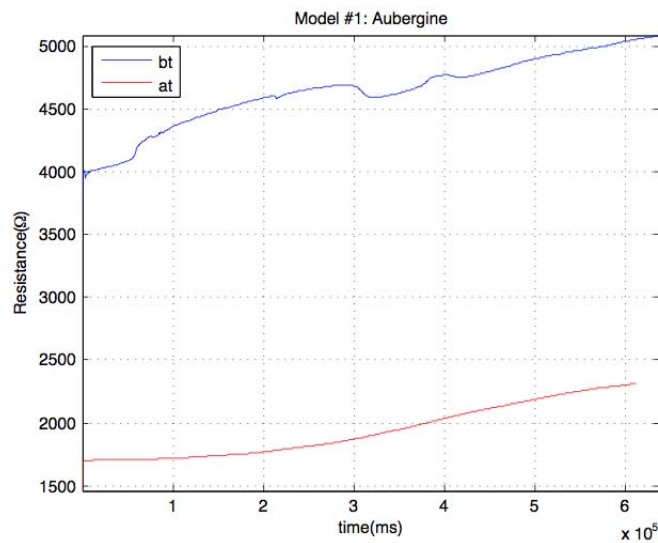


Figura 3.16: Andamento temporale dei valori di resistenza registrati mediante le modalità descritte al Capitolo 3.4.2 nel campione solido (parallelepipedo) di melanzana usato nel Modello #1, prima del trattamento di elettroporazione (bt , linea blu) e dopo (at , linea rossa).

La Figura 3.16 riporta l'andamento dei valori di resistenza in funzione del tempo misurati del campione solido (parallelepipedo) di tessuto di melanzana utilizzato nel Modello #1, rispettivamente prima (bt , linea blu) e dopo (at , linea rossa) il trattamento di elettroporazione ricavati come descritto al paragrafo 3.4.2. Come nel grafico di Figura 3.15, anche qui è possibile notare come con il passare del tempo sia prima sia dopo l'elettroporazione i valori di resistenza del campione di melanzana tendano ad aumentare.

Anche in questo caso, come osservato nel grafico di Figura 3.15, prima del trattamento (bt , linea blu) il grafico mostra valori di resistenza sensibilmente maggiori di quelli trovati misurando la resistenza dopo l'elettroporazione (at ,

linea rossa).

Come valore di resistenza per ricavare i valori di resistività è stato considerato l'ultimo campione, corrispondente alla fine del transitorio temporale di carica della capacità formata dalle piastre conduttive e dal tessuto interposto (cfr. paragrafi 2.3.5, 2.3.6).

Tabella 3.2: Valori di resistenza misurati pre (bt) e post (at) trattamento nei campioni di tessuto ricavati dai vegetali usati per il modellino #1, alla fine del transitorio. I valori di resistività sono ottenuti dalla relazione (3.1) sulla base delle caratteristiche geometriche del parallelepipedo riportate in Tabella 3.1

	Resistance (Ω)	Resistivity (Ωm)
Potato (bt)	$4,7 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^2$
Aubergine (bt)	$5,1 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^2$
Potato (at)	$3,3 \cdot 10^3$	$9,7 \cdot 10^1$
Aubergine (at)	$2,3 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^1$

I valori di resistenza misurata e resistività calcolata per i campioni di tessuto sono riportati nella Tabella 3.2. Si tenga conto che i valori di resistenza riportati in tale tabella sono i dati dei resistenza dei campioni di tessuto registrati dopo un transitorio di 10 minuti. La resistività è stata calcolata utilizzando l'equazione (3.1) e le dimensioni geometriche dei parallelepipedi riportate in Tabella 3.1.

Da un'analisi di Tabella 3.2 è possibile notare una diminuzione della resistività del tessuto rispetto ai valori iniziali registrati prima di aver applicato gli impulsi di elettroporazione sia nel campione di melanzana sia in quello di patata. La riduzione della resistività, corrispondente ad un aumento della conducibilità, è dovuta agli effetti del trattamento elettroporativo a cui è stato sottoposto il modello di test [3].

E' interessante notare come prima del trattamento i campioni di melanzana e patata di questo modello siano caratterizzati da un valore circa uguale di resistività ($1,3 \cdot 10^2 \Omega m$). E tuttavia, al termine del trattamento, si registra che la resistività del campione di melanzana si è assestata ad un valore minore ($6,0 \cdot 10^1 \Omega m$) rispetto a quello della patata ($9,7 \cdot 10^1 \Omega m$).

3.6.2 Dati di resistenza e corrente durante l' elettroporazione del Modello #1

La Figura 3.17 (a) mostra il modellino #1 utilizzato nel test e costruito secondo le specifiche descritte al paragrafo 3.3.1 prima del trattamento di elettroporazione. Nella Figura 3.17 (b) è mostrato lo stesso modellino fotografato dopo qualche ora dall' applicazione del trattamento di elettroporazione, con indicati in rosso i corrispondenti punti di applicazione degli elettrodi (in bianco i numeri degli aghi).

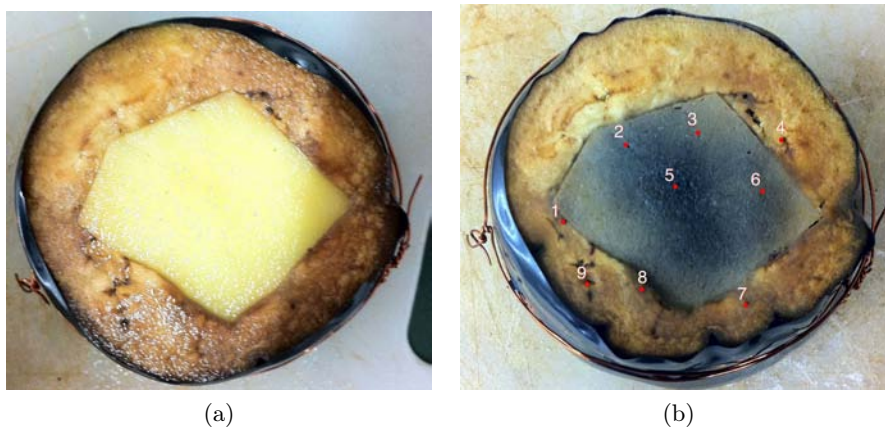


Figura 3.17: A sinistra (a): il modellino #1 prima del trattamento elettroporativo (visione verticale). A destra (b): il modellino #1 dopo il trattamento elettroporativo (visione verticale). Segnati in rosso e numerati in bianco: i punti di applicazione degli elettrodi.

E' possibile notare dalla Figura 3.17 (b) come il fenomeno dell' elettroporazione abbia effettivamente avuto luogo. I segni di colore scuro che compaiono dopo qualche ora dal trattamento sono dovuti alla fuoriuscita dalle cellule vegetali di amido che si ossida a contatto con l' aria [16].

La Tabella 3.3 è suddivisa in due parti:

- Nella tabella superiore sono riportati i dati di corrente media corrispondenti al primo ($I_{med 1^\circ}$) ed al decimo impulso di tensione ($I_{med 10^\circ}$). La prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva, la seconda (Dis [mm]) la distanza in *mm* fra gli elettrodi attivi.
- Nella tabella inferiore sono riportati i dati di resistenza massima (R Max), minima (R Min) e media (R Med) per ogni coppia di aghi adiacenti valutati a partire dai dati di tensione e corrente registrati dal generatore di impulsi per ECT durante il trattamento. Come per la parte superiore, la prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la

coppia di aghi attiva, la seconda (Dis [mm]) la distanza in *mm* fra gli elettrodi attivi.

Tabella 3.3: Sopra: i dati di corrente media registrata al primo (I med 1°) e al decimo impulso di tensione (I med 10°) dal generatore di impulsi per ECT durante il trattamento. Sotto: i dati di resistenza massima (R Max), minima (R Min) e media (R Med) per ogni coppia di aghi adiacenti. L'unità di misura per le colonne I med è [A].

Coppia Aghi	Dis [mm]	I med (1°)	I med (10°)
(4;3)	12,5	2,7	2,9
(4;6)	10	2,3	2,3
(4;5)	18	4,8	5,1
(3;5)	13	5,0	4,9
(3;2)	10	3,6	3,6
(2;5)	12	4,6	4,3
(2;1)	18	5,1	5,4
(1;9)	15	2,3	2,5
(5;9)	26,5	6,6	6,9
(8;9)	10	2,6	2,6
(8;5)	20,5	7,3	7,5
(5;7)	24,5	7,1	7,5
(8;7)	18	4,6	4,7
(6;7)	26,5	7,0	7,3

Coppia Aghi	Dis [mm]	R Max [ohm]	R Min [ohm]	R Med [ohm]
(4;3)	12,5	460,4	414,2	430,8
(4;6)	10	430,3	421,0	419,9
(4;5)	18	371,8	341,1	353,4
(3;5)	13	259,3	250,6	254,5
(3;2)	10	271,0	263,0	264,4
(2;5)	12	216,6	216,2	214,5
(2;1)	18	351,3	320,8	334,0
(1;9)	15	647,0	597,4	623,1
(5;9)	26,5	411,4	379,1	392,4
(8;9)	10	380,4	369,6	370,3
(8;5)	20,5	281,2	262,3	269,8
(5;7)	24,5	346,5	318,2	330,7
(8;7)	18	388,6	369,8	377,5
(6;7)	26,5	388,8	362,7	374,7

Tabella 3.4: I dati di resistenza registrati ad ogni impulso di tensione dal generatore di impulsi per ECT per ogni coppia di aghi adiacenti durante il trattamento di elettroporazione (e.g.: nella colonna 4° sono riportati i dati di resistenza registrati per ogni coppia di aghi al quarto impulso del trattamento). L' unità di misura per tutte le resistenze della tabella è $[\Omega]$.

Coppia Aghi	Dis [mm]	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
(4;3)	12,5	460,4	440,7	438,3	431,0	433,1	430,3	422,6	420,0	417,3	414,2
(4;6)	10	430,3	422,4	428,7	423,0	422,7	409,9	420,6	413,1	407,3	421,0
(4;5)	18	371,8	365,4	358,8	355,6	351,0	350,2	350,4	345,3	344,3	341,1
(3;5)	13	259,3	258,4	256,6	254,8	253,8	255,1	252,5	252,0	251,4	250,6
(3;2)	10	271,0	266,7	262,9	261,0	265,9	264,4	262,9	263,7	262,5	263,0
(2;5)	12	213,2	213,9	213,9	213,7	214,1	214,8	214,4	214,3	216,6	216,2
(2;1)	18	351,3	346,6	341,6	338,9	333,5	330,0	329,9	326,3	320,9	320,8
(1;9)	15	647,0	641,0	636,6	630,5	616,7	624,3	608,9	619,5	609,7	597,4
(5;9)	26,5	411,4	404,2	402,1	396,8	390,8	388,8	385,2	383,8	381,5	379,1
(8;9)	10	373,1	380,4	377,8	368,1	364,7	375,0	363,8	360,5	369,8	369,6
(8;5)	20,5	281,2	276,7	273,3	273,8	269,3	268,0	267,6	264,1	261,8	262,3
(5;7)	24,5	346,5	343,0	336,2	333,3	328,4	328,3	327,7	323,6	321,5	318,2
(8;7)	18	388,6	383,2	379,5	380,4	374,8	373,8	375,1	376,5	373,2	369,8
(6;7)	26,5	388,8	386,5	380,1	380,5	374,5	372,1	368,9	365,2	367,3	362,7

La Tabella 3.4 riporta i dati di resistenza valutati a partire dai valori di tensione e corrente dei singoli impulsi dal generatore di impulsi per ECT per ogni coppia di aghi adiacenti. Ad esempio, la colonna 6° riporta i dati di resistenza valutata per il sesto impulso del trattamento per ogni coppia di aghi. Come nelle tabelle precedenti, la prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva e la seconda (Dis [mm]) la distanza in *mm* fra gli elettrodi attivi.

Osservando i dati della Tabella 3.4 è possibile notare come ad ogni impulso si registri una progressiva diminuzione dei valori di resistenza ai capi di una coppia di elettrodi, come atteso dalla letteratura (cfr. paragrafo 2.3.3) [14]. Incrociando questi dati con quelli della parte inferiore della Tabella 3.3, si noti come per ogni coppia di aghi adiacenti la resistenza massima (R Max) coincida con la resistenza misurata al primo impulso di tensione (1°), mentre la resistenza minima (R Min) coincide con la resistenza misurata al decimo (ed ultimo) impulso di tensione (10°). Questo fatto sembra confermare quanto affermato negli studi di Ivorra et al. [14], ovvero che per elevati valori di campo elettrico ad ogni impulso elettroporativo la conducibilità del materiale registra un incremento rispetto all' impulso precedente.

In riferimento alla parte superiore della Tabella 3.3, è possibile notare come la corrente che scorre al 10° impulso di tensione ($I_{med} 10^\circ$) fra la coppia di aghi (3;2) sia maggiore di circa un Ampere rispetto a quella che scorre fra le coppie (4;6) e (8;9). Queste tre coppie di aghi sono caratterizzate dalla medesima distanza fra gli elettrodi (10*mm*), ciò che cambia è la zona in cui questi sono impiantati, come è possibile notare dalla Figura 3.18: (3;2) ha

entrambi gli aghi impiantati nel tessuto di patata, (4;6) ne ha uno impiantato nel tessuto di patata e l' altro nel tessuto di melanzana, (8;9) li ha entrambi impiantati nel tessuto di melanzana.

Si noti poi come nella terna di coppie di aghi caratterizzate da distanza 18mm fra gli elettrodi, il valore medio di corrente al decimo impulso di tensione (I med 10°) sia massimo nel caso della coppia (2;1) (5,4A), minimo nel caso della coppia (8;7) (4,7A) e pari a 5,1A nel caso della coppia (4;5). La prima e la terza hanno un ago impiantato nel tessuto di patata (2 e 5 rispettivamente) e l' altro a ridosso della regione di confine, nel tessuto di melanzana (1 e 4 rispettivamente), la seconda ha entrambi gli aghi impiantati nel tessuto di patata.

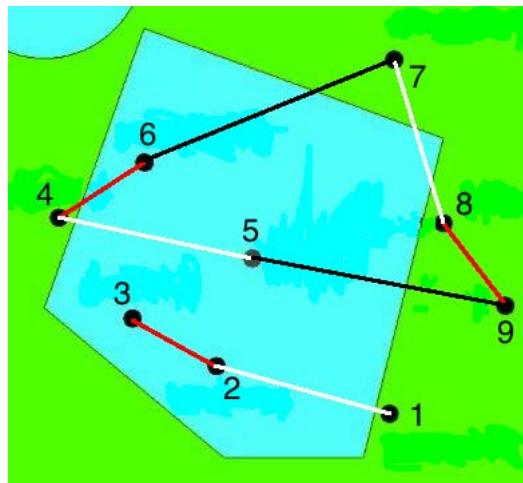
Per le due coppie di aghi caratterizzate da distanza $26,5\text{mm}$ fra gli elettrodi, (6;7) e (5;9), il valore medio di corrente al decimo impulso di tensione (I med 10°) è più alto nella coppia (6;7). Entrambe queste coppie di aghi ((6;7), (5;9)) hanno gli aghi impiantati uno nel tessuto di melanzana, l' altro in quello di patata, cambia, non di molto, la distanza dal confine patata-melanzana.

La tabella 3.5 riassume i dati di resistenza e corrente media per il decimo impulso di tensione delle coppie di aghi caratterizzate da uguale distanza fra gli elettrodi. Come nelle tabelle precedenti, la prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva e la seconda (Dis [mm]) la distanza in mm fra gli elettrodi attivi. La terza colonna (10°) riporta i dati di resistenza valutata dai valori di tensione e corrente al decimo impulso registrati dal generatore di impulsi per ECT. La quarta colonna (I med (10°)) riporta i valori di corrente media registrati al decimo impulso dal generatore di impulsi per ECT.

Tabella 3.5: I dati di resistenza e corrente media per il decimo impulso di tensione delle coppie con distanza uguale fra gli elettrodi.

Coppia Aghi	Dis [mm]	R 10° [ohm]	I med (10°) [A]
(3;2)	10	263,0	3,6
(4;6)	10	421,0	2,3
(8;9)	10	369,6	2,6
(4;5)	18	341,1	5,1
(2;1)	18	320,8	5,4
(8;7)	18	369,8	4,7
(5;9)	26,5	379,1	6,9
(6;7)	26,5	362,7	7,3

La Figura 3.18 rappresenta schematicamente la mappa degli elettrodi con i relativi punti di applicazione sul modello. Vengono evidenziate con colori diversi le coppie di aghi con uguale distanza fra gli elettrodi.



	d=10mm	d=18mm	d=26,5mm
Coppie di aghi	(4; 6), (3; 2), (8; 9)	(4; 5), (2; 1), (8; 7)	(5; 9), (6; 7)

Figura 3.18: Sopra: mappa schematica degli elettrodi con relativi punti di applicazione sul modello. In verde acqua il tessuto di patata, in verde acido il tessuto di melanzana. Segnate in rosso le tre coppie di aghi distanti 10mm, in bianco le tre coppie di aghi distanti 18mm e in bianco le due coppie di aghi distanti 26,5mm. Sotto: tabella che riassume le coppie di aghi caratterizzate da distanza uguale fra gli elettrodi.

3.7 Modellino #2

3.7.1 Dati di resistenza e resistività dei tessuti del Modello #2

In Tabella 3.6 sono riportate le caratteristiche geometriche dei campioni solidi di tessuto a forma di parallelepipedo utilizzati per la misura della resistenza pre (*bt*) e post (*at*) trattamento (cfr. Figura 3.26) nel modello #2, secondo le modalità di acquisizione introdotte nel paragrafo 3.4.2. Da tali misure è stato possibile ricavare i valori di resistività dei campioni solidi di tessuto attraverso la (3.1).

Tabella 3.6: Caratteristiche geometriche dei campioni di tessuto usati per la misura della resistenza pre e post trattamento. Entrambi i parallelepipedi sono ricavati dai vegetali usati per il modellino #2.

	Width (cm)	Length (cm)	Height (cm)
Potato	2,2	2,75	2,0
Aubergine	1,8	2,75	1,85

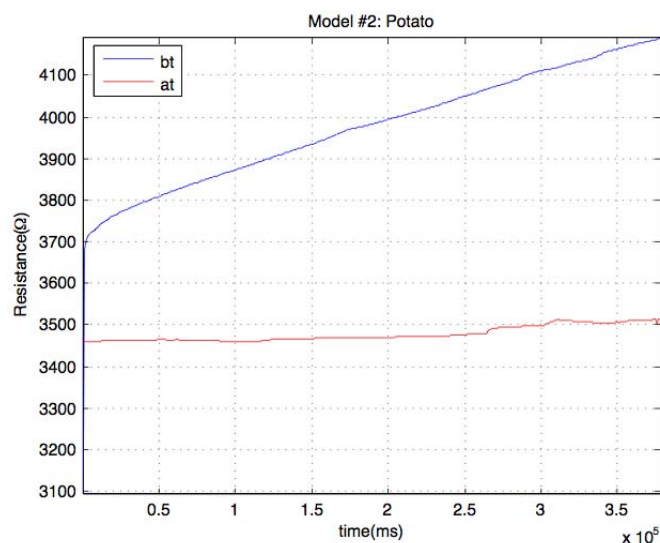


Figura 3.19: Andamento temporale dei valori di resistenza registrati mediante le modalità descritte al Capitolo 3.4.2 nel campione solido (parallelepipedo) di patata usato nel Modello #2, prima del trattamento di elettroporazione (*bt*, linea blu) e dopo (*at*, linea rossa).

La figura 3.19 riporta l'andamento dei valori di resistenza in funzione del tempo misurati del campione solido (parallelepipedo) di tessuto di pa-

tata utilizzato nel Modello #2, rispettivamente prima (*bt*, linea blu) e dopo (*at*, linea rossa) il trattamento di elettroporazione ricavati come descritto al paragrafo 3.4.2. E' possibile notare come, con il passare del tempo, sia prima sia dopo l' elettroporazione i valori di resistenza del campione di patata tendano ad aumentare. In generale nel grafico in Figura 3.19 si vede che la resistenza prima dell' elettroporazione assume valori maggiori rispetto a quelli ottenuti dopo l' elettroporazione come ci si aspetta.

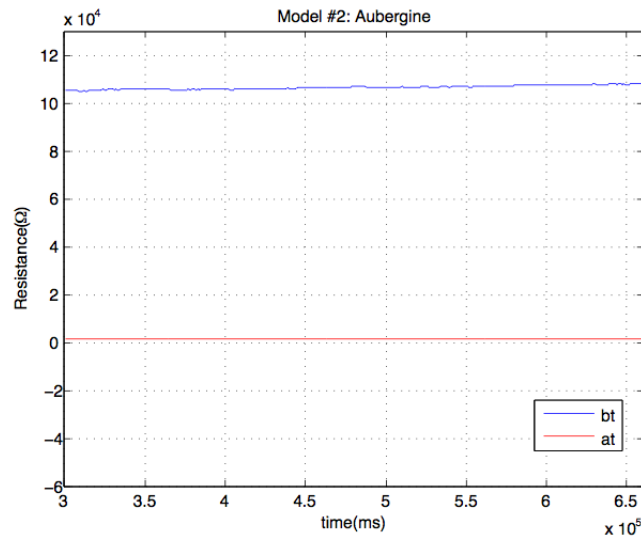


Figura 3.20: Andamento temporale dei valori di resistenza registrati mediante le modalità descritte al Capitolo 3.4.2 nel campione solido (parallelepipedo) di melanzana usato nel Modello #2, prima del trattamento di elettroporazione (*bt*, linea blu) e dopo (*at*, linea rossa).

La Figura 3.20 riporta l' andamento dei valori di resistenza in funzione del tempo misurati del campione solido (parallelepipedo) di tessuto di melanzana utilizzato nel Modello #2, rispettivamente prima (*bt*, linea blu) e dopo (*at*, linea rossa) il trattamento di elettroporazione ricavati come descritto al paragrafo 3.4.2. Come nel grafico di Figura 3.19, anche qui è possibile notare come con il passare del tempo sia prima sia dopo l' elettroporazione i valori di resistenza del campione di melanzana tendano ad aumentare.

Anche in questo caso, come osservato nel grafico di Figura 3.19, prima del trattamento (*bt*, linea blu) il grafico mostra valori di resistenza sensibilmente maggiori di quelli trovati misurando la resistenza dopo l' elettroporazione (*at*, linea rossa).

Come valore di resistenza per ricavare i valori di resistività è stato considerato l' ultimo campione, corrispondente alla fine del transitorio tempo-

rile di carica della capacità formata dalle piastre conduttive e dal tessuto interposto (cfr. paragrafi 2.3.5, 2.3.6).

Tabella 3.7: Valori di resistenza misurati pre (bt) e post (at) trattamento nei campioni di tessuto ricavati dai vegetali usati per il modellino #2, alla fine del transitorio. I valori di resistività sono ottenuti dalla relazione (3.1) sulla base delle caratteristiche geometriche del parallelepipedo riportate in Tabella 3.6

	Resistance (Ω)	Resistivity (Ωm)
Potato (bt)	$4,2 \cdot 10^3$	$6,7 \cdot 10^1$
Aubergine (bt)	$1,1 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^3$
Potato (at)	$3,5 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^1$
Aubergine (at)	$1,4 \cdot 10^3$	$1,7 \cdot 10^1$

I valori di resistenza misurata e resistività calcolata per i campioni di tessuto sono riportati nella Tabella 3.7. Si tenga conto che i valori di resistenza riportati in tale tabella sono i dati di resistenza dei campioni di tessuto registrati dopo un transitorio di 10 minuti. La resistività è stata calcolata utilizzando l'equazione (3.1) e le dimensioni geometriche dei parallelepipedi riportate in Tabella 3.6

Da un'analisi di Tabella 3.7, è possibile notare una diminuzione della resistività del tessuto rispetto ai valori iniziali registrati prima di aver applicato gli impulsi di elettroporazione sia nel campione di melanzana sia di quello di patata. La riduzione della resistività, corrispondente ad un aumento della conducibilità, è dovuta agli effetti del trattamento elettroporativo a cui è stato sottoposto il modello di test [3].

E' interessante notare come, diversamente da quanto osservato nel caso precedente (cfr. paragrafo 3.6.1), prima del trattamento (bt), il campione di melanzana è caratterizzato da un valore di resistività di tre ordini di grandezza maggiore rispetto a quello di patata ($6,7 \cdot 10^1 \Omega m$). Tuttavia, in seguito al trattamento (at), la resistività del campione di melanzana si è assesta ad un valore minore ($1,7 \cdot 10^1 \Omega m$) rispetto a quello della patata ($5,6 \cdot 10^1 \Omega m$), come già osservato nei risultati del test al modello #1.

3.7.2 Dati di resistenza e corrente durante l' elettroporazione del Modello #2

La Figura 3.21 (a) mostra il modellino #2 utilizzato nel test e costruito secondo le specifiche descritte al paragrafo 3.3.1 prima del trattamento di elettroporazione. Nella Figura 3.21 (b) è mostrato lo stesso modellino fotografato dopo qualche ora dall' applicazione del trattamento di elettroporazione, con indicati in rosso i corrispondenti punti di applicazione degli elettrodi (in bianco i numeri degli aghi).

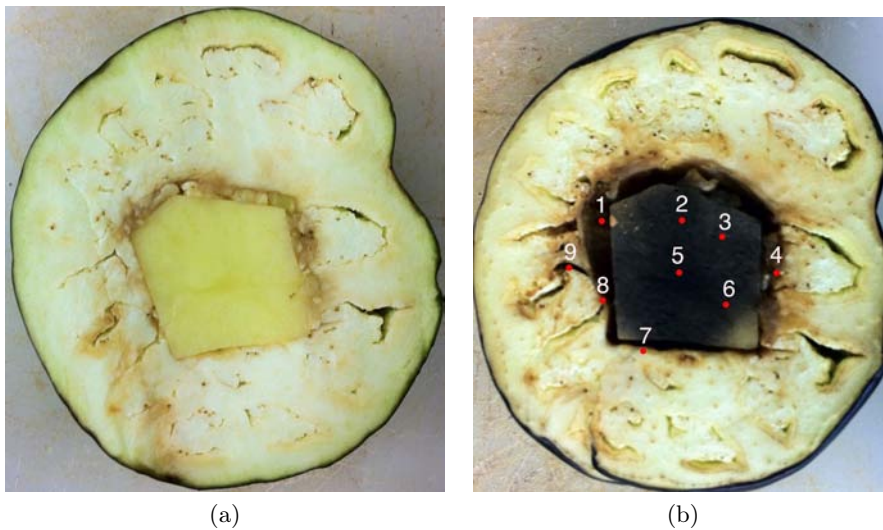


Figura 3.21: A sinistra (a): il modellino #2 prima del trattamento elettroporativo (visione verticale). A destra (b): il modellino #2 dopo il trattamento elettroporativo (visione verticale). Segnati in rosso e numerati in bianco: i punti di applicazione degli elettrodi.

E' possibile notare dalla Figura 3.21 (b) come il fenomeno dell' elettroporazione abbia effettivamente avuto luogo. I segni di colore scuro che compaiono dopo qualche ora dal trattamento sono dovuti alla fuoriuscita dalle cellule vegetali di amido che si ossida a contatto con l' aria [16].

La Tabella 3.8 è suddivisa in due parti:

- Nella tabella superiore sono riportati i dati di corrente media corrispondenti al primo ($I_{med 1^\circ}$) ed al decimo impulso di tensione ($I_{med 10^\circ}$). La prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva, la seconda (Dis [mm]) la distanza in *mm* fra gli elettrodi attivi.
- Nella tabella inferiore sono riportati i dati di resistenza massima (R Max), minima (R Min) e media (R Med) per ogni coppia di aghi adiacenti valutati a partire dai dati di tensione e corrente registrati dal

generatore di impulsi per ECT durante il trattamento. Come per la parte superiore, la prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva, la seconda (Dis [mm]) la distanza in *mm* fra gli elettrodi attivi.

Tabella 3.8: Sopra: i dati di corrente media registrata al primo (I med 1°) e al decimo impulso di tensione (I med 10°) dal generatore di impulsi per ECT durante il trattamento. Sotto: i dati di resistenza massima (R Max), minima (R Min) e media (R Med) per ogni coppia di aghi adiacenti. L'unità di misura per le colonne I med è [A].

Coppia Aghi	Dis [mm]	I med [1°]	I med [10°]
(4;3)	12,5	2,2	2,3
(4;6)	10	1,7	1,7
(4;5)	18	2,7	2,7
(3;5)	13	4,9	5,0
(3;2)	10	3,0	3,0
(2;5)	12	1,9	1,9
(2;1)	18	4,0	3,9
(1;9)	15	2,2	2,4
(5;9)	26,5	0,8	0,9
(8;9)	10	3,0	3,4
(8;5)	20,5	6,8	7,1
(5;7)	24,5	7,9	8,4
(8;7)	18	5,6	5,6
(6;7)	26,5	9,0	9,2

Coppia Aghi	Dis [mm]	R Max [ohm]	R Min [ohm]	R Med [ohm]
(4;3)	12,5	559,8	526,2	541,8
(4;6)	10,0	575,9	557,2	553,5
(4;5)	18,0	366,5	357,1	360,0
(3;5)	13,0	370,5	347,7	358,6
(3;2)	10,0	429,3	413,5	419,9
(2;5)	12,0	520,3	510,9	508,9
(2;1)	18,0	296,9	288,8	292,0
(1;9)	15,0	822,4	741,8	774,2
(5;9)	26,5	1863,8	1726,5	1782,5
(8;9)	10,0	906,4	782,5	826,8
(8;5)	20,5	301,8	279,6	290,0
(5;7)	24,5	310,9	283,9	296,1
(8;7)	18,0	322,5	310,8	315,3
(6;7)	26,5	303,7	282,5	292,3

Tabella 3.9: I dati di resistenza registrati ad ogni impulso di tensione dal generatore di impulsi per ECT per ogni coppia di aghi adiacenti durante il trattamento di elettroporazione (e.g.: nella colonna 4° sono riportati i dati di resistenza calcolati per ogni coppia di aghi al quarto impulso del trattamento). L' unità di misura per tutte le resistenze della tabella è $[\Omega]$

Coppia Aghi	Dis [mm]	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
(4;3)	12,5	559,8	547,7	542,8	541,5	543,9	547,3	541,0	532,7	535,1	526,2
(4;6)	10,0	575,9	546,9	565,0	544,2	538,6	557,4	540,7	553,9	554,8	557,2
(4;5)	18,0	366,5	360,4	363,5	359,1	362,1	357,3	355,6	359,8	359,0	357,1
(3;5)	13,0	370,5	367,5	367,1	361,6	360,7	355,2	354,3	351,7	350,3	347,7
(3;2)	10,0	429,3	427,1	427,0	423,8	417,5	416,9	416,6	414,6	413,0	413,5
(2;5)	12,0	518,9	504,1	520,3	501,5	511,3	496,5	512,4	510,9	502,0	510,9
(2;1)	18,0	296,9	295,7	292,0	291,1	291,8	290,8	290,8	293,0	289,4	288,8
(1;9)	15,0	822,4	797,8	795,9	790,7	772,9	772,4	758,4	755,7	733,8	741,8
(5;9)	26,5	1850,6	1863,8	1766,4	1835,2	1743,6	1830,8	1723,2	1749,3	1735,6	1726,5
(8;9)	10,0	906,4	875,0	859,3	842,8	822,5	814,2	793,4	787,1	785,0	782,5
(8;5)	20,5	301,8	299,2	294,9	292,6	289,3	289,5	285,3	284,8	282,7	279,6
(5;7)	24,5	310,9	308,6	303,5	299,7	296,5	292,7	290,5	289,5	285,5	283,9
(8;7)	18,0	322,5	321,4	317,4	315,5	314,2	314,0	315,6	312,0	309,7	310,8
(6;7)	26,5	303,7	300,4	296,3	293,1	293,4	290,5	288,7	288,3	286,2	282,5

La tabella 3.9 riporta i dati di resistenza valutati a partire dai valori di tensione e corrente dei singoli impulsi dal generatore di impulsi per ECT per ogni coppia di aghi adiacenti. Ad esempio, la colonna 6° riporta i dati di resistenza valutata per il sesto impulso del trattamento per ogni coppia di aghi. Come nelle tabelle precedenti, la prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva e la seconda (Dis [mm]) la distanza in *mm* fra gli elettrodi attivi.

Osservando i dati della Tabella 3.9 è possibile notare come ad ogni impulso si registri una progressiva diminuzione dei valori di resistenza ai capi di una coppia di elettrodi, come atteso dalla letteratura (cfr. paragrafo 2.3.3) [14]. Incrociando questi dati con quelli della parte inferiore della Tabella 3.8, si noti come per ogni coppia di aghi adiacenti la resistenza massima (R Max) coincide con la resistenza misurata al primo impulso di tensione (1°), mentre la resistenza minima (R Min) coincide con la resistenza misurata al decimo (ed ultimo) impulso di tensione (10°). Questo fatto sembra confermare quanto affermato negli studi di Ivorra et al. [14], ovvero che per elevati valori di campo elettrico ad ogni impulso elettroporativo la conducibilità del materiale registra un incremento rispetto all' impulso precedente.

In riferimento alla parte superiore della Tabella 3.8, si noti come nella terna di coppie di aghi caratterizzate da distanza 10*mm* fra gli elettrodi, il valore medio di corrente al decimo impulso di tensione (I med 10°) sia massimo nel caso della coppia (8;9) (3,4A), minimo nel caso della coppia (4;6) (1,7A) e pari a 3,0A nel caso della coppia (3;2). La prima ha entrambi gli aghi impiantati nel tessuto di melanzana, la seconda ne ha uno (4) impiantato nel tessuto di melanzana e l' altro (6) impiantato nel tessuto di patata, la

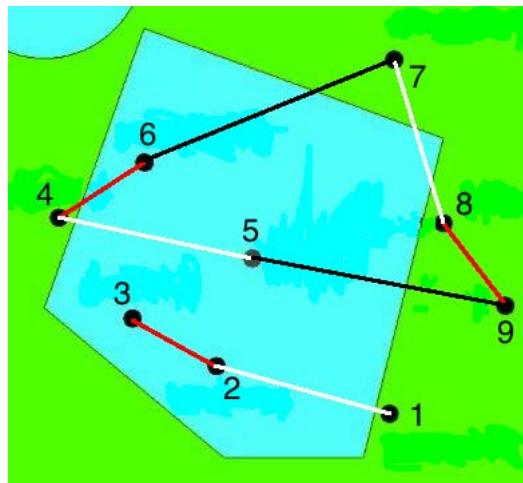
terza li ha entrambi impiantati nel tessuto di melanzana. Si noti poi come nella terna di coppie di aghi caratterizzate da distanza 18mm fra gli elettrodi, il valore medio di corrente al decimo impulso di tensione ($I_{\text{med } 10^\circ}$) sia massimo nel caso della coppia (8;7) ($5,6\text{A}$), minimo nel caso della coppia (4;5) ($2,7\text{A}$) e pari a $3,9\text{A}$ nel caso della coppia (2;1). La prima ha entrambi gli aghi impiantati nel tessuto di melanzana (la linea che li congiunge passa per il tessuto di patata in buona parte), la seconda e la terza hanno un ago (rispettivamente 5 e 2) impiantato nel tessuto di patata e l'altro (rispettivamente 4 e 1) nel tessuto di melanzana a ridosso della regione di confine. Per le due coppie di aghi caratterizzate da distanza $26,5\text{mm}$ fra gli elettrodi, (6;7) e (5;9), il valore medio di corrente al decimo impulso di tensione ($I_{\text{med } 10^\circ}$) è molto più alto nella coppia (6;7) ($9,2\text{A}$ contro $0,9\text{A}$). Entrambe queste coppie di aghi ((6;7), (5;9)) hanno gli aghi impiantati uno nel tessuto di melanzana, l'altro in quello di patata, cambia, non di molto, la distanza dal confine patata-melanzana.

La tabella 3.10 riassume i dati di resistenza e corrente media per il decimo impulso di tensione delle coppie di aghi caratterizzate da uguale distanza fra gli elettrodi. Come nelle tabelle precedenti, la prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva e la seconda (Dis [mm]) la distanza in mm fra gli elettrodi attivi. La terza colonna (10°) riporta i dati di resistenza valutata dai valori di tensione e corrente al decimo impulso registrati dal generatore di impulsi per ECT. La quarta colonna ($I_{\text{med } (10^\circ)}$) riporta i valori di corrente media registrati al decimo impulso dal generatore di impulsi per ECT.

Tabella 3.10: I dati di resistenza e corrente media per il decimo impulso di tensione delle coppie con distanza uguale fra gli elettrodi.

Coppia Aghi	Dis [mm]	R 10° [ohm]	I med [10°] [A]
(3;2)	10	413,5	3
(4;6)	10	557,2	1,7
(8;9)	10	782,5	3,4
(4;5)	18	357,1	2,7
(2;1)	18	288,8	3,9
(8;7)	18	310,8	5,6
(5;9)	26,5	1726,5	0,9
(6;7)	26,5	282,5	9,2

La Figura 3.22 rappresenta schematicamente la mappa degli elettrodi con i relativi punti di applicazione sul modello. Vengono evidenziate con colori diversi le coppie di aghi con uguale distanza fra gli elettrodi.



	d=10mm	d=18mm	d=26,5mm
Coppie di aghi	(4; 6), (3; 2), (8; 9)	(4; 5), (2; 1), (8; 7)	(5; 9), (6; 7)

Figura 3.22: Sopra: mappa schematica degli elettrodi con relativi punti di applicazione sul modello. In verde acqua il tessuto di patata, in verde acido il tessuto di melanzana. Segnate in rosso le tre coppie di aghi distanti 10mm, in bianco le tre coppie di aghi distanti 18mm e in bianco le due coppie di aghi distanti 26,5mm. Sotto: tabella che riassume le coppie di aghi caratterizzate da distanza uguale fra gli elettrodi.

3.8 Modellino #3

3.8.1 Dati di resistenza e resistività dei tessuti del Modello #3

In Tabella 3.11 sono riportate le caratteristiche geometriche dei campioni solidi di tessuto a forma di parallelepipedo utilizzati per la misura della resistenza pre (*bt*) e post (*at*) trattamento (cfr. Tabella 3.12) nel modello #3, secondo le modalità di acquisizione introdotte nel paragrafo 3.4.2. Da tali misure è stato possibile ricavare i valori di resistività dei campioni solidi di tessuto attraverso la (3.1).

Tabella 3.11: Caratteristiche geometriche dei campioni di tessuto usati per la misura della resistenza pre e post trattamento. Entrambi i parallelepipedi sono ricavati dai vegetali usati per il modellino #3.

	Width (cm)	Length (cm)	Height (cm)
Potato	3,4	2,75	3,35
Aubergine	3,15	2,75	2,95

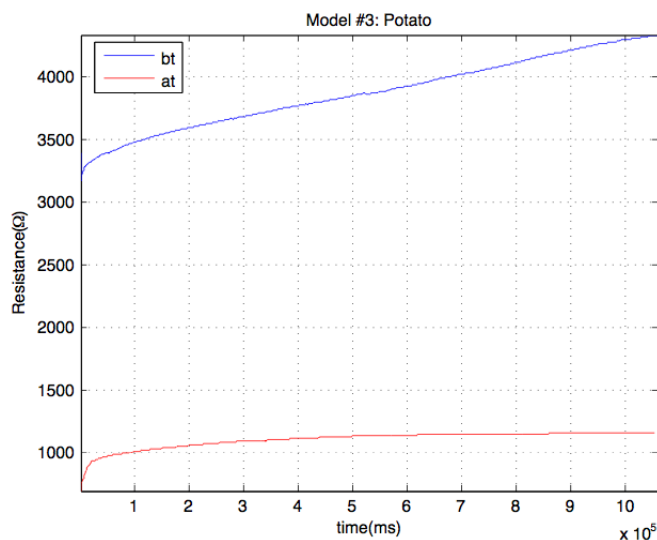


Figura 3.23: Andamento temporale dei valori di resistenza registrati mediante le modalità descritte al Capitolo 3.4.2 nel campione solido (parallelepipedo) di patata usato nel Modello #3, prima del trattamento di elettroporazione (*bt*, linea blu) e dopo (*at*, linea rossa).

La figura 3.23 riporta l'andamento dei valori di resistenza in funzione del tempo misurati del campione solido (parallelepipedo) di tessuto di pa-

tata utilizzato nel Modello #3, rispettivamente prima (*bt*, linea blu) e dopo (*at*, linea rossa) il trattamento di elettroporazione ricavati come descritto al paragrafo 3.4.2. E' possibile notare come, con il passare del tempo, sia prima sia dopo l' elettroporazione i valori di resistenza del campione di patata tendano ad aumentare. In generale nel grafico in Figura 3.23 si vede che la resistenza prima dell' elettroporazione assume valori maggiori rispetto a quelli ottenuti dopo l' elettroporazione come ci si aspetta.

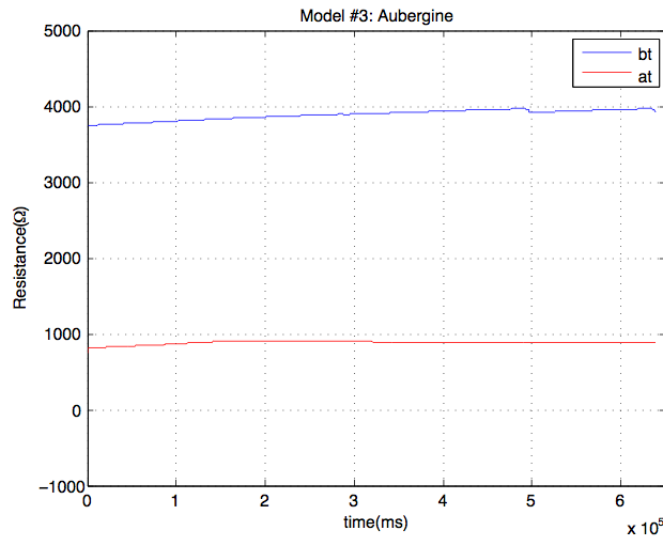


Figura 3.24: Andamento temporale dei valori di resistenza registrati mediante le modalità descritte al Capitolo 3.4.2 nel campione solido (parallelepipedo) di melanzana usato nel Modello #3, prima del trattamento di elettroporazione (*bt*, linea blu) e dopo (*at*, linea rossa).

La Figura 3.24 riporta l' andamento dei valori di resistenza in funzione del tempo misurati del campione solido (parallelepipedo) di tessuto di melanzana utilizzato nel Modello #3, rispettivamente prima (*bt*, linea blu) e dopo (*at*, linea rossa) il trattamento di elettroporazione ricavati come descritto al paragrafo 3.4.2. Come nel grafico di Figura 3.23, anche qui è possibile notare come con il passare del tempo sia prima sia dopo l' elettroporazione i valori di resistenza del campione di melanzana tendano ad aumentare.

Anche in questo caso, come osservato nel grafico di Figura 3.23, prima del trattamento (*bt*, linea blu) il grafico mostra valori di resistenza sensibilmente maggiori di quelli trovati misurando la resistenza dopo l' elettroporazione (*at*, linea rossa).

Come valore di resistenza per ricavare i valori di resistività è stato considerato l' ultimo campione, corrispondente alla fine del transitorio tempo-

rale di carica della capacità formata dalle piastre conduttive e dal tessuto interposto (cfr. paragrafi 2.3.5, 2.3.6).

Tabella 3.12: Valori di resistenza misurati pre (bt) e post (at) trattamento nei campioni di tessuto ricavati dai vegetali usati per il modellino #3, alla fine del transitorio. I valori di resistività sono ottenuti dalla relazione (3.1) sulla base delle caratteristiche geometriche del parallelepipedo riportate in Tabella 3.11

	Resistance (Ω)	Resistivity (Ωm)
Potato (bt)	$4,3 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^2$
Aubergine (bt)	$3,9 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^2$
Potato (at)	$1,2 \cdot 10^3$	$4,9 \cdot 10^1$
Aubergine (at)	$8,8 \cdot 10^2$	$2,9 \cdot 10^1$

I valori di resistenza misurata e resistività calcolata per i campioni di tessuto sono riportati nella Tabella 3.12. Si tenga conto che i valori di resistenza riportati in tale tabella sono i dati di resistenza dei campioni di tessuto registrati dopo un transitorio di 10 minuti. La resistività è stata calcolata utilizzando l'equazione (3.1) e le dimensioni geometriche dei parallelepipedi riportate in Tabella 3.11.

Da un'analisi di Tabella 3.12, è possibile notare una diminuzione della resistività del tessuto rispetto ai valori iniziali registrati prima di aver applicato gli impulsi di elettroporazione sia nel campione di melanzana sia in quello di patata. La riduzione della resistività, corrispondente ad un aumento della conducibilità, è dovuta agli effetti del trattamento elettroporativo a cui è stato sottoposto il modello di test [3].

E' interessante notare come, diversamente da quanto osservato nei casi precedenti (cfr. paragrafi 3.7, 3.8), prima del trattamento (bt), il campione di melanzana è caratterizzato da un valore di resistività minore ($1,3 \cdot 10^2 \Omega m$) rispetto a quello di patata ($1,8 \cdot 10^2 \Omega m$). Similmente agli altri casi precedentemente discussi tuttavia, in seguito al trattamento (at), la resistività del campione di melanzana si è assesta ad un valore minore ($2,9 \cdot 10^1 \Omega m$) rispetto a quello della patata ($4,9 \cdot 10^1 \Omega m$).

3.8.2 Dati di resistenza e corrente durante l' elettroporazione del Modello #3

La Figura 3.25 (a) mostra il modellino #3 utilizzato nel test e costruito secondo le specifiche descritte al paragrafo 3.3.1 prima del trattamento di elettroporazione. Nella Figura 3.25 (b) è mostrato lo stesso modellino fotografato dopo qualche ora dall' applicazione del trattamento di elettroporazione, con indicati in rosso i corrispondenti punti di applicazione degli elettrodi (in bianco i numeri degli aghi).

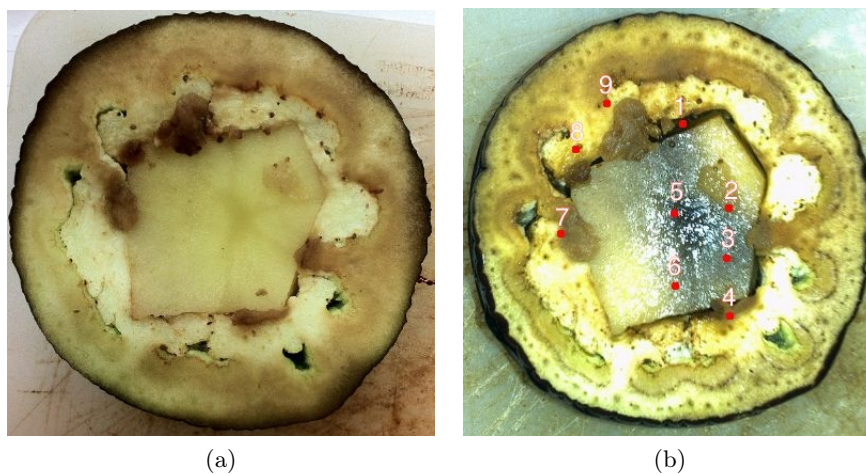


Figura 3.25: A sinistra (a): il modellino #3 prima del trattamento elettroporativo (visione verticale). A destra (b): il modellino #3 dopo il trattamento elettroporativo (visione verticale). Segnati in rosso e numerati in bianco: i punti di applicazione degli elettrodi.

E' possibile notare dalla Figura 3.25 (b) come il fenomeno dell' elettroporazione abbia effettivamente avuto luogo. I segni di colore scuro che compaiono dopo qualche ora dal trattamento sono dovuti alla fuoriuscita dalle cellule vegetali di amido che si ossida a contatto con l' aria [16].

La Tabella 3.13 è suddivisa in due parti:

- Nella tabella superiore sono riportati i dati di corrente media corrispondenti al primo ($I_{med 1^\circ}$) ed al decimo impulso di tensione ($I_{med 10^\circ}$). La prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva, la seconda (Dis [mm]) la distanza in *mm* fra gli elettrodi attivi.
- Nella tabella inferiore sono riportati i dati di resistenza massima (R Max), minima (R Min) e media (R Med) per ogni coppia di aghi adiacenti valutati a partire dai dati di tensione e corrente registrati dal generatore di impulsi per ECT durante il trattamento. Come per la

parte superiore, la prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva, la seconda (Dis [mm]) la distanza in *mm* fra gli elettrodi attivi.

Tabella 3.13: Sopra: i dati di corrente media registrata al primo (I med 1°) e al decimo impulso di tensione (I med 10°) dal generatore di impulsi per ECT durante il trattamento. Sotto: i dati di resistenza massima (R Max), minima (R Min) e media (R Med) per ogni coppia di aghi adiacenti. L'unità di misura per le colonne I med è [A].

Coppia Aghi	Dis [mm]	I med [1°]	I med [10°]
(4;3)	12,5	2,9	3,2
(4;6)	10,0	2,5	2,5
(4;5)	18,0	4,9	5,0
(3;5)	13,0	3,8	3,7
(3;2)	10,0	5,0	4,9
(2;5)	12,0	3,6	4,1
(2;1)	18,0	0,8	0,8
(1;9)	15,0	2,8	3,0
(5;9)	26,5	0,6	0,6
(8;9)	10,0	6,6	6,9
(8;5)	20,5	1,7	2,0
(5;7)	24,5	1,2	1,3
(8;7)	18,0	2,2	2,4
(6;7)	26,5	7,9	8,6

Coppia Aghi	Dis [mm]	R Max [ohm]	R Min [ohm]	R Med [ohm]
(4;3)	12,5	423,0	374,6	390,9
(4;6)	10,0	397,3	377,9	389,4
(4;5)	18,0	257,4	243,5	248,9
(3;5)	13,0	251,8	248,1	249,1
(3;2)	10,0	235,5	230,1	232,0
(2;5)	12,0	501,0	429,9	458,4
(2;1)	18,0	1860,9	1850,9	1817,9
(1;9)	15,0	985,4	898,1	940,8
(5;9)	26,5	1756,7	1730,5	1697,9
(8;9)	10,0	311,8	287,8	300,8
(8;5)	20,5	1491,9	1210,9	1341,7
(5;7)	24,5	1523,3	1403,7	1448,8
(8;7)	18,0	1255,9	1101,5	1172,7
(6;7)	26,5	347,0	311,1	326,7

Tabella 3.14: I dati di resistenza registrati ad ogni impulso di tensione dal generatore di impulsi per ECT per ogni coppia di aghi adiacenti durante il trattamento di elettroporazione (e.g.: nella colonna 4° sono riportati i dati di resistenza calcolati per ogni coppia di aghi al quarto impulso del trattamento). L' unità di misura per tutte le resistenze della tabella è $[\Omega]$.

Coppia Aghi	Dis [mm]	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°
(4;3)	12,5	423,0	406,8	397,8	387,6	393,5	384,7	377,0	385,9	377,6	374,6
(4;6)	10,0	397,3	392,0	394,9	391,1	387,9	391,9	393,3	387,1	380,7	377,9
(4;5)	18,0	257,4	250,5	250,8	253,2	247,8	248,1	246,4	246,3	244,5	243,5
(3;5)	13,0	251,8	251,0	250,4	248,6	250,6	247,7	247,3	247,2	248,8	248,1
(3;2)	10,0	235,5	234,2	233,0	232,4	233,1	232,4	231,8	227,7	229,6	230,1
(2;5)	12,0	501,0	486,4	472,8	465,8	460,9	454,3	442,5	437,1	433,6	429,9
(2;1)	18,0	1804,0	1858,5	1786,6	1768,4	1851,8	1860,9	1779,3	1797,0	1821,1	1850,9
(1;9)	15,0	979,3	985,4	972,0	948,9	945,7	934,0	917,8	926,2	900,4	898,1
(5;9)	26,5	1665,7	1703,9	1707,5	1756,7	1575,2	1684,1	1734,1	1679,4	1742,3	1730,5
(8;9)	10,0	311,8	311,6	308,6	304,9	301,8	299,4	296,8	294,8	291,0	287,8
(8;5)	20,5	1482,2	1491,9	1411,8	1363,7	1366,4	1326,5	1282,5	1244,2	1237,0	1210,9
(5;7)	24,5	1523,3	1490,6	1349,0	1438,1	1515,8	1424,1	1510,6	1450,7	1382,4	1403,7
(8;7)	18,0	1255,9	1245,3	1227,7	1177,1	1183,6	1149,7	1149,6	1122,9	1113,5	1101,5
(6;7)	26,5	347,0	338,9	335,5	331,4	326,3	323,4	320,9	317,8	314,5	311,1

La Tabella 3.14 riporta i dati di resistenza valutati a partire dai valori di tensione e corrente dei singoli impulsi dal generatore di impulsi per ECT per ogni coppia di aghi adiacenti. Ad esempio, la colonna 6° riporta i dati di resistenza valutata per il sesto impulso del trattamento per ogni coppia di aghi. Come nelle tabelle precedenti, la prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva e la seconda (Dis [mm]) la distanza in *mm* fra gli elettrodi attivi.

Osservando i dati della tabella 3.14 è possibile notare come ad ogni impulso si registri una progressiva diminuzione dei valori di resistenza ai capi di una coppia di elettrodi, come atteso dalla letteratura (cfr. paragrafo 2.3.3) [14]. Incrociando questi dati con quelli della parte inferiore della tabella 3.13, si noti come per ogni coppia di aghi adiacenti la resistenza massima (R Max) coincide con la resistenza misurata al primo impulso di tensione (1°), mentre la resistenza minima (R Min) coincide con la resistenza misurata al decimo (ed ultimo) impulso di tensione (10°). Questo fatto sembra confermare quanto affermato negli studi di Ivorra et al. [14], ovvero che per elevati valori di campo elettrico ad ogni impulso elettroporativo la conducibilità del materiale registra un incremento rispetto all' impulso precedente.

In riferimento alla parte superiore della Tabella 3.13, si noti come nella terna di coppie di aghi caratterizzate da distanza 10*mm* fra gli elettrodi, il valore medio di corrente al decimo impulso di tensione (I med 10°) sia massimo nel caso della coppia (8;9) (6,9A), minimo nel caso della coppia (4;6) (2,5A) e pari a 4,9A nel caso della coppia (3;2). La prima ha entrambi gli aghi impiantati nel tessuto di melanzana, la seconda ne ha uno (4) impiantato nel tessuto di melanzana e l' altro (6) impiantato nel tessuto di patata, la

terza li ha entrambi impiantati nel tessuto di patata. Si noti poi come nella terna di coppie di aghi caratterizzate da distanza 18mm fra gli elettrodi, il valore medio di corrente al decimo impulso di tensione ($I_{\text{med } 10^\circ}$) sia massimo nel caso della coppia (4;5) ($5,0A$), minimo nel caso della coppia (2;1) ($0,8A$) e pari a $2,4A$ nel caso della coppia (8;7). La prima ha un ago (5) impiantato nel tessuto di patata e l'altro nel tessuto di melanzana a ridosso della regione di confine (4), la seconda presenta una situazione analoga, con l'ago 1 impiantato nella melanzana a ridosso della regione di confine e l'ago 2 nel tessuto di patata, la terza ha entrambi gli aghi impiantati nel tessuto di melanzana (il segmento che li congiunge passa in buona parte per il tessuto di patata tuttavia).

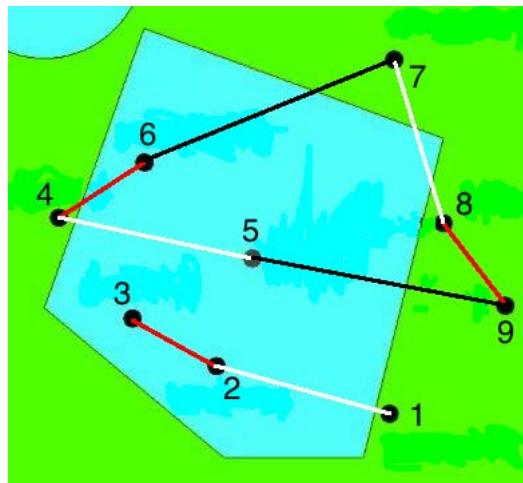
Per le due coppie di aghi caratterizzate da distanza $26,5\text{mm}$ fra gli elettrodi, (6,7) e (5,9), il valore medio di corrente al decimo impulso di tensione ($I_{\text{med } 10^\circ}$) è molto più alto nella coppia (6;7) ($8,6A$ contro $0,6A$), analogamente a quanto osservato nel caso del modello #2. Entrambe queste coppie di aghi ((6;7), (5;9)) hanno gli aghi impiantati uno nel tessuto di melanzana, l'altro in quello di patata, cambia, non di molto, la distanza dal confine patata-melanzana.

La tabella 3.15 riassume i dati di resistenza e corrente media per il decimo impulso di tensione delle coppie di aghi caratterizzate da uguale distanza fra gli elettrodi. Come nelle tabelle precedenti, la prima colonna da sinistra (Coppia aghi) riporta la coppia di aghi attiva e la seconda (Dis [mm]) la distanza in mm fra gli elettrodi attivi. La terza colonna (10°) riporta i dati di resistenza valutata dai valori di tensione e corrente al decimo impulso registrati dal generatore di impulsi per ECT. La quarta colonna ($I_{\text{med } (10^\circ)}$) riporta i valori di corrente media registrati al decimo impulso dal generatore di impulsi per ECT.

Tabella 3.15: I dati di resistenza e corrente media per il decimo impulso di tensione delle coppie con distanza uguale fra gli elettrodi.

Coppia Aghi	Dis [mm]	R 10° [ohm]	I med (10°) [A]
(3;2)	10	230,1	4,9
(4;6)	10	377,9	2,5
(8;9)	10	287,8	6,9
(4;5)	18	243,5	5,0
(2;1)	18	1850,9	0,8
(8;7)	18	1101,5	2,4
(5;9)	26,5	1730,5	0,6
(6;7)	26,5	311,1	8,6

La Figura 3.26 rappresenta schematicamente la mappa degli elettrodi con i relativi punti di applicazione sul modello. Vengono evidenziate con colori diversi le coppie di aghi con uguale distanza fra gli elettrodi.



	$d=10mm$	$d=18mm$	$d=26,5mm$
Coppie di aghi	(4; 6), (3; 2), (8; 9)	(4; 5), (2; 1), (8; 7)	(5; 9), (6; 7)

Figura 3.26: Sopra: mappa schematica degli elettrodi con relativi punti di applicazione sul modello. In verde acqua il tessuto di patata, in verde acido il tessuto di melanzana. Segnate in rosso le tre coppie di aghi distanti $10mm$, in bianco le tre coppie di aghi distanti $18mm$ e in bianco le due coppie di aghi distanti $26,5mm$. Sotto: tabella che riassume le coppie di aghi caratterizzate da distanza uguale fra gli elettrodi.

Capitolo 4

Confronto dei dati dei test sui tre modelli

In questo capitolo verrà presentato un confronto dei dati ottenuti nei test sui tre modelli realizzati. Verranno confrontati:

- I valori di resistività (calcolati attraverso (3.1), sulla base delle dimensioni geometriche dei campioni, partendo dai valori di resistenza misurati secondo le modalità descritte ai paragrafi 3.4.2 e 3.5) dei tessuti vegetali dei tre modelli;
- I valori di corrente media misurata dal generatore di impulsi per ECT per il 10° impulso di tensione per i gruppi di aghi caratterizzati da uguale distanza fra gli elettrodi di ciascuno dei tre modelli;
- I valori di resistenza media (per il 10° impulso) calcolati dai valori di tensione e corrente registrati dal generatore di impulsi per ECT per i gruppi di aghi caratterizzati da uguale distanza fra gli elettrodi di ciascuno dei tre modelli;
- Le immagini dei tre modelli fotografati dopo qualche ora dal trattamento elettroporativo con lo schematico della distribuzione del campo elettrico simulato al calcolatore;

4.1 Resistività

4.1.1 Tessuto di patata

La Tabella 4.1 riporta i valori di resistività pre (*bt*) e post (*at*) trattamento dei tessuti di patata utilizzati nei tre modelli.

Tabella 4.1: Valori di resistività valutati pre (*bt*) e post (*at*) trattamento nei campioni di tessuto di patata ricavati dai modellini #1, #2 e #3, alla fine del transitorio.

	Model #1	Model #2	Model #3
Resistivity (<i>bt</i>) [Ωm]	$1,3 \cdot 10^2$	$6,7 \cdot 10^1$	$1,8 \cdot 10^2$
Resistivity (<i>at</i>) [Ωm]	$9,7 \cdot 10^1$	$5,6 \cdot 10^1$	$4,9 \cdot 10^1$

Osservando i dati in Tabella 4.1, è possibile notare in ciascuno dei tre modelli una diminuzione dei valori di resistività dopo che il tessuto è stato sottoposto al trattamento di elettroporazione. Tale risultato deriva dall'aumento di conducibilità che si verifica dopo l'elettroporazione del tessuto, come atteso dalla letteratura [14].

E' interessante notare come il tessuto di patata del modello #3 sia caratterizzato da un valore di resistività maggiore prima dell'elettroporazione ($1,8 \cdot 10^2 \Omega m$) rispetto ai valori che si trovano per i modelli #1 e #2 (rispettivamente $1,3 \cdot 10^2 \Omega m$ e $6,7 \cdot 10^1 \Omega m$), mentre in seguito al trattamento elettroporativo questo assume un valore di resistività minore rispetto agli altri due. Infatti, la resistività del tessuto di patata del modello #3 assume il valore $4,9 \cdot 10^1 \Omega m$, più basso rispetto ai $9,7 \cdot 10^1 \Omega m$ e $5,6 \cdot 10^1 \Omega m$ dei modelli #1 e #2, rispettivamente.

4.1.2 Tessuto di melanzana

La Tabella 4.2 riporta i valori di resistività pre (*bt*) e post (*at*) trattamento dei tessuti di melanzana utilizzati nei tre modelli.

Tabella 4.2: Valori di resistività valutati pre (*bt*) e post (*at*) trattamento nei campioni di tessuto di melanzana ricavati dai modellini #1, #2 e #3, alla fine del transitorio.

	Model #1	Model #2	Model #3
Resistivity (bt) [Ωm]	$1,3 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^2$
Resistivity (at) [Ωm]	$6,0 \cdot 10^1$	$1,7 \cdot 10^1$	$2,9 \cdot 10^1$

Osservando i dati esposti nella Tabella 4.2, è possibile notare in ciascuno dei tre modelli una diminuzione dei valori sia di resistività in seguito al trattamento di elettroporazione. Analogamente al caso dei tessuti di patata discusso nel paragrafo 4.1.1, tale risultato deriva dall' aumento di conducibilità che si verifica dopo l' elettroporazione del tessuto, come atteso dalla letteratura [14].

E' interessante notare come il tessuto di melanzana del modello #2 sia caratterizzato da un valore di resistività maggiore prima dell' elettroporazione ($1,3 \cdot 10^3 \Omega m$) rispetto ai modelli #1 e #3 (rispettivamente $1,3 \cdot 10^2 \Omega m$ e $1,3 \cdot 10^2 \Omega m$), mentre in seguito al trattamento elettroporativo questo assume un valore di resistività minore rispetto agli altri due. Infatti, il tessuto di melanzana del modello #2 assume il valore $1,7 \cdot 10^1 \Omega m$, più basso rispetto ai $6,0 \cdot 10^1 \Omega m$ e $2,9 \cdot 10^1 \Omega m$ dei modelli #1 e #3, rispettivamente.

4.2 Corrente media per il 10° impulso di tensione

4.2.1 Coppie di aghi con $d = 10mm$

Tabella 4.3: Valori di corrente media per il 10° impulso misurata dal generatore di impulsi per ECT per il gruppo delle coppie di aghi caratterizzate da distanza fra gli elettrodi pari a $10mm$. L' unità di misura è $[A]$.

Coppia Aghi	Model #1	Model #2	Model #3
(3;2)	3,6	3,0	4,9
(4;6)	2,3	1,7	2,5
(8;9)	2,6	3,4	6,9

Osservando i dati di Tabella 4.3 è possibile notare come il valore medio di corrente per il 10° impulso per la coppia di aghi (3;2) sia massimo nel modello #3 (4,9A), minimo nel modello #2 (3,0A) e pari a 3,6A nel modello #1. Per quanto riguarda la coppia di aghi (4;6), il valore medio di corrente per il 10° impulso è massimo nel modello #3 (2,5A), minimo nel modello #2 (1,7A) e pari a 2,3A nel caso del modello #1. Si verifica infine che per la coppia di aghi (8;9) il valore medio di corrente per il 10° impulso è massimo nel modello #3 (6,9A), minimo nel modello #1 (2,6A) e pari a 3,4A nel modello #2. Si nota quindi come i valori di corrente più elevati si registrino nel modello #3 per ogni coppia di aghi caratterizzati da $d = 10mm$.

4.2.2 Coppie di aghi con $d = 18mm$

Tabella 4.4: Valori di corrente media per il 10° impulso misurata dal generatore di impulsi per ECT per il gruppo delle coppie di aghi caratterizzate da distanza fra gli elettrodi pari a $18mm$. L' unità di misura è $[A]$.

Coppia Aghi	Model #1	Model #2	Model #3
(4;5)	5,1	2,7	5,0
(2;1)	5,4	3,9	0,8
(8;7)	4,7	5,6	2,4

Osservando i dati di Tabella 4.4 è possibile notare come il valore medio di corrente per il 10° impulso per la coppia di aghi (4;5) sia massimo nel modello #1 (5,1A), minimo nel modello #2 (2,7A) e pari a 5,0A nel modello #3. Per quanto riguarda la coppia di aghi (2;1), il valore medio di corrente per il 10° impulso è massimo nel modello #1 (5,4A), minimo nel modello #3

(0,8A) e pari a 3,9A nel caso del modello #2. Si verifica infine che per la coppia di aghi (8;7) il valore medio di corrente per il 10° impulso è massimo nel modello #2 (5,6A), minimo nel modello #3 (2,4A) e pari a 4,7A nel modello #1.

4.2.3 Coppie di aghi con $d = 26,5mm$

Tabella 4.5: Valori di corrente media per il 10° impulso misurata dal generatore di impulsi per ECT per il gruppo delle coppie di aghi caratterizzate da distanza fra gli elettrodi pari a 26,5mm. L'unità di misura è [A].

Coppia Aghi	Model #1	Model #2	Model #3
(5;9)	6,9	0,9	0,6
(6;7)	7,3	9,2	8,6

Osservando i dati di Tabella 4.5 è possibile notare come il valore medio di corrente per il 10° impulso per la coppia di aghi (5;9) sia massimo nel modello #1 (6,9A), minimo nel modello #3 (0,6A) e pari a 0,9A nel modello #2. Si verifica infine che per la coppia di aghi (6;7) il valore medio di corrente per il 10° impulso è massimo nel modello #2 (9,2A), minimo nel modello #1 (7,3A) e pari a 8,6A nel modello #3.

4.3 Resistenza media per il 10° impulso di tensione

4.3.1 Coppie di aghi con $d = 10mm$

Tabella 4.6: Valori di resistenza media per il 10° impulso calcolata dai valori di tensione e corrente registrati dal generatore di impulsi per ECT per il gruppo delle coppie di aghi caratterizzate da distanza fra gli elettrodi pari a $10mm$. L' unità di misura è $[\Omega]$.

Coppia Aghi	Model #1	Model #2	Model #3
(3;2)	263,0	413,5	230,1
(4;6)	421,0	557,2	377,9
(8;9)	369,6	782,5	287,8

Osservando i dati di Tabella 4.6 è possibile notare come il valore medio di resistenza valutata dai valori di tensione e corrente per il 10° impulso per la coppia di aghi (3;2) sia massimo nel modello #2 ($413,5\Omega$), minimo nel modello #3 ($230,1\Omega$) e pari a $263,0\Omega$ nel modello #1. Per quanto riguarda la coppia di aghi (4;6), il valore medio di resistenza per il 10° impulso è massimo nel modello #2 ($557,2\Omega$), minimo nel modello #3 ($377,9\Omega$) e pari a $421,0\Omega$ nel caso del modello #1. Si verifica infine che per la coppia di aghi (8;9), il valore medio di resistenza per il 10° impulso è massimo nel modello #2 ($782,5\Omega$), minimo nel modello #3 ($287,8\Omega$) e pari a $369,6\Omega$ nel caso del modello #1. Si nota quindi come i valori di resistenza più elevati si registrino nel modello #2 per ogni coppia di aghi caratterizzati da $d = 10mm$.

4.3.2 Coppie di aghi con $d = 18mm$

Tabella 4.7: Valori di resistenza media per il 10° impulso calcolata dai valori di tensione e corrente registrati dal generatore di impulsi per ECT per il gruppo delle coppie di aghi caratterizzate da distanza fra gli elettrodi pari a $18mm$. L' unità di misura è $[\Omega]$.

Coppia Aghi	Model #1	Model #2	Model #3
(4;5)	341,1	357,1	243,5
(2;1)	320,8	288,8	1850,9
(8;7)	369,8	310,8	1101,5

Osservando i dati di Tabella 4.7 è possibile notare come il valore medio di resistenza valutata dai valori di tensione e corrente per il 10° impulso per la coppia di aghi (4;5) sia massimo nel modello #2 ($357,1\Omega$), minimo nel modello #3 ($243,5\Omega$) e pari a $341,1\Omega$ nel modello #1. Per quanto riguarda

la coppia di aghi (2;1), il valore medio di resistenza per il 10° impulso è massimo nel modello #3 (1850, 9Ω), minimo nel modello #2 (288, 8Ω) e pari a 320, 8Ω nel caso del modello #1. Si verifica infine che per la coppia di aghi (8;7), il valore medio di resistenza per il 10° impulso è massimo nel modello #3 (1101, 5Ω), minimo nel modello #2 (310, 8Ω) e pari a 369, 8Ω nel caso del modello #1.

I valori di resistenza elevata potrebbero essere dovuti alla non perfetta aderenza dei tessuti di patata e melanzana nella zona di confine.

4.3.3 Coppie di aghi con $d = 26,5\text{mm}$

Tabella 4.8: Valori di resistenza media per il 10° impulso calcolata dai valori di tensione e corrente registrati dal generatore di impulsi per ECT per il gruppo delle coppie di aghi caratterizzate da distanza fra gli elettrodi pari a 26,5mm. L'unità di misura è [Ω].

Coppia Aghi	Model #1	Model #2	Model #3
(5;9)	379, 1	1726, 5	1730, 5
(6;7)	362, 7	282, 5	311, 1

Osservando i dati di Tabella 4.8 è possibile notare come il valore medio di resistenza valutata dai valori di tensione e corrente per il 10° impulso per la coppia di aghi (5;9) sia massimo nel modello #3 (1730, 5Ω), minimo nel modello #1 (379, 1Ω) e pari a 1726, 5Ω nel modello #2. Si verifica infine che per la coppia di aghi (6;7), il valore medio di resistenza per il 10° impulso è massimo nel modello #1 (362, 7Ω), minimo nel modello #2 (282, 5Ω) e pari a 311, 1Ω nel caso del modello #3.

I valori di resistenza elevata potrebbero essere dovuti alla non perfetta aderenza dei tessuti di patata e melanzana nella zona di confine.

4.4 Distribuzione del campo elettrico simulata al calcolatore e sperimentale

Si era anticipato nel paragrafo 3.1 come il tessuto di patata abbia la proprietà di diventare scuro se viene elettroporato. A tal proposito, si è utilizzato del tessuto ricavato da questo ortaggio per simulare la massa tumorale nei modelli di test. Difatti, la proprietà del tessuto di patata di diventare più scuro in caso di elettroporazione consente la visualizzazione della distribuzione del campo elettrico nei modelli di test e permette un confronto di questa con quella simulata al calcolatore.

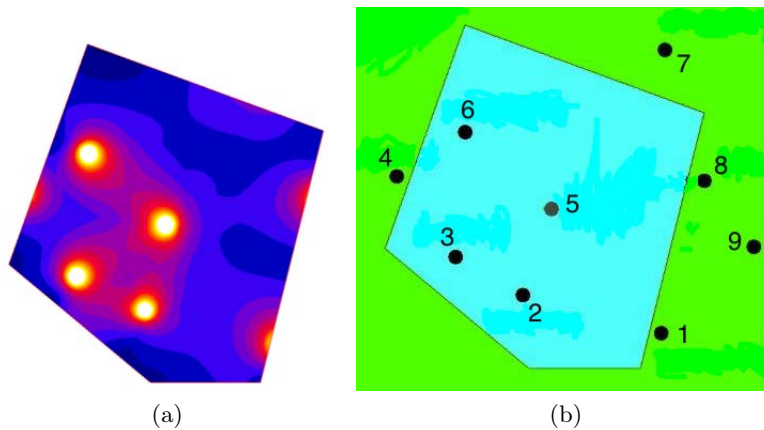


Figura 4.1: A sinistra (a): Mappa schematica della distribuzione del campo elettrico nella massa tumorale (visione dall'alto) simulata al calcolatore. Le zone di colore più chiaro (fino al bianco) sono quelle dove l'effetto dell'elettroporazione è maggiore, quelle di colore più scuro (fino al blu scuro) sono quelle dove l'effetto dell'elettroporazione è minore. A destra (b): Mappa schematica della massa tumorale, indicati in nero i punti di applicazione degli elettrodi (visione dall'alto).

La Figura 4.1 (a) mostra la distribuzione del campo elettrico nella massa tumorale simulata al calcolatore, vista dall'alto. Con i colori più chiari sono evidenziate le aree del tumore in cui l'effetto del trattamento di elettroporazione è maggiore, mentre con i colori più scuri sono evidenziate le aree del tumore in cui l'effetto del trattamento è minore. La Figura 4.1 (b) mostra la mappa schematica dei punti di applicazione degli elettrodi sulla massa tumorale. Osservando congiuntamente le Figure 4.1 (a) e 4.1 (b), si noti come in prossimità dei punti di applicazione degli elettrodi il campo elettrico abbia valori più elevati che in ogni altra area. Il campo elettrico è invece minimo nei punti più distanti dai punti di applicazione degli elettrodi.

Le Figure 4.2 (a), (b) e (c) mostrano gli effetti del trattamento di elettroporazione ottenuti sulle masse tumorali dei modelli #1, #2 e #3 rispettivamente.

Si noti come in tutti e tre modelli il trattamento di elettroporazione abbia effettivamente avuto luogo, data la presenza dei segni di colore scuro sulla superficie del tessuto di patata. Come già anticipato nel Capitolo 3, tali segni che compaiono dopo qualche ora dal trattamento sono dovuti alla fuoriuscita dalle cellule di amido che si ossida a contatto con l'aria [16].

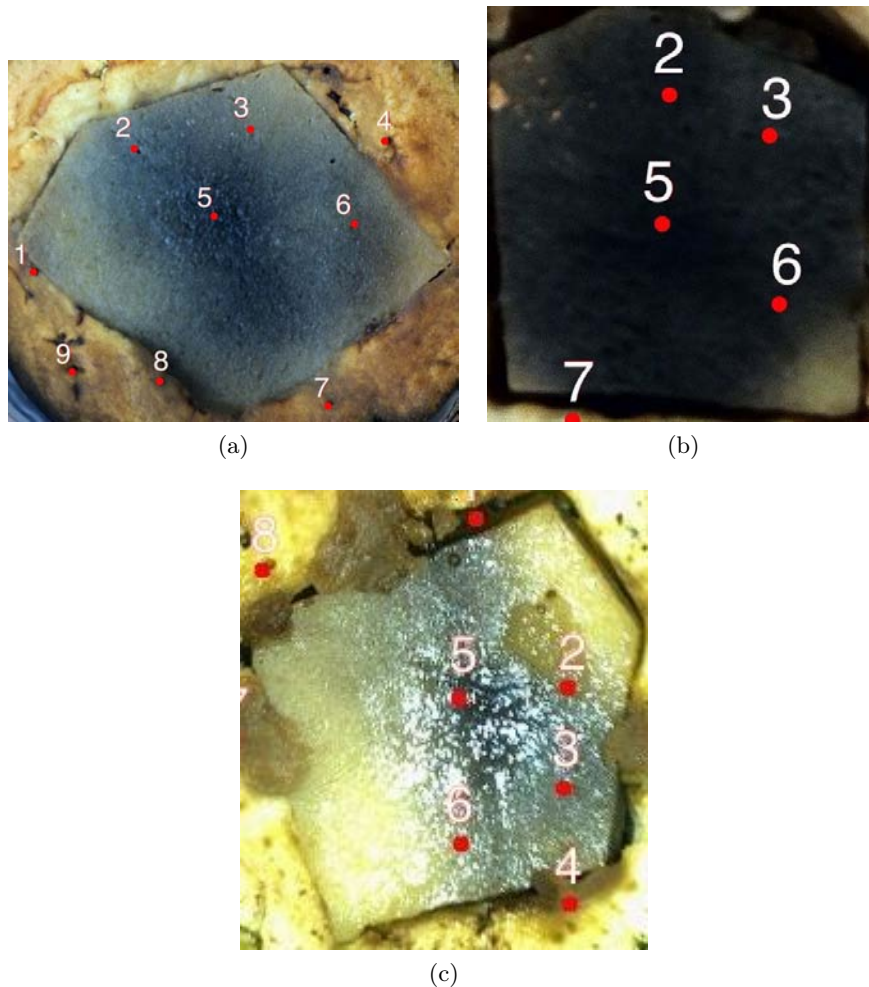


Figura 4.2: (a): Effetto dell' elettroporazione nella massa tumorale del modello #1; (b): Effetto dell' elettroporazione nella massa tumorale del modello #2; (c): Effetto dell' elettroporazione nella massa tumorale del modello #3. Visibili in tutte e tre le immagini i punti di applicazione degli elettrodi (segnati in rosso e numerati in bianco).

Nei tessuti di patata di tutti e tre i modelli (cfr. Figura 4.2) è possibile notare la comparsa di segni scuri più marcati nelle zone più vicine ai punti di applicazione degli elettrodi, mentre nelle zone più lontane dai punti di

applicazione il colore del tessuto è progressivamente più simile a quello che si ha in condizioni naturali. Si osservi ad esempio la Figura 4.2 (c): l'area delimitata dai punti di applicazione degli elettrodi 5,2,3 e 6 è significativamente più annerita rispetto alla zona a destra del punto di applicazione dell'elettrodo 6 o rispetto a quella in alto a sinistra del punto di applicazione dell'elettrodo 2. Si noti infine come i segni scuri tendano ad essere più marcati nelle regioni in cui la mappa del campo elettrico di Figura 4.1 (a) indicava un campo elettrico di intensità più elevata, mentre tendano invece ad essere meno evidenti nelle regioni in cui la simulazione dava un campo elettrico di intensità inferiore (in particolare di blu scuro). Per questi motivi, è lecito affermare che i risultati di distribuzione del campo elettrico nei modelli di test sperimentali hanno confermato la distribuzione del campo elettrico nel modello simulato al calcolatore.

Conclusioni

In questo elaborato è stato realizzato un set up di elettrodi sperimentale e dei modelli di tessuto biologico che potessero simulare un tumore e del tessuto sano circostante per la verifica della distribuzione del campo elettrico in seguito ad elettroporazione. Sono stati eseguiti dei test applicando il trattamento di elettroporazione su questi modelli vegetali utilizzando un set up sperimentale costruito ad hoc. I modelli vegetali sono stati costruiti con patate e melanzane, due materiali caratterizzati da diversa conducibilità. Il tessuto di patata ha simulato la massa tumorale ed il tessuto di melanzana ha simulato il tessuto sano circostante. Durante i test sono stati registrati i valori di corrente e tensione ed è stata calcolata la resistenza ai capi di ciascuna coppia di elettrodi. La variazione di colore nel tessuto di patata, che diventa scuro se elettroporato, è stata utilizzata per verificare la distribuzione del campo elettrico all' interno del tessuto biologico trattato. Il risultato sperimentale è stato confrontato con la distribuzione di campo ottenuta al calcolatore con la stessa configurazione di aghi. Infine sono state inoltre valutate le caratteristiche elettriche dei tessuti usati per la realizzazione dei modelli.

Bibliografia

- [1] «Elettrochemioterapia: una valida soluzione per le metastasi cutanee e sub cutanee», <http://www.igea.it/news.php?id=63>.
- [2] L.M. Mir, *Bases and rationale of the electrochemotherapy*, Elsevier, 2006
- [3] A. Ivorra, B. Rubinsky *Electric field modulation in tissue electroporation with electrolytic and non-electrolytic additives*, Elsevier, 2007
- [4] «Electroporation: Transdermal Delivery System», <http://www.aespio.com/meta-duo.asp?mm=1&sm=5>
- [5] «Electrochemotherapy», http://en.wikipedia.org/wiki/File:Shema_ect.jpg
- [6] G. Sersa, D. Miklavcic, M. Cemazar, Z. Rudolf, G. Pucihar, e M. Snoj, *Electrochemotherapy in treatment of tumours*, European Journal of Surgical Oncology: The Journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology, 2008
- [7] R. Heller et al., *Phase I/II trial for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumors using electrochemotherapy*, Cancer, 1996
- [8] M. Belehradec, C. Domenge, B. Luboinski, S. Orłowski, J. Belehradec Jr, e L. M. Mir, *Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial*, Cancer, 1993
- [9] R. Heller et al., *Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin*, Cancer, 1998
- [10] L.W. Matthiessen, R.L. Chalmers, D.C. Sainsbury, S. Veeramani, G. Kessell, A.C. Humphreys, J.E. Bond, T. Muir, J. Gehl *Management of cutaneous metastases using electrochemotherapy*, Acta Oncol, 2011
- [11] G. Sersa, M. Cemazar, M. Snoj, *Electrochemotherapy of solid tumors – preclinical and clinical experience*, 33rd Annual International Conference of the IEEE EMBS Boston, Massachusetts USA, 2011
- [12] «Electrochemotherapy», <http://dermnetnz.org/procedures/electrochemotherapy.html>

- [13] D. Miklavcic, N. Pavselj, F. X. Hart, *Electric Properties of Tissues*, Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering, 2006
- [14] A. Ivorra, B. Al-Sakere, B. Rubinsky and L.M. Mir, *In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation: conductivity changes reflect the treatment outcome*, Iop Publishing, 2009
- [15] R. I. Hayden, C. A. Moyse, F. W. Calder, D. P. Crawford e D. S. Fensom, *Electrical Impedance Studies on Potato and Alfalfa Tissue*, Journal of Experimental Botany, 1969 pubblicazione
- [16] N. Boussetta, N. Grimi, N.I. Lebovka, E. Vorobiev, *“Cold” electroporation in potato tissue induced by pulsed electric field*, Journal of Food Engineering, 2013