



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Ingegneria
Dipartimento di Ingegneria Industriale

Tesi di Laurea

**PROTOTIPO DI ELETTRODO PER
L'ELETTROCHEMIOTERAPIA: ASPETTI COSTRUTTIVI E
PRIME PROVE**

Relatore: Ch.mo Prof. Fabrizio Dughiero
Correlatori: Dott. Ing. Elisabetta Sieni
Dott. Luca G. Campana

Laureando: Francesco Scandola

Anno Accademico 2012-2013

A Claudia, nel tuo ricordo.

INDICE

1 INTRODUZIONE.....	7
1.1 Definizioni e concetti base.....	7
1.2 Effetti della durata e dell'intensità degli impulsi.....	8
1.3 L'elettrochemioterapia nel trattamento dei tumori.....	9
1.4 Studi su cellule in vitro.....	9
1.5 Studi su tumori in vivo.....	10
1.6 Effetto del campo elettrico e del numero di impulsi.....	11
1.7 Studi clinici dell'ECT sull'uomo.....	12
2 LA CELLULA: ASPETTI BASE.....	14
2.1 Struttura e funzioni della membrana plasmatica	15
2.2 Modalità di scambio attraverso la membrana cellulare.....	16
2.3 Modellizzazione elettrica e geometrica della cellula.....	17
2.4 Fenomeni bioelettrici.....	19
2.5 Calcolo del potenziale transmembranale indotto per cellule di diversa forma.....	20
2.5.1 Cellula sferica.....	20
2.5.2 Cellula sferoidale ed ellissoidale.....	22
2.5.3 Cellula dalla forma irregolare.....	24
2.6 Meccanismi di formazione dei pori.....	24
2.6.1 Modello idrodinamico.....	24
2.6.2 Modello elastico.....	25
2.6.3 Modello idroelastico.....	26
2.6.4 Modello Viscoidroelastico.....	26
2.6.5 Modello di formazione dei pori acquosi.....	27
3 STRUMENTI PER L'ECT.....	29
3.1 Generatore di impulsi.....	30
3.1.1 Generatore a scarica di un condensatore.....	30
3.1.2 Generatore ad onda quadra.....	31
3.1.3 Generatore modulare ad onda quadra.....	32
3.1.4 Generatore analogico.....	33
4 ELETTRODO A MAGLIA	34
4.1 Introduzione.....	34
4.1.1 Descrizione dell'elettrodo a maglia.....	35
4.2 Periferica di connessione degli elettrodi.....	36
4.3 Generatore di impulsi.....	40
4.3.1 Intervento della protezione di massima corrente.....	40
4.3.2 Impulsi di tensione mancanti.....	41
4.3.3 Variazione della tensione degli impulsi.....	42
4.4 Software per l'elaborazione dati.....	42
4.5 Costruzione dell'elettrodo a maglia.....	43

4.6 Schema del trattamento.....	44
5 RISULTATI DELLE PROVE.....	45
5.1 Valutazione del numero di paralleli.....	46
5.2 Procedimento delle prove.....	46
5.2.1 Prove su tessuto di patata.....	46
5.2.2 Prove al microscopio ottico.....	47
5.2.2.1 Colorazione della membrana.....	47
5.2.2.2 Colorazione dell'amido.....	47
5.2.3 Prova in vitro.....	48
5.3 Elettrodo A.....	49
5.3.1 Prove sperimentali.....	51
5.3.1.1 P1: lunghezza aghi 12 mm.....	52
5.3.1.2 P2 : lunghezza aghi 6 mm.....	54
5.3.2 Prove al microscopio.....	56
5.4 Elettrodo B.....	57
5.4.1 Prove sperimentali.....	58
5.4.1.1 P1: lunghezza aghi 12 mm.....	59
5.4.1.2 P2: lunghezza aghi 12 mm.....	60
5.4.1.3 P3: lunghezza aghi 6 mm.....	62
5.4.1.4 P4: lunghezza aghi 6 mm.....	63
5.4.2 Prove al microscopio.....	65
5.5 Elettrodo C.....	66
5.5.1 Prove sperimentali.....	67
5.5.1.1 P1: lunghezza aghi 12 mm.....	67
5.5.1.2 P2: lunghezza aghi 12 mm.....	69
5.5.1.3 P3: lunghezza aghi 6 mm.....	70
5.5.1.4 P4: lunghezza aghi 6 mm.....	72
5.5.2 Prove al microscopio.....	73
5.6 Elettrodo D.....	74
5.6.1 Prove sperimentali.....	75
5.6.1.1 P1: lunghezza aghi 12 mm.....	75
5.6.1.2 P2: lunghezza aghi 12 mm.....	76
5.6.1.3 P3: lunghezza aghi 6 mm.....	78
5.6.1.4 P4: lunghezza aghi 6 mm.....	79
5.6.2 Prove al microscopio.....	81
5.7 Elettrodo E.....	82
5.7.1 Prove sperimentali.....	83
5.7.1.1 P1 : lunghezza aghi 12 mm.....	83
5.7.1.2 P2: lunghezza aghi12 mm.....	84
5.7.1.3 P3: lunghezza aghi 6 mm.....	86
5.7.1.4 P4: lunghezza aghi 6 mm.....	87
5.7.2 Prove al microscopio.....	89
5.8 Discussione dei risultati ottenuti.....	90
6 PROVA IN VITRO.....	93
7 CONCLUSIONI.....	95

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Fabrizio Dughiero per avermi dato la possibilità di fare questa tesi e l'Ing. Elisabetta Sieni per aver seguito con tanta pazienza e disponibilità costante lo sviluppo di questo elaborato.

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

Ringrazio IGEA s.p.a. per aver fornito un prototipo di generatore per ECT a onda quadra necessario per le prove.

Un sentito ringraziamento va a Mosè Castiello per avermi aiutato nella realizzazione degli elettrodi e della periferica di controllo degli impulsi e alla Dott.ssa Alessandra Bartolozzi del Dipartimento di Ingegneria Industriale di Padova per avermi permesso di analizzare al microscopio i campioni di patata elettroporati.

Padova, Ottobre 2013

Francesco Scandola

1 INTRODUZIONE

1.1 Definizioni e concetti base

L'elettroporazione è una tecnica innovativa minimamente invasiva che permette di creare dei pori nelle membrane cellulari applicando degli impulsi elettrici della durata di centinaia di microsecondi che ne alterano la permeabilità.

L'applicazione di un campo elettrico ad una cellula, nel caso sia avvenuta un'elettroporazione reversibile (RE), provoca una temporanea alterazione della permeabilità della membrana, mentre nel caso l'intensità del campo elettrico e la sua durata di applicazione fossero prolungati si può avere un'elettroporazione irreversibile (IRE) in cui la cellula permane nel suo stato di permeabilità alterata; in questo caso la cellula muore per lisi della membrana.

Sia la RE che la IRE possono essere utilizzate per scopi terapeutici:

- La RE viene utilizzata in combinazione con alcuni farmaci chemioterapici per aumentare l'efficacia degli stessi, e nella terapia genica;
- L'IRE viene utilizzata per l'ablazione di tessuti superficiali.

In entrambi i tipi di trattamento l'applicazione di un campo elettrico modifica il potenziale transmembranale della cellula, pertanto il doppio strato lipidico che compone la membrana cellulare si modifica permettendo la creazione di pori sulla sua superficie che permettono il passaggio di micromolecole e macromolecole all'interno e all'esterno della cellula[1].

Il meccanismo secondo cui si formano i pori nella RE e nella IRE è simile, con la differenza che nella RE i pori, dopo l'applicazione degli impulsi, tendono a richiudersi e la cellula torna al suo stato naturale. La RE permette perciò l'apertura di canali attraverso i quali far entrare all'interno della cellula geni, farmaci, coloranti e proteine che normalmente non riuscirebbero a penetrare la membrana, mentre, nell'IRE i pori portano alla rottura permanente della membrana (lisi). Si avrà RE se l'intensità del campo elettrico rimane al di sotto di una determinata soglia, mentre se è maggiore si avrà IRE.

Nella pratica attuale l'elettroporazione è applicabile sia in vivo che in vitro. Nella Tab.1.1 sono schematizzate le applicazioni che si hanno nei due casi considerati.

IN VITRO (in singole cellule in coltura)	IN VIVO (in cellule in tessuti)
Introduzione di DNA in batteri, cellule animali, vegetali e lieviti.	Trasporto di farmaci attraverso la pelle, sarcomi o altre tipologie di tessuto.
Per la sperimentazione e la ricerca.	Per terapie geniche o antitumorali, o per vaccinazioni.

Tab.1.1: Principali applicazioni dell'elettroporazione

Attualmente l'elettroporazione è utilizzata con scopi medici. Infatti Mir e altri dimostrarono che l'elettropermeabilizzazione reversibile aumenta l'assorbimento di farmaci anticancro che possiedono un'alta citotossicità, come la bleomicina ed il cisplatino. Questo tipo di trattamento risulta particolarmente adatto per i tumori della pelle, melanomi e tumori al seno. Diversi studi hanno concluso che l'elettrochemioterapia per alcuni tipi di tumori maligni può rappresentare una valida alternativa al trattamento chirurgico [2] [3].

1.2 Effetti della durata e dell'intensità degli impulsi

Se il valore dell'intensità del campo rimane sotto un valore limite si ottiene un'elettroporazione reversibile se invece il valore è al di sopra di questa soglia si otterrà un'elettroporazione irreversibile con la creazione di pori permanenti nella membrana plasmatica che porteranno la cellula alla morte. Mediante l'elettroporazione è possibile anche ottenere l'elettrofusione di cellule tra loro adiacenti: in questo caso la membrana si fonde nei punti di contatto dando così origine ai sincizi (Fig.1.1).

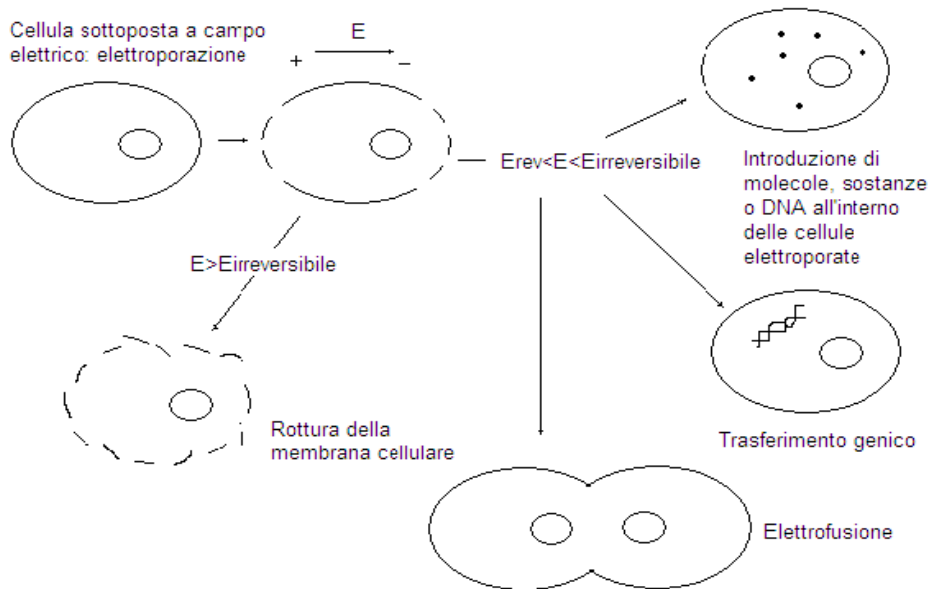


Fig.1.1: Fenomeni che si possono verificare in conseguenza all'applicazione di un campo elettrico esterno.

Perciò, riassumendo, i vari fenomeni che possono interessare una cellula in conseguenza all'applicazione di un campo elettrico sono:

$E < E_{irr}$	Elettroporazione reversibile
	Elettrofusione
$E > E_{irr}$	Elettroporazione irreversibile

Tab.1.2: Fenomeni sulla cellula in base all'intensità del campo elettrico applicato

Inoltre un ruolo importante a parità dell'intensità del campo elettrico è ricoperto dalla durata dell'impulso stesso in Fig.1.2 sono esposti gli effetti che si possono ottenere sulla cellula in funzione della durata degli impulsi.

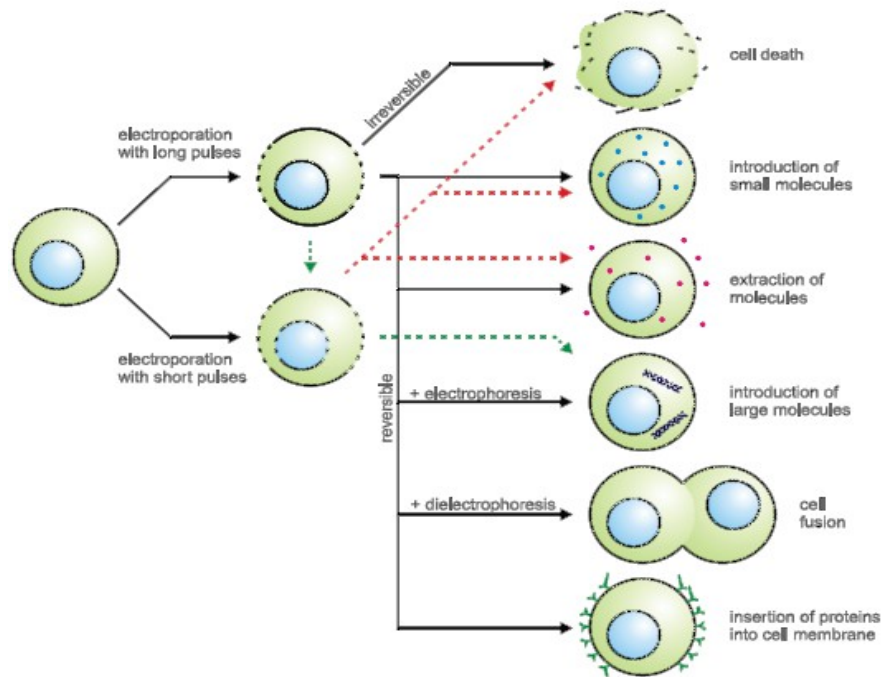


Fig.1.2: Fenomeni che si possono verificare in conseguenza all'applicazione di brevi impulsi (fino a 100 μ s) o impulsi più lunghi (fino a 10 ms)

1.3 L'elettrochemioterapia nel trattamento dei tumori

Il trattamento dei tumori può essere effettuato mediante differenti terapie farmacologiche o fisiche. Le principali terapie di prima linea utilizzate in clinica sono la resezione chirurgica, se possibile, la chemioterapia e la radioterapia o combinazioni di esse. Recentemente per alcuni tipi di tumore, generalmente cutanei, è stata introdotta l'elettrochemioterapia (ECT) che mediante l'applicazione di un campo elettrico pulsato, permette un migliore assorbimento del farmaco chemioterapico precedentemente iniettato nella lesione trattata. Infatti la maggiore efficacia del trattamento si ottiene se gli impulsi elettrici vengono applicati quando la concentrazione del farmaco nell'ambiente extra cellulare è alta, in questo modo si riesce a trasportare con una buona efficienza una quantità sufficiente di farmaco all'interno del doppio strato lipidico delle cellule [2].

1.4 Studi su cellule in vitro

L'efficacia con cui l'elettroporazione permette ad una grande varietà di molecole di oltrepassare la membrana plasmatica è stata provata in differenti studi biochimici e farmacologici. In ogni caso, quando si utilizzano farmaci chemioterapici, questa facilità di trasporto nell'ambiente intracellulare riesce ad aumentare la citotossicità del farmaco stesso, riuscendo ad applicare un trattamento più efficace alla sola zona interessata. Sono stati testati vari farmaci in combinazione con l'elettroporazione di cellule in vitro per riuscire ad identificare i farmaci più efficaci. I farmaci chemioterapici utilizzabili in elettrochemioterapia devono avere la caratteristica di essere idrofili. Dagli studi compiuti solamente due farmaci sono risultati adatti, il primo è la bleomicina, molecola idrofila che normalmente non riesce ad oltrepassare efficientemente la membrana cellulare, ma che ha una grande citotossicità se penetra nelle cellule. Il trattamento di elettroporazione cellulare, permette la permeabilizzazione della membrana delle cellule che facilità

l'assorbimento di alcune centinaia di molecole di bleomicina che sono sufficienti ad uccidere una cellula. Il secondo è il cisplatino la cui capacità di oltrepassare la membrana senza trattamento ECT è bassa. Recenti studi affermano che il cisplatino è trasportato all'interno della cellula principalmente tramite un fenomeno di diffusione passiva, gli stessi hanno dimostrato che il processo di controllo del trasporto intracellulare dell'omeostasi del rame porta ad un flusso di cisplatino verso l'interno della cellula, oppure ad un deflusso verso l'ambiente esterno. Anche in questo caso il processo di elettroporazione della membrana cellulare permette un flusso ed un accumulo del farmaco all'interno della cellula incrementando la sua citotossicità a più di 80 volte.

Tutti i test preclinici su culture cellulari hanno validato l'efficacia della bleomicina e del cisplatino, ed hanno fornito delle linee guida per applicare in vivo il trattamento di ECT.

1.5 Studi su tumori in vivo

Inizialmente la sperimentazione di questa terapia innovativa è stata effettuata su modelli animali. Infatti studi compiuti con differenti tipi di tumore siano essi stati trapiantati o spontanei, hanno dimostrato l'efficacia antitumorale dell'elettrochemioterapia su topi, ratti, criceti, gatti, conigli, cani e cavalli.

Nel caso di animali da laboratorio dopo la somministrazione del farmaco per via endovenosa (4 mg/kg per il cisplatino e 0.5 mg/kg per la bleomicina) si ottiene la massima concentrazione del farmaco nel tumore dopo alcuni minuti, invece se si somministra l'agente chemioterapico per via intratumorale questo intervallo di tempo è sensibilmente più breve e l'applicazione degli impulsi di corrente deve avvenire il prima possibile, al massimo entro qualche minuto.

I risultati degli esperimenti condotti in vivo su varie razze di animali hanno, quindi, dimostrato l'efficacia dell'elettroporazione coadiuvata alla somministrazione di bleomicina o cisplatino nel trattamento di tumori solidi: un singolo trattamento di ECT può indurre una parziale o completa regressione del tumore, mentre, la sola applicazione dell'elettroporazione, oppure la sola somministrazione del farmaco, non producono gli stessi effetti terapeutici (Fig.1.3).

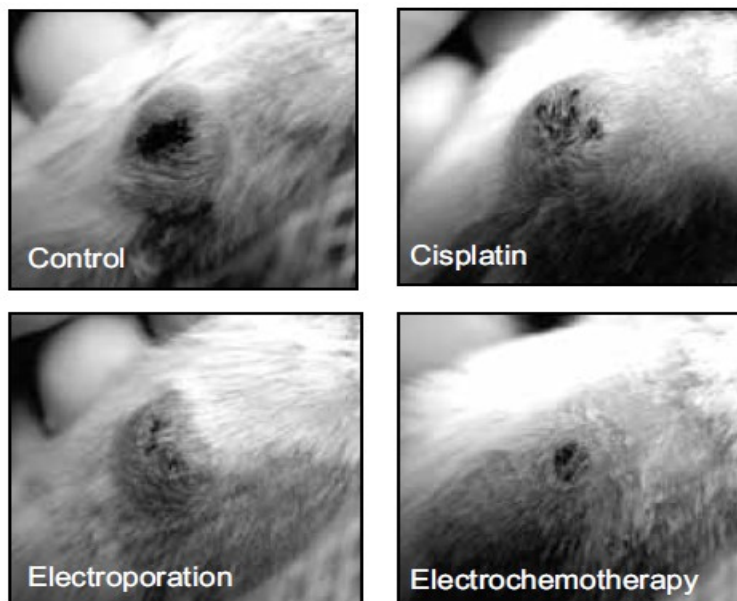


Fig.1.3: Esempio dell'efficacia dell'ECT con cisplatino 8 giorni dopo il trattamento confrontato con l'applicazione singola di impulsi elettrici e del cisplatino.

I tumori trattati con l'elettrochemioterapia in fase preclinica sono stati tumori sottocutanei o localizzati in muscoli, cervello e fegato, come sarcoma, carcinoma glioma o melanoma maligno. Attualmente il protocollo per l'applicazione del trattamento di ECT in vivo (Fig.1.4) prevede che il farmaco sia somministrato per via intravenosa o per via intratumorale; uno dei requisiti affinché il trattamento vada a buon fine è che al momento dell'applicazione degli impulsi sul tessuto tumorale il farmaco chemioterapico sia presente in quantità sufficiente.

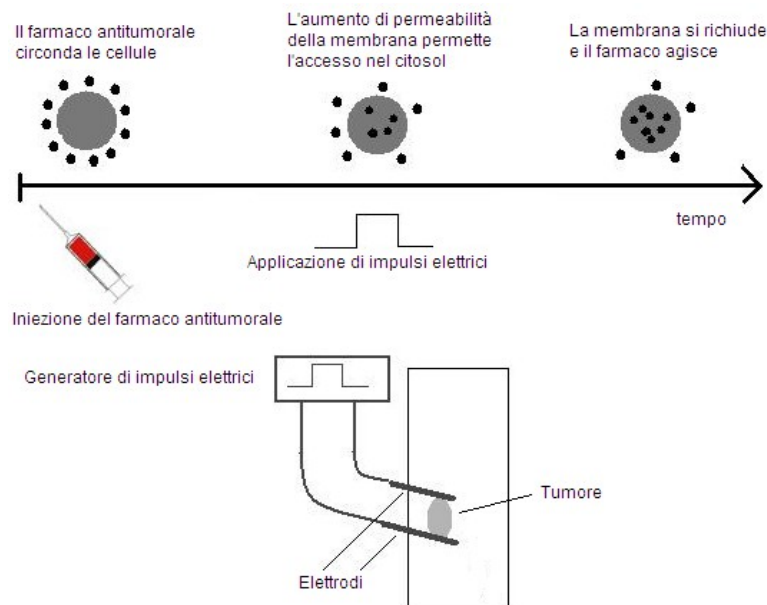


Fig.1.4: protocollo per l'ECT in applicazioni in vivo

1.6 Effetto del campo elettrico e del numero di impulsi

In alcuni studi si è inoltre visto che si ottengono dei buoni risultati se le cellule sono esposte ad un campo sufficientemente intenso e se la sua distribuzione nel tessuto è omogenea; questo aspetto può essere controllato studiando un'apposita geometria degli elettrodi. Ad esempio si è notato che con elettrodi piatti per tumori superficiali con un'intensità del campo elettrico di 1000 V/cm sono sufficienti ad elettroporare reversibilmente il tumore invece per valori superiori a 1500 V/cm si ottiene la morte cellulare del tessuto elettroporato. Studi sperimentali hanno permesso di dedurre che per ottenere un'omogenea e sicura elettroporazione l'intervallo ideale dell'intensità del campo elettrico deve essere compreso fra 1000 V/cm e 1500 V/cm.

Si è visto anche che una migliore elettroporazione può essere ottenuta applicando più treni di impulsi e ruotando il verso del campo elettrico. Infine per tutti i tipi di elettrodo si è dimostrato che, se il farmaco è presente nell'area trattata si ottiene una migliore efficacia se si applicano più impulsi in rapida successione. Normalmente si applicano 4 oppure 8 impulsi da 100 μ s [4].

1.7 Studi clinici dell'ECT sull'uomo

Uno studio clinico condotto presso l'ospedale policlinico universitario di Padova dal Dott. Campana ha dimostrato l'efficacia del trattamento dell'elettroporazione in combinazione con la somministrazione di bleomicina. Sono stati trattati 52 pazienti con differenti tipi di cancro, in maggior parte melanoma e tumori al seno, esclusi dai trattamenti di rimozione chirurgica e radioterapia (Fig.1.5), per un totale di 608 noduli. Il 27% dei pazienti erano affetti da noduli con un diametro maggiore di 3 cm.

Characteristic	No. of patients (N = 52)	No. of nodules (N = 608)
<i>Age (y)</i>		
Range	35–85	
Median	67	
<i>Sex</i>		
Male	20	233
Female	32	375
<i>Cancer type</i>		
Melanoma	34	373
Breast cancer ^a	11	174
Soft tissue sarcoma	5	29
Squamous carcinoma	1	31
Head and neck cancer	1	1
<i>Location of tumor nodules</i>		
Head and neck	6	32
Trunk	15	352
Limbs	31	224

^a Chest wall recurrences

Fig.1.5: caratteristiche dei pazienti e dei tumori trattati

In questo studio si è preferito utilizzare la bleomicina rispetto al cisplatino perchè il suo profilo citotossico è il più indicato per trattare i tipi di tumore dei pazienti.

Il farmaco è stato somministrato per via intravenosa e per via intratumorale, in quest'ultimo caso il dosaggio varia in funzione delle dimensioni del nodulo da trattare:

- 1000 IU/cm³ per noduli < 0.5 cm³;
- 500 IU/cm³ per noduli 0.5 cm³ e 1 cm³;
- 250 IU/cm³ per noduli > 3 cm³.

Gli impulsi elettrici sono stati applicati sia con elettrodi ad aghi paralleli sia a disposizione esagonale. La risposta al trattamento dei tumori è stata poi monitorata tramite visite mediche di controllo ed ecografie oltre che attraverso esami del sangue ripetuti 2, 4, 8, 12 settimane dopo il trattamento. I pazienti che dopo 4 settimane hanno ottenuto una risposta parziale o nulla, hanno ripetuto il trattamento. Dopo un mese dalla prima sessione terapeutica di ECT, una risposta oggettiva¹ è stata ottenuta in 50 pazienti; in particolare, valutando la risposta al trattamento secondo il protocollo di valutazione di risposta dei tumori solidi (RECIST²), si è ottenuto una risposta totale per 26 pazienti, mentre per gli altri 24 la risposta è stata parziale, per due pazienti non sono stati valutati cambiamenti nelle dimensioni del tumore. Dei 26 pazienti che hanno avuto una risposta totale al primo trattamento, 17 hanno ottenuto una guarigione nella zona trattata dopo un tempo medio di 9 mesi, ma in 7 di questi pazienti sono comparse nuove lesioni in aree non trattate.

¹Risposta congrua ai criteri del protocollo utilizzato per la valutazione del trattamento di ECT

²Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

Al secondo ciclo di ECT sono stati ammessi 27 pazienti. Questi pazienti sono stati reclutati per due motivi: o hanno mostrato una risposta parziale al primo trattamento o si è notata la comparsa di nuove lesioni. In particolare:

- 14 hanno avuto una risposta parziale;
- 7 per la comparsa di nuove lesioni;
- 4 il verificarsi di entrambi gli eventi.

Su un totale di 257 noduli, 169 (65.7%) sono spariti completamente e 86 (34.3%) hanno avuto una risposta parziale come indicato in Fig.1.6.

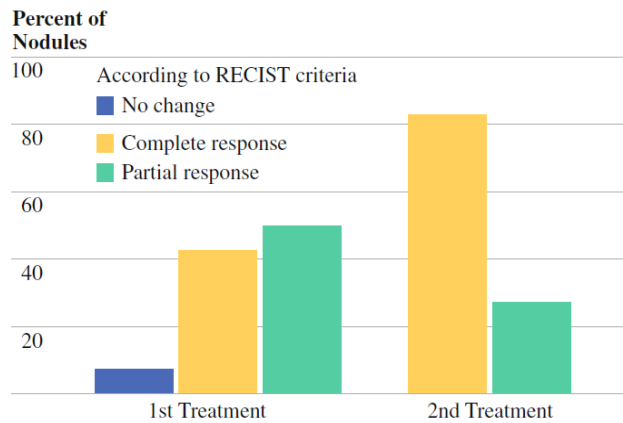


Fig.1.6: risposta dei noduli al primo ed al secondo trattamento di ECT

Complessivamente, terminati i cicli di ECT per tutti e 52 i pazienti, dei 608 noduli trattati 262 (43%) hanno ottenuto una risposta completa, 306 (50%) una risposta parziale e i restanti 40 (7%) non sono cambiati [3].

2 LA CELLULA: ASPETTI BASE

Gli esseri viventi presentano una serie di caratteristiche che non si trovano mai tutte insieme nel mondo inanimato: si muovono, scambiano sostanze con l'ambiente esterno, possono essere stimolati e reagire in modo complesso a influssi esterni, sintetizzano molecole di grandi dimensioni, e soprattutto crescono e si riproducono. Fra gli esseri viventi che presentano queste proprietà caratteristiche i più semplici sono la cellula che rappresenta una struttura integrata le cui parti sono tutte necessarie affinché l'insieme funzioni armonicamente. La struttura principale di ogni cellula è formata da:

- Nucleo;
- Citoplasma;
- Membrana plasmatica.

Il nucleo (Fig.2.1) è la struttura più grande e visibile della cellula, occupa fino ad un terzo delle cellule molto piccole, un decimo o anche meno in quelle grandi, ed è separato nettamente dal citoplasma tramite la membrana nucleare.

Al suo interno hanno sede uno o più nucleoli, e il resto è occupato da zone più o meno dense di cromatina, formata da DNA avvolto su gruppi di proteine, che al momento della divisione cellulare fornirà il materiale cromosomico.

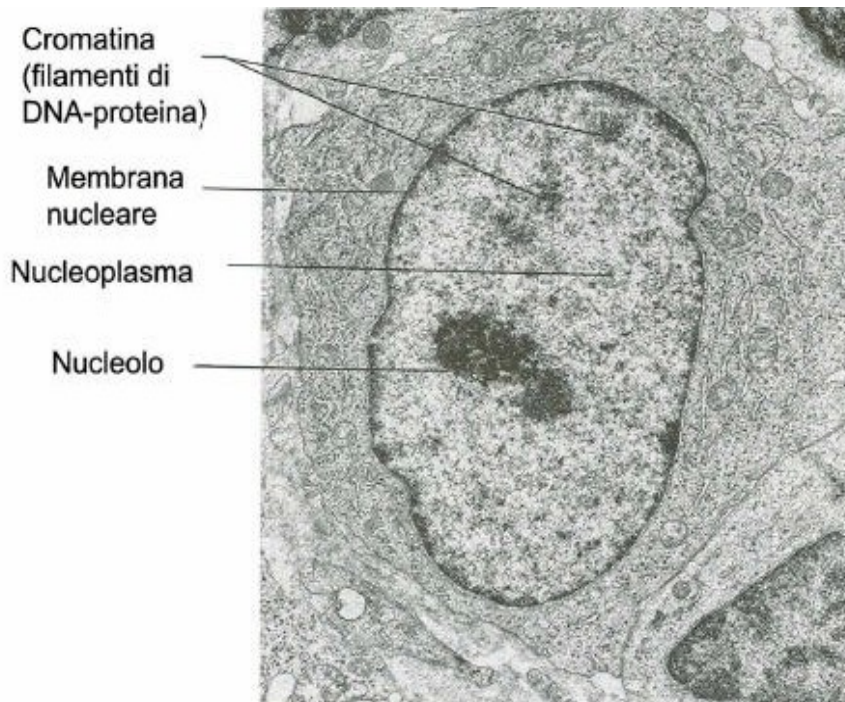


Fig.2.1: composizione del nucleo

Il citoplasma è la parte più voluminosa della cellula ed è quella morfologicamente più diversificata e nella quale avvengono tutte le attività metaboliche. Fondamentalmente è composto da corpuscoli e filamenti che costituiscono il citoscheletro della cellula stessa. La membrana plasmatica delimita tutto il contenuto cellulare, essa funge da barriera che però non la isola completamente; essa permette l'ingresso di sostanze utili e la fuoriuscita di prodotti di scarto.

2.1 Struttura e funzioni della membrana plasmatica

La membrana plasmatica è composta da proteine e da lipidi, in grande maggioranza fosfolipidi azotati associati a due catene quasi rettilinee derivate da acidi grassi. Questi lipidi formano due strati di molecole: le parti idrofobiche si fronteggiano all'interno della membrana, mentre le parti idrofile che sono rivolte rispettivamente verso l'interno della cellula e verso l'ambiente esterno. In questo doppio strato sono inserite delle proteine, che sporgono da uno dei lati o da entrambi. Le proteine che si trovano all'esterno sono identificabili chimicamente e spesso sono sormontate da glucidi di varia composizione (Fig.2.2).

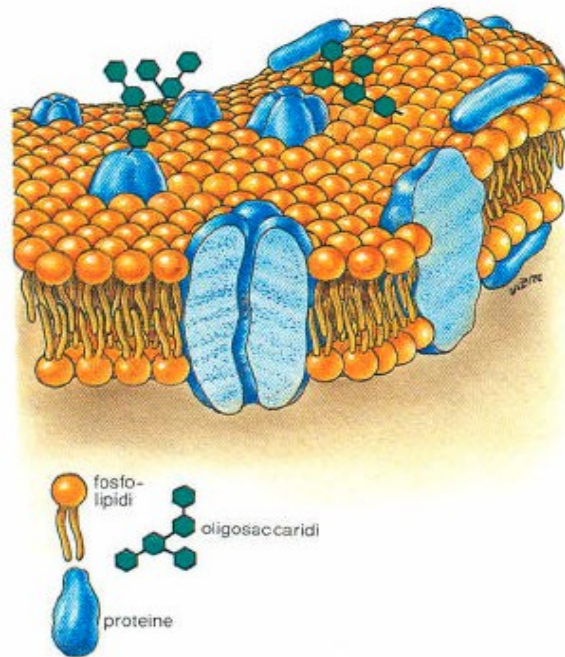


Fig.2.2: Struttura della membrana cellulare

Il doppio strato di lipidi è in grado di aggregarsi e sigillarsi in modo autonomo ed è in uno stato di costante fluidità in cui le proteine vi si spostano continuamente. Proprio per questa particolare proprietà la membrana plasmatica può essere definita come un mosaico fluido. Le due facce della membrana non sono equivalenti e i trasferimenti attraverso la membrana non sono identici nei due sensi.

Alcune proteine presenti hanno lo scopo di permettere il passaggio di sostanze verso il citoplasma o verso l'ambiente esterno attraverso il doppio strato lipidico, tali proteine sono definite di trasporto e presentano al loro interno dei canali che si aprono o si chiudono secondo le circostanze, facilitando o meno il passaggio di molecole. Esistono poi altri tipi di proteine come ad esempio un particolare tipo che si lega a una molecola presente all'esterno, cambiando così di forma e liberando la loro carica all'interno.

Poiché gran parte della superficie della membrana è composta da lipidi, le sostanze solubili in esse passano molto più velocemente di quanto lascerebbe supporre il loro peso molecolare.

Il passaggio di sostanze attraverso la membrana può essere rallentato da vari fattori, ad esempio dalle cariche elettriche presenti nelle sostanze. Schematizzando si può affermare che la diffusione è rapida per l'ossigeno, e sempre più lenta man mano che si passa all'acqua, al CO₂, al glucosio ed infine agli ioni. Si osserva che le sostanze aventi

un peso molecolare di qualche centinaia di dalton³ sono troppo grandi per diffondersi attraverso la membrana: gli amminoacidi o il glucosio ci riescono, ma non i disaccaridi che sono due volte più grandi. Quindi, la diffusione non dipende soltanto dalle dimensioni e dalla differenza di concentrazione sui due lati della membrana.

C'è infine tutta una serie di sostanze che vengono trasportate dal lato dove la concentrazione è minore verso quello dove è maggiore, questo tipo di trasporto attivo è possibile solamente attraverso un dispendio considerevole di energia fornito principalmente dalla molecola ATP. Un classico esempio di questo particolare fenomeno è la pompa Na-K delle cellule animali: lo ione sodio viene spinto verso l'esterno contro gradiente di concentrazione, mentre lo ione potassio, molto più diluito nell'ambiente esterno, viene attirato nella cellula.

Perciò è possibile ipotizzare che sulla membrana si formi una differenza di potenziale che modifica le condizioni di passaggio delle sostanze cariche elettricamente.

Alla luce di quanto esposto fino ad ora è possibile definire per la membrana cellulare le seguenti funzioni:

- Delimitare l'ambiente intracellulare da quello extracellulare;
- Scambiare materia;
- Comunicare con l'ambiente esterno.

2.2 Modalità di scambio attraverso la membrana cellulare

La membrana plasmatica si modifica continuamente e interviene in molti processi necessari per la vita cellulare. Essa inoltre può fungere da zona di ancoraggio fra cellule vicine e può essere sede di segnali di riconoscimento o di recettori di messaggi provenienti dall'esterno.

In ogni caso, in assenza di altri fattori o forze le molecole o ioni si spostano seguendo il loro gradiente di concentrazione. Lo scambio di queste sostanze attraverso la membrana plasmatica può avvenire secondo i seguenti modi:

1. Diffusione: le molecole si spostano secondo il loro gradiente di concentrazione, la sua efficienza aumenta quando la superficie di scambio della cellula è grande rispetto al volume della stessa;
2. Osmosi: movimento dell'acqua attraverso la membrana al fine di avere la stessa concentrazione osmotica totale del citoplasma. Al fine di creare un ambiente isotonic in cui gli scambi d'acqua sono in equilibrio, il fluido si muoverà sempre da una regione la cui concentrazione di soluto è minore (ambiente ipotonico) verso una regione a concentrazione di soluto maggiore (ambiente ipertonico);
3. Esocitosi: fenomeno attraverso il quale viene incorporata nella membrana la parete di una vescicola spinosa o di un granulo di secrezione, che successivamente viene proiettata all'esterno;
4. Endocitosi: una porzione di superficie cellulare penetra nel citosol trascinando con sé una porzione di sostanza esterna.

L'elettroporazione serve ad aumentare per un breve periodo la permeabilità della cellula e permettere il passaggio di molecole che altrimenti risulterebbe difficoltoso e poco efficiente [5].

³1 Da = 1.660 x 10⁻²⁷ kg e corrisponde all'unità di massa atomica (uma).

2.3 Modellizzazione elettrica e geometrica della cellula

Al fine di analizzare gli aspetti che regolano i processi secondo i quali avviene l'elettroporazione, a causa della complessità della membrana cellulare (Fig.2.3) generalmente si fa riferimento a modelli semplificati, come membrane lipidiche a doppio strato o vescicole lipidiche unilamellari. Grazie alla sua semplice geometria ed alla sua composizione omogenea, il doppio strato lipidico è considerato come una frazione dell'intera membrana cellulare.

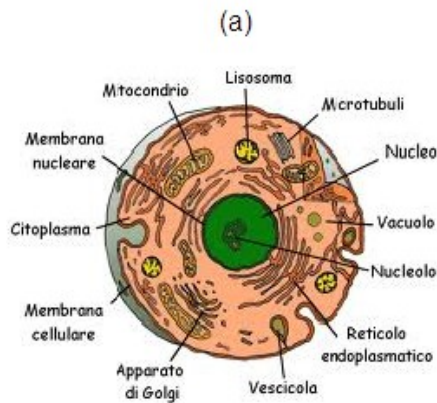


Fig.2.3: generica composizione della cellula immagine tratta da: <http://emisca.altervista.org/biotecnologie/schema%20cellula.html>

Per descrivere le proprietà elettriche della cellula fino ad alcuni MHz si utilizza il modello esposto da Fricke nel 1920. In questo modello ogni singola porzione dell'ambiente intracellulare ed extracellulare può essere vista come una resistenza ed ogni porzione infinitesimale della membrana cellulare è rappresentata da una capacità. Perciò la combinazione di questi elementi porta ad un circuito elettrico equivalente del tessuto cellulare considerato (Fig.2.4).

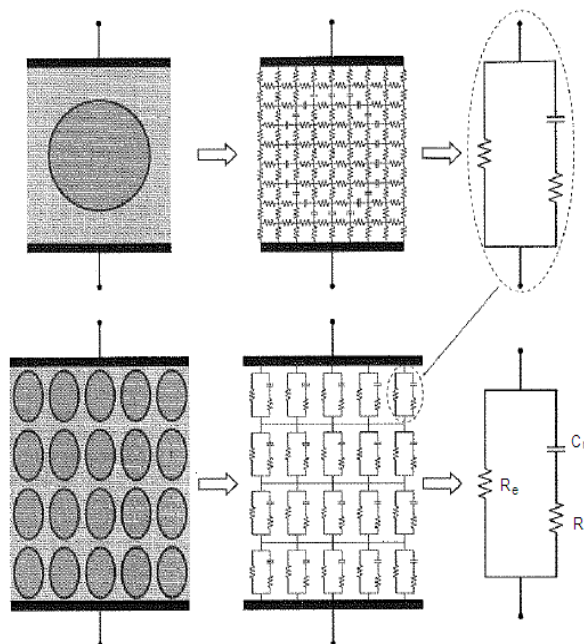


Fig.2.4: schematizzazione del modello elettrico di una cellula secondo Fricke.

Tale circuito equivalente è composto da:

- R_e : resistenza dell'ambiente extracellulare;
- C_m : capacità della membrana plasmatica;
- R_i : resistenza dell'ambiente intracellulare.

Il comportamento resistivo extracellulare e intracellulare dipende dal loro contenuto di ioni, entrambi infatti sono soluzioni ioniche. Al di fuori della cellula gli ioni più abbondanti sono Na^+ e Cl^- invece nel citosol è presente in maggioranza lo ione K^+ . Al fine di caratterizzare elettricamente i fluidi all'interno e all'esterno della membrana plasmatica il valore di conducibilità che normalmente si considera per l'ambiente extracellulare è per convenzione quello del sangue a 37°C che corrisponde a 1.5 S/m , mentre per il citoplasma si impiega un valore sensibilmente più basso: 0.6 S/m .

Poichè la membrana cellulare consiste principalmente in un doppio strato lipidico dello spessore di 7 nm la sua conducibilità è molto bassa perciò può essere considerato come un buon dielettrico. La struttura nel suo complesso quindi, composta da ambiente extracellulare, doppio strato lipidico e citoplasma può essere modellata come una struttura formata da conduttore-dielettrico-conduttore in cui la membrana dal punto di vista elettrico può essere rappresentata come una capacità il cui valore sperimentale si aggira intorno a 0.01 F/m^2 . Questo modello riesce a descrivere il comportamento sia di una singola cellula sia di un tessuto, perciò è appropriato a descrivere il fenomeno dell'elettroporazione.

Considerando il modello in Fig.2.4 si nota che per frequenze basse il modulo dell'impedenza vista ai capi dell'elettrodo sarà in modulo approssimabile con R_e , mentre alle alte frequenze si avrà (Fig.2.5):

$$|Z| = \frac{R_e \cdot R_i}{R_e + R_i} \quad (1)$$

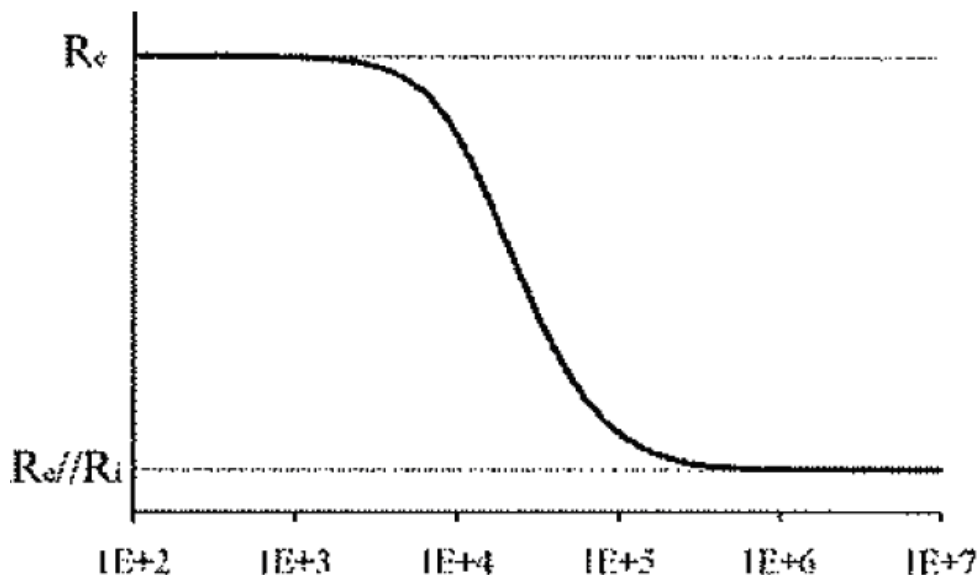


Fig.2.5: variazione dell'impedenza di una cellula in funzione della frequenza

Tipicamente, nella maggior parte dei tessuti animali, il range di transizione fra il comportamento elettrico a bassa frequenza e quello ad alta frequenza è compreso fra 10 kHz e 1MHz.

Quando avviene l'elettroporazione la membrana cellulare si permeabilizza, e la sua conducibilità aumenta, alle alte frequenze questo effetto non si manifesta in maniera molto visibile, ma a basse frequenze si può osservare una significativa diminuzione dell'impedenza associata al tessuto. Da un punto di vista geometrico la cellula può essere caratterizzata da un corpo geometrico circondato da un involucro uniforme rappresentante la membrana plasmatica (Fig.2.6).

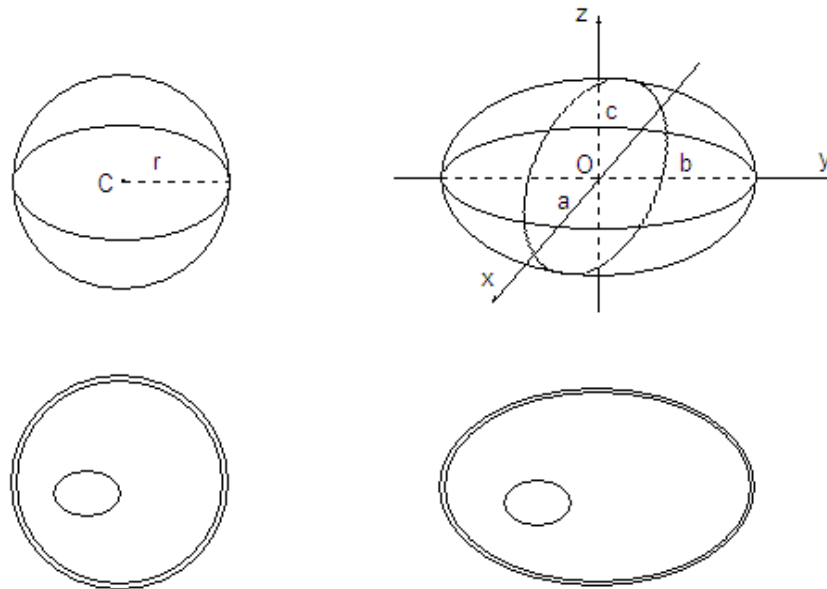


Fig.2.6: Schematizzazione geometrica della cellula [2]

Per descrivere il comportamento, in seguito all'elettroporazione, di una cellula singola e sospesa i modelli semplificativi più usati sono sferoidali o ellissoidali. Tali modelli, accettabili per descrivere una singola cellula, non sono adatti a simulare un tessuto cellulare in cui le cellule sono adiacenti l'una all'altra e differiscono tra loro per la forma[6].

2.4 Fenomeni bioelettrici

Con il termine bioelettricità ci si riferisce all'energia elettromagnetica prodotta dagli organismi viventi. Tale energia si manifesta generalmente attraverso la propagazione in tessuti nervosi e muscoli di correnti ioniche. In una visione più ampia la bioelettricità si riferisce allo studio delle interazioni di organismi viventi con l'energia elettromagnetica applicata da sorgenti esterne, come nel caso dell'elettroporazione. [6].

I fenomeni bioelettrici di passaggio di ioni all'interno della membrana cellulare si manifestano su un tessuto vivente sempre con le stesse modalità, perciò è possibile creare un modello generale che rappresenti la membrana cellulare ed i suoi meccanismi di funzionamento.

Affinchè avvengano fenomeni di questo tipo è necessaria la presenza di una differenza di potenziale che può essere fornita da una soluzione acquosa in cui sono presenti ioni sciolti, come il citoplasma ed il liquido interstiziale all'esterno della cellula, limitati nella mobilità così da creare differenze di potenziale localmente stabili nella soluzione (Fig.2.7).

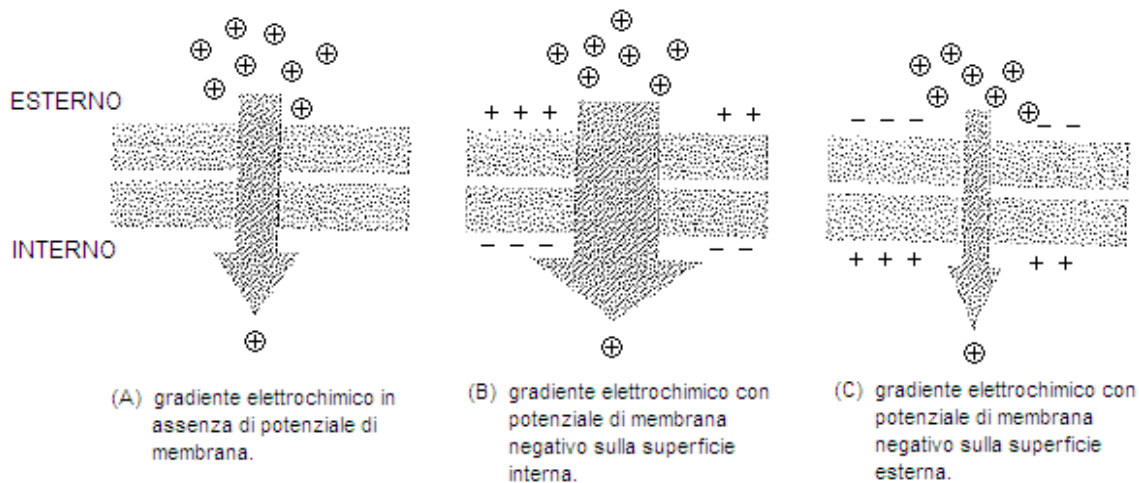


Fig.2.7: Gradiente elettrochimico di una soluzione carica che attraversa la membrana in differenti situazioni

È noto che un campo elettrico esterno modifica il potenziale di transmembrana. Normalmente è sempre presente nelle cellule un potenziale di membrana a riposo ed è compreso fra -90mV e -40mV. Questa tensione è dovuto al fatto che nel citoplasma c'è un deficit di ioni positivi all'interno del citoplasma rispetto agli ioni negativi. Al fine di ricercare l'equilibrio omeostatico, la cellula attraverso questa differenza di potenziale permette il passaggio di specifici ioni attraverso la membrana.

Quando a una cellula, oppure a un generico tessuto biologico, viene applicato un campo elettrico, questo porta ad una distorsione nel campo elettrico della cellula e nelle sue immediate vicinanze e il suo campo elettrico totale $V(t)$ è ottenuto tramite la sovrapposizione della componente di tensione transmembranale di riposo V_r e di quella indotta $\Delta V_m(t)$:

$$V(t) = V_r + \Delta V_m(t) \quad (2)$$

Se la tensione transmembranale supererà un certo valore di soglia si otterrà la formazione di pori, o più genericamente un aumento della conducibilità della cellula a seguito dell'elettroporazione della membrana cellulare [2].

2.5 Calcolo del potenziale transmembranale indotto per cellule di diversa forma

2.5.1 Cellula sferica

Per un'esposizione ad un campo elettrico continuo, la tensione transmembranale indotta è determinabile tramite la soluzione delle equazioni di Laplace.

In ogni caso le cellule non sono mai completamente sferiche, ma vengono considerate come tali per semplificare i calcoli. Inoltre come seconda approssimazione si considera la membrana plasmatica come isolante.

Sotto queste ipotesi il campo indotto che attraversa la membrana ΔV_m è data dall'equazione di Schwan :

$$\Delta V_m = \frac{3}{2} E r \cos(\theta) \quad (3)$$

Dove $E = |\mathbf{E}_{\text{ext}}|$ è il modulo del campo elettrico nella regione dove la cellula è situata, r è il raggio della cellula e θ è l'angolo del centro della cellula rispetto alle linee del campo elettrico (Fig.2.8).

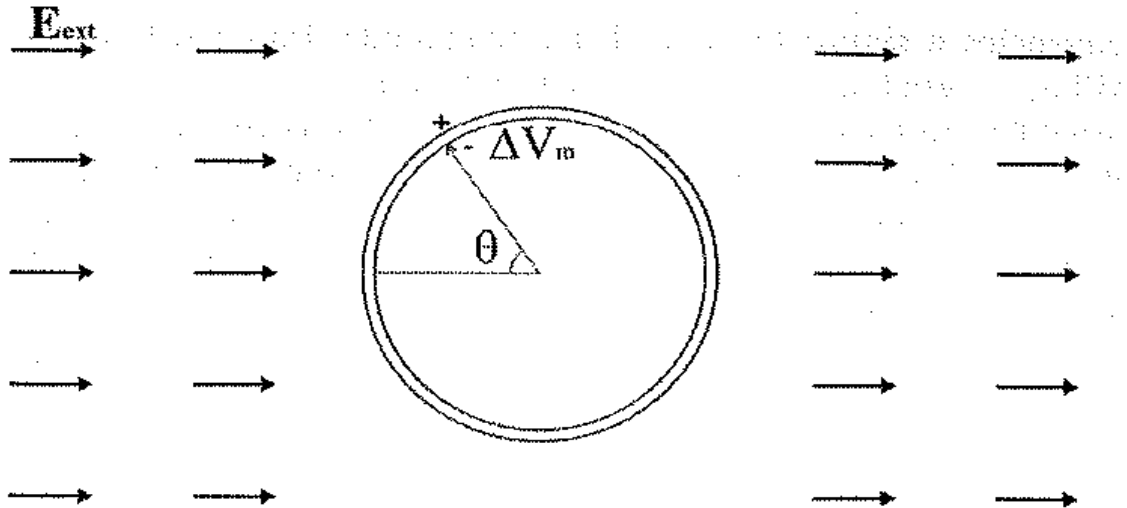


Fig.2.8: tensione transmembranale ΔV_m in funzione del campo elettrico \mathbf{E}_{ext} applicato dall'esterno.

La tensione transmembranale perciò è proporzionale al campo elettrico applicato dall'esterno ed al raggio della cellula; inoltre essa raggiunge il suo massimo e minimo per $\theta = 0^\circ$ e per $\theta = 180^\circ$ che identificano i "poli" della cellula. Perciò si può assumere che il potenziale transmembranale indotto su una cellula sarà massimo quando le linee di campo sono normali all'ipotetica linea equatoriale della cellula, mentre per tutti gli altri punti intermedi il potenziale varia con legge cosinusoidale come descritto dalla linea tratteggiata in Fig.2.9

La legge che descrive l'andamento del potenziale di membrana indotto a seguito dell'applicazione di un campo elettrico esterno è:

$$\Delta V_m = \frac{3}{2} E r \cos \theta (1 - e^{-\frac{t}{\tau_m}}) \quad (4)$$

Dove τ_m è la costante di tempo di carica della membrana

$$\tau_m = \frac{r \epsilon_m}{2d \frac{\sigma_i \sigma_e}{\sigma_i + 2\sigma_e} + r \sigma_m} \quad (5)$$

con:

- σ_i conduttività del citoplasma
- σ_m conduttività del doppio strato lipidico
- σ_e conduttività del liquido interstiziale esterno alla cellula
- ϵ_m permittività dielettrica della membrana cellulare
- d spessore della membrana
- r raggio della cellula

2.5.2 Cellule sferoidali ed ellissoidali

Per una cellula sferica la descrizione geometrica della sua membrana plasmatica è realistica se il suo spessore può essere ritenuto uniforme. Ciò può essere agevolmente ottenuto considerando lo spazio fra due sfere concentriche. Considerando due sferoidi o ellissoidi confocali lo spessore della membrana plasmatica è necessariamente non uniforme, perciò il calcolo della distribuzione spaziale del campo indotto considerando il modello a sfere concentriche non è realistico. Tuttavia considerando la membrana perfettamente isolante, il potenziale transmembranale indotto calcolato non si discosta molto da quello reale; ciò vale a dire che la schermatura elettrica della membrana cellulare è totale e quindi il potenziale del citoplasma in ogni punto interno della cellula è costante, pertanto si può affermare che la geometria della superficie interna alla membrana non ha effetto sulla distribuzione spaziale fuori dalla cellula.

L'andamento del potenziale di membrana di una cellula sferoidale ed il suo confronto con una cellula sferica è illustrato in Fig.2.9

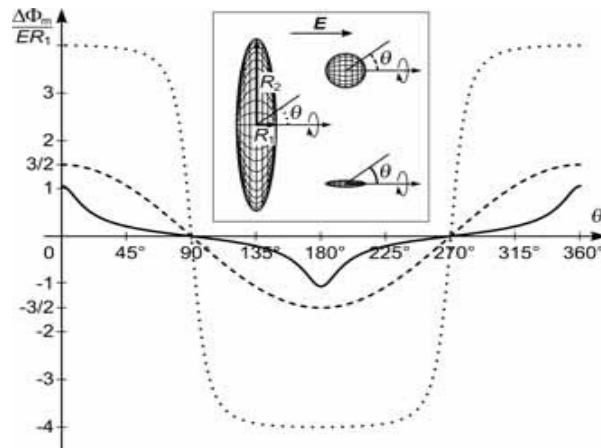


Fig.2.9: Andamento del potenziale transmembranale in funzione dell'angolo polare θ per cellule sferoidali con l'asse di simmetria allineata con la direzione del campo.

- Linea continua: cellula sferoidale allungata;
- Linea tratteggiata: cellula sferica;
- Linea punteggiata: cellula sferoidale obblata.

Per cellule che non sono sferiche si esprime ΔV_m in funzione della lunghezza d'arco della cellula piuttosto che in funzione dell'angolo θ (per una sfera queste due grandezze sono direttamente proporzionali), perciò si utilizza una versione normalizzata indicando con p variabile da 0 a 1 tutti i punti equidistanti della membrana dal punto iniziale di riferimento (Fig.2.10).

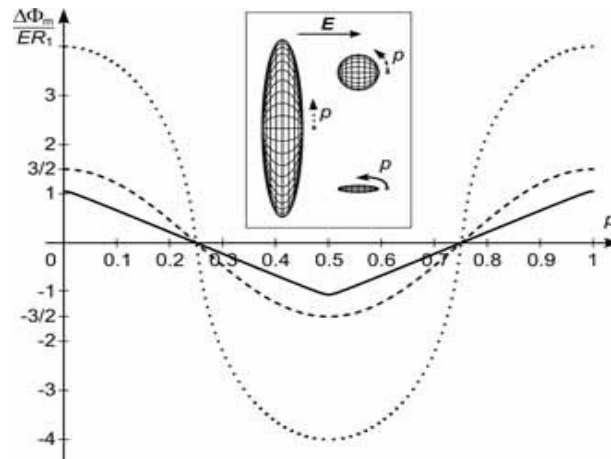


Fig.2.10: Andamento del potenziale transmembranale in funzione dell'arco di lunghezza normalizzato p per cellule sferoidale con l'asse di rotazione di simmetria allineato alla direzione del campo elettrico:

- Linea continua: cellula sferoidale allungata;
- Linea tratteggiata: cellula sferica;
- Linea punteggiata: cellula sferoidale oblata;

Un'altra complicazione derivante dal considerare la cellula uno sferoide o ellissoide è che il campo transmembranale indotto è anche funzione dell'orientazione della cellula rispetto al campo elettrico applicato.

Per considerare questo aspetto si scompone il vettore campo elettrico in componenti parallele agli assi di riferimento sferoidali o ellissoidali, per poi determinare il potenziale transmembranale indotto come la combinazione lineare delle tensioni indotte sugli stessi assi (Fig.2.11).

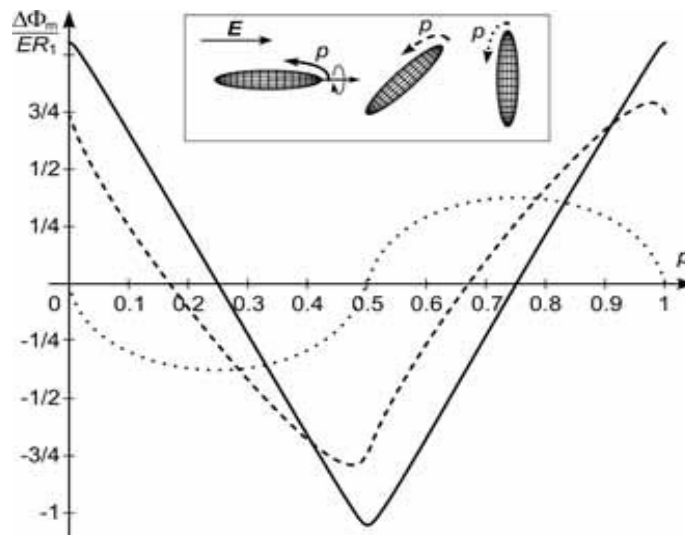


Fig.2.11: Potenziale transmembranale indotto per uno sferoide in funzione della direzione del campo elettrico applicato dall'esterno.

- Linea continua: asse di rotazione parallelo al campo elettrico;
- Linea tratteggiata: asse di simmetria inclinato di 45° rispetto al campo elettrico applicato;
- Linea punteggiata: asse di rotazione dello sferoide normale al campo.

2.5.3 Cellula dalla forma irregolare

Per cellule aventi una forma irregolare non è possibile determinare il potenziale transmembranale indotto in modo esatto, perciò è necessario trovare il potenziale di membrana numericamente [7]. In Fig.2.12 è indicato il potenziale transmembranale indotto per cellule aventi una forma irregolare.

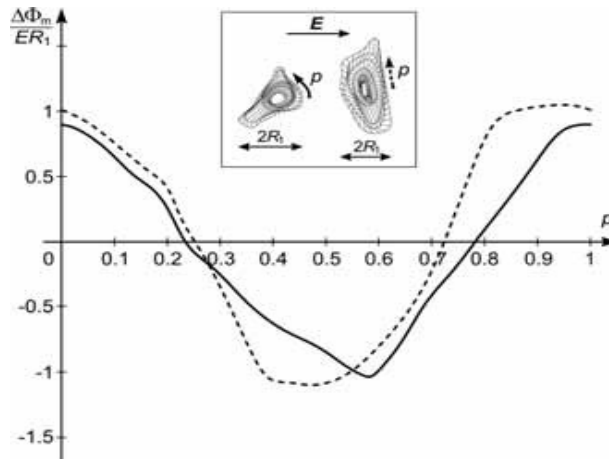


Fig.2.12: Potenziale transmembranale indotto per cellule aventi una forma irregolare.

2.6 Meccanismi di formazione dei pori

Le interazioni del campo elettrico con tessuti biologici, in particolare con membrane cellulari composte da doppi strati lipidici, sono state studiate intensamente nell'ultima decade. Tali studi hanno dimostrato, sia teoricamente che sperimentalmente, che un intenso campo elettrico pulsato è in grado di destabilizzare la membrana causando una redistribuzione di carica nella sua struttura.

Il fattore che descrive questo fenomeno è la tensione transmembranale indotta.

Data la difficoltà nel comprendere l'esatta dinamica con cui i pori acquosi si formano sulla membrana cellulare a seguito di un campo elettrico pulsato, nel tempo si sono elaborati alcuni modelli teorici con lo scopi di:

- Dare un'idea, ed una conseguente immagine fisicamente realistica della membrana cellulare, sia essa elettroporata o meno;
- Determinare la dipendenza dell'efficacia nell'elettroporazione in base ai parametri degli impulsi applicati;
- Stabilire un valore realistico del minimo valore di tensione transmembranale per la quale avviene l'elettroporazione;
- Stabilire le condizioni per la quale l'elettroporazione diviene irreversibile.

2.6.1 Modello idrodinamico

Il modello idrodinamico, sviluppato nei primi anni '70, descrive la membrana come un doppio strato carico, composto da materiale isolante e incompressibile, che separa due liquidi conduttori.

La tensione transmembranale indotta $\Delta V_m(t)$ esercita una pressione su questo strato, e poichè essendo per ipotesi tale doppio strato lipidico incompressibile nel volume, tenderà ad aumentare la sua area superficiale. In alternativa, se il volume o il perimetro della cellula sono assunti costanti, la membrana cellulare tenderà ad incresparsi.

Se l'area superficiale aumenta, aumenta di conseguenza anche la tensione superficiale e perciò anche la pressione che va ad opporsi alla compressione.

Per $V(t)$ sufficientemente bassi la membrana raggiunge un equilibrio in cui lo spessore della membrana si stabilizza.

Questo equilibrio è possibile raggiungerlo al di sotto di un valore critico ΔV_m dato da :

$$\Delta V_m = \sqrt{((\Gamma d_0) / (2 \epsilon_m))} \quad (6)$$

Dove:

- Γ è la tensione superficiale;
- d_0 è lo spessore incomprimibile;
- ϵ_m è la costante dielettrica del mezzo.

Per valori superiori a $\Delta V_m = 0.24$ V la membrana comincia ad essere instabile, la pressione di compressione prevale e causa la rottura del doppio strato lipidico.

Ci sono due principali problemi con questo modello per i quali non è possibile considerarlo pienamente realistico; il primo è che il modello si applica a liquidi con fluidità uniforme, ciò non è vero per la membrana plasmatica che presenta fluidità diversa a seconda della direzione (infatti il movimento normale alla membrana delle cellule è di norma molto difficoltoso), il secondo problema è che tale modello non descrive il fenomeno della permeabilizzazione cellulare.

2.6.2 Modello elastico

Diversamente dal modello idrodinamico, che considera la membrana cellulare come se avesse un volume costante ed una superficie variabile, questo modello considera un volume variabile a superficie costante.

In questo caso la pressione esercitata dalla tensione transmembranale indotta induce una diminuzione del volume del doppio strato lipidico, causando un aumento della pressione elastica che si oppone alla causa di deformazione.

Anche in questo caso esiste una pressione critica oltre la quale non è più possibile raggiungere un equilibrio fra le due forze data da:

$$\Delta V_m \approx 0.61 d_0 \sqrt{(Y / \epsilon_m)} \quad (7)$$

Dove:

- d_0 spessore iniziale
- Y modulo di elasticità della membrana
- ϵ_m permittività dielettrica del materiale

Per valori superiori a $\Delta V_m \approx 4.57$ V si raggiunge una condizione di instabilità tra pressione di compressione e pressione elastica.

Analogamente al modello idrodinamico anche in quello elastico si prevede la compressione delle code lipidiche, nonostante venga considerato il modulo di elasticità della membrana, la rottura si verifica per un aumento della tensione di compressione.

Il modello considera erroneamente un valore della tensione critica troppo alto oltre a considerare invariabile Y .

2.6.3 Modello idroelastico

Unendo le ipotesi del modello idrodinamico e di quello elastico, considerando cioè la membrana come un liquido dotato sia di tensione superficiale sia di elasticità, è possibile creare un modello che descrive meglio la realtà. Tale modello prevede sia la compressione delle code lipidiche sia la deformazione della membrana cellulare.

In questo modo si ottengono tensioni critiche $\Delta V_m \approx 0.34$ V in accordo con i risultati sperimentali. Nonostante questo, il modello non fornisce un'immagine realistica della membrana elettropermeabilizzata, in quanto viene considerata come uno strato di spessore infinitesimo ed uniforme, non riscontrabile nella realtà.

2.6.4 Modello Viscoidroelastico

Il modello viscoidroelastico completa quello idroelastico aggiungendo anche la viscosità della membrana. Come nel modello idroelastico la membrana può essere sia compressa che increspata, ma il tutto non è istantaneo e avviene con un certo ritardo dovuto alla viscosità stessa della membrana.

Durante la deformazione della membrana la resistenza al movimento molecolare porta ad un assottigliamento della membrana laddove il movimento delle molecole dovrebbe essere stato più rapido al fine di mantenere lo spessore costante.

Fino a $\Delta V_m = 2.68$ V l'equilibrio della membrana è ancora possibile, oltre si hanno perdite di integrità del doppio strato lipidico e si formano assottigliamenti ed increspature.

A differenza degli altri modelli, ciò che rende il modello viscoidroelastico più inerente alla realtà è che oltre a prevedere una tensione critica si considera anche il tempo critico di applicazione dell'impulso τ_c , in questo modo si ha che l'elettroporazione avviene se viene mantenuto il valore di tensione critica ΔV_m per un tempo pari o superiore a τ_c .

Le formule che descrivono questo modello sono:

$$\Delta V_m = \sqrt[4]{((8\Gamma Y d_0^3)/\epsilon_m^2)} \quad (8)$$

$$\tau_c = 24\mu / (\epsilon_m^2 U^4 / \Gamma d_0^3 - 8Y) \quad (9)$$

Dove:

- Γ è la tensione superficiale;
- Y è il modulo elastico della membrana;
- d_0 è lo spessore normale della membrana;
- ϵ_m è la permittività dielettrica della membrana;
- μ è la viscosità della membrana;
- U è la tensione applicata sulla membrana.

2.6.5 Modello di formazione dei pori acquosi

I modelli idrodinamico, elastico, idroelastico e viscoelastico considerano l'elettroporazione come un fenomeno su larga scala in cui nessun ruolo è attribuito alla struttura molecolare della membrana.

Il modello di formazione di pori acquosi considera l'elettroporazione come il risultato della formazione di pori acquosi nel doppio strato lipidico. Ogni poro è formato da un largo numero di molecole lipidiche, e la forma, dimensione e la sua stabilità sono fortemente influenzati dalla natura stessa di queste molecole e dalle loro interazioni elettrochimiche. In particolare si sono individuate tre fasi principali:

- Formazione di pori idrofobi spontanei nel doppio strato lipidico dovuto a fluttuazioni termiche spontanee;
- L'aumento della tensione transmembranale dovuta all'applicazione di un campo elettrico esterno induce un aumento nella formazione di pori acquosi sulla membrana cellulare associati a fluttuazioni termiche;
- Se il poro idrofobo ha un raggio superiore ad un raggio critico r^* allora si ha l'idrofilizzazione dove il poro si riconfigura dando origine ad un poro idrofilo. (Fig.2.13)

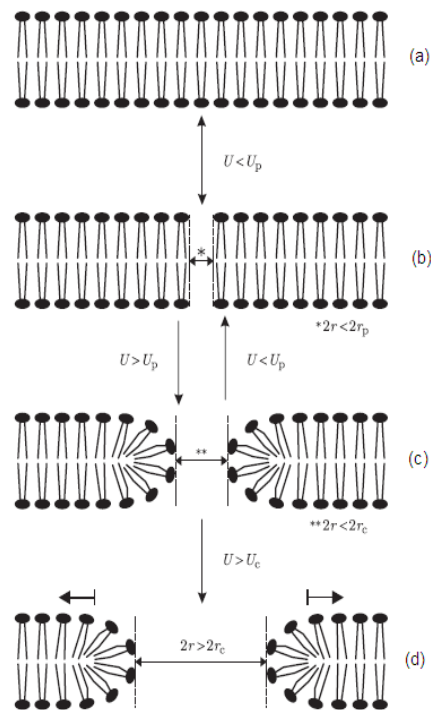


Fig.2.13: Meccanismo di formazione di un poro idrofilo

Finora il modello di formazione dei pori acquosi è quello considerato in letteratura come il più convincente per spiegare il fenomeno dell'elettroporazione [2][8].

3 STRUMENTI PER L'ECT

Come già detto un'efficace elettroporazione in ambito clinico dipende dalla distribuzione del campo elettrico sul tessuto trattato per cui il parametro più importante che influisce sull'elettroporabilizzazione della membrana cellulare è il campo elettrico locale.

Per fare in modo che l'intensità del campo sia adeguata occorrono un generatore di impulsi e degli elettrodi; normalmente il generatore di impulsi, o elettroporatore, deve essere in grado di fornire una tensione adeguata il cui valore di corrente è governato dall'impedenza presente fra gli elettrodi.

Per l'ECT si utilizzano impulsi a onda quadra della durata di 100 μ s considerando una tensione di 1000 V/cm e attualmente sono disponibili vari tipi di elettrodi che si distinguono in base alla loro geometria (Fig.3.1):

- Elettrodo a piatti paralleli;
- Elettrodi ad ago;
- Elettrodi a pinze;
- Elettrodi coassiali.

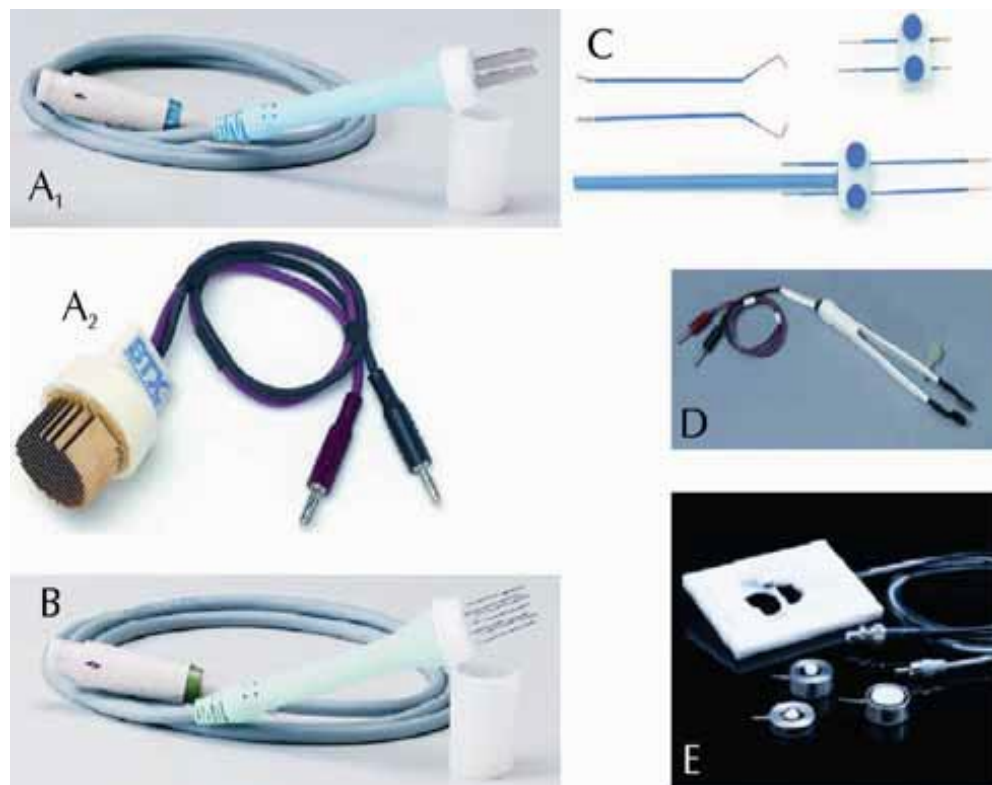


Fig.3.1: vari tipi di elettrodi per vari usi

Gli stessi elettrodi possono essere suddivisi in base all'ambito in cui vengono utilizzati, gli elettrodi A₁ (elettrodo piatto) e B (elettrodo ad aghi) vengono utilizzati in ECT, mentre gli elettrodi A₂, C, D ed E vengono utilizzati per altre applicazioni sia in vitro che in vivo. Nella progettazione di un elettrodo la caratterizzazione del carico al quale esso sarà collegato gioca un ruolo di fondamentale importanza. Infatti in prima approssimazione il carico tra una coppia di elettrodi può essere considerato come una resistenza in parallelo ad una

capacità. Il valore di questi componenti sono legati alla geometria dell'elettrodo e alle caratteristiche elettriche del tessuto trattato.

In cellule coltivate in vitro questi parametri possono essere controllati in modo preciso, in quanto le proprietà elettriche e chimiche possono essere definite entro certi limiti e possono essere misurate. In vivo invece, sebbene si conosca la geometria dell'elettrodo non si possono conoscere esaustivamente le proprietà elettriche del tessuto trattato, e perciò devono essere stimate.

In ogni caso al momento della progettazione della periferica, benché sia possibile, in via del tutto qualitativa, prevedere l'andamento dell'impedenza di un generico tessuto sottoposto a degli impulsi ad alta tensione, è impossibile stimare con precisione come le proprietà elettriche del tessuto elettroporato varino in relazione a questo evento[9].

3.1 Generatore di impulsi

L'elettroporatore è un generatore che deve essere in grado di fornire impulsi di tensione oppure di corrente adeguati per l'elettroporazione.

La massima tensione e corrente che esso è in grado di erogare sono il primo criterio di dimensionamento, soprattutto per i dispositivi di commutazione che devono essere adatti per lavorare entro determinati range di tensione e corrente :

- $V_{\text{impressa}} (5 \div 100) \text{ V}$ si utilizzano amplificatori operazionali;
- $V_{\text{impressa}} (100 \div 3000) \text{ V}$ si utilizzano transistor.
- $V_{\text{impressa}} > 3000 \text{ V}$ si utilizzano dispositivi a scarica

Per impulsi di durata superiore a $100 \mu\text{s}$ l'aspetto più importante da considerare è il fatto che l'impedenza del carico varia durante l'impulso e perciò il generatore di impulsi deve essere insensibile a questa variazione. Di seguito vengono riportati alcuni esempi di generatori di impulsi.

3.1.1 Generatore a scarica di un condensatore

Questa è la prima concezione di generatore per l'elettroporazione, utilizzata per sperimentazione in vitro, è costituito da un generatore di tensione variabile, una capacità, un commutatore e un resistore opzionale per regolare la costante di tempo (Fig.3.2).

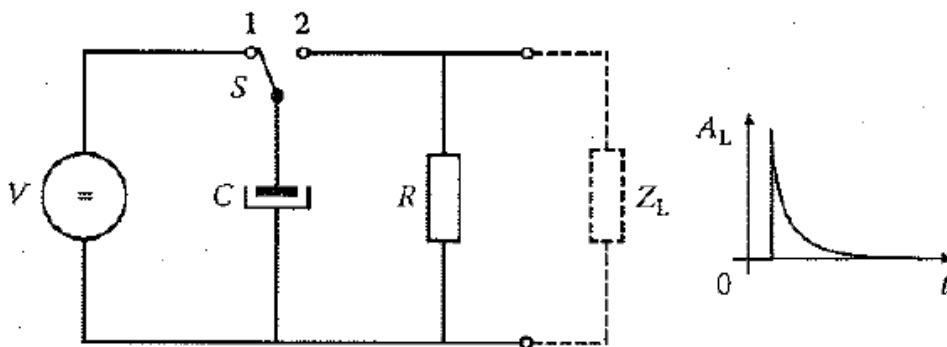


Fig.3.2: Circuito del generatore a scarica di un condensatore e la forma d'onda dell'impulso che genera

Questo generatore funziona in due fasi, carica e scarica del condensatore che crea impulsi che decadono esponenzialmente. Nella prima fase il commutatore è in posizione 1 e perciò il generatore carica la capacità alla tensione V , nella seconda fase il

commutatore va in posizione 2 e si scarica sul parallelo formato dalla resistenza e dal carico. La costante di tempo della scarica è data da:

$$\tau = Z_L C \quad (10)$$

dove Z_L è il modulo dell'impedenza del carico.

La bioimpedenza Z_L si riduce durante l'applicazione dell'impulso, perciò la costante di tempo che determina la forma dell'impulso varia durante la sua applicazione. Per ovviare a questo problema si inserisce una resistenza in parallelo a Z_L con lo scopo di definire meglio la costante di scarica.

Infatti in questo modo la costante di tempo risulta:

$$\tau = \left(\frac{R Z_L}{R + Z_L} \right) C \quad (11)$$

Se per esempio $Z_L = 10R$ la costante di tempo ora è approssimabile al prodotto RC .

$$\tau = \left(\frac{R Z_L}{R + Z_L} \right) C = \left(\frac{10R}{11} \right) C \approx RC \quad (12)$$

Il circuito in Fig.3.2 è un dispositivo semplice ed economico, tuttavia non permette di ottenere una sequenza di impulsi elevata causa l'elevato tempo impiegato a caricare il condensatore.

3.1.2 Generatore ad onda quadra

Per controllare meglio i parametri del campo elettrico applicato è stato concepito il generatore a onda quadra. Il suo concetto di costruzione è molto simile al precedente tipo. E' costituito da una sorgente variabile di alta tensione continua, un condensatore ed un interruttore (Fig.3.3). La complessità di questo sistema sta nel sistema di controllo dell'interruttore, che tipicamente è un dispositivo di potenza a semiconduttore (MOSFET o IGBT).

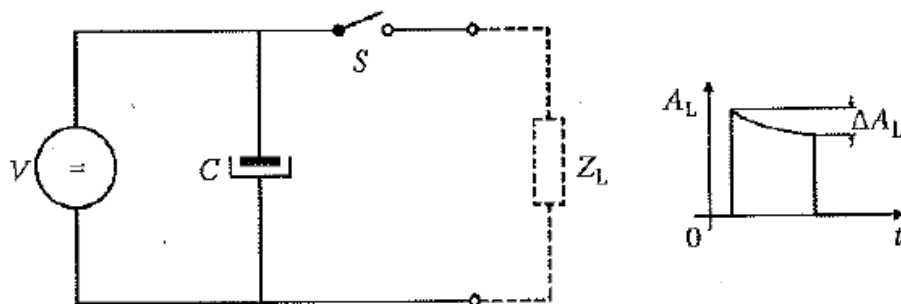


Fig.3.3: circuito del generatore a onda quadra e la forma dell'impulso che genera.

Con questo sistema si riesce a controllare meglio l'impulso, che però non è mai perfettamente ad onda quadra; ciò è dovuto al fatto che gli impulsi possiedono un'alta energia ma anche una durata breve. Infatti la sola sorgente di tensione non è in grado di fornire un'adeguata energia ad ogni scarica, che deve essere immagazzinata dal condensatore C , questo comporta che ad ogni scarica ci sia una variazione dell'ampiezza dell'impulso pari a ΔA_L .

A causa di questo vengono utilizzati capacità di valore elevato che però limitano la variazione di ampiezza complessiva dell'impulso in seguito ad una variazione della tensione della sorgente V .

3.1.3 Generatore modulare ad onda quadra

Questo tipo di generatore per elettroporatore è nato per avere più flessibilità nel controllo dell'ampiezza dell'impulso, è costituito da N generatori ad onda quadra collegati in serie controllati singolarmente (Fig.3.4). La caratteristica principale di questa configurazione è che l'ampiezza di ogni sorgente è doppia rispetto a quella che la precede:

$$V_n = 2 V_{(n-1)} \quad (13)$$

Negli altri generatori è possibile variare l'ampiezza della tensione V , mentre in questo caso ciascuna sorgente fornisce una tensione V_x . L'impulso totale che ne deriva è perciò formato da tutti i contributi delle singole sorgenti ad onda quadra attivi in quell'intervallo di tempo. Da questo sistema è possibile ottenere 2^N livelli di tensione dove il più basso discostamento è dato dalla sorgente che eroga la tensione minore.

Seppur sia possibile ottenere impulsi ad onda quadra ben definiti, il costo di questo dispositivo aumenta in relazione ai livelli di tensione che si vogliono ottenere.

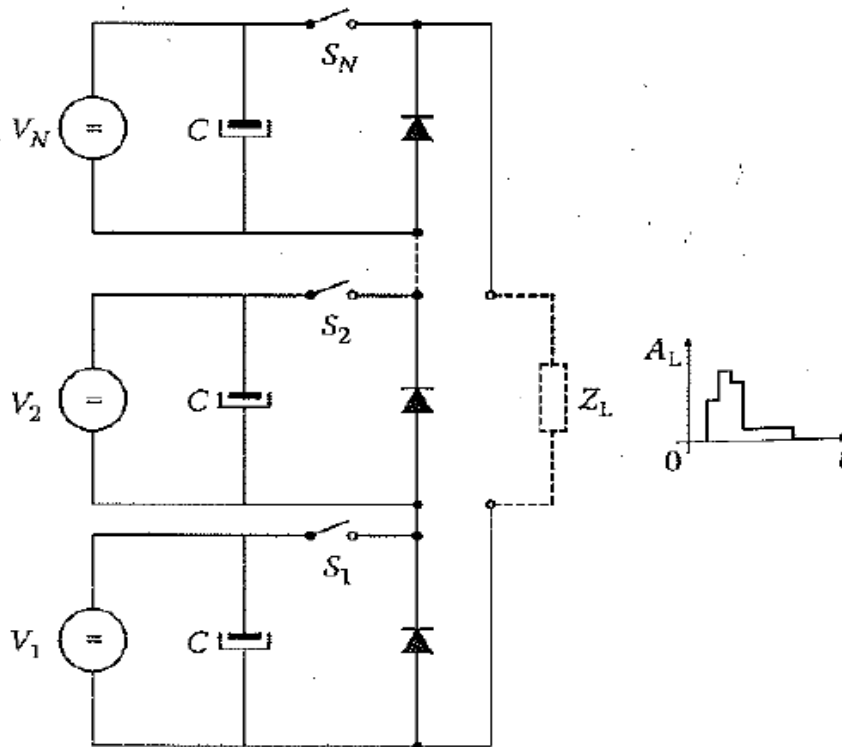


Fig.3.4: circuito del generatore modulare ad onda quadra e relativo impulso

3.1.4 Generatore analogico

Questa configurazione è ottenuta tramite una sorgente di tensione V , un condensatore C , un generatore di segnale F_G , uno switch lineare Q e una coppia di resistenze R_1 , R_2 . La sorgente che carica il condensatore, nel quale è immagazzinata l'energia per la scarica, è impostata ad un valore di tensione maggiore di quella che sarà applicata al carico per fare evitare variazioni di ampiezza dell'impulso.

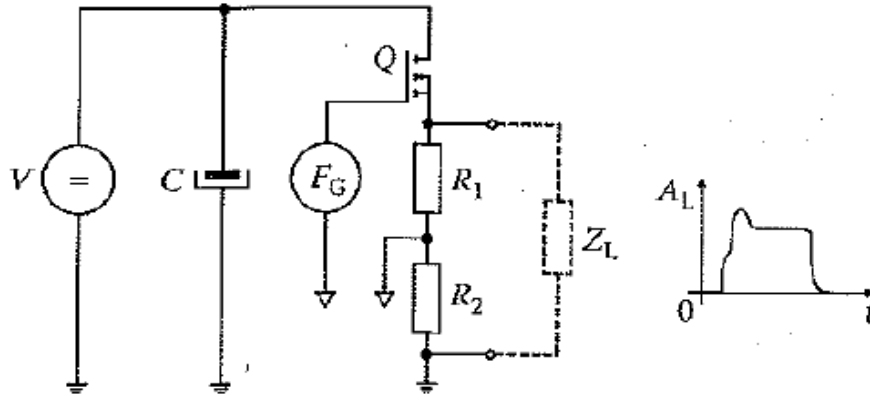


Fig.3.5: circuito del generatore analogico e relativa forma d'onda.

La forma dell'impulso viene generata dalla sorgente da F_G , e amplificata attraverso lo switch e le resistenze di un fattore $(R_1+R_2)/R_1$. Questo generatore permette un ampio controllo su tutti i parametri dell'impulso, tuttavia i tempi di salita e discesa dell'impulso sono elevati ed inoltre il circuito di amplificazione è causa di una notevole dissipazione di potenza rispetto alle configurazioni precedenti [10][11].

4 Elettrodo a Maglia

4.1 Introduzione

Attualmente per applicare un trattamento di elettrochemioterapia su tumori cutanei e sottocutanei localizzati vengono utilizzati elettrodi ad aghi disposti ad esagono regolare su un supporto rigido a cui si applicano impulsi da 730 V per ogni coppia di elettrodi distanti fra loro 7,3 mm (Fig.4.1).

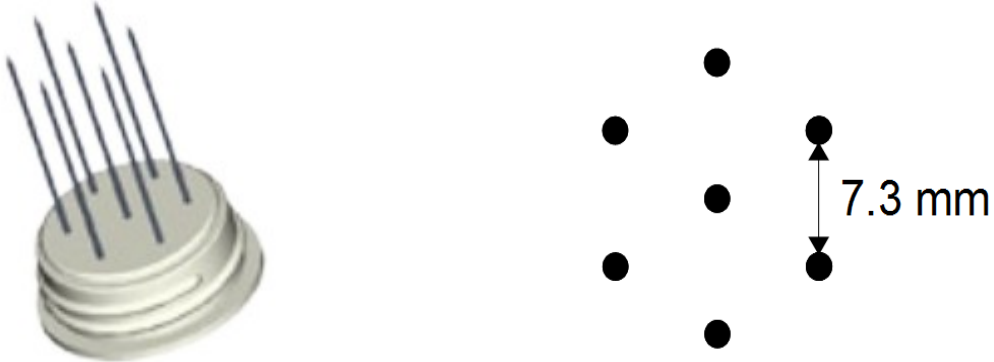


Fig.4.1: Elettrodo ad aghi esagonale

Considerando elettrodi a configurazione esagonale come in Fig.4.1 sono applicati impulsi a tutte le possibili coppie di aghi che distano fra loro 7,3 mm, per un totale di 12 gruppi di 8 impulsi, in modo da ottenere un'elettroporazione omogenea nel volume dell'elettrodo (Fig.4.2). Questi elettrodi sono utili a trattare tumori di area di 1 – 2 cm². Nel caso il tumore sia più esteso, per ottenere un'elettroporazione omogenea, il medico deve spostare ripetutamente l'elettrodo su tutta la superficie da trattare, elettroporando piccole porzioni di tessuto alla volta.

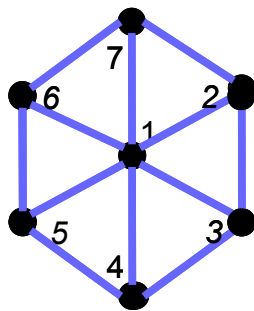


Fig.4.2: impulsi applicati da un elettrodo ad aghi esagonale

Al fine di rendere più pratico il trattamento si è pensato ad un elettrodo che, pur mantenendo lo stesso schema ad esagono, con poche applicazioni della sequenza di impulsi potesse coprire un'area maggiore. Questo dispositivo è stato chiamato "elettrodo a maglia".

L'elettrodo a maglia è stato costruito accostando opportunamente più gruppi di elettrodi in configurazione esagonale: per elettroporare tutta l'area coperta dagli elettrodi occorre che tutte le possibili coppie di elettrodi siano alimentate. Per fare questo è stato necessario trovare una strategia di connessione opportuna. Nel seguito si descriverà il dispositivo progettato e le strategie studiate per la connessione all'attuale apparecchio per ECT usato in clinica.

4.1.1 Descrizione dell'elettrodo a maglia

In Fig.4.3 è riportato uno schema di principio dell'elettrodo costruito. Gli aghi dell'elettrodo sono posizionati in modo da formare una maglia in cui i cerchi evidenziano gruppi di 7 elettrodi isolati l'uno dall'altro, mentre i quadrati altrettanto gruppi di 7 elettrodi isolati fra loro.

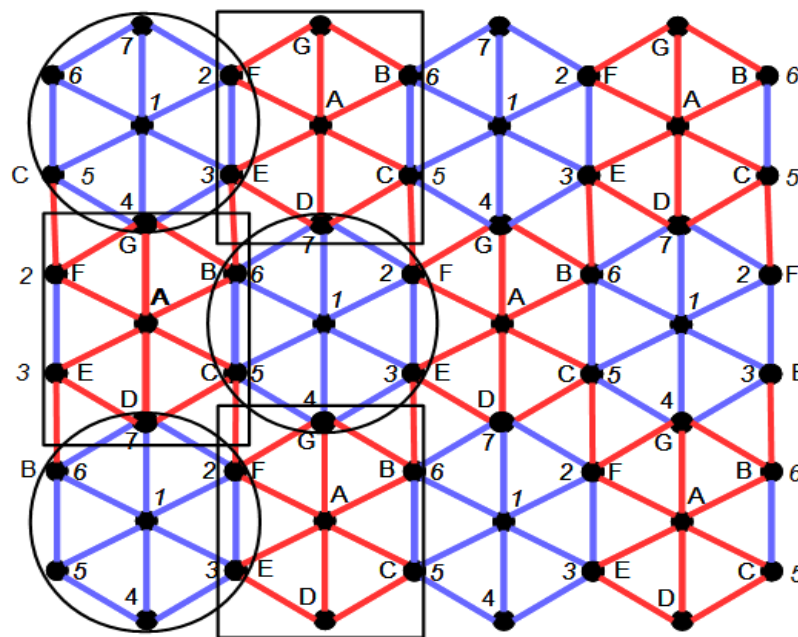


Fig.4.3: schema di principio dell'elettrodo

Quindi dalla Fig.4.3 è possibile individuare 2 schemi di gruppi da 7 elettrodi che hanno in comune alcuni aghi. Nell'ottica di connettersi al generatore attuale si è pensato di alimentare gli elettrodi a gruppi di 7 aghi con la logica implementata nella macchina in uso. Questo ha portato a studiare come connettere gli aghi dell'elettrodo al generatore.

Poichè l'elettrodo a maglia è formato da più gruppi di 7 elettrodi che si ripetono, ciascuna coppia di elettrodi è alimentata in sequenza, si è pensato che coppie di elettrodi corrispondenti nei gruppi evidenziati dai cerchi potessero essere alimentate in parallelo. A questo scopo è stato fatto un esperimento su una patata, in cui sono stati applicati degli impulsi a più coppie di aghi connesse in parallelo, e si è visto che è possibile alimentare configurazioni di questo genere fino a che la resistenza equivalente del tessuto, vista ai capi del generatore, non diventa così bassa da far intervenire la protezione di massima corrente dell'elettroporatore impostata a 40A. Allo stesso modo anche coppie di elettrodi corrispondenti nei gruppi di 7 elettrodi evidenziati con i quadrati possono essere connesse in parallelo.

A questo punto è sorto il problema degli elettrodi comuni alle due sequenze. Numerando opportunamente i gruppi di più elettrodi evidenziati dai cerchi e dai quadrati è stato

possibile individuare una logica di connessione opportuna. In particolare gli elettrodi dei cerchi sono stati numerati come in Fig.4.4a mentre quelli dei quadrati come in Fig.4.4b.



Fig.4.4: Elettrodi esagonali costituenti l'elettrodo a maglia

Gli aghi che formano l'elettrodo a maglia sono, quindi, connessi al generatore di impulsi mediante 2 appositi gruppi di contatti da connettere al manipolo della macchina per elettrochemioterapia che riproducono gli schemi in Fig.4.3.

4.2 Periferica di connessione degli elettrodi

In Fig.4.5 è riportato uno schema della periferica di connessione degli elettrodi.

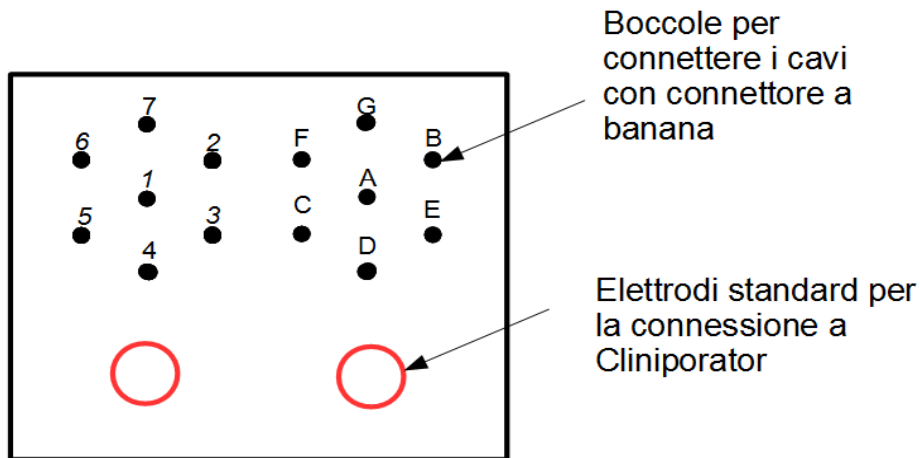


Fig.4.5: piattaforma di connessione degli elettrodi

La periferica di connessione degli elettrodi (Fig.4.5) è interposta fra il generatore e l'elettrodo a maglia infatti ha lo scopo di alimentare con gli impulsi le diverse coppie di aghi connesse in parallelo. Ai morsetti della contattiera vengono collegati tutti gli aghi dell'elettrodo secondo lo schema elettrico di Fig.4.8.

È da notare che se si considera lo schema dell'elettrodo in Fig.4.6(a), in cui le coppie di aghi alimentate secondo la sequenza di impulsi di Tab.4.1, e in cui è stato messo in risalto il gruppo di 7 elettrodi numerati con le lettere, due coppie di gruppi adiacenti numerati con la sequenza di numeri e le possibili coppie di aghi, si vede che le coppie F-C e B-E non possono essere alimentate. Si nota inoltre che le coppie F-E e B-C corrispondenti alle coppie 2-3 e 5-6 dell'altra sequenza sarebbero alimentate 2 volte: la prima volta sono

alimentate durante la sequenza degli impulsi applicati agli esagoni numerati, la seconda dalla sequenza di impulsi applicata agli esagoni identificati dalle lettere.

n° impulso	Sequenza impulsi
1	1 - 2
2	1 - 3
3	1 - 4
4	1 - 5
5	1 - 6
6	1 - 7
7	2 - 3
8	3 - 4
9	4 - 5
10	5 - 6
11	6 - 7
12	7 - 2

n° impulso	Sequenza impulsi
13	A - B
14	A - C
15	A - D
16	A - E
17	A - F
18	A - G
19	B - C
20	C - D
21	D - E
22	E - F
23	F - G
24	G - B

Tab.4.1: sequenza di impulsi applicata

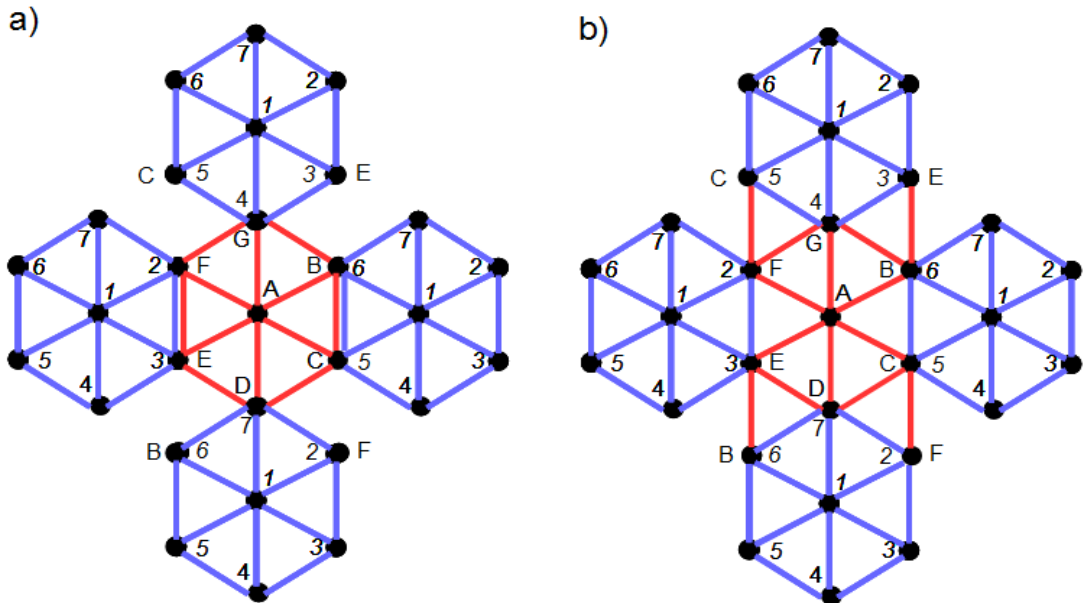


Fig.4.6: applicazione degli impulsi sull'elettrodo:
 a) secondo la sequenza di Tab.4.1
 b) secondo la sequenza di Tab.4.2

Per risolvere questo problema si sono scambiati i contatti C ed E sulla periferica di connessione degli impulsi (Fig.4.7): in questo modo applicando la sequenza di impulsi indicata in Tab.4.2 è possibile applicare gli impulsi anche alle coppie mancanti F-E e B-C come indicato in Fig.4.6(b).

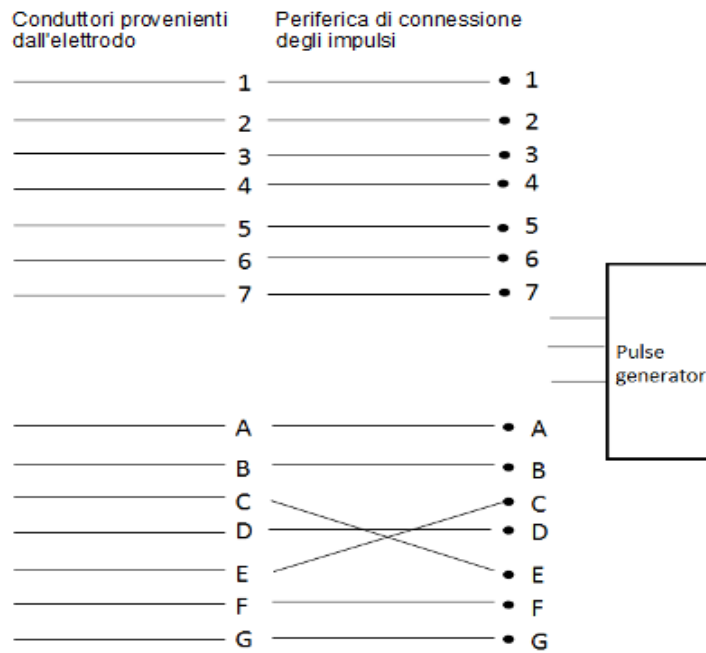


Fig.4.7: scambio dei contatti sulla periferica di connessione

n° impulso	Sequenza impulsi
1	1 - 2
2	1 - 3
3	1 - 4
4	1 - 5
5	1 - 6
6	1 - 7
7	2 - 3
8	3 - 4
9	4 - 5
10	5 - 6
11	6 - 7
12	7 - 2

n° impulso	Sequenza impulsi
13	A - B
14	A - E
15	A - D
16	A - C
17	A - F
18	A - G
19	B - E
20	E - D
21	D - C
22	C - F
23	F - G
24	G - B

Tab.4.2: sequenza degli impulsi applicabile alla piattaforma di connessione

In Fig.4.8 è riportato un esempio di connessione dell'elettrodo a maglia ai 2 gruppi di contatti della periferica. Si nota che per ogni ago, tranne per quelli che sono connessi ad 1 e A, partono due connessioni, una viene collegata all'esagono identificato da numeri, mentre l'altra è connessa all'esagono identificato dalle lettere.

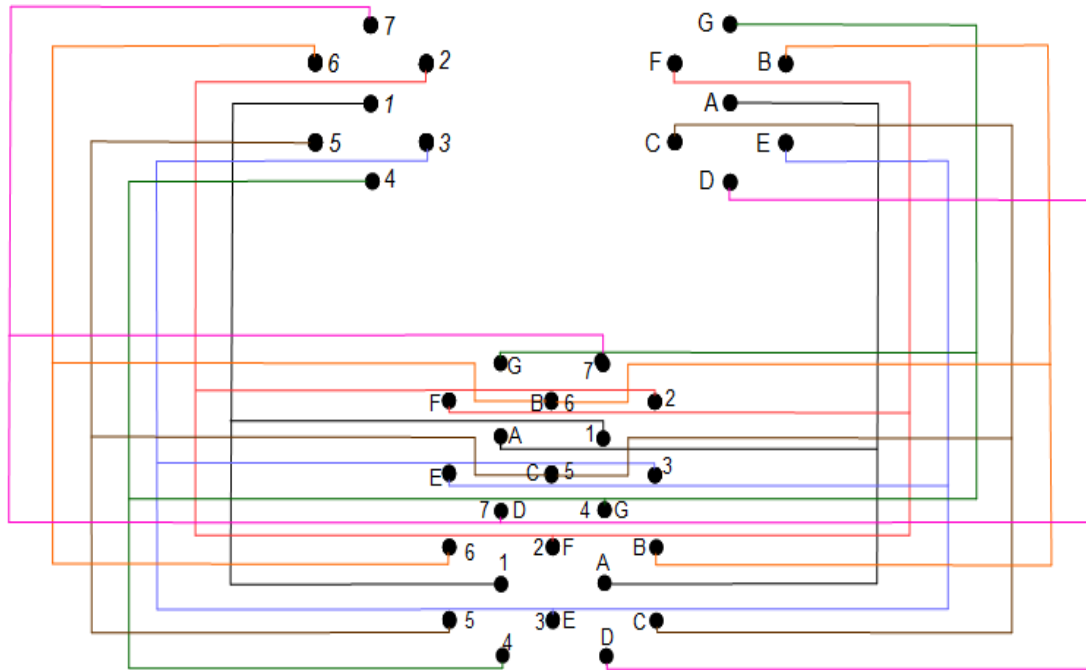


Fig.4.8: schema fondamentale dell'elettrodo a maglia

In questo modo utilizzando la periferica di connessione è possibile collegare i due terminali del generatore alle boccole presenti sulla periferica di connessione ed applicare gli impulsi a ciascuna coppia di elettrodi in una sequenza scelta arbitrariamente. Un esempio è riportato in Tab.4.3: sono riportate le due sequenze di coppie di elettrodi utilizzate negli esperimenti.

n° impulso	Sequenza impulsi
1	1 - 2
2	1 - 3
3	1 - 4
4	1 - 5
5	1 - 6
6	1 - 7
7	2 - 3
8	3 - 4
9	4 - 5
10	5 - 6
11	6 - 7
12	7 - 2

n° impulso	Sequenza impulsi
13	A - B
14	A - E
15	A - D
16	A - C
17	A - F
18	A - G
19	B - E
20	E - D
21	D - C
22	C - F
23	F - G
24	G - B

Tab.4.3: sequenza degli impulsi applicabile alla piattaforma di connessione

In questo modo, sfruttando la connessione in parallelo di più coppie di aghi e i due schemi di connessione è possibile ricoprire in modo uniforme la superficie da trattare, che può essere anche notevolmente estesa.

In Fig.4.9 sono messe in evidenza le sequenze di scarica sull'elettrodo a maglia.

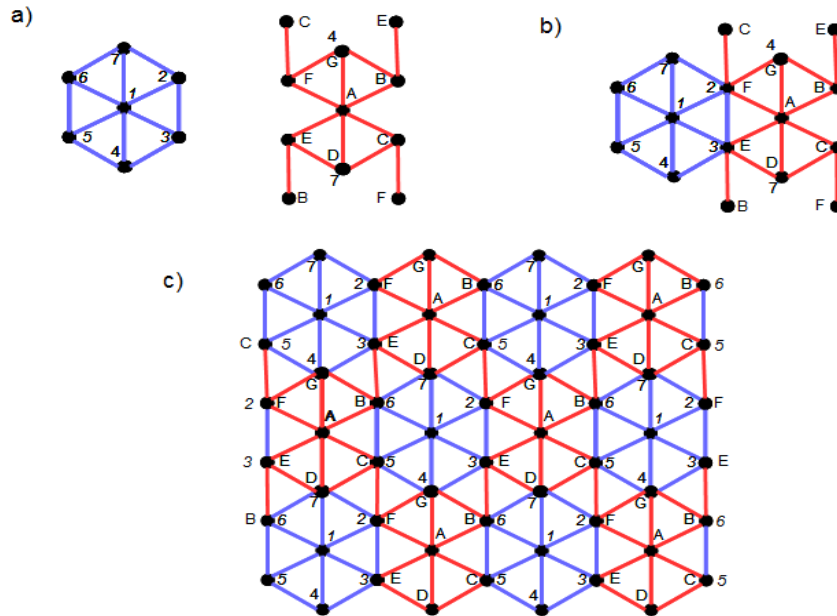


Fig.4.9: Composizione degli impulsi sugli aghi dell'elettrodo a maglia:
a) sequenza di scarica sugli aghi che compongono gli esagoni dell'elettrodo considerati separatamente;
b) sequenza di scarica degli esagoni uniti;
c) rappresentazione degli impulsi su una superficie estesa.

4.3 Generatore di impulsi

Il generatore di impulsi utilizzato nelle sperimentazioni è un prototipo fornito da Igea s.p.a. che crea impulsi di tensione ad onda quadra della durata e ampiezza opportuni.

In queste prove sono stati utilizzati impulsi da 100 μ s con tensione variabile in modo da applicare ai capi di ogni coppia di elettrodi un campo elettrico di 500 V/cm o 1000 V/cm.

Nell'utilizzo del generatore si sono identificati problemi descritti di seguito di cui si è dovuto tener conto nella costruzione degli elettrodi e nel loro utilizzo.

4.3.1 Intervento della protezione di massima corrente

Se il valore della resistenza che il generatore di impulsi vede ai suoi capi è troppo bassa, esso limita la corrente erogata ad un valore di $I_{max} = 40A$.

Nella progettazione e nell'uso del nuovo elettrodo è necessario valutare la resistenza vista ai capi del generatore per fare in modo che non sia tale da far intervenire questo tipo di limitazione. In Fig.4.10 è riportato un caso in cui interviene la protezione di massima corrente per i primi 3 impulsi di corrente.



Fig.4.10: Limitazione di massima corrente sugli impulsi applicati dal generatore

4.3.2 Impulsi di tensione mancanti

In alcuni casi può anche accadere che il generatore non riesca a fornire tutti gli impulsi voluti (Fig.4.11). Questo effetto è più evidente man mano che il numero di impulsi cresce. Per tenere conto del fatto che possono mancare degli impulsi nelle tabelle riassuntive delle prove degli elettrodi a maglia testati è stato specificato il numero dell'ultimo impulso di tensione che è stato applicato in modo corretto dall'elettroporatore e da cui sono poi stati ricavati i corrispondenti valori di corrente.



Fig.4.11: impulsi di tensione mancanti applicando 50 impulsi ad una tensione di 2500 V

4.3.3 Variazione della tensione degli impulsi

Confrontando fra di loro gli impulsi di Fig.4.12 si nota che la tensione decresce man mano che gli impulsi si ripetono, tutto ciò è legato al numero di paralleli che l'elettroporatore deve gestire: più il loro numero è elevato, minore sarà la resistenza equivalente vista ai suoi capi e quindi il generatore dovrà erogare un'intensità di corrente di valore elevato che comporta una diminuzione della tensione fornita dall'elettroporatore stesso.

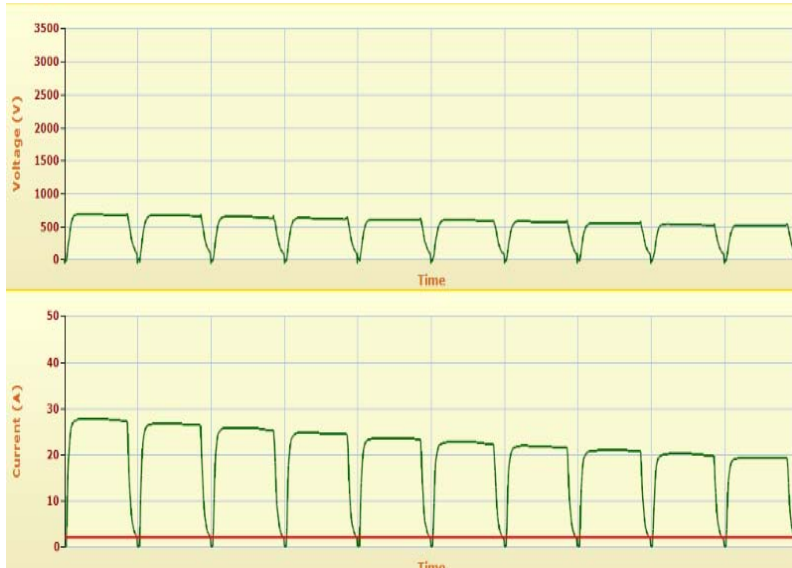


Fig.4.12: andamento della tensione che il generatore di impulsi applica sui paralleli in funzione della corrente erogata.

4.4 Software per l'elaborazione dati

Il generatore di impulsi per ogni applicazione del trattamento registra i valori di tensione e corrente di ciascun impulso erogato. Per ciascun impulso con semiperiodo di $120 \mu\text{s}$ sono memorizzati 120 campioni di tensione ed altrettanti di corrente con tempo di campionamento $t = 1 \mu\text{s}$.

In Fig.4.13 è rappresentato un esempio di impulsi generati in cui è evidenziata la durata di un impulso.

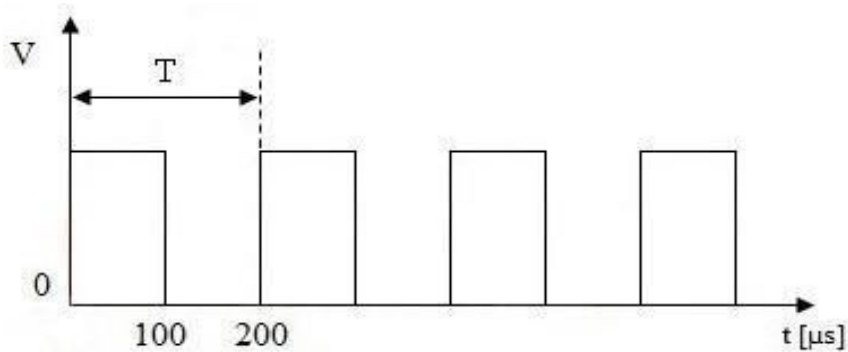


Fig.4.13: impulsi di tensione generati dall'elettroporatore

La parte di impulso a 0 V, per ridurre lo spazio di archiviazione non è memorizzato. La macchina rende disponibili perciò solo i 100 valori della parte alta dell'impulso ed i successivi venti. Successivamente questi valori di tensione e corrente tramite un apposito software con il quale è possibile anche visualizzare gli impulsi, estrae i valori di tensione e corrente relativi a ciascun impulso da cui si può calcolare il valore della resistenza associato al tessuto trattato in cui sono impiantati gli elettrodi. Il software di analisi degli impulsi è stato precedentemente sviluppato nella tesi di Diego Corradini, ed è stato modificato per elaborare gruppi di 10 impulsi anziché 8 [12].

Questo software ricerca in automatico il valore della tensione dell'impulso e verifica se c'è una zona sufficientemente ampia per cui la tensione si mantiene a questo valore trovato. Se vi è un numero sufficiente di campioni che assume questo valore viene calcolato il valore di resistenza associato a questo impulso. In caso contrario il valore di resistenza non viene calcolato. Questo software funziona in modo adeguato per le macchine utilizzate nella pratica clinica che permettono di avere impulsi di tensione e corrente stabili. Il prototipo a disposizione in laboratorio, in alcuni casi non è in grado di mantenere tensione e corrente degli impulsi costante, in questo modo può accadere che non ci sia un numero sufficienti di campioni a tensione e corrente costanti. Questo ha comportato la necessità di modificare il software di analisi per tener conto di questo problema aumentando il range dei campioni ammissibili per l'elaborazione dei valori delle resistenze. Lo stralcio del programma in cui è visibile questa modifica è consultabile in appendice A.

4.5 Costruzione dell'elettrodo a maglia

Gli elettrodi sono stati costruiti impiantando degli spilli in acciaio lunghi 16 mm dal diametro di 0,5 mm su una base di plastica rigida spessa 3mm ritagliata in modo tale da creare un cerchio dal diametro compreso fra 75 mm e 80 mm. È stata scelta questa misura per fare in modo di poter inserire gli elettrodi a maglia nelle piastre Petri, che hanno un diametro pari a 85 mm, per poter così fare agevolmente prove su cellule coltivate in vitro. I collegamenti sono stati fatti avvolgendo un filo per wire wrapping intorno agli aghi impiantati sulla base plastica. Infine per poter connettere gli elettrodi alla periferica di connessione si sono saldati i conduttori per wire wrapping a delle pagliette con fori da 4 mm tramite un saldatore a stagno. Per variare la lunghezza degli aghi nelle prove sono stati utilizzati dei fogli di sughero spessi 2 mm.

4.6 Schema del trattamento

Dati gli elementi descritti in precedenza, il sistema per poter applicare impulsi tramite il nuovo elettrodo a maglia è formata dai seguenti blocchi:

- Generatore di impulsi;
- Periferica di collegamento degli elettrodo;
- Elettrodo a maglia.

Tali blocchi sono collegati tra loro come indicato in Fig.4.14:



Fig.4.14: schema di collegamento delle apparecchiature utilizzate negli esperimenti

In Fig.4.15 è riportato il sistema utilizzato in laboratorio per le prove in cui si vede il generatore, l'elettrodo e la periferica di collegamento. In questo modo è possibile comandare il generatore per applicare la sequenza di impulsi sul campione a cui è connesso l'elettrodo a maglia mediante un'apposita pedalina.

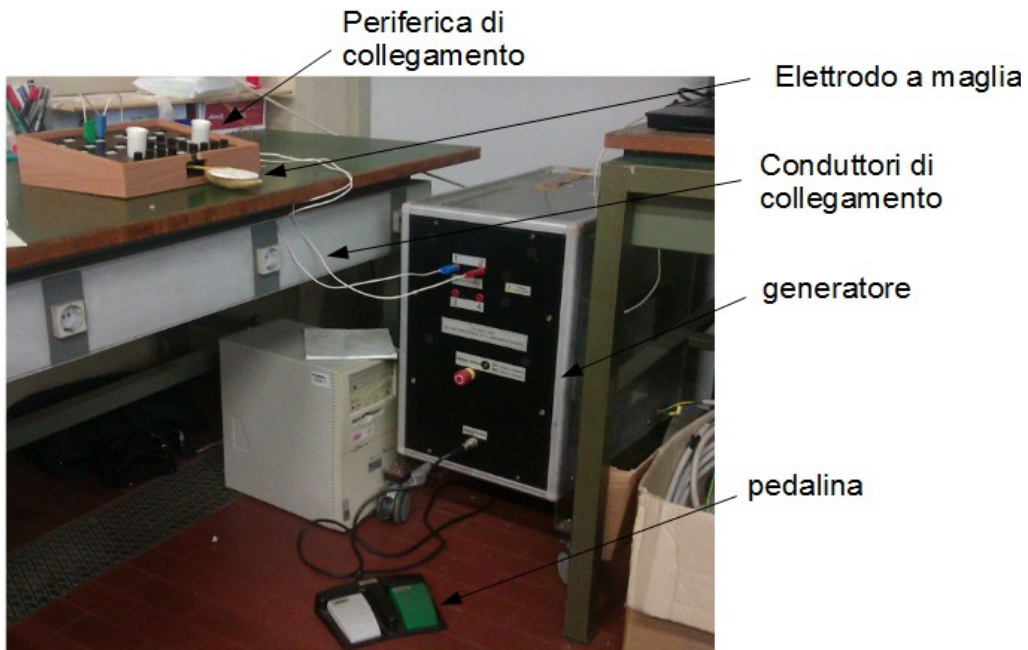


Fig.4.15: apparecchiatura utilizzata negli esperimenti

5 RISULTATI DELLE PROVE

Per il lavoro illustrato in questa tesi sono stati costruiti alcuni prototipi di elettrodo a maglia utilizzando gli schemi presentati nel capitolo precedente.

I prototipi sviluppati sono serviti a valutare i seguenti aspetti:

- Il numero di coppie di elettrodi che possono essere messe in parallelo;
- La distanza a cui possono essere posizionati gli aghi;
- Come si modifica l'effetto dell'elettroporazione del tessuto con aghi a distanze crescenti;
- L'efficacia dell'elettroporazione riducendo la tensione applicata ad una coppia di elettrodi;
- Il numero di impulsi necessari ad elettroporare il tessuto riducendo la tensione applicata a ciascuna coppia di elettrodi;
- L'effetto della lunghezza dell'elettrodo sull'efficacia dell'elettroporazione confrontando i valori di corrente ottenuti con elettrodi lunghi a 12 mm o 6mm.

Le prove per verificare che il nuovo elettrodo fosse in grado di elettroporare le cellule sono state principalmente effettuate su tessuto di patata, infatti è noto che esso assume un colore scuro se viene elettroporato a causa dell'ossidazione dell'amido contenuto nelle cellule. Infatti in seguito all'elettroporazione si ha la fuoriuscita di amido dalle membrane delle cellule danneggiate che diventa scuro a contatto con l'aria [13].

Per alcuni elettrodi, allo scopo di verificare che il concetto di connettere più coppie di elettrodi in parallelo fosse fattibile, sono state effettuate delle prove su culture cellulari. Infatti si voleva essere sicuri che l'elettroporazione avvenisse anche in cellule umane allo stesso modo con cui era stato verificato in passato per gli elettrodi standard. Queste prove sono state effettuate nel laboratorio di istologia, presso il dipartimento di morfologia, chirurgia e medicina sperimentale dell'università di Ferrara.

Nel seguito si riportano i risultati ottenuti con diversi elettrodi costruiti utilizzando un disco di materiale plastico dello spessore di 3 mm dal diametro compreso fra 75 e 80 mm. Successivamente sono stati posizionati più aghi variando la distanza d tra aghi adiacenti secondo lo schema in Fig.4.9 . In particolare sono stati preparati i seguenti elettrodi:

- A) N° aghi = 109 $d= 7$ mm;
- B) N° aghi = 55 $d= 10$ mm;
- C) N° aghi = 13 $d= 20$ mm;
- D) N° aghi = 7 $d= 25$ mm;
- E) N° aghi = 7 $d= 30$ mm.

La Fig.5.1 riporta un esempio di elettrodo a maglia in cui è evidenziata la distanza tra due aghi.



Fig.5.1: distanza fra gli elettrodi ad ago

5.1 Valutazione del numero di paralleli

Per ogni elettrodo, se possibile, sono state connesse più coppie di aghi in parallelo. Il numero di possibili coppie in parallelo è limitato dal valore massimo di corrente erogabile dal generatore ($I_{max} = 40$ A). Per valutare il numero di possibili paralleli si può considerare la resistenza ai capi di più elettrodi connessi in parallelo. Infatti il generatore di impulsi vede ai suoi capi una resistenza che dipende dal numero di coppie di aghi collegate in parallelo sulla periferica di connessione degli elettrodi. Considerando, in prima approssimazione, il tessuto sottoposto ad elettroporazione come lineare, omogeneo ed isotropo da un punto di vista elettrico, si può ipotizzare che le resistenze ai capi di due elettrodi distanti tra loro d , siano uguali. Perciò l'elettroporatore vedrà ai suoi capi:

$$R_{eq} = R_{periferica} + R_{elettrodo} + \frac{R_{el}}{n^{\circ} \text{ paralleli}} \quad (14)$$

Dove:

- R_{eq} : resistenza vista ai capi del generatore di impulsi;
- $R_{periferica}$: resistenza associata ai collegamenti della periferica di collegamento degli elettrodi del valore di 1.2Ω ;
- $R_{elettrodo}$: resistenza associata ai collegamenti e ai conduttori dell'elettrodo di circa 0.5Ω ;
- R_{el} : resistenza fra due generiche coppie di aghi distanti fra loro 7mm.

Per cui dalla (14), noti i valori di resistenze in gioco, è possibile ricavare il numero massimo di paralleli. Per valutare l'effetto di elettroporazione ottenibile con il nuovo dispositivo, per ciascun elettrodo possono essere effettuate le seguenti prove:

1. Elettroporazione di tessuto di patata con aghi lunghi 12 mm applicando un campo elettrico standard di $E = 100$ V/mm ed applicando 10 impulsi;
2. Elettroporazione di tessuto di patata con aghi lunghi 12 mm applicando un campo elettrico di $E = 50$ V/mm ed applicando 50 impulsi;
3. Elettroporazione di tessuto di patata con aghi lunghi 6 mm applicando un campo elettrico standard di $E = 100$ V/mm ed applicando 10 impulsi;
4. Elettroporazione di tessuto di patata con aghi lunghi 6 mm applicando un campo elettrico standard di $E = 50$ V/mm ed applicando 50 impulsi;
5. in alcuni casi prove in vitro su cellule con tensione standard applicando 8 impulsi.

5.2 Procedimento delle prove

I nuovi elettrodi sono stati provati sia su tessuto di patata sia su culture cellulari.

5.2.1 Prove su tessuto di patata

Le prove sono state effettuate collegando l'elettrodo a maglia in prova alla periferica di collegamento (Fig.5.2). La periferica permette di collegare l'elettrodo ad un prototipo di generatore di impulsi progettato da Igea s.p.a., in grado di generare da 10 a 100 impulsi fino a 3000 V, mediante due cavi. In questo modo gli impulsi possono essere applicati a tutte le coppie di boccole presenti sulla periferica di collegamento equidistanti fra loro. Tale sistema permette di applicare gli impulsi all'elettrodo precedentemente impiantato su di una patata tagliata e preparata allo scopo.

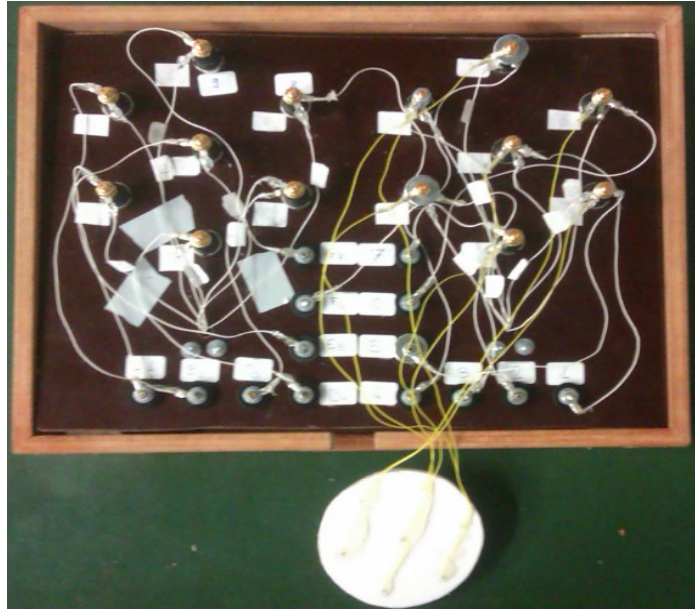


Fig.5.2: Collegamento fra la periferica di collegamento e l'elettrodo

Durante le prove sono stati registrati, mediante il generatore, i valori di tensione e corrente degli impulsi ai capi del parallelo e da cui è stato ricavato il valore di resistenza. Per ogni prova, poi, è stato fotografato l'effetto sul tessuto di patata dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore. In alcuni casi si è osservato il tessuto elettroporato al microscopio ottico.

5.2.2 Prove al microscopio ottico

Per verificare gli effetti subiti dal tessuto sottoposto a elettroporazione in alcuni casi si è analizzato al microscopio ottico lo stato delle cellule di patata confrontando il tessuto elettroporato con quello che non ha subito il trattamento. Per questo esperimento sono state eseguite due colorazioni del tessuto per visualizzare particolari diversi delle cellule: la membrana e i granuli di amido. Le cellule sono state visualizzate utilizzando ingrandimenti a 20x e 40x e le fotografie sono state acquisite mediante una macchina fotografica digitale Casio.

5.2.2.1 Colorazione della membrana

Per colorare la membrana è stato usato blu di metilene, che ha permesso di mettere in evidenza i danni subiti dalla membrana cellulare. Il blu di metilene, utilizzato in chimica come indicatore nelle reazioni di ossidazione, colora di azzurro la struttura della membrana i grani di amido si notano dal bordo colorato di azzurro .

5.2.2.2 Colorazione dell'amido

Il reattivo di Lugol è una soluzione utilizzata in biologia come colorante per marcare l'amido durante osservazioni a microscopio, è una soluzione in acqua di ioduro di potassio e iodio diluiti poi in acqua distillata in proporzione 1:4. In questo caso la membrana plasmatica è meno visibile, mentre i grani di amido diventano di colore scuro.

5.2.3 Prova in vitro

Per verificare l'effetto che l'elettrodo a maglia ha sulla permeabilizzazione delle membrane cellulari, è stato testato l'elettrodo da 1 cm su una coltura cellulare monostrato coltivata in vitro. L'efficienza dell'elettroporazione è stata visualizzata tramite due coloranti a fluorescenza: il propidio e la calceina. Il propidio non riesce a penetrare le cellule sane, ma oltrepassa la membrana plasmatica delle cellule permeabilizzate in seguito all'applicazione di impulsi elettrici. In questo modo è possibile identificare le cellule elettroporate tramite un microscopio a fluorescenza, in quanto la fluorescenza del propidio è visibile quando riesce a legarsi alle proteine ed agli acidi nucleici presenti all'interno delle cellule. La calceina invece riesce a oltrepassare facilmente la membrana cellulare di cellule vive. Per cui, poichè questo colorante è trattenuto dalle cellule solamente se queste sono vive, permette di capire quali cellule sono sopravvissute oppure no all'elettroporazione (Fig.5.3).

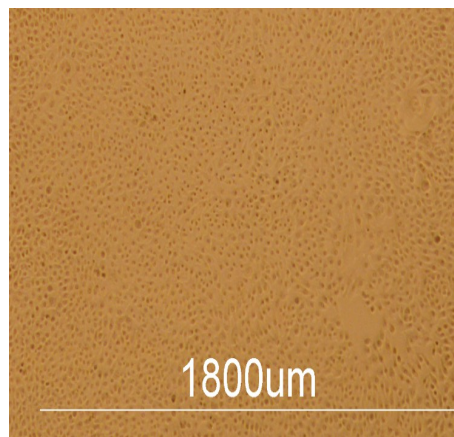


Fig.5.3: Coltura cellulare prima dell'elettroporazione

In questo esperimento sono state utilizzate cellule di osteosarcoma coltivate su una piastra Petri di diametro di 85 mm. La prova sulle cellule in vitro è stata condotta applicando 8 impulsi elettrici ad onda quadra da 1000V della durata di 100 μ s, tramite il generatore di impulsi Cliniporator™ connesso all'elettrodo a maglia di 1 cm (Fig.5.4). Dopo il trattamento la Petri è stata mantenuta alla temperatura ambiente per 2 minuti per annullare lo stress meccanico della coltura cellulare, successivamente, dopo averla lavata dal propidio, ed aver messo la calceina, è stata messa in incubazione per 5 minuti a 37°C [14].



Fig.5.4: Prova condotta su cellule in vitro con l'elettrodo a maglia da 1 cm

5.3 Elettrodo A

L'elettrodo con aghi alla distanza di 7mm vuole riprodurre l'effetto prodotto dagli elettrodi standard utilizzati nella pratica clinica. Questo elettrodo, illustrato in Fig.5.5, è stato utilizzato come riferimento per valutare l'efficacia di nuovi schemi di elettrodi.

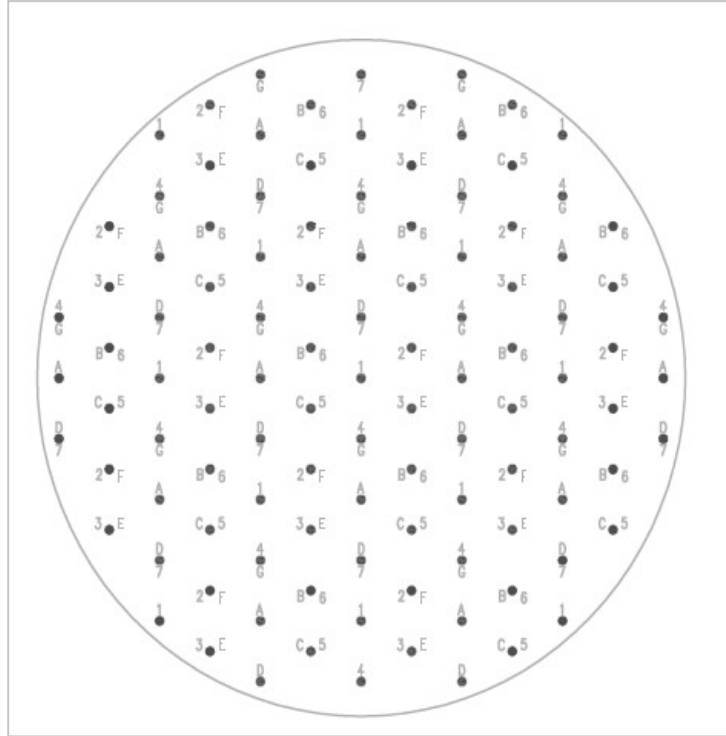


Fig.5.5: elettrodo a maglia da 7 mm

Su una base di materiale plastico rigido sono stati montati 109 aghi distanti fra loro 7 mm, per un totale di 288 coppie. Per ogni coppia vengono applicati 10 impulsi di tensione a 700V.

In Tab.5.1 è riportato il riassunto del numero di coppie di elettrodi corrispondenti che andrebbero messe in parallelo. Tale numero va da 10 a 14.

impulso	n° paralleli
1 – 2	11
1 – 3	11
1 – 4	11
1 – 5	11
1 – 6	11
1 – 7	11
2 – 3	13
3 – 4	11
4 – 5	11
5 – 6	13
6 – 7	11
7 – 2	11

impulso	n° paralleli
A – B	13
A – E	13
A – D	14
A – C	13
A – F	13
A – G	14
B – E	10
E – D	13
D – C	13
C – F	10
F – G	13
G – B	13

Tab.5.1: numero di paralleli sull'elettrodo

Conoscendo il valore della resistenza ai capi di una coppia di elettrodi (R_{el}), ottenuta applicando un impulso di tensione a 700V fra due elettrodi ad ago distanti tra loro 7mm, è possibile calcolare, tramite la (14), il numero massimo di paralleli per fare in modo che il generatore non veda ai suoi capi una R_{eq} troppo bassa e che perciò non ecceda il limite massimo della corrente erogabile dal generatore (Tab.5.2).

R_{eq}	[Ω]	17,5
$R_{periferica}$	[Ω]	1,2
$R_{elettrodo}$	[Ω]	0,5
R_{el}	[Ω]	140
n° paralleli		9

Tab.5.2: Stima del numero massimo dei paralleli

In questo caso è possibile connettere in parallelo al massimo 9 coppie. Poichè il massimo numero di coppie di elettrodi che possono essere messe in parallelo in questo caso è minore del numero delle possibili coppie che andrebbero connesse in parallelo (fino a 14) per l'elettrodo in Fig.5.5, si è diviso l'elettrodo in due porzioni come indicato in Fig.5.6, applicando poi la sequenza di impulsi alle coppie di aghi appartenenti alle due sezioni in modo separato: prima sono state alimentate le coppie di elettrodi del quadrante in alto (Q_1) e poi quelle del quadrante in basso (Q_2), così da ottenere un numero di coppie di aghi in parallelo come indicato in Tab.5.3.

impulso	n° paralleli	
	Q_1	Q_2
1 - 2	5	6
1 - 3	5	6
1 - 4	5	6
1 - 5	6	5
1 - 6	6	5
1 - 7	6	5
2 - 3	6	7
3 - 4	5	6
4 - 5	5	6
5 - 6	7	6
6 - 7	6	5
7 - 2	6	5

impulso	n° paralleli	
	Q_1	Q_2
A - B	7	6
A - E	6	7
A - D	5	9
A - C	7	6
A - F	6	7
A - G	9	5
B - E	5	5
E - D	5	8
D - C	5	8
C - F	5	5
F - G	8	5
G - B	8	5

Tab.5.3: numero di paralleli per il quadrante alto e per il quadrante basso

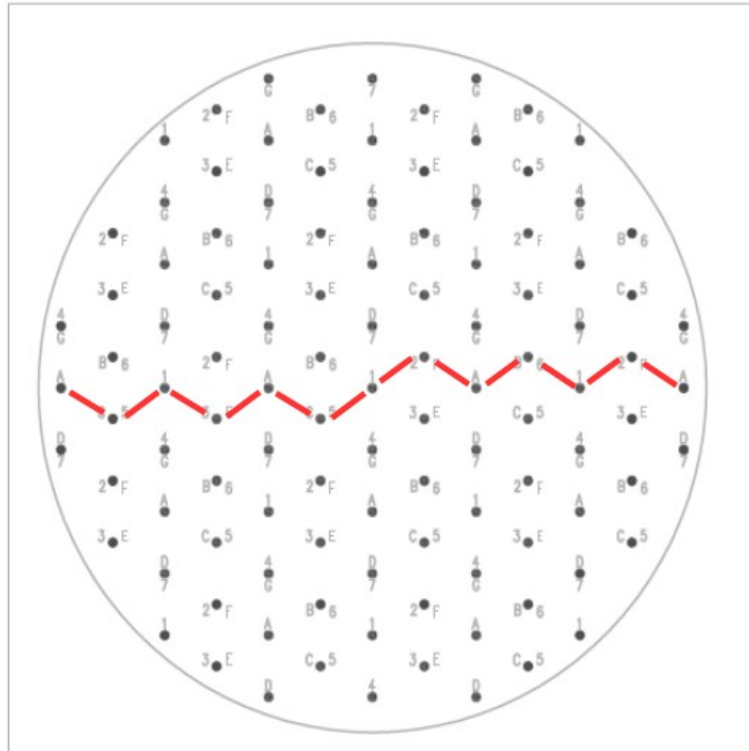


Fig.5.6: Suddivisione dell'elettrodo in modo da limitare il numero di paralleli

5.3.1 Prove sperimentali

In Tab.5.4 è riportato uno schema delle prove effettuate per l'elettrodo A con distanza fra gli aghi di 7mm. L'efficacia dell'elettroporazione con questo elettrodo è stata valutata applicando 10 impulsi di tensione a 700V ai capi di ciascuna coppia di elettrodi per due diverse lunghezze degli aghi (12 mm e 6 mm).

Per questo elettrodo si sono valutati:

- Colore del tessuto di patata per capire se si elettropora oppure no;
- Resistenze ai capi dell'elettrodo;
- Foto al microscopio ottico delle cellule elettroporate.

		P1	P2
d	[mm]	7	7
V	[V]	700	700
N° impulsi		10	10
Lunghezza aghi	[mm]	12	6

Tab.5.4: prove effettuate per l'elettrodo A

5.3.1.1 P1: lunghezza aghi 12 mm

In Tab.5.5 e Tab.5.6 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e del decimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Si ricorda che a ciascuna coppia di elettrodi indicata sono connesse più coppie di aghi in parallelo. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi utilizzando i valori di tensione e corrente dell'ultimo impulso.

Dai dati riportati si vede che:

- Dividendo in due quadranti l'elettrodo il valore della corrente resta sotto i 40 A;
- La tensione e la corrente erogata dal generatore di impulsi diminuiscono sensibilmente fra il primo ed il decimo impulso applicato per ogni coppia⁴;
- A parità di coppie in parallelo R_{e11} è inferiore rispetto a R_{e10} , mentre si dovrebbe notare una diminuzione della resistenza in conseguenza all'aumento della conducibilità delle cellule elettroporate. Questo fenomeno è dovuto al fatto che la tensione cala in funzione della corrente erogata. E mano a mano che gli impulsi si ripetono, non è possibile mantenere lo stesso campo elettrico per tutti gli impulsi;
- Considerando la corrente del primo impulso della coppia C-F del quadrante Q_1 non è detto che meno coppie sono connesse in parallelo, minore è la corrente che l'elettroporatore eroga, infatti in questo caso nonostante ci siano solamente 5 paralleli la corrente è prossima ai 40A, ed è maggiore, per esempio, alla corrente erogata nel primo impulso per la coppia A-G del quadrante Q_1 dove i paralleli sono 9. Questo fenomeno può essere dovuto al fatto che il tessuto di patata sottoposta alla prova non è uniforme dal punto di vista elettrico;
- Le resistenze misurate ai capi di una coppia di aghi sono diverse fra di loro, sia per R_{e11} che per R_{e10} . Questo è dovuto, come nel punto precedente, al comportamento elettrico del tubero che non è uniforme.

IMPULSO	Quadrante	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{10} med	I_{10} med	R_{10} Med	N. paralleli	R_{e11}	R_{e10}
		[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]		Ω	Ω
1 2	Q1	680,5	34,8	19,6	467,0	22,3	21,0	5	97,8	104,8
	Q2	672,5	26,9	25,0	501,6	19,2	26,1	6	150,3	156,6
1 3	Q1	683,3	32,0	21,3	484,6	21,1	22,9	5	106,7	114,7
	Q2	673,4	30,5	22,1	482,3	20,6	23,4	6	132,5	140,6
1 4	Q1	680,6	35,4	19,2	464,6	22,3	20,8	5	96,2	104,2
	Q2	676,4	27,2	24,8	504,9	19,3	26,2	6	149,0	157,0
1 5	Q1	680,5	35,2	19,3	477,3	21,2	22,5	6	116,1	134,9
	Q2	675,3	31,9	21,2	479,4	21,0	22,8	5	106,0	114,0
1 6	Q1	676,3	37,5	18,0	452,9	23,4	19,4	6	108,1	116,3
	Q2	675,3	28,1	24,0	497,3	19,6	25,3	5	120,1	126,7
1 7	Q1	681,0	32,6	20,9	480,9	21,7	22,2	6	125,5	132,9
	Q2	674,3	31,8	21,2	481,9	21,0	22,9	5	106,0	114,5
2 3	Q1	675,1	35,9	18,8	462,9	22,6	20,4	6	112,9	122,7
	Q2	673,2	32,8	20,5	477,3	21,3	22,4	7	143,8	156,6
3 4	Q1	676,8	35,2	19,2	467,9	22,4	20,9	5	96,2	104,3
	Q2	677,2	29,5	23,0	494,0	20,1	24,5	6	138,0	147,2
4 5	Q1	679,3	35,0	19,4	471,1	22,2	21,2	5	97,1	105,9
	Q2	680,9	29,7	22,9	496,1	20,1	24,7	6	137,5	148,4
5 6	Q1	675,9	38,4	17,6	462,9	22,6	20,5	7	123,2	143,3
	Q2	679,7	30,2	22,5	491,4	20,4	24,1	6	135,0	144,4
6 7	Q1	677,6	36,2	18,7	462,9	22,7	20,4	6	112,2	122,5
	Q2	676,9	31,6	21,4	483,5	20,9	23,2	5	107,2	115,8
7 2	Q1	674,6	35,6	19,0	464,0	22,7	20,4	6	113,9	122,7
	Q2	674,4	33,6	20,1	474,4	21,7	21,9	5	100,4	109,6

Tab.5.5: tensione corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per gli esagoni dell'elettrodo a maglia identificata con numeri (per ogni coppia la prima riga si riferisce al quadrante alto Q1, la seconda al quadrante basso Q2)

⁴Questo fenomeno è legato ad un problema del prototipo di generatore ad impulsi che non riesce a mantenere la tensione stabile

Prototipo di Elettrodo per l'ECT: Aspetti Costruttivi e prime prove

IMPULSO	Quadrante	V ₁ med	I ₁ med	R ₁ Med	V ₁₀ med	I ₁₀ med	R ₁₀ Med	N. paralleli	R _{eff1}	R _{eff10}
		[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]		Ω	Ω
A B	Q1	673,4	39,7	17,0	434,1	25,0	17,4	7	118,9	121,7
	Q2	678,5	32,3	21,0	482,2	21,3	22,7	6	125,9	136,1
A E	Q1	676,7	38,0	17,8	453,3	23,1	19,6	6	106,8	117,7
	Q2	672,7	37,8	17,8	453,2	23,4	19,4	7	124,7	135,8
A D	Q1	678,5	35,5	19,1	466,4	22,3	20,9	5	95,5	104,4
	Q2	670,1	38,4	17,4	451,2	23,7	19,1	9	156,9	171,5
A C	Q1	674,5	37,3	18,1	453,1	23,0	19,7	7	126,6	137,6
	Q2	671,6	38,2	17,6	452,0	23,7	19,1	6	105,4	114,6
A F	Q1	671,9	39,7	16,9	448,5	27,3	16,5	6	101,7	98,7
	Q2	673,6	37,4	18,0	453,0	23,1	19,6	7	126,1	137,0
A G	Q1	674,9	37,8	17,8	453,2	23,5	19,3	9	160,5	173,5
	Q2	677,8	32,5	20,9	483,4	21,4	22,6	5	104,4	112,8
B E	Q1	680,8	32,9	20,7	480,7	21,9	21,9	5	103,4	109,5
	Q2	675,6	32,5	20,8	482,9	21,5	22,5	5	103,9	112,5
E D	Q1	682,0	33,5	20,4	481,1	21,8	22,1	5	101,8	110,3
	Q2	673,9	38,4	17,5	452,8	23,7	19,1	8	140,3	153,1
D C	Q1	680,5	36,4	18,7	459,0	23,3	19,7	5	93,5	98,5
	Q2	675,6	37,5	18,0	456,5	23,4	19,5	8	144,0	156,2
C F	Q1	674,8	39,7	17,0	424,2	25,6	16,5	5	85,1	82,7
	Q2	675,8	34,6	19,5	472,3	22,2	21,3	5	97,5	106,4
F G	Q1	670,8	39,7	16,9	424,0	25,6	16,6	8	135,3	132,5
	Q2	678,7	30,6	22,2	491,5	20,6	23,9	5	110,8	119,3
G B	Q1	675,7	38,2	17,7	452,0	23,7	19,0	8	141,6	152,3
	Q2	684,8	29,3	23,4	504,0	19,9	25,3	5	117,0	126,7

Tab.5.6: tensione, corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per gli esagoni dell'elettrodo a maglia identificata con lettere (per ogni coppia la prima riga si riferisce al quadrante alto Q1, la seconda al quadrante basso Q2)

Le foto in Fig.5.7 mostrano le superfici della patata subito dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore. Si nota il colore più scuro assunto dal campione dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi.



Fig.5.7: superficie del tubero dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore

In Fig.5.8 è riportata la sezione verticale del campione dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi. Si nota che l'elettroporazione è avvenuta in profondità. Tuttavia, oltre la profondità degli aghi ($l = 12\text{mm}$) i segni tipici dell'elettroporazione si interrompono bruscamente.



Fig.5.8: sezione del tubero elettroporato dopo 24 ore

5.3.1.2 P2 : lunghezza aghi 6 mm

In Tab.5.7 e Tab.5.8 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e del decimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Si ricorda che a ciascuna coppia di elettrodi indicata sono connesse più coppie di aghi in parallelo. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze per il primo e l'ultimo impulso ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentate moltiplicando il valore della resistenza vista ai capi del generatore per il numero di paralleli di ogni coppia. Dai dati riportati si nota che:

- I valori di corrente sono minori rispetto alla prova a 12 mm;
- A parità di coppie in parallelo R_{el1} è inferiore rispetto a R_{el10} per tutte le coppie.

COPPIA	Quadrante	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{10} med	I_{10} med	R_{10} Med	N. paralleli	R_{el1}	R_{el10}
		[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]		Ω	Ω
1 2	Q1	675,3	20,7	32,7	534,6	16,6	32,3	5	163,4	161,3
	Q2	690,1	20,7	33,4	558,3	16,0	34,8	6	200,4	209,0
1 3	Q1	678,7	20,9	32,5	534,7	16,2	33,0	5	162,6	164,8
	Q2	691,7	22,2	31,1	551,8	16,7	33,0	6	186,9	198,0
1 4	Q1	678,0	23,6	28,7	524,6	17,4	30,1	5	143,4	150,7
	Q2	693,1	20,3	34,1	558,9	15,7	35,6	6	204,8	213,6
1 5	Q1	679,3	22,2	30,6	534,7	16,6	32,2	6	183,7	193,0
	Q2	689,9	22,7	30,3	546,9	17,0	32,2	5	151,7	160,9
1 6	Q1	679,5	25,0	27,2	520,5	18,1	28,7	6	163,1	172,3
	Q2	696,0	17,6	39,6	577,4	14,2	40,7	5	198,0	203,6
1 7	Q1	684,0	21,4	32,0	545,1	16,4	33,3	6	191,8	199,6
	Q2	693,1	22,9	30,2	549,0	17,0	32,3	5	151,1	161,4
2 3	Q1	682,3	23,0	29,7	534,4	17,2	31,0	6	178,3	186,0
	Q2	692,9	22,6	30,7	548,8	16,9	32,5	7	214,8	227,4
3 4	Q1	678,7	23,1	29,4	534,7	17,0	31,4	5	147,1	156,9
	Q2	692,9	20,9	33,2	561,4	15,9	35,2	6	199,0	211,3
4 5	Q1	684,1	23,4	29,2	534,7	17,2	31,1	5	146,0	155,6
	Q2	693,1	20,9	33,1	561,5	16,0	35,2	6	198,6	211,2
5 6	Q1	679,6	23,7	28,7	534,7	17,3	30,8	7	200,8	215,8
	Q2	697,3	18,6	37,5	568,6	14,7	38,6	6	225,0	231,7
6 7	Q1	688,7	22,4	30,8	535,1	16,7	32,0	6	184,7	192,2
	Q2	695,2	18,6	37,5	576,9	14,5	39,8	5	187,3	198,8
7 2	Q1	687,7	21,0	32,8	552,2	15,9	34,8	6	196,5	208,9
	Q2	690,8	23,0	30,1	544,7	17,1	31,8	5	150,3	159,0

Tab.5.7: tensione, corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per gli esagoni dell'elettrodo a maglia identificata con numeri (per ogni coppia la prima riga si riferisce al quadrante alto Q1, la seconda al quadrante basso Q2)

Prototipo di Elettrodo per l'ECT: Aspetti Costruttivi e prime prove

IMPULSO	Quadrante	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{10} med	I_{10} med	R_{10} Med	N. paralleli	R_{s1}	R_{s10}
		[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]		Ω	Ω
A B	Q1	680,8	26,8	25,4	518,0	19,3	26,9	7	177,6	188,4
	Q2	693,3	19,8	35,0	563,2	15,8	35,7	6	210,1	214,2
A E	Q1	684,6	24,4	28,1	530,5	18,0	29,5	6	168,6	177,1
	Q2	692,1	26,3	26,3	527,0	18,9	27,9	7	184,0	195,3
A D	Q1	688,8	21,9	31,5	547,0	16,9	32,5	5	157,3	162,3
	Q2	684,3	27,4	24,9	524,2	19,3	27,2	9	224,4	244,7
A C	Q1	685,4	25,2	27,2	525,5	18,3	28,7	7	190,4	200,9
	Q2	683,3	26,4	25,9	529,4	18,9	28,0	6	155,4	167,9
A F	Q1	684,3	26,8	25,5	518,2	19,0	27,3	6	153,1	163,8
	Q2	686,9	25,0	27,4	534,6	18,2	29,3	7	192,1	205,4
A G	Q1	680,4	29,0	23,4	508,2	19,9	25,5	5	117,2	127,5
	Q2	690,1	22,4	30,8	549,0	17,0	32,3	5	154,2	161,4
B E	Q1	687,0	23,5	29,2	535,1	17,6	30,4	5	145,9	151,8
	Q2	694,8	18,6	37,3	567,6	14,7	38,6	5	186,5	193,1
E D	Q1	690,3	19,6	35,3	559,8	15,3	36,5	5	176,4	182,7
	Q2	691,0	24,7	28,0	534,9	17,7	30,2	8	224,2	242,0
D C	Q1	688,4	19,4	35,5	564,7	15,0	37,8	5	177,6	188,8
	Q2	690,4	24,8	27,9	534,7	17,8	30,0	8	223,0	240,0
C F	Q1	690,8	22,3	31,0	548,8	16,6	33,1	5	154,8	165,5
	Q2	693,8	21,4	32,4	563,0	16,2	34,8	5	162,2	173,9
F G	Q1	688,2	26,2	26,2	529,7	18,4	28,7	8	209,9	229,9
	Q2	694,4	19,2	36,2	564,9	14,9	38,0	5	180,8	189,9
G B	Q1	686,7	27,6	24,8	520,3	19,3	27,0	8	198,7	215,9
	Q2	693,1	17,1	40,6	580,9	13,8	42,2	5	203,1	210,8

Tab.5.8: tensione, corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per gli esagoni dell'elettrodo a maglia identificata con lettere (per ogni coppia la prima riga si riferisce al quadrante alto Q1, la seconda al quadrante basso Q2).

Le foto in Fig.5.9 mostrano le superfici della patata subito dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore. Ad un esame visivo la superficie è elettroporata in modo uniforme e presenta contorni ben definiti.



Fig.5.9: patata subito dopo l'applicazione di impulsi e dopo 24 ore

In Fig.5.10 è riportata la sezione verticale del campione. Il tessuto elettroporato presenta un colore nero per tutta la profondità dell'elettrodo, oltre tale profondità il colore scuro si interrompe in modo brusco.



Fig.5.10: sezione del tubero, si può notare che l'elettroporazione è avvenuta in modo omogeneo per tutto lo spessore di penetrazione dell'elettrodo a maglia.

5.3.2 Prove al microscopio

In Fig.5.11 e in Fig.5.12 sono riportate due immagini, ottenute al microscopio ottico, di campioni di patata, rispettivamente prelevati in una zona dove il tubero era sano ed in una zona dove invece è avvenuta l'elettroporazione con 10 impulsi a 700V. I due campioni sono stati colorati con il reattivo di Lugol per mettere in risalto i granuli di amido.

Le foto sono ottenute con luce bianca e con un ingrandimento a 20x.

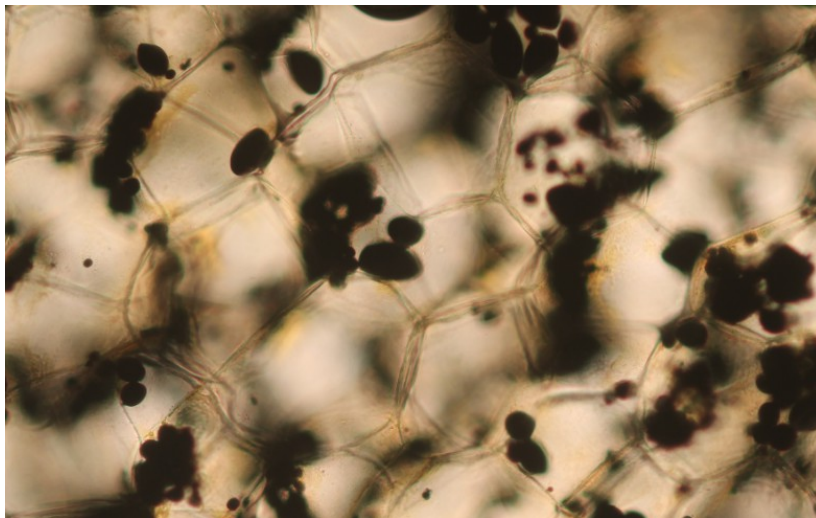


Fig.5.11: visione a microscopio di cellule di patate sane

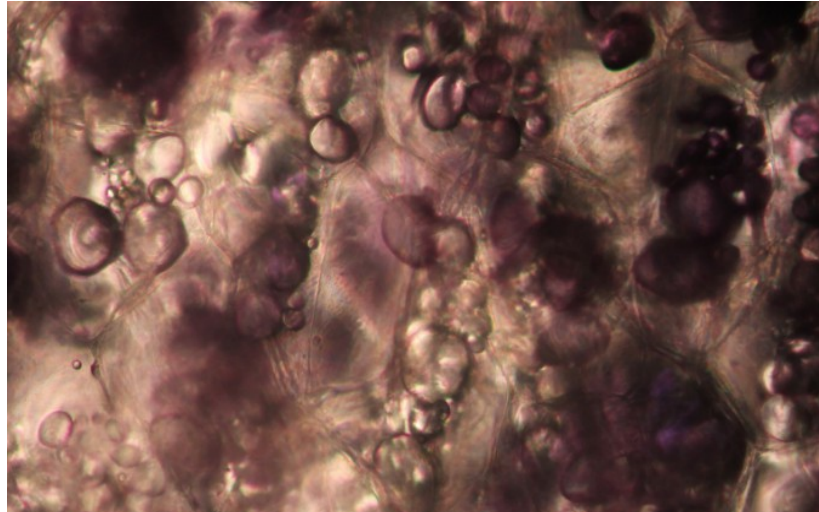


Fig.5.12: cellule elettroporate con elettrodo a maglia da 7mm con un treno di 10 impulsi da 700V

Si può notare come le cellule su cui non sono stati applicati impulsi di tensione presentino contorni regolari e ben definiti, mentre nelle cellule sottoposte ad elettroporazione le membrane cellulari risultano sfaldate ed irregolari.

5.4 Elettrodo B

Su una base di materiale plastico rigido sono stati montati 55 aghi distanti fra loro 1 cm, per un totale di 138 coppie (Fig.5.13).

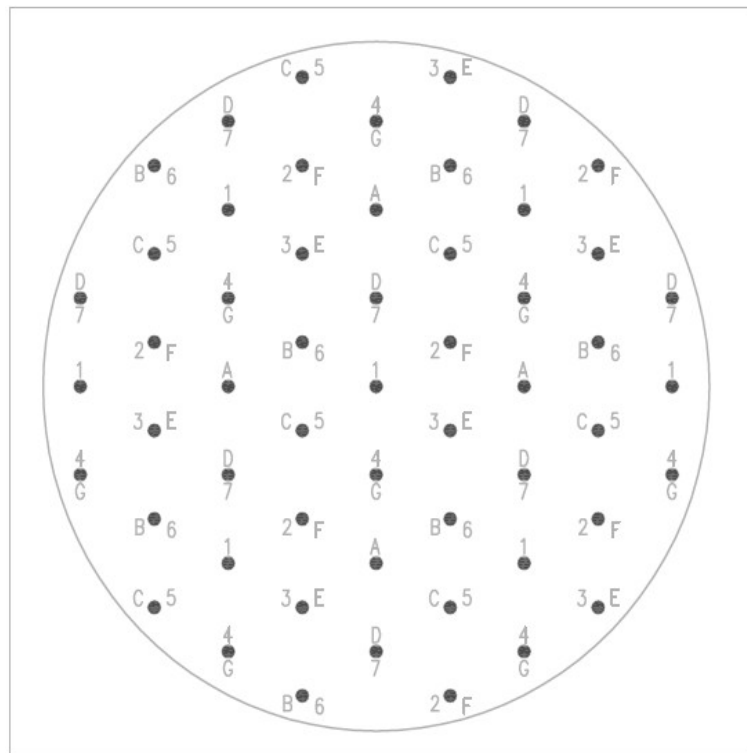


Fig.5.13: elettrodo a maglia da 1 cm

Il numero di paralleli da considerare in questo caso sono evidenziati in Tab.5.9:

1 – 2	6
1 – 3	6
1 – 4	7
1 – 5	6
1 – 6	6
1 – 7	7
2 – 3	6
3 – 4	7
4 – 5	7
5 – 6	6
6 – 7	7
7 – 2	7

A – B	4
A – E	4
A – D	4
A – C	4
A – F	4
A – G	4
B – E	6
E – D	6
D – C	6
C – F	6
F – G	6
G – B	6

Tab.5.9: numero di paralleli sull'elettrodo B

Conoscendo il valore della resistenza ai capi di una coppia di elettrodi (R_{el}), ottenuta applicando 1000V fra una coppia di elettrodi ad ago distanti tra loro 1 cm, è possibile calcolare, tramite la (14), il numero massimo di paralleli per fare in modo che il generatore non veda ai suoi capi una R_{eq} troppo bassa e che perciò non ecceda il limite massimo della corrente erogabile dal generatore (Tab.5.10).

R_{eq}	[Ω]	25
$R_{periferica}$	[Ω]	1,2
$R_{elettrodo}$	[Ω]	0,5
R_{el}	[Ω]	165
n° paralleli		7

Tab.5.10: Stima del numero massimo dei paralleli

Il numero massimo possibile di paralleli calcolati è 7, perciò non è necessario dividere l'elettrodo.

5.4.1 Prove sperimentali

In Tab.5.11 sono riportate le prove effettuate per l'elettrodo B con distanza fra gli aghi di 1 cm. L'efficacia dell'elettroporazione con questo elettrodo è stata valutata applicando 10 impulsi di tensione a 1000V e 50 impulsi a 650V ai capi di ciascuna coppia di elettrodi per due diverse lunghezze degli aghi (12 mm e 6 mm).

Per questo elettrodo si sono valutati:

- Colore del tessuto di patata per capire se è elettroporata oppure no;
- Resistenze ai capi dell'elettrodo;
- Foto al microscopio ottico delle cellule elettroporate.

PROVA		P1	P2	P3	P4
d	[mm]	10	10	10	10
V	[V]	1000	650	1000	650
N° impulsi		10	50	10	50
Lunghezza aghi	[mm]	12	12	6	6

Tab.5.11: Prove effettuate per l'elettrodo B

5.4.1.1 P1: lunghezza aghi 12 mm

In Tab.5.12 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e del decimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Si ricorda che a ciascuna coppia di elettrodi indicata sono connesse più coppie di aghi in parallelo. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentate.

Dai dati riportati si vede che:

- Nonostante il numero di paralleli non sia elevato come nell'elettrodo A nei primi impulsi per le coppie che vanno da 1-7 a 7-2 e per quelle da B-E a G-B si notano valori di corrente prossimi a 40A.
- Per tutte le coppie, visto l'alto valore di corrente erogata, la tensione decresce vistosamente man mano che gli impulsi si ripetono⁵.

IMPULSO	V ₁ med	I ₁ med	R ₁ Med	V ₁₀ med	I ₁₀ med	R ₁₀ Med	N. paralleli	R _{el1} Med	R _{el10} Med
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]		[Ω]	[Ω]
1 2	960,2	32,5	29,5	732,4	25,4	28,8	6	177,2	172,9
1 3	961,4	35,2	27,3	727,3	26,1	27,9	6	163,9	167,2
1 4	959,1	38,7	24,8	708,3	27,8	25,5	7	173,4	178,6
1 5	962,5	36,8	26,2	719,3	26,9	26,7	6	157,1	160,2
1 6	965,6	38,4	25,2	713,5	27,8	25,7	6	151,1	154,0
1 7	963,7	39,7	24,3	697,9	29,2	23,9	7	170,1	167,4
2 3	966,9	39,6	24,4	705,0	28,0	25,2	6	146,3	151,0
3 4	960,7	39,7	24,2	693,1	28,9	24,0	7	169,6	167,9
4 5	960,9	39,7	24,2	693,1	29,2	23,7	7	169,6	165,9
5 6	967,6	39,7	24,4	702,0	28,3	24,8	6	146,4	148,6
6 7	962,6	39,7	24,3	680,7	30,1	22,6	7	169,9	158,4
7 2	962,6	39,7	24,3	684,5	30,0	22,8	7	169,9	159,7
A B	975,3	33,7	29,0	750,3	25,2	29,8	4	115,9	119,3
A E	975,0	34,2	28,5	748,2	25,2	29,7	4	113,9	118,7
A D	973,6	35,4	27,5	742,3	25,9	28,7	4	109,9	114,7
A C	976,2	34,7	28,2	751,3	25,5	29,5	4	112,6	118,0
A F	981,3	34,7	28,3	750,9	25,6	29,4	4	113,3	117,5
A G	973,3	36,4	26,8	737,8	26,5	27,8	4	107,1	111,2
B E	968,7	39,7	24,4	693,3	29,9	23,2	6	146,6	139,0
E D	960,8	39,7	24,2	679,9	30,9	22,0	6	145,4	132,1
D C	963,4	39,7	24,3	680,4	30,9	22,0	6	145,8	132,2
C F	964,9	39,7	24,3	696,4	29,8	23,4	6	146,0	140,2
F G	966,0	39,7	24,4	694,0	30,2	23,0	6	146,1	137,7
G B	966,9	39,7	24,4	682,6	31,2	21,9	6	146,3	131,4

Tab.5.12: tensione, corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo a maglia

Le foto in Fig.5.14 mostrano le superfici della patata subito dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore. Si può notare come l'elettroporazione è avvenuta in modo uniforme su tutta la superficie.

⁵Questo fenomeno è legato ad un problema del prototipo di generatore ad impulsi che non riesce a mantenere la tensione stabile.



Fig.5.14: superficie del tubero dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore

In Fig.5.15 è riportata la sezione verticale del tubero lungo tutta la profondità degli elettrodi ad ago si nota che il colore nero assunto dalla patata è uniforme. Oltre tale profondità l'imbrunimento si interrompe bruscamente



Fig.5.15: Sezione del tubero elettroporato dopo 24 ore

5.4.1.2 P2: lunghezza aghi 12 mm

In Tab.5.13 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e dell'ultimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi. La prova è stata eseguita a 650V perchè è il valore minimo di tensione che l'elettroporatore è in grado di fornire.

Dai dati riportati si nota che:

- Essendo la tensione degli impulsi impostata a 650V, la corrente ha minor intensità rispetto alla prova P1, e perciò non viene limitata dalla protezione di massima corrente della macchina;
- Tranne che per la coppia G-B, tutte le altre coppie hanno impulsi mancanti;
- Nonostante la corrente non sia elevata come in P1 la tensione si abbassa per tutte le coppie man mano che si ripetono gli impulsi;
- Tranne che per le coppie 1-2, 1-3 e 1-4 a parità di coppie in parallelo R_{el1} è inferiore rispetto a R_{el50} per tutte le coppie.

Prototipo di Elettrodo per l'ECT: Aspetti Costruttivi e prime prove

IMPULSO	V ₁ med	I ₁ med	R ₁ Med	V ₅₀ med	I ₅₀ med	R ₅₀ Med	N. paralleli	N° ultimo impulso	R _{es1} Med	R _{es50} Med
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]			[Ω]	[Ω]
1 2	635,7	21,7	29,3	574,9	24,3	23,7	6	43	175,8	141,9
1 3	639,8	24,7	25,9	597,3	23,9	25,0	6	43	155,3	150,2
1 4	634,6	28,7	22,1	592,0	25,8	23,0	7	43	154,8	160,7
1 5	638,9	27,9	22,9	597,3	25,0	23,9	6	43	137,2	143,3
1 6	637,2	28,1	22,7	558,1	23,4	23,9	6	45	135,9	143,2
1 7	632,7	31,0	20,4	567,2	26,2	21,6	7	44	142,8	151,5
2 3	636,9	29,4	21,7	597,6	25,9	23,0	6	43	129,9	138,2
3 4	633,3	29,9	21,2	592,3	26,0	22,7	7	42	148,3	159,2
4 5	635,5	31,1	20,5	614,9	28,2	21,8	7	42	143,3	152,6
5 6	637,5	29,8	21,4	594,3	26,2	22,7	6	45	128,4	136,1
6 7	635,1	32,0	19,9	613,5	29,0	21,2	7	42	139,1	148,1
7 2	636,6	32,1	19,8	571,8	26,9	21,3	7	44	138,8	149,1
A B	642,8	23,1	27,9	606,4	20,8	29,2	4	43	111,5	116,9
A E	635,7	23,4	27,1	606,7	20,6	29,5	4	42	108,5	118,0
A D	640,5	24,5	26,2	606,7	21,6	28,1	4	44	104,7	112,5
A C	640,4	24,2	26,5	560,6	19,4	28,9	4	45	105,9	115,6
A F	641,1	24,3	26,4	608,9	21,6	28,2	4	42	105,7	112,9
A G	642,0	25,5	25,2	607,1	22,0	27,6	4	43	100,7	110,5
B E	634,4	31,2	20,4	594,3	27,1	21,9	6	42	122,1	131,4
E D	633,8	31,3	20,3	589,1	27,2	21,6	6	43	121,6	129,8
D C	627,9	32,8	19,1	633,8	31,0	20,5	6	41	114,8	122,7
C F	633,6	31,4	20,2	569,8	26,6	21,4	6	44	121,2	128,5
F G	633,1	32,4	19,6	569,0	27,0	21,1	6	42	117,4	126,6
G B	634,9	32,9	19,3	452,5	21,0	21,6	6	50	115,8	129,4

Tab.5.13: tensione, corrente e resistenza del primo e dell'ultimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo a maglia (V₅₀, I₅₀, R₅₀ identificano i valori corrispondenti all'impulso considerato come ultimo)

Come testimoniato dalla Fig.5.16 ad un esame visivo il tessuto di patata presenta un'elettroporazione omogenea su tutta la sua superficie.



Fig.5.16: superficie del tubero subito dopo l'applicazione di impulsi e dopo 24 ore

In Fig.5.17 è riportata la sezione verticale del campione dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi. Si nota che l'elettroporazione è avvenuta in profondità. Oltre la profondità degli aghi i segni tipici dell'elettroporazione si interrompono bruscamente.



Fig.5.17: Sezione della patata dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi

5.4.1.3 P3: lunghezza aghi 6 mm

In Tab.5.14 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e del decimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentate. Si può notare che:

- La minor lunghezza degli aghi fa in modo che a parità di tensione gli impulsi di corrente siano di entità minore e perciò i valori di resistenza sono sensibilmente maggiori rispetto ai casi in cui la lunghezza degli aghi è di 12 mm;
- Nonostante gli impulsi di corrente siano compresi fra 20A e 30A , la loro tensione cala durante la successione degli impulsi.

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{10} med	I_{10} med	R_{10} Med	N. paralleli	R_{e1} Med	R_{e10} Med
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]		[Ω]	[Ω]
1 2	974,6	22,7	43,0	808,0	19,8	40,8	6	258,2	245,0
1 3	974,9	25,1	38,8	802,2	20,7	38,7	6	232,6	232,2
1 4	971,2	28,3	34,3	786,4	22,8	34,5	7	240,1	241,3
1 5	971,8	26,7	36,4	799,9	21,1	37,8	6	218,6	227,0
1 6	974,7	27,0	36,1	799,8	21,5	37,2	6	216,3	223,2
1 7	972,4	29,1	33,4	786,6	23,0	34,2	7	233,8	239,4
2 3	974,1	27,3	35,7	798,0	21,6	36,9	6	214,2	221,2
3 4	972,5	28,7	33,9	788,7	22,9	34,5	7	237,0	241,2
4 5	973,5	28,9	33,6	782,7	22,7	34,4	7	235,5	241,0
5 6	974,2	26,8	36,3	807,9	21,1	38,3	6	218,0	230,0
6 7	972,6	29,3	33,2	786,8	23,4	33,6	7	232,7	235,0
7 2	975,2	29,0	33,6	790,3	23,2	34,1	7	235,1	238,7
A B	977,4	21,4	45,6	832,6	18,2	45,7	4	182,5	182,7
A E	980,0	21,8	45,0	835,9	18,2	45,9	4	179,9	183,7
A D	981,3	22,6	43,4	829,3	18,7	44,4	4	173,5	177,5
A C	981,1	22,0	44,7	836,6	18,1	46,1	4	178,8	184,5
A F	979,6	22,0	44,4	836,9	18,2	46,0	4	177,8	184,2
A G	981,0	23,3	42,1	823,8	19,3	42,8	4	168,5	171,2
B E	973,1	28,8	33,8	792,9	23,7	33,5	6	202,6	201,1
E D	973,2	28,8	33,8	793,0	23,6	33,5	6	203,0	201,2
D C	975,3	28,7	34,0	793,4	23,4	33,8	6	203,8	203,0
C F	978,6	26,7	36,6	809,4	22,0	36,8	6	219,7	220,8
F G	977,6	28,6	34,2	797,2	23,2	34,3	6	205,4	206,0
G B	974,4	29,3	33,3	789,6	23,5	33,5	6	199,6	201,3

Tab.5.14: tensione, corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo a maglia

Dalla Fig.5.18 si vede che l'applicazione degli impulsi è stata efficace sulla superficie trattata che risulta elettroporata con dei contorni ben definiti.



Fig.5.18: superficie del tubero dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore

Analizzando la sezione di Fig.5.19 l'imbrunimento del tessuto risulta essere omogeneo nei primi 6 mm, mentre, aumentando la profondità, il tessuto risulta essere elettroporato ma non in modo omogeneo come avviene negli strati più superficiali.



Fig.5.19: sezione della patata dopo 24 ore

5.4.1.4 P4: lunghezza aghi 6 mm

In Tab.5.15 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e dell'ultimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentata. La prova è stata eseguita a 650V perchè è il valore minimo che l'elettroporatore è in grado di fornire. Dai dati riportati si nota che:

- Le resistenze sono maggiori rispetto alla prova P2 a causa della minor lunghezza degli aghi;
- Non si è riusciti ad applicare 50 impulsi per nessuna coppia;
- Il valore contenuto di corrente erogata degli impulsi fa decrescere in modo minore la tensione rispetto ai casi precedenti.

Prototipo di Elettrodo per l'ECT: Aspetti Costruttivi e prime prove

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{50} med	I_{50} med	R_{50} Med	N. paralleli	N°ultimo impulso	R_{511} Med	R_{950} Med
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]			[Ω]	[Ω]
1 2	652,7	12,7	51,4	603,9	13,4	44,9	6	44	308,3	269,6
1 3	649,7	14,2	45,8	649,7	14,1	46,0	6	41	275,0	275,8
1 4	649,9	15,7	41,3	627,2	14,1	44,6	7	41	289,2	311,9
1 5	648,5	15,1	42,8	648,3	14,1	46,1	6	44	256,9	276,6
1 6	649,9	15,6	41,7	606,0	13,4	45,1	6	45	250,2	270,4
1 7	649,6	16,3	40,0	649,4	15,1	43,1	7	41	279,8	301,6
2 3	649,6	16,0	40,5	649,8	14,9	43,5	6	41	243,1	261,0
3 4	646,8	16,1	40,2	591,1	13,6	43,6	7	46	281,5	305,3
4 5	649,2	16,2	40,1	649,9	15,1	43,1	7	41	280,4	302,0
5 6	649,9	15,1	43,1	649,0	13,8	47,1	6	41	258,8	282,8
6 7	649,7	16,3	39,8	577,9	13,2	43,7	7	47	278,3	305,7
7 2	645,5	15,8	41,0	649,9	14,4	45,3	7	41	286,7	316,8
A B	649,9	12,7	51,3	649,9	12,1	53,9	4	41	205,1	215,7
A E	649,4	12,7	51,0	649,9	11,5	56,4	4	41	203,9	225,7
A D	649,4	12,7	51,0	649,9	11,5	56,4	4	41	203,9	225,7
A C	649,8	12,4	52,5	650,8	11,1	58,6	4	41	209,8	234,3
A F	654,3	12,3	53,0	651,0	11,1	58,6	4	41	211,9	234,2
A G	649,6	12,7	51,2	649,9	11,4	56,8	4	41	204,9	227,3
B E	649,4	16,7	38,9	649,4	15,3	42,6	6	41	233,6	255,3
E D	649,1	15,9	40,7	649,4	14,8	43,9	6	41	244,3	263,6
D C	649,7	15,5	41,9	649,9	14,5	44,9	6	41	251,6	269,7
C F	650,1	15,1	42,9	650,5	14,1	46,2	6	42	257,6	277,1
F G	649,9	15,3	42,5	649,9	14,6	44,6	6	41	254,7	267,4
G B	641,7	16,8	38,3	649,4	15,4	42,2	6	41	229,9	252,9

Tab.5.15: tensione, corrente e resistenza del primo e dell'ultimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo a maglia (V_{50} , I_{50} , R_{50} identificano i valori corrispondenti all'impulso considerato come ultimo)

Dalla Fig.5.20 si evince che l'elettroporazione è risultata efficace su tutta la superficie della patata interessata al trattamento, ed i contorni sono ben definiti.



Fig.5.20: superficie della patata subito dopo l'applicazione di 50 impulsi a 650 V a e dopo 24 ore

Mentre in Fig.5.21 si vede che per tutta la lunghezza degli aghi (6 mm) il colore più scuro assunto dal tubero è evidente, mentre aumentando la profondità tale effetto è sempre meno evidente.



Fig.5.21: sezione verticale del tubero elettroporato dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi

5.4.2 Prove al microscopio

Come per l'elettrodo A trattando un campione elettroporato con 10 impulsi da 1000V con il reattivo di Lugol, e fotografando le cellule al microscopio con un ingrandimento a 20x, si nota che le membrane cellulari risultano ingrossate e non ben definite; inoltre in alcuni punti le membrane cellulari presentano lacerazioni (Fig.5.22).

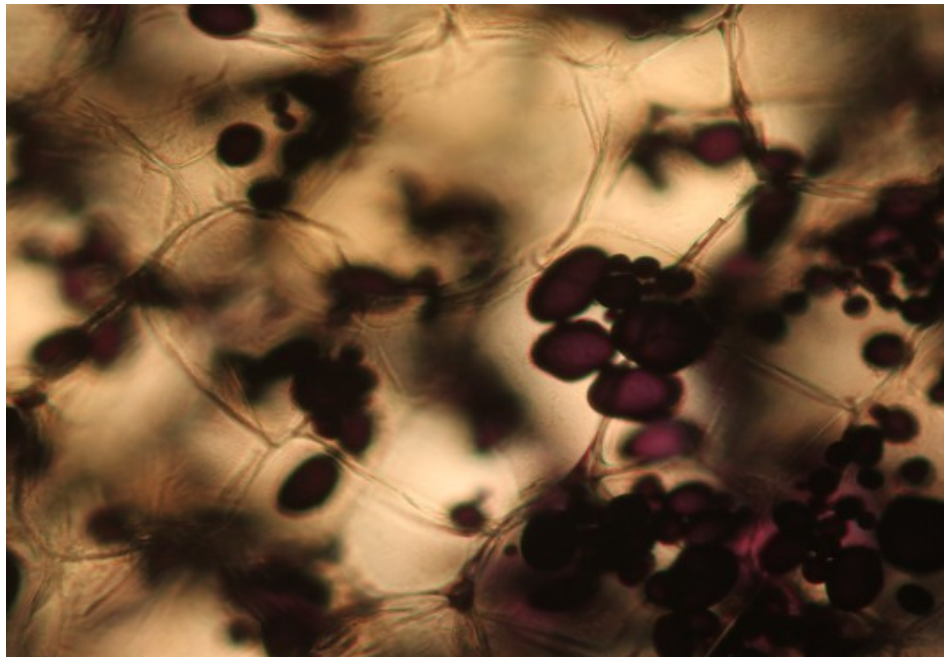


Fig.5.22: cellule elettroporate con elettrodo a maglia da 1cm con 10 impulsi da 1000V

5.5 Elettrodo C

Su una base circolare di materiale plastico rigido sono stati montati 13 aghi distanti fra loro 2 cm, per un totale di 24 coppie (Fig.5.23).

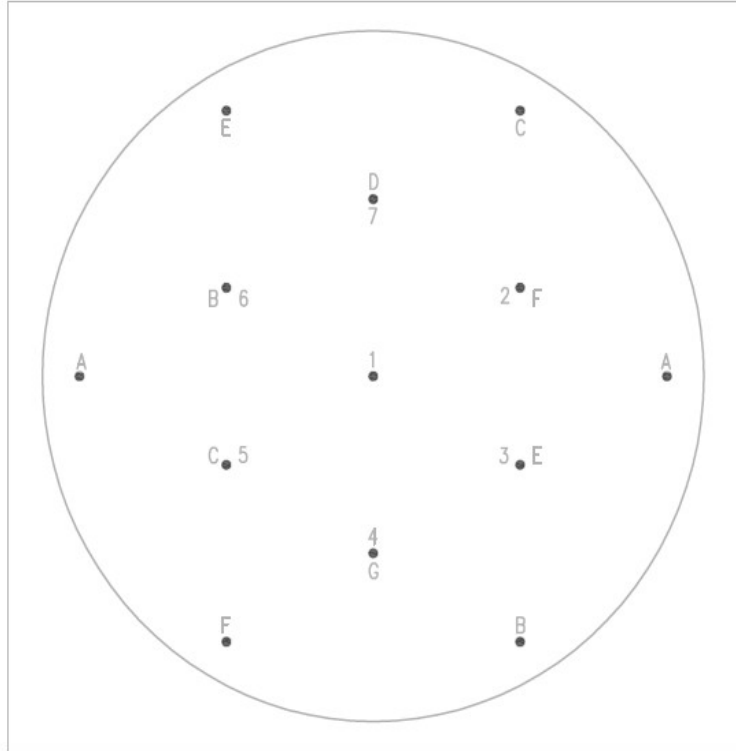


Fig.5.23: elettrodo a maglia di 2 cm

Rispetto alla sequenza di impulsi utilizzata per l'elettrodo a 7mm e per quello a 1 cm in questo caso si saltano le coppie A – G e A – D perchè non presenti sull'elettrodo (Tab.5.16).

impulso	n° paralleli
1 – 2	1
1 – 3	1
1 – 4	1
1 – 5	1
1 – 6	1
1 – 7	1
2 – 3	1
3 – 4	1
4 – 5	1
5 – 6	1
6 – 7	1
7 – 2	1

impulso	n° paralleli
A – B	1
A – E	1
A – D	0
A – C	1
A – F	1
A – G	0
B – E	2
E – D	1
D – C	1
C – F	2
F – G	1
G – B	1

Tab.5.16:sequenza degli impulsi e numero di paralleli per l'elettrodo C

5.5.1 Prove sperimentali

In Tab.5.17 sono riportate le prove effettuate con l'elettrodo C con distanza fra gli aghi di 1 cm. L'efficacia dell'elettroporazione con questo elettrodo è stata valutata applicando 10 impulsi di tensione a 2000V e 50 impulsi a 1000V ai capi di ciascuna coppia di elettrodi per due diverse lunghezze degli aghi (12 mm e 6 mm).

Per questo elettrodo si sono valutati:

- Il colore del tessuto di patata per capire se è elettroporata oppure no;
- Le resistenze ai capi dell'elettrodo;
- Sono state fatte delle foto al microscopio ottico per visualizzare le cellule elettroporate.

PROVA		P1	P2	P3	P4
d	[mm]	20	20	20	20
V	[V]	2000	1000	2000	1000
N° impulsi		10	50	10	50
Lunghezza aghi	[mm]	12	12	6	6

Tab.5.17: Prove effettuate per l'elettrodo B

5.5.1.1 P1: lunghezza aghi 12 mm

In Tab.5.18 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e del decimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Si ricorda che per alcune coppie di elettrodi indicate in Tab.5.16 sono connesse due coppie di aghi in parallelo. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentate.

Dai dati riportati si vede che:

- La tensione decresce in funzione della corrente erogata durante la successione degli impulsi;
- L'aumento della permeabilità delle cellule in conseguenza all'applicazione degli impulsi è evidente in quanto la resistenza al decimo impulso è minore rispetto a quella del primo impulso.

Prototipo di Elettrodo per l'ECT: Aspetti Costruttivi e prime prove

IMPULSO	V ₁ med	I ₁ med	R ₁ Med	V ₁₀ med	I ₁₀ med	R ₁₀ Med	N. paralleli	R _{el1}	Rel ₁₀
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]		[Ω]	[Ω]
1 2	1998,7	14,5	137,6	1863,3	16,5	113,3	1	137,6	113,3
1 3	1995,9	15,3	130,7	1865,7	16,2	115,0	1	130,7	115,0
1 4	2002,9	10,9	183,3	1905,8	11,6	163,7	1	183,3	163,7
1 5	1996,4	16,6	120,3	1855,3	17,1	108,8	1	120,3	108,8
1 6	1991,8	16,3	122,5	1857,1	16,8	110,4	1	122,5	110,4
1 7	2002,9	14,0	143,6	1878,7	14,7	127,7	1	143,6	127,7
2 3	1992,9	20,1	99,3	1826,3	19,8	92,5	1	99,3	92,5
3 4	2003,2	12,6	158,5	1888,2	13,1	144,6	1	158,5	144,6
4 5	2003,2	12,7	157,7	1892,0	13,1	144,2	1	157,7	144,2
5 6	1989,0	19,1	104,4	1830,6	18,7	98,0	1	104,4	98,0
6 7	1993,7	15,2	130,8	1867,3	15,6	119,4	1	130,8	119,4
7 2	1992,6	16,2	122,8	1857,8	16,8	110,5	1	122,8	110,5
A B	1992,7	19,2	104,0	1833,1	19,1	95,9	1	104,0	95,9
A E	1989,0	20,7	96,3	1820,8	20,1	90,4	1	96,3	90,4
A C	1992,3	20,9	95,5	1822,2	20,1	90,7	1	95,5	90,7
A F	1989,0	22,2	89,7	1811,1	21,7	83,6	1	89,7	83,6
B E	1990,9	22,6	88,2	1809,3	22,2	81,6	2	176,4	163,2
E D	1993,8	17,6	113,4	1845,0	18,1	102,1	1	113,4	102,1
D C	1992,6	18,7	106,9	1839,6	19,0	96,7	1	106,9	96,7
C F	1986,0	24,8	80,0	1787,4	24,8	72,2	2	159,9	144,3
F G	1997,7	14,3	139,4	1873,6	15,0	125,2	1	139,4	125,2
G B	1995,3	13,9	144,1	1875,9	14,3	130,7	1	144,1	130,7

Tab.5.18: tensione, corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo C

Come si può notare dalla Fig.5.24 il tessuto sottoposto alla sequenza di scarica è elettroporato nella parte centrale, mentre verso l'esterno presenta zone in cui il colore scuro è localizzato oppure non uniforme.



Fig.5.24: patata subito dopo l'applicazione di impulsi con l'elettrodo C e dopo 24 ore

Dalla Fig.5.25 si vede che per tutta la lunghezza degli aghi la patata è elettroporata, mentre man mano che la profondità aumenta il colore più scuro del tubero è sempre meno evidente, soprattutto nella zona centrale della sezione verticale.



Fig.5.25: sezione del tubero elettroporato dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi

5.5.1.2 P2: lunghezza aghi 12 mm

In Tab.5.19 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e dell'ultimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentate. La prova è stata eseguita applicando 50 impulsi a 1000V.

Dai dati riportati si nota che:

- Confrontando, ad esempio la R_{e1} delle coppie 1-2 e A-F, si nota che il loro valore è molto diverso. Da ciò si deduce che il tessuto sottoposto all'elettroporazione non è omogeneo ed isotropo dal punto di vista elettrico;
- I valori di corrente non superano mai i 10 A, e la tensione degli impulsi non cala;
- In nessuna coppia si riescono ad applicare 50 impulsi.

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{50} med	I_{50} med	R_{50} Med	N. paralleli	N° ultimo impulso	R_{e1}	R_{e50}
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]			[Ω]	[Ω]
1 2	997,6	4,3	234,4	967,4	5,1	189,1	1	46	234,4	189,1
1 3	995,5	4,5	220,1	969,0	4,7	204,6	1	45	220,1	204,6
1 4	1002,1	4,1	242,6	980,4	4,2	233,2	1	46	242,6	233,2
1 5	1001,3	5,0	198,9	977,7	5,1	190,6	1	46	198,9	190,6
1 6	1002,9	5,1	195,2	981,1	5,2	187,0	1	45	195,2	187,0
1 7	1009,2	4,4	229,1	981,1	4,4	223,0	1	46	229,1	223,0
2 3	1000,6	6,9	145,9	980,4	6,9	142,9	1	45	145,9	142,9
3 4	1003,4	5,2	191,9	980,4	6,9	142,9	1	44	191,9	142,9
4 5	1008,0	5,5	182,3	981,8	5,6	175,5	1	46	182,3	175,5
5 6	1005,7	5,7	176,6	981,1	5,6	174,6	1	45	176,6	174,6
6 7	1009,4	7,0	144,6	981,1	6,7	145,9	1	43	144,6	145,9
7 2	1003,2	5,9	169,1	991,2	5,8	171,1	1	44	169,1	171,1
A B	1009,0	6,9	146,9	984,3	7,1	138,0	1	45	146,9	138,0
A E	1002,9	7,4	135,7	966,7	7,0	137,8	1	43	135,7	137,8
A C	1009,2	7,5	134,0	979,5	7,2	136,6	1	44	134,0	136,6
A F	1007,6	7,9	128,4	980,9	7,5	131,0	1	44	128,4	131,0
B E	995,7	9,2	109,2	952,5	9,0	108,5	2	44	218,3	216,9
E D	1009,7	6,8	149,0	991,2	6,7	148,6	1	44	149,0	148,6
D C	1003,9	6,8	147,8	981,1	6,8	145,3	1	45	147,8	145,3
C F	1009,2	9,7	104,6	980,2	9,5	103,7	2	44	209,1	207,3
F G	1009,0	7,5	134,4	980,4	7,3	133,7	1	44	134,4	133,7
G B	1008,9	7,3	138,4	980,6	7,2	136,1	1	43	138,4	136,1

Tab.5.19: tensione, corrente e resistenza del primo e dell'ultimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo C (V_{50} , I_{50} , R_{50} identificano i valori corrispondenti all'impulso considerato come ultimo)

In Fig.5.26 è mostrato il tubero sottoposto all'esperimento dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi. Il tessuto presenta un colore scuro distribuito in modo uniforme su tutta la superficie, ma in profondità, oltre a qualche zona localizzata, sembra non essere stato elettroporato se non in zone circoscritte in prossimità delle punte degli aghi.



Fig.5.26: Vista in sezione dopo 24 ore dall'applicazione del trattamento

Dopo 30 ore guardando in sezione verticale il tubero (Fig.5.27), risulta più evidente la colorazione nera, segno che l'elettroporazione è avvenuta in modo corretto. Questo sta a significare che, vista la natura estremamente variabile del tessuto sottoposto all'esperimento, è necessario tenere in osservazione i campioni anche per le successive ore e verificare se avvengono cambiamenti significativi.



Fig.5.27: sezione del tessuto elettroporato dopo 30 ore dall'applicazione degli impulsi

5.5.1.3 P3: lunghezza aghi 6 mm

In Tab.5.20 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e del decimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentata. Si può notare che:

- La minor lunghezza degli aghi fa in modo che a parità di tensione gli impulsi di corrente siano di entità minore e perciò i valori di resistenza sono sensibilmente maggiori rispetto ai casi in cui la lunghezza degli aghi è di 12 mm;
- Date le intensità di corrente in gioco la corrente decade in misura minore rispetto all'elettrodo A e B.

Prototipo di Elettrodo per l'ECT: Aspetti Costruttivi e prime prove

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{10} med	I_{10} med	R_{10} Med	N. paralleli	R_{e1}	Re_{50}
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]		[Ω]	[Ω]
1 2	2017,5	7,6	264,5	1945,6	9,0	217,1	1	264,5	217,1
1 3	2017,6	8,1	248,1	1945,3	9,2	211,8	1	248,1	211,8
1 4	2017,8	6,8	297,3	1960,0	7,7	254,2	1	297,3	254,2
1 5	2017,8	8,7	233,2	1937,3	9,6	201,0	1	233,2	201,0
1 6	2017,6	8,4	241,3	1945,1	9,4	206,4	1	241,3	206,4
1 7	2017,8	7,7	262,1	1945,8	8,6	225,0	1	262,1	225,0
2 3	2014,3	10,6	189,7	1926,8	11,4	168,5	1	189,7	168,5
3 4	2017,5	8,1	249,0	1945,8	8,9	217,7	1	249,0	217,7
4 5	2017,5	8,4	240,9	1941,2	9,3	209,6	1	240,9	209,6
5 6	2017,5	10,7	187,8	1925,4	11,5	167,3	1	187,8	167,3
6 7	2017,8	9,3	217,4	1936,8	10,1	191,3	1	217,4	191,3
7 2	2017,6	9,7	207,8	1929,0	10,5	183,9	1	207,8	183,9
A B	2015,5	10,4	194,8	1930,7	11,1	173,8	1	194,8	173,8
A E	2017,5	10,6	191,1	1930,0	11,2	171,6	1	191,1	171,6
A C	2014,3	11,3	178,7	1916,8	11,8	161,9	1	178,7	161,9
A F	2017,5	11,2	179,7	1923,2	11,9	161,5	1	179,7	161,5
B E	2017,3	12,3	163,5	1911,4	13,6	141,0	2	326,9	281,9
E D	2017,6	10,3	196,3	1928,2	11,1	174,2	1	196,3	174,2
D C	2017,6	10,9	184,6	1917,4	11,9	160,7	1	184,6	160,7
C F	2016,7	13,4	150,3	1902,3	14,6	130,3	2	300,6	260,5
F G	2016,7	9,6	210,5	1932,0	11,3	171,1	1	210,5	171,1
G B	2017,6	9,0	223,9	1936,7	9,6	201,7	1	223,9	201,7

Tab.5.20: tensione, corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo C

In Fig.5.28 si nota che l'applicazione degli impulsi è stata efficace sulla superficie trattata, anche se i contorni risultano meno definiti rispetto all'elettrodo A.



Fig.5.28: superficie del tubero dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore

Dalla sezione in Fig.5.29 è possibile notare che il tessuto ha subito un'elettroporazione omogenea nei primi 6 mm, mentre, aumentando la profondità, il colore nero assunto dal tubero tende a sfumare.



Fig.5.29: sezione della patata dopo 24 ore.

5.5.1.4 P4: lunghezza aghi 6 mm

In Tab.5.21 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e dell'ultimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentata.

Dai dati riportati si nota che:

- Vista la lunghezza degli aghi a 6 mm, la tensione fornita dal generatore di impulsi dimezzata rispetto alle prove P1 e P3, ed il numero di paralleli dell'elettrodo C, le correnti sono di intensità minore rispetto ai casi precedenti e perciò la tensione, man mano che gli impulsi si ripetono, non decade;
- Per nessuna coppia è stato possibile applicare una serie completa di 50 impulsi;
- Date le intensità di corrente in gioco la corrente decade in misura minore rispetto all'elettrodo A e B;
- Si nota che per ogni coppia le resistenze fra due elettrodi ad ago nel primo impulso (R_{e1}) è sempre maggiore della stessa resistenza calcolata per l'ultimo impulso (R_{e50}) a conferma del fatto che la permeabilità delle cellule aumenta con il ripetersi degli impulsi.

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{50} med	I_{50} med	R_{50} Med	N. paralleli	N° ultimo impulso	R_{e1}	R_{e50}
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]			[Ω]	[Ω]
1 2	1011,1	2,9	346,6	1007,9	3,7	269,2	1	43	346,6	269,2
1 3	1015,3	3,2	319,3	1011,9	3,5	291,1	1	41	319,3	291,1
1 4	1015,1	2,6	383,5	1022,7	2,7	376,2	1	41	383,5	376,2
1 5	1009,7	3,9	261,5	1009,9	4,0	250,7	1	41	261,5	250,7
1 6	1015,3	3,6	286,2	1009,0	3,6	278,6	1	41	286,2	278,6
1 7	1011,4	3,1	323,1	1009,6	3,1	324,2	1	41	323,1	324,2
2 3	1018,2	3,9	262,5	1009,6	3,8	264,1	1	41	262,5	264,1
3 4	1011,5	2,7	370,7	1010,1	2,8	365,6	1	42	370,7	365,6
4 5	1017,3	3,0	339,9	1009,6	3,1	325,5	1	42	339,9	325,5
5 6	1016,3	4,1	246,0	1009,2	4,2	239,7	1	41	246,0	239,7
6 7	1015,3	3,4	300,3	1009,7	3,4	299,8	1	41	300,3	299,8
7 2	1013,5	3,4	302,5	1015,3	3,4	295,9	1	41	302,5	295,9
A B	1016,1	3,8	265,7	1008,1	4,1	246,3	1	44	265,7	246,3
A E	1014,6	3,9	262,0	1009,7	3,9	257,2	1	41	262,0	257,2
A C	1009,7	4,5	224,2	1002,2	4,5	220,5	1	41	224,2	220,5
A F	1009,7	4,3	237,5	995,3	4,2	235,9	1	42	237,5	235,9
B E	1009,7	4,6	217,3	999,9	4,8	208,7	2	44	434,7	417,5
E D	1009,9	3,9	261,1	1005,7	3,9	256,6	1	42	261,1	256,6
D C	1009,7	4,3	234,5	1009,4	4,5	224,7	1	43	234,5	224,7
C F	1010,4	5,4	187,8	995,3	5,5	180,5	2	44	375,6	361,0
F G	1014,6	3,5	289,3	1008,2	3,6	278,3	1	41	289,3	278,3
G B	1009,6	3,5	292,2	1010,6	3,5	287,9	1	41	292,2	287,9

Tab.5.21: tensione, corrente e resistenza del primo e dell'ultimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo C (V_{50} , I_{50} , R_{50} identificano i valori corrispondenti all'impulso considerato come ultimo)

Dalla Fig.5.30 si evince che l'elettroporazione è avvenuta in superficie, ma i contorni non sono ben definiti come nell'elettrodo A.



Fig.5.30: superficie della patata subito dopo l'applicazione di 50 impulsi a 1000V e dopo 24 ore

Mentre in Fig.5.31 si vede che per tutta la lunghezza degli aghi l'elettroporazione è avvenuta omogeneamente, mentre più in profondità è sempre meno evidente.



Fig.5.31 sezione verticale del tubero elettroporato dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi

5.5.2 Prove al microscopio

Trattando un campione di tessuto di patata, elettroporato con l'elettrodo C applicando 10 impulsi di tensione a 2000V, con il reattivo di Lugol, e fotografando le cellule a microscopio con un ingrandimento a 20x, si nota che le membrane cellulari risultano ingrossate e non ben definite (Fig.5.32).

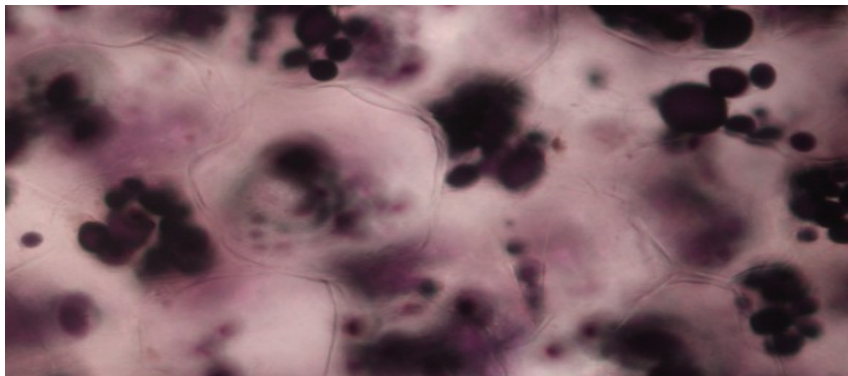


Fig.5.32: visione a microscopio del tessuto cellulare sottoposto a elettroporazione con 10 impulsi a 2000V.

5.6 Elettrodo D

Su una base circolare di materiale plastico rigido sono stati montati 7 aghi distanti fra loro 2,5 cm, per un totale di 12 coppie (Fig.5.33).

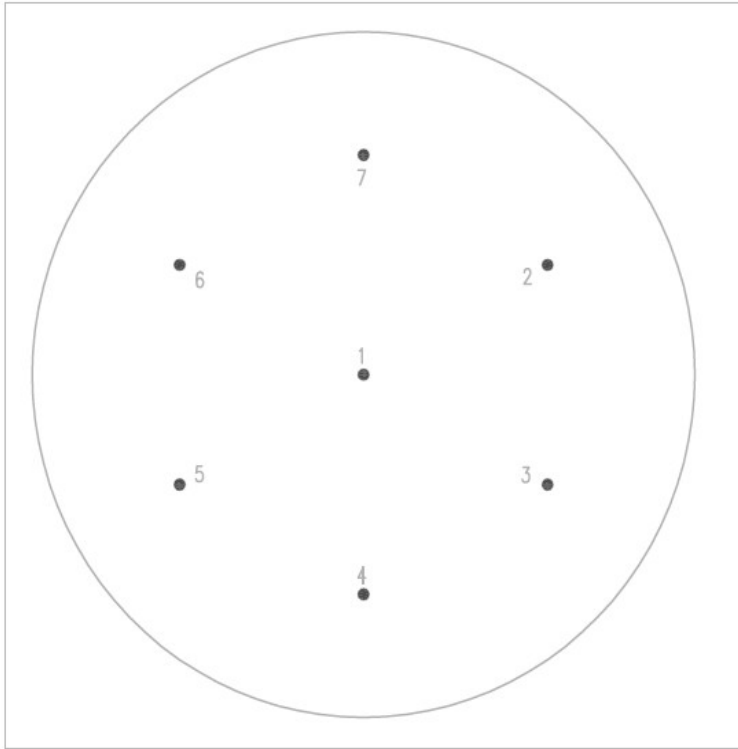


Fig.5.33: Elettrodo a maglia di 2.5 cm

Rispetto agli elettrodi precedenti nell'elettrodo D è presente solamente un esagono numerato, perciò la sequenza di impulsi da applicare è limitata a quelle coppie composte solamente da numeri. Inoltre non sono presenti paralleli, perciò la resistenza vista ai capi del generatore di impulsi è uguale a quella fra le coppie di elettrodi ad ago trascurando le resistenze della periferica di connessione e la resistenza dei collegamenti dell'elettrodo (Tab.5.22).

impulso	n° paralleli
1 - 2	1
1 - 3	1
1 - 4	1
1 - 5	1
1 - 6	1
1 - 7	1
2 - 3	1
3 - 4	1
4 - 5	1
5 - 6	1
6 - 7	1
7 - 2	1

Tab.5.22:sequenza degli impulsi e numero di paralleli per l'elettrodo D

5.6.1 Prove sperimentali

In Tab.5.23 sono riportate le prove effettuate per l'elettrodo D con distanza fra gli aghi di 2.5 cm. L'efficacia dell'elettroporazione con questo elettrodo è stata valutata applicando 10 impulsi di tensione a 2500V e 50 impulsi a 1250V ai capi di ciascuna coppia di elettrodi per due diverse lunghezze degli aghi (12 mm e 6 mm).

Per questo elettrodo si sono valutati:

- Colore del tessuto di patata per capire se è elettroporata oppure no;
- Resistenze ai capi dell'elettrodo;
- Foto al microscopio ottico delle cellule elettroporate.

PROVA		P1	P2	P3	P4
d	[mm]	20	20	20	20
V	[V]	2500	1250	2500	1250
N° impulsi		10	50	10	50
Lunghezza aghi	[mm]	12	12	6	6

Tab.5.23: Prove effettuate per l'elettrodo D.

5.6.1.1 P1: lunghezza aghi 12 mm

In Tab.5.24 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e del decimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentata.

Dai dati riportati si vede che:

- Man mano che gli impulsi si ripetono la tensione decresce, si può notare che per la coppia 1-7, dove la corrente erogata nel primo impulso è maggiore rispetto a quella delle altre coppie, presenta un valore di tensione al decimo impulso che è minore di tutte le tensioni al decimo impulso presente nelle altre coppie. Perciò si può vedere che la tensione fornita dal generatore cala in funzione della corrente che eroga;
- Per ogni coppia le resistenze nel primo impulso (R_1 Med) è sempre maggiore della stessa resistenza calcolata per il decimo impulso (R_{10} Med) a conferma del fatto che la permeabilità delle cellule aumenta con il ripetersi degli impulsi.

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{10} med	I_{10} med	R_{10} Med
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]
1 2	2521,8	13,2	190,7	2392,2	14,9	160,3
1 3	2521,6	14,2	177,6	2391,5	15,1	158,5
1 4	2516,4	15,1	167,3	2390,0	16,2	147,7
1 5	2521,8	12,3	206,0	2410,9	13,3	180,8
1 6	2521,6	13,7	184,0	2397,0	15,1	158,9
1 7	2520,7	15,5	162,5	2384,0	16,1	148,2
2 3	2516,1	12,4	202,5	2406,2	12,8	187,5
3 4	2518,9	13,0	193,9	2392,2	14,2	168,9
4 5	2520,3	13,0	193,4	2398,5	13,7	174,8
5 6	2521,2	11,8	213,7	2412,4	12,1	199,2
6 7	2517,6	13,3	189,7	2405,2	13,6	177,1
7 2	2512,7	14,2	177,5	2392,2	14,7	163,2

Tab.5.24: tensione corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo a maglia (si ricorda che $R_{e11}=R_1$ Med e $R_{e110}=R_{10}$ Med).

Le foto in Fig.5.34 mostrano le superfici della patata subito dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore. Nel centro l'elettroporazione risulta omogenea, mentre in periferia, in special modo dove hanno agito le coppie 2-3 e 5-6, il colore scuro non è omogeneo.

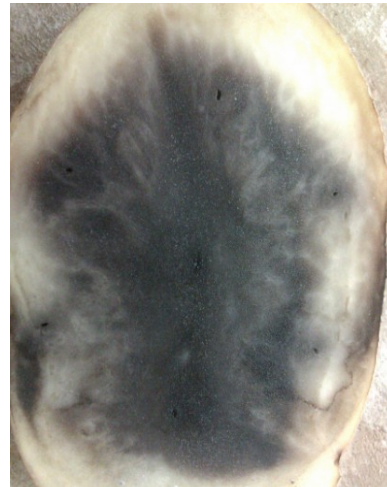


Fig.5.34: superficie del tubero dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore.

In Fig.5.35 è riportata la sezione del tubero lungo tutta la profondità degli elettrodi ad ago. Si nota che il colore nero assunto dalla patata è uniforme per tutta la lunghezza degli aghi, mentre più in profondità tende ad attenuarsi fino a sparire.



Fig.5.35: sezione del tubero elettroporato dopo 24 ore

5.6.1.2 P2: lunghezza aghi 12 mm

In Tab.5.25 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e dell'ultimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi. La prova è stata eseguita applicando 50 impulsi a 1250 V.

Dai dati riportati si nota che:

- Gli impulsi di corrente sono di bassa intensità.
- Per nessuna coppia è stato possibile applicare 50 impulsi
- Tranne che per la coppia 7-2 la resistenza nel primo impulso (R_1 Med) è sempre maggiore della stessa resistenza calcolata per il decimo impulso (R_{10} Med) a conferma del fatto che la permeabilità delle cellule aumenta con il ripetersi degli impulsi.

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{50} med	I_{50} med	R_{50} Med	N° ultimo impulso
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]	
1 2	1268,7	4,8	265,9	1245,6	5,6	223,6	44
1 3	1267,5	5,7	221,1	1252,9	6,5	193,0	43
1 4	1268,7	5,9	215,1	1241,8	6,4	194,8	44
1 5	1261,5	6,9	184,0	1239,9	7,6	162,3	44
1 6	1257,4	6,1	205,4	1251,9	6,6	190,3	43
1 7	1260,7	6,0	210,8	1241,8	6,5	191,3	44
2 3	1266,9	5,5	231,1	1239,9	5,4	227,9	46
3 4	1263,4	5,5	231,3	1241,5	5,5	227,6	44
4 5	1257,3	6,1	205,0	1239,9	6,4	193,6	44
5 6	1264,6	7,0	180,0	1253,2	7,2	175,1	43
6 7	1268,7	5,6	225,7	1250,3	5,6	221,4	44
7 2	1267,5	5,7	221,9	1249,9	5,6	222,8	43

Tab.5.25: tensione, corrente e resistenza del primo e dell'ultimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo D (V_{50} , I_{50} , R_{50} identificano i valori corrispondenti all'impulso considerato come ultimo).

Come testimoniato dalla Fig.5.36 la patata 24 ore dopo l'applicazione degli impulsi presenta una vasta zona dove l'elettroporazione ha avuto effetto in misura minore.



Fig.5.36: superficie del tubero dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore.

Questa disuniformità si riscontra anche nella sezione verticale di Fig.5.37, ciò è dovuto al fatto che le caratteristiche elettriche del tessuto di patata sottoposto all'elettroporazione cambiano in ogni sua porzione, e perciò nonostante sia visibile l'effetto dell'elettroporazione anche nella zona più chiara, è difficile prevedere come il tubero reagisca in relazione all'applicazione di impulsi elettrici.

In ogni caso è da notare che ci sono segni di elettroporazione per una profondità che è oltre il doppio della lunghezza degli elettrodi.



Fig.5.37: sezione verticale del tubero 24 ore dopo l'applicazione degli impulsi.

5.6.1.3 P3: lunghezza aghi 6 mm

In Tab.5.26 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e del decimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi. Si può notare che:

- Per la coppia 4-5, dove la corrente erogata nel primo impulso è maggiore rispetto alle altre coppie, presenta un valore di tensione al decimo impulso che è minore di tutte le tensioni al decimo impulso presente nelle altre coppie.;
- Le resistenze nel primo impulso (R_1 Med) è sempre maggiore della stessa resistenza calcolata per il decimo impulso (R_{10} Med) a conferma del fatto che la permeabilità delle cellule aumenta con il ripetersi degli impulsi.

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{10} med	I_{10} med	R_{10} Med
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]
1 2	2524,2	8,1	310,5	2443,2	10,0	245,2
1 3	2521,6	9,9	254,2	2429,7	11,1	221,2
1 4	2521,8	10,8	232,7	2421,1	12,2	199,5
1 5	2521,4	9,8	258,6	2435,2	11,1	219,4
1 6	2521,0	9,9	253,6	2429,9	11,6	209,6
1 7	2521,4	10,1	248,8	2425,4	11,9	203,9
2 3	2521,6	10,1	250,5	2435,4	9,3	263,3
3 4	2516,7	10,9	230,3	2434,2	10,6	231,0
4 5	2514,3	11,6	217,4	2410,8	13,0	185,6
5 6	2521,6	10,4	242,7	2430,7	11,8	206,2
6 7	2518,8	10,1	250,6	2435,2	10,3	239,0
7 2	2518,4	10,7	235,2	2422,9	10,9	223,5

Tab.5.26: tensione corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo a maglia.

Dalla Fig.5.38 si può notare che il colore più scuro dal tubero è omogeneo su tutta la superficie di applicazione dell'elettrodo. I contorni sono più sfumati rispetto alle prove condotte con l'elettrodo A di riferimento.



Fig.5.38: superficie del tubero dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore

Analizzando la sezione verticale di Fig.5.39 si nota che l'imbrunimento del tessuto è uniforme per tutta la lunghezza di applicazione degli aghi dell'elettrodo (6 mm) aumentando la profondità il tubero presenta segni di elettroporazione più sfumati.



Fig.5.39: sezione verticale del tubero dopo 24 ore.

5.6.1.4 P4: lunghezza aghi 6 mm

In Tab.5.27 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e dell'ultimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentata. Dai dati riportati si nota che:

- Vista la lunghezza degli aghi a 6mm, la tensione fornita dimezzata rispetto alle prove P1 e P3, nell'elettrodo D le correnti sono di intensità minore rispetto ai casi precedenti e perciò la tensione, man mano che gli impulsi si ripetono, non decade;
- Per nessuna coppia è stato possibile applicare una serie completa di 50 impulsi;
- Si nota che per ogni coppia le resistenze fra due elettrodi ad ago nel primo impulso (R_{el1}) è sempre maggiore della stessa resistenza calcolata per l'ultimo impulso (R_{el50}) a conferma del fatto che la permeabilità delle cellule aumenta con il ripetersi degli impulsi.

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{50} med	I_{50} med	R_{50} Med	N° ultimo impulso
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]	
1 2	1268,7	2,9	445,2	1260,1	3,6	349,4	41
1 3	1268,6	4,0	316,7	1254,3	4,4	282,3	42
1 4	1268,2	3,9	326,5	1254,2	4,5	281,2	44
1 5	1268,3	3,5	362,2	1267,3	3,9	323,7	42
1 6	1266,6	3,5	357,2	1259,2	3,9	321,7	41
1 7	1265,6	3,5	361,2	1254,3	3,9	321,6	41
2 3	1268,7	3,7	343,2	1254,3	3,8	327,6	42
3 4	1265,5	4,4	289,3	1254,5	4,7	267,6	42
4 5	1263,7	4,3	296,3	1255,0	4,5	280,1	43
5 6	1263,9	3,9	323,0	1256,7	4,1	307,7	44
6 7	1267,4	3,5	359,4	1254,2	3,7	341,1	43
7 2	1267,4	3,6	355,0	1254,3	3,7	337,2	42

Tab.5.27: tensione, corrente e resistenza del primo e dell'ultimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo D (V_{50} , I_{50} , R_{50} identificano i valori corrispondenti all'impulso considerato come ultimo)

Dalla Fig.5.40 si evince che in questo caso l'elettroporazione è risultata efficace su tutta la superficie della patata interessata dal trattamento, ma i suoi contorni non sono ben definiti come nell'elettrodo di riferimento A.



Fig.5.40: Superficie del tubero subito dopo l'applicazione di 50 impulsi a 1250V con l'elettrodo D e dopo 24 ore

In Fig.5.41 si vede che per tutta la lunghezza degli aghi (6 mm) il colore più scuro assunto dal tubero è ben visibile, mentre aumentando la profondità tale effetto risulta sempre meno evidente.



Fig.5.41: sezione verticale del tubero elettroporato dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi

5.6.2 Prove al microscopio

Trattando un campione elettroporato con 10 impulsi a 2500 V tramite il blu di metilene e fotografando le cellule a microscopio con un ingrandimento a 20x è possibile notare come le cellule abbiano perso la loro forma caratteristica, inoltre le membrane cellulari sono ingrossate e lesionate in alcuni punti (Fig.5.42).

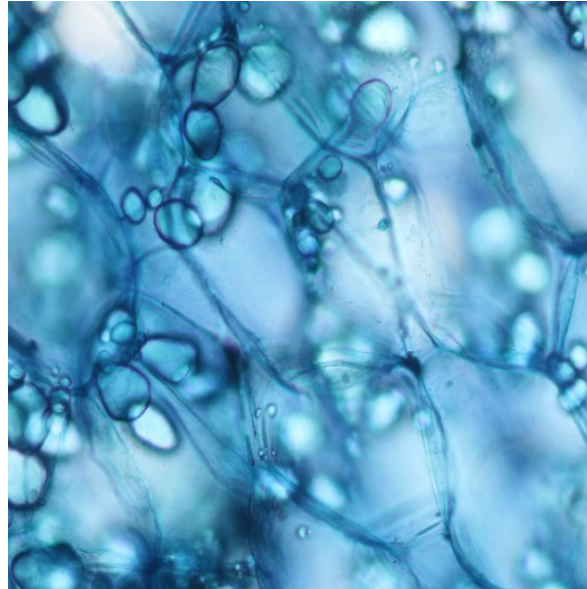


Fig.5.42: campione di tessuto trattato con blu di metilene ed elettroporato con 10 impulsi a 2500V con l'elettrodo D.

In Fig.5.43 invece è visualizzato un campione elettroporato tramite 50 impulsi a 1250 V, trattato secondo la modalità precedenti ma fotografato tramite un filtro verde. É possibile notare come le membrane cellulari siano vistosamente lesionate.

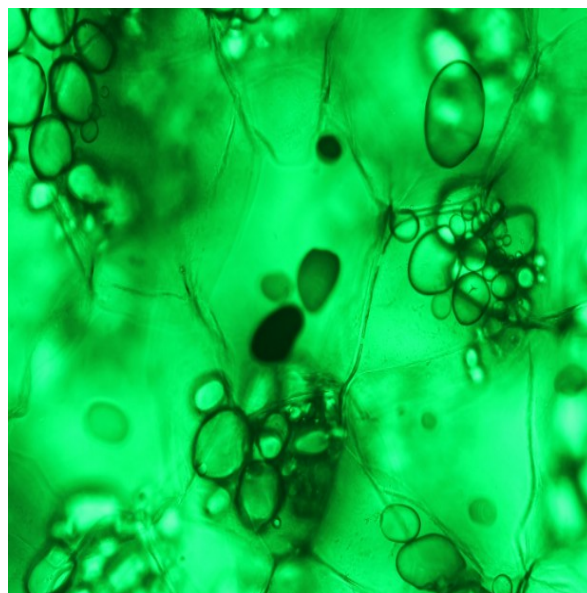


Fig.5.43: campione di tessuto trattato con blu di metilene ed elettroporato con 10 impulsi a 2500V con l'elettrodo D

5.7 Elettrodo E

Su una base di materiale plastico rigido sono stati montati 7 aghi distanti fra loro 3 cm, per un totale di 12 coppie (Fig.5.44).

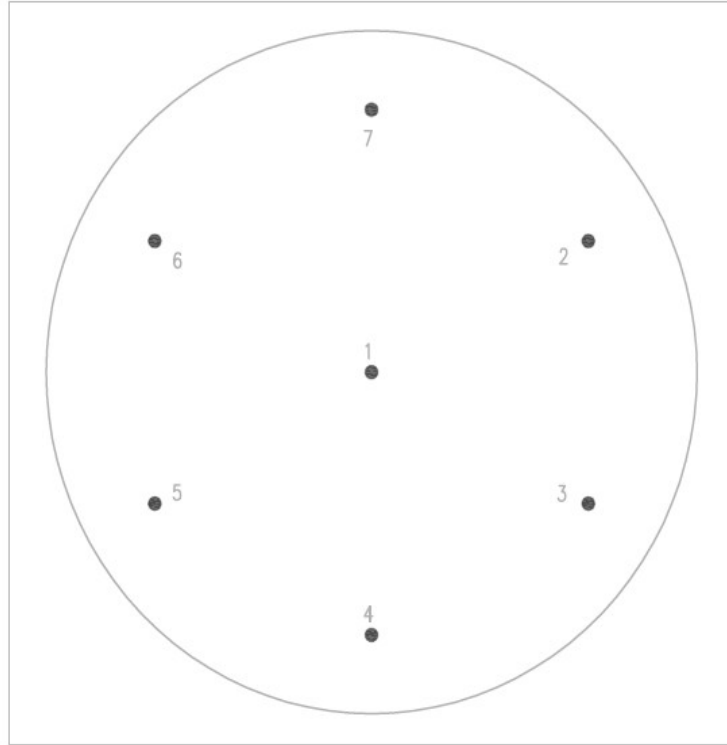


Fig.5.44: elettrodo a maglia di 3cm.

Come per l'elettrodo D è presente solamente un esagono numerato, perciò la sequenza di impulsi da applicare è limitata a quelle coppie composte solamente da numeri. Inoltre non sono presenti paralleli, perciò la resistenza vista ai capi del generatore di impulsi è uguale a quella fra le coppie di elettrodi ad ago, trascurando le resistenze dovute alla periferica di connessione e quella dei collegamenti dell'elettrodo (Tab.5.28).

impulso	n° paralleli
1 - 2	1
1 - 3	1
1 - 4	1
1 - 5	1
1 - 6	1
1 - 7	1
2 - 3	1
3 - 4	1
4 - 5	1
5 - 6	1
6 - 7	1
7 - 2	1

Tab.5.28: sequenza degli impulsi e numero di paralleli per l'elettrodo E.

5.7.1 Prove sperimentali

In Tab.5.29 sono riportate le prove effettuate per l'elettrodo E con distanza fra gli aghi di 3 cm. L'efficacia dell'elettroporazione con questo elettrodo è stata valutata applicando 10 impulsi di tensione a 3000 V e 50 impulsi a 1500V ai capi di ciascuna coppia di elettrodi per due diverse lunghezze degli aghi (12 mm e 6 mm).

Per questo elettrodo si sono valutati:

- Il colore del tessuto di patata per capire se è elettroporata oppure no;
- Le resistenze ai capi dell'elettrodo;
- Le foto al microscopio ottico delle cellule elettroporate.

PROVA		P1	P2	P3	P4
d	[mm]	30	30	30	30
V	[V]	3000	1500	3000	1500
N° impulsi		10	50	10	50
Lunghezza aghi	[mm]	12	12	6	6

Tab.5.29: Prove effettuate per l'elettrodo B.

5.7.1.1 P1 : lunghezza aghi 12 mm

In Tab.5.30 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e del decimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi. Dai dati riportati si vede che:

- Man mano che gli impulsi si ripetono la tensione decresce, si può notare che per la coppia 6-7, e 7-2 dove la corrente erogata nel primo impulso è maggiore rispetto alle altre coppie, presenta un valore di tensione al decimo impulso che è minore di tutte le tensioni al decimo impulso presente nelle altre coppie;
- Per ogni coppia le resistenze nel primo impulso (R_1 Med) è sempre maggiore della stessa resistenza calcolata per il decimo impulso (R_{10} Med) a conferma del fatto che la permeabilità delle cellule, e quindi la loro conducibilità, aumenta con il ripetersi degli impulsi.

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{10} med	I_{10} med	R_{10} Med
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]
1 2	3023,6	11,1	272,7	2881,7	12,9	223,3
1 3	3013,3	11,3	266,0	2907,1	13,1	221,8
1 4	3015,3	12,0	251,6	2896,1	13,4	215,5
1 5	3011,1	12,0	250,3	2895,8	13,5	214,0
1 6	3011,1	13,8	218,2	2881,6	15,1	191,0
1 7	3002,5	15,2	198,1	2867,0	16,4	174,4
2 3	3008,6	12,7	237,7	2895,2	13,5	213,7
3 4	3009,9	12,8	235,6	2885,0	14,0	206,6
4 5	3003,4	12,4	241,8	2889,4	13,3	216,5
5 6	3007,0	12,5	239,7	2895,8	12,9	223,8
6 7	2997,5	16,7	179,8	2852,9	17,1	167,2
7 2	2996,7	16,3	183,7	2852,9	16,9	168,7

Tab.5.30: tensione, corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo E.

Come si può notare dalla Fig.5.45 superficialmente il tubero presenta zone dove l'elettroporazione non è avvenuta oppure è avvenuta in misura minore, soprattutto nelle zone dove hanno agito le coppie 1-6, 5-6, 6-7 e 7-2.



Fig.5.45: tubero subito dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore.

Dalla Fig.5.46 in sezione si nota un imbrunimento omogeneo solo nelle zone prossime alla superficie ma è anche visibile una leggera colorazione nera fino a 20 mm di profondità. Nelle successive ore non sono stati notati significativi cambiamenti. Questo reazione all'elettroporazione è dovuto al tessuto sottoposto all'esperimento: probabilmente dipende dalla variabilità dovuta alla varietà del tubero.



Fig.5.46: sezione del tubero elettroporato.

5.7.1.2 P2: lunghezza aghi 12 mm

In Tab.5.31 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e dell'ultimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi della coppia di aghi. La prova è stata eseguita applicando 50 impulsi a 1500 V.

Dai dati riportati si nota che:

- Gli impulsi di corrente sono di intensità modesta, perciò non influenzano gli impulsi di tensione;
- Per nessuna coppia è stato possibile applicare 50 impulsi
- Le resistenze nel primo impulso (R_1 Med) sono sempre maggiori delle corrispondenti resistenze calcolate per l'ultimo impulso applicato (R_{50} Med) a conferma del fatto che la permeabilità delle cellule aumenta con il ripetersi degli impulsi.

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{50} med	I_{50} med	R_{50} Med	N° ultimo impulso
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]	
1 2	1513,7	4,2	358,9	1499,1	5,7	262,9	44
1 3	1516,3	5,4	282,0	1498,6	6,1	246,9	44
1 4	1513,5	6,5	232,7	1492,8	7,3	203,4	44
1 5	1513,8	5,7	265,9	1485,0	6,4	231,7	45
1 6	1513,7	5,0	302,6	1499,1	5,7	263,0	46
1 7	1513,8	5,5	277,3	1486,5	6,0	246,9	45
2 3	1519,6	5,1	299,3	1490,8	5,2	288,9	46
3 4	1513,8	6,3	240,7	1495,6	6,6	226,3	44
4 5	1513,8	6,5	231,4	1484,7	6,7	220,8	45
5 6	1513,8	5,2	290,0	1487,5	5,2	284,6	46
6 7	1513,7	5,1	295,9	1485,9	5,2	283,8	46
7 2	1513,8	5,5	276,5	1484,7	5,7	260,2	46

Tab.5.31: tensione, corrente e resistenza del primo e dell'ultimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo E (V_{50} , I_{50} , R_{50} identificano i valori corrispondenti all'impulso considerato come ultimo).

In Fig.5.47 è mostrato il tubero sottoposto all'esperimento dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi. Presenta un colore nero distribuito in modo uniforme su tutta la superficie.

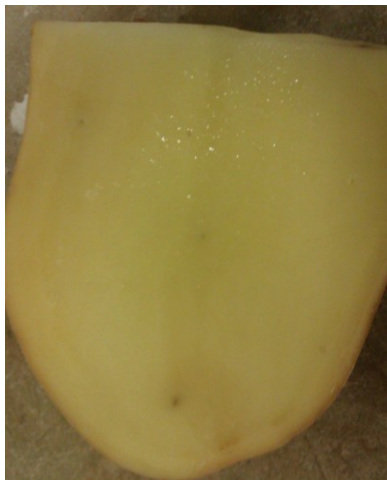


Fig.5.47: superficie del tubero dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore.

In Fig.5.48 è riportata la sezione verticale del campione dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi. Si nota che come nell'esperimento precedente l'elettroporazione è concentrata solo nelle zone prossime alla superficie.



Fig.5.48: sezione del tubero elettroporato.

5.7.1.3 P3: lunghezza aghi 6 mm

In Tab.5.32 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e del decimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi di ciascuna coppia di aghi alimentata. Si può notare che:

- per ogni coppia la resistenza corrispondente al primo impulso (R_1 Med) è sempre maggiore della stessa resistenza calcolata per il decimo impulso (R_{10} Med).

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{10} med	I_{10} med	R_{10} Med
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]
1 2	3039,6	7,9	385,1	2948,1	8,8	335,5
1 3	3034,1	9,3	327,3	2945,3	10,5	281,9
1 4	3039,0	9,8	310,3	2928,4	13,0	226,8
1 5	3034,0	9,4	323,5	2939,1	11,2	263,4
1 6	3039,2	7,9	384,1	2953,5	9,3	316,4
1 7	3027,0	8,8	345,1	2947,6	9,7	304,7
2 3	3032,7	8,4	360,9	2953,7	8,3	355,9
3 4	3029,3	11,8	257,4	2925,5	12,2	239,1
4 5	3030,8	11,1	275,0	2925,7	11,6	252,7
5 6	3026,8	10,1	301,8	2934,5	10,7	275,7
6 7	3025,5	8,8	344,9	2953,5	9,3	319,7
7 2	3025,5	9,1	333,3	2941,8	10,1	290,2

Tab.5.32: tensione corrente e resistenza del primo e del decimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo E.

Dalla Fig.5.49 si può notare come l'elettroporazione sia avvenuta in modo omogeneo su tutta la superficie ricoperta dall'elettrodo tranne che per le zone in corrispondenza delle coppie 6 – 7 e 7 – 2. Inoltre si può notare come gli impulsi elettrici abbiano lesionato l'integrità stessa del tubero nelle zone prossime agli aghi.



Fig.5.49: superficie del tubero dopo l'applicazione degli impulsi e dopo 24 ore.

La Fig.5.50 mostra la sezione del tessuto di patata, che risulta elettroporato in modo uniforme per tutto lo spessore di penetrazione degli aghi dell'elettrodo, man mano che aumenta la profondità l'imbrunimento tende a diminuire. In ogni caso l'elettroporazione è avvenuta molto in profondità rispetto al caso P1 e P2, a testimonianza del fatto che a parità di lunghezza degli aghi, per tipi diversi di patata il fenomeno dell'elettroporazione si manifesta in modo diverso. È perciò necessario individuarne una varietà che permetta di confrontare i risultati ottenuti con i diversi tipi di elettrodi.



Fig.5.50: sezione verticale del tubero dopo 24 ore.

5.7.1.4 P4: lunghezza aghi 6 mm

In Tab.5.33 sono riportati i valori di tensione e corrente del primo e dell'ultimo impulso applicato per ciascuna coppia di elettrodi indicati nella prima colonna. Da questi valori è stato poi calcolato il valore delle resistenze ai capi del parallelo di ciascuna coppia di aghi alimentata. Dai dati riportati si nota che:

- In questo caso, visto che la lunghezza degli elettrodi è ridotto a 6 mm, la tensione fornita dal generatore dimezzata rispetto alle prove P1 e P3, per l'elettrodo E le correnti sono di intensità minore rispetto ai casi precedenti. In questo caso la tensione, man mano che gli impulsi si ripetono, non decade;
- Per nessuna coppia è stato possibile applicare una serie completa di 50 impulsi;
- Si nota che per ogni coppia le resistenze fra due elettrodi ad ago nel primo impulso (R_1 Med) è sempre maggiore della stessa resistenza calcolata per l'ultimo impulso (R_{50} Med) a conferma del fatto che la permeabilità delle cellule aumenta con il ripetersi degli impulsi.

IMPULSO	V_1 med	I_1 med	R_1 Med	V_{50} med	I_{50} med	R_{50} Med	N° ultimo impulso
	[V]	[A]	[Ω]	[V]	[A]	[Ω]	
1 2	1513,7	3,2	479,8	1513,0	4,1	370,9	43
1 3	1513,7	3,5	433,4	1504,1	4,0	374,9	45
1 4	1516,9	4,2	362,9	1513,2	4,7	323,9	44
1 5	1513,8	3,9	390,8	1499,3	4,4	341,2	42
1 6	1519,3	3,6	419,4	1513,7	4,0	377,8	41
1 7	1513,7	4,0	378,7	1501,1	4,5	331,1	42
2 3	1513,8	3,4	444,2	1500,0	3,5	428,1	42
3 4	1513,6	4,2	361,8	1513,5	4,4	345,4	41
4 5	1513,8	4,3	354,5	1505,0	4,4	339,6	43
5 6	1518,9	3,9	384,9	1512,1	4,2	356,0	42
6 7	1513,8	4,0	375,1	1503,0	4,4	343,9	44
7 2	1513,7	4,1	369,3	1511,8	4,3	349,6	42

Tab.5.33: tensione, corrente e resistenza del primo e dell'ultimo impulso per tutte le coppie dell'elettrodo E (V_{50} , I_{50} , R_{50} identificano i valori corrispondenti all'impulso considerato come ultimo).

Dalla Fig.5.51 si vede che l'elettrodo ha agito in modo omogeneo su tutta la superficie interessata al trattamento, anche se i contorni non sono ben definiti come per le prove effettuate nell'elettrodo A



Fig.5.51: superficie del tubero subito dopo l'applicazione di 50 impulsi a 1500 V e dopo 24 ore.

In Fig.5.52 si vede che l'elettrodo ha agito per tutta la lunghezza degli aghi, oltre i 6mm l'imbrunimento del tessuto si interrompe dopo 18-20 mm.



Fig.5.52: sezione verticale del tubero elettroporato dopo 24 ore dall'applicazione degli impulsi

5.7.2 Prove al microscopio

Trattando un campione, elettroporato con l'elettrodo E con 10 impulsi a 3000 V, con il reattivo di Lugol, e fotografando le cellule a microscopio con un ingrandimento a 20x, si può notare come le cellule di Fig.5.53 abbiano cambiato forma rispetto alle cellule sane di Fig.5.11 e come le membrane risultino ingrossate e lesionate.

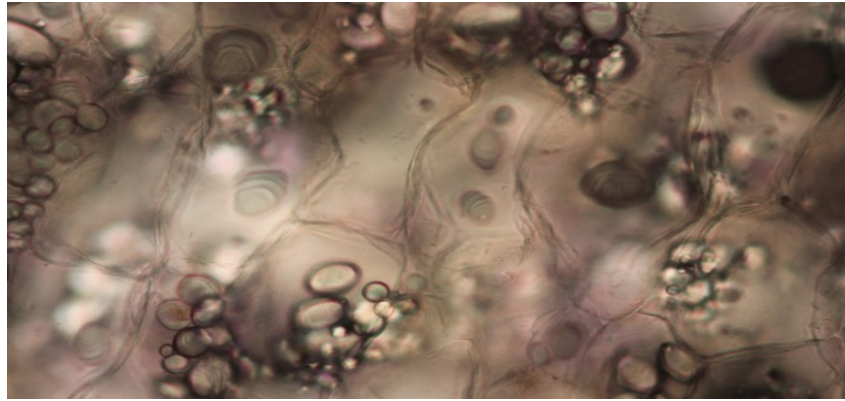


Fig.5.53: campione di tessuto trattato con reattivo di Lugol ed elettroporato con 10 impulsi a 3000V con l'elettrodo E.

Trattando con il blu di metilene un altro campione dello stesso tessuto di patata elettroporato con 10 impulsi a 3000V, e fotografandolo con un ingrandimento 40x è possibile notare nel particolare cerchiato di Fig.5.54 che la membrana della cellula è danneggiata.

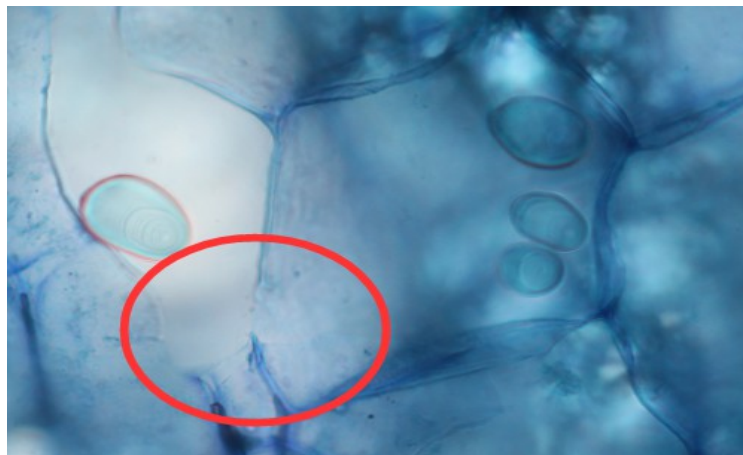


Fig.5.54: particolare di una cellula elettroporata

5.8 Discussione dei risultati ottenuti

Nella Tab.5.34 sono stati confrontati fra di loro i valori di corrente che scorre mediamente in una coppia di elettrodi ottenuti nelle prove P1 applicando 10 impulsi con una tensione di 1000V/cm, ai capi delle possibili coppie di aghi alimentate mediante la sequenza identificata dai numeri. I dati in Tab.5.34 si riferiscono alle prove con aghi lunghi 12 mm.

Tipo elettrodo	A	B	C	D	E
P1	I	I	I	I	I
	[A]	[A]	[A]	[A]	[A]
1 2	7,0	5,4	14,5	13,2	11,1
1 3	6,4	5,9	15,3	14,2	11,3
1 4	7,1	5,5	10,9	15,1	12,0
1 5	5,9	6,1	16,6	12,3	12,0
1 6	6,3	6,4	16,3	13,7	13,8
1 7	5,4	5,7	14,0	15,5	15,2
2 3	6,0	6,6	20,1	12,4	12,7
3 4	7,0	5,7	12,6	13,0	12,8
4 5	7,0	5,7	12,7	13,0	12,4
5 6	5,5	6,6	19,1	11,8	12,5
6 7	6,0	5,7	15,2	13,3	16,7
7 2	5,9	5,7	16,2	14,2	16,3

Tab.5.34: valori di corrente ai capi delle coppie di aghi numerati per tutti gli elettrodi applicando 10 impulsi a 1000 V/cm con una lunghezza degli aghi pari a 12 mm.

Nella Tab.5.35 sono stati confrontati fra di loro i valori di corrente che scorre mediamente in una coppia di elettrodi ad ago ottenuti nelle prove P3 applicando 10 impulsi con un campo elettrico di 1000V/cm, ai capi delle possibili coppie di aghi alimentate mediante la sequenza identificata dai numeri. I dati in Tab.5.35 si riferiscono alle prove con aghi lunghi 6 mm.

Tipo elettrodo	A	B	C	D	E
P2	I	I	I	I	I
	[A]	[A]	[A]	[A]	[A]
1 2	4,1	3,8	7,6	8,1	7,9
1 3	4,2	4,2	8,1	9,9	9,3
1 4	4,7	4,0	6,8	10,8	9,8
1 5	3,7	4,4	8,7	9,8	9,4
1 6	4,2	4,5	8,4	9,9	7,9
1 7	3,6	4,2	7,7	10,1	8,8
2 3	3,8	4,5	10,6	10,1	8,4
3 4	4,6	4,1	8,1	10,9	11,8
4 5	4,7	4,1	8,4	11,6	11,1
5 6	3,4	4,5	10,7	10,4	10,1
6 7	3,7	4,2	9,3	10,1	8,8
7 2	3,5	4,1	9,7	10,7	9,1

Tab.5.35: valori di corrente ai capi delle coppie di aghi numerati per tutti gli elettrodi applicando 10 impulsi a 1000 V/cm con una lunghezza degli aghi pari a 6 mm.

Dalle tabelle si nota che all'aumentare della distanza fra gli aghi la corrente tende ad aumentare. La differenza più evidente si nota nel passaggio tra l'elettrodo B ($d=10\text{ mm}$) e l'elettrodo C ($d=20\text{ mm}$). Analizzando la Fig.5.15 e la Fig.5.25 corrispondenti alla prova di tipo P1 si nota che l'elettroporazione ottenuta con l'elettrodo C ha raggiunto una profondità più elevata rispetto a quella ottenuta per l'elettrodo B. Inoltre si vede che con l'aumentare della profondità dell'elettroporazione il colore nero, indicativo dell'elettroporazione, è sempre più sfumato. Da questa osservazione si può dedurre che l'elettroporazione avviene lungo le linee di flusso del campo elettrico, ed essa, è più marcata nelle regioni dove tale campo è più elevato.

Alle stesse conclusioni si giunge anche con simulazioni tramite Flux. Infatti confrontando la distribuzione del campo elettrico su un piano passante per l'asse di simmetria di due 2 aghi posti ad 1 cm (Fig.5.55a) ed a 3 cm (Fig.5.55b), si può notare come il campo elettrico, a parità di intensità, si distribuisca in una zona più profonda nel caso di aghi distanziati 3 cm.

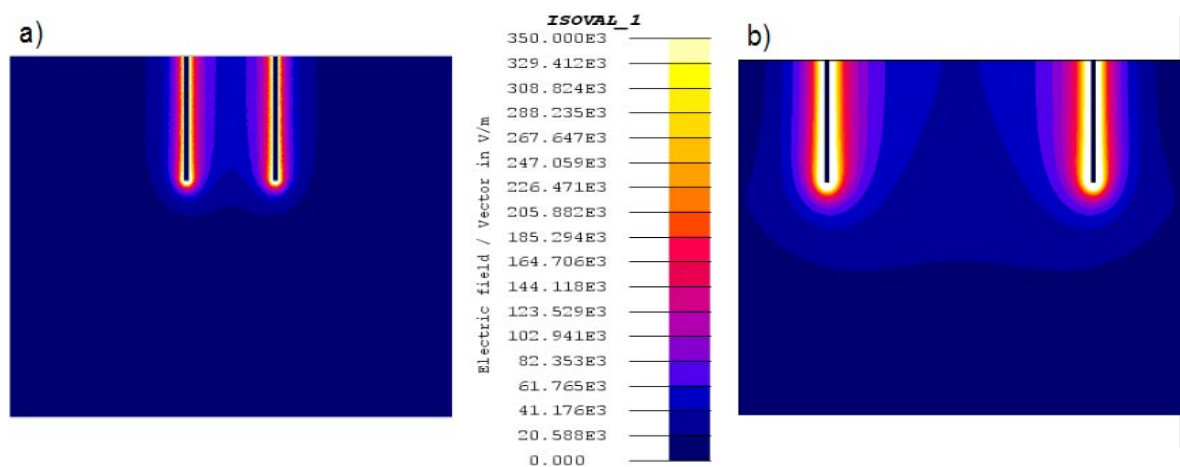


Fig.5.55 : confronto del campo elettrico applicato da due aghi posti alla distanza di 1cm (a) e 3 cm (b)

6 PROVA IN VITRO

Analizzando le fotografie delle cellule ottenute con un microscopio a fluorescenza dopo l'elettroporazione applicata su cellule in vitro secondo il procedimento descritto nel paragrafo 5.2.3, e confrontandole con le cellule prima del trattamento (Fig.5.56) si deduce che le cellule sono state elettroporate, poichè risulta evidente che il propidio è riuscito a penetrare la membrana cellulare. Tranne in una zona localizzata in prossimità a dove era presente l'ago, al momento dell'applicazione degli impulsi elettrici, le cellule sono ancora vive, come mostrato in Fig.5.57.

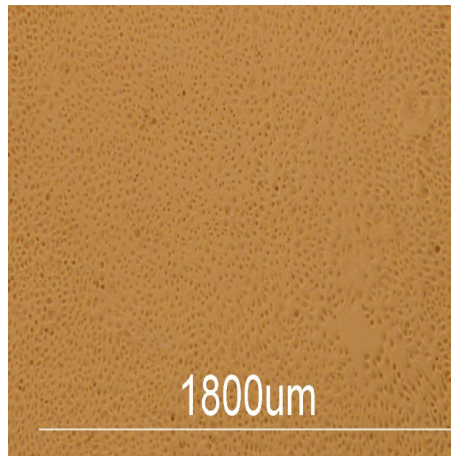


Fig.5.56: Coltura cellulare prima dell'elettroporazione.

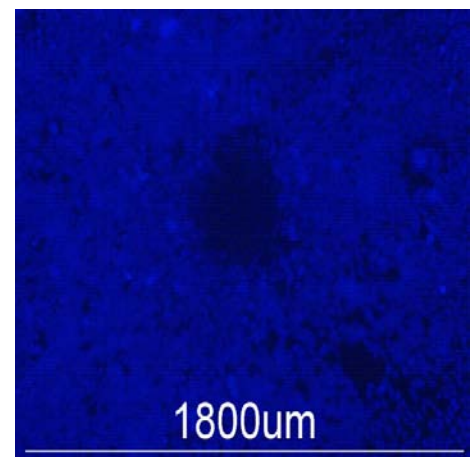
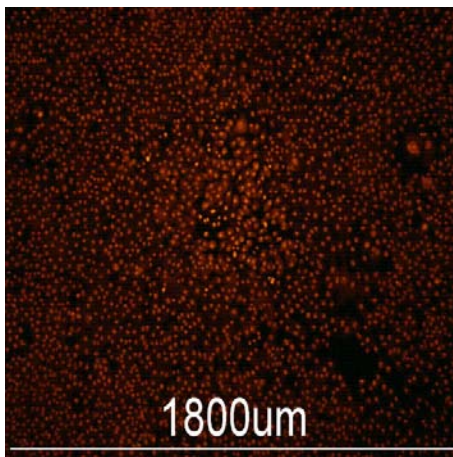


Fig.5.57: cellule trattate con propidio (rosso) e calceina (blu) dopo il processo di elettroporazione.

7 CONCLUSIONI

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

In questa tesi è stato sviluppato un primo prototipo di "elettrodo a maglia" per l'applicazione di trattamenti di ECT di aree estese. Questo prototipo, in analogia agli attuali elettrodi per ECT, utilizza aghi equispaziati da piantare nella lesione da trattare montati su un supporto rigido. La terapia dell'ECT prevede l'applicazione di impulsi elettrici ai capi di ciascuna coppia di aghi. Nella macchina attuale gli elettrodi standard sono formati da 7 aghi, e le possibili coppie di aghi sono alimentate in sequenza. Aumentando il numero di aghi ovviamente aumenta il tempo per completare un trattamento. Per questo motivo l'alimentazione degli aghi del nuovo elettrodo a maglia è stata studiata in modo da connettere più aghi in parallelo. In questo lavoro si è pensato di utilizzare la sequenza di impulsi già utilizzata in clinica, per cui è stato messo a punto un modo per cui tutte le possibili coppie di elettrodi potessero essere alimentate applicando due o più sequenze di impulsi. In particolare i prototipi sviluppati sono serviti a studiare:

- Il numero massimo di coppie di aghi che si possono connettere in parallelo;
- L'efficacia dell'elettroporazione in funzione della distanza tra aghi adiacenti (d varia da 7mm a 30 mm);
- L'effetto della lunghezza degli aghi ($l = 12$ mm oppure $l = 6$ mm);
- L'effetto della riduzione della tensione tra coppie di aghi adiacenti e l'aumento del numero di impulsi.

Gli elettrodi ottenuti sono stati testati sia in laboratorio, usando un apposito phantom, sia su culture cellulari. In entrambi i casi si è dimostrato che la struttura dell'elettrodo a maglia permette l'elettroporazione.

In questa tesi per capire se l'elettroporazione avveniva è stato utilizzato il tessuto di patata perchè nelle 24-30 ore successive all'elettroporazione assume un colore scuro a causa del processo di ossidazione che subisce l'amido fuoriuscito dalle membrane cellulari a seguito dell'applicazione di impulsi. Dalle prove effettuate è stato poi possibile estrapolare i valori di tensione, corrente e resistenza di ogni impulso. Confrontando i dati ottenuti si deduce che le patate sono un buon mezzo per riconoscere se l'elettroporazione è avvenuta in modo uniforme, nonostante la loro grande variabilità dal punto di vista elettrico.

Le prove con cellule in vitro hanno mostrato che tutte le cellule venivano elettroporate.

In ogni caso si è dimostrata la validità di questi elettrodi, deducendo che diminuendo la tensione applicata ed applicando più impulsi è possibile ottenere una buona efficacia nell'elettroporazione. Si è anche notato che aumentando la distanza fra gli aghi si diminuisce l'omogeneità dell'elettroporazione, ma essa avviene più in profondità seguendo le linee di flusso del campo elettrico. È comunque necessario procedere con le sperimentazioni ripetendo queste prove su cellule coltivate in vitro per dimostrare l'effettiva validità del nuovo elettrodo.

APPENDICE A

Stralcio del programma di elaborazione dati che identifica i campioni dell'impulso ammessi al calcolo della resistenza.

```
% ciclo lettura dei singoli impulsi
for i=1:TotImp
    c = 0; % contatore campioni validi
    percentuale = 1/10; % percentuale di valori attorno al maxV che si
    vogliamo considerare
    maxV_periodo = max(EP(N).Volt(1+PERIODO*(i-1):PERIODO*i)); % tensione
    massima nell'impulso
    % ciclo lettura dei campioni all'interno di un impulso
    for j=1:PERIODO-1
        range = maxV_periodo * percentuale; % massimo discostamento da
        maxV accettato
        % verifica che il valore dei volt è compreso nel range stabilito
        if(EP(N).Volt(PERIODO*i-j) >= (maxV_periodo - range))
            % campioni racchiusi nel range
            % derivata discreta delle tensioni
            derivata = EP(N).Volt(PERIODO*i-j)-EP(N).Volt(PERIODO*i-j-1);
            if(derivata == 0)
                c = c+1; % incremento contatore campioni validi
                rSample(c) = EP(N).Volt(PERIODO*i-j) /
            EP(N).Current(PERIODO*i-j); % calcolo della resistenza
                vSample(c) = EP(N).Volt(PERIODO*i-j);
                iSample(c) = EP(N).Current(PERIODO*i-j);
            end
        end
    end
end
end
```


BIBLIOGRAFIA

- [1] S. Kee, J. Gehl, e E.W. Lee, *Clinical Aspects of Electroporation*, Springer, 2011.
- [2] E. Claut, *Elettroporazione ed elettrochemioterapia: aspetti fisiologici e bioelettrici*, 2010.
- [3] L.G.Campana, S. Mocellin, M. Basso, O. Puccetti, G. De Salvo, V. Chiarion-Sileni, A. Vecchiato, L. Corti, C. R. Rossi, D. Nitti, *Bleomycin-Based Electrochemotherapy: Clinical Outcome from a Single Institution's Experience with 52 Patients*, *Annals of surgical oncology*, 2008.
- [4] G. Serša, M. Čemažar, *Electroporation in electrochemotherapy of Tumors*, *Electroporation based Technologies and Treatments*, pagg. 51-56.
- [5] H. Firket, *La cellula vivente*, Marzo 1994, edizioni Newton.
- [6] B. Rubinsky, *Irreversible Electroporation*, Springer, 2010.
- [7] T. Kotnik, Resting and Induced Transmembrane Voltage, *Electroporation based Technologies and Treatments*, pagg.7-12, 2012.
- [8] A.G. Pakhomov, D. Miklavčič, M.S. Markov, *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine*, cap.4, Taylor & Francis, 2010.
- [9] D. Miklavčič, Matej Reberšek, Development of devices and electrodes, *Electroporation based Technologies and Treatments*, pagg. 79-85, 2012.
- [10] L. Scarparo, *Studio e simulazione di un generatore di impulsi per elettroporazione*, 2010.
- [11] A.G. Pakhomov, D. Miklavčič, e M.S. Markov, *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine*, cap.16, Taylor & Francis, 2010.
- [12] D. Corradini, *Software per l'analisi dei dati nei trattamenti di elettroporazione*, 2011.
- [13] M.Hjouj, B. Rubinsky, *Magnetic Resonance Imaging Characteristics of Nonthermal Irreversible Electroporation in Vegetable Tissue*, 2010.
- [14] A. Ongaro, A. Pellati, A.Caruso, M.Battista, F. De Terlizzi, M De Mattei, M. Fini, *Identification of in Vitro Electropermeabilization Equivalent Pulse Protocols*, *Technology in Cancer Research and Treatment*, Vol.10, Number 5, Ottobre 2011.