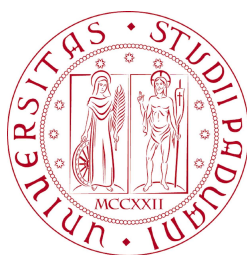




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
FACOLTÀ DI INGEGNERIA





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

—  
DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE  
—

TESI DI LAUREA TRIENNALE IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**EFFETTI DELLA STIMOLAZIONE CON  
CAMPO ELETTROMAGNETICO AD ALTA  
FREQUENZA SULLA PROLIFERAZIONE DI  
CELLULE DI ASTROCITOMA UMANO IN  
VITRO**

RELATORE:

CH.MO PROF. ING. ALFREDO RUGGERI

CORRELATORI:

VASSANELLI STEFANO

GIRARDI STEFANO

LAUREANDO: CHIARA ZANATA

ANNO ACCADEMICO 2011-2012



*A mia mamma,  
sperando un giorno di diventare come lei...*



# Indice

<b>1</b>	<b>Capitolo introduttivo</b>	<b>3</b>
1.1	Cellule gliali . . . . .	3
1.2	Neoplasie gliali . . . . .	6
1.3	Campi elettromagnetici e tessuti biologici . . . . .	11
1.4	Risonanza quantica molecolare . . . . .	14
1.4.1	Vesalius e Rexon-age . . . . .	15
1.5	Precedenti sperimentazioni . . . . .	16
<b>2</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>19</b>
2.1	Obiettivo della sperimentazione . . . . .	19
2.2	Cellule H4 . . . . .	20
2.3	Dispositivo Rexon-age . . . . .	20
2.4	Test svolti . . . . .	21
2.4.1	Primo tipo di test . . . . .	22
2.4.2	Secondo Test . . . . .	23
<b>3</b>	<b>Risultati</b>	<b>25</b>
3.1	Elaborazione dei dati . . . . .	25
3.2	Primo Test . . . . .	27
3.3	Secondo Test . . . . .	29
	<b>Conclusioni e commenti</b>	<b>33</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>35</b>





# Capitolo 1

## Capitolo introduttivo

### 1.1 Cellule gliali

Il tessuto nervoso si compone di due tipi di cellule diverse: *neuroni* e *cellule gliali*. I neuroni sono in grado di ricevere e trasmettere impulsi nervosi; le cellule gliali, che costituiscono il 40% delle cellule del sistema nervoso centrale, sono indispensabili non solo per il sostegno meccanico dei neuroni, ma anche per il loro nutrimento, protezione ed isolamento elettrico[1].

Secondo alcuni studi, inoltre, le cellule gliali risultano avere un ruolo attivo nello sviluppo e nella maturazione delle sinapsi stesse. L'insieme delle cellule gliali si definisce *nevroglia* e può essere distinta in interstiziale, epiteliale e periferica.

La **nevroglia interstiziale** comprende:

- Microglia;
- Macroglia.

La *microglia* ha la funzione di protezione immunitaria, in quanto nel caso in cui agenti infettivi superino la barriera ematoencefalica, le cellule della microglia si attivano per distruggerli.

Della macroglia fanno parte:

- Astrociti;
- Oligodendrociti.

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

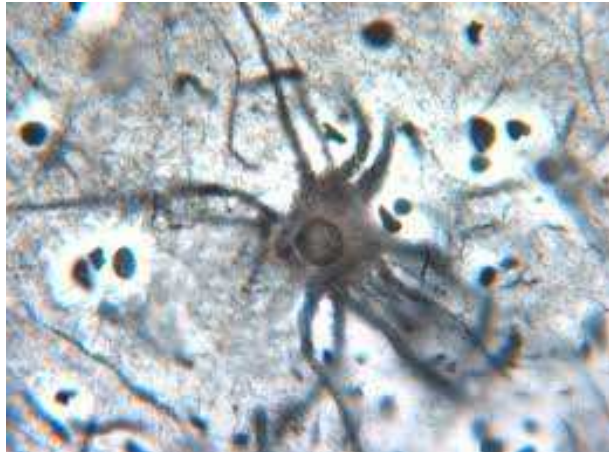


Figura 1.1: Astrocita

A livello morfologico si distinguono in:

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

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

Gli astrociti costituiscono il tramite attraverso cui i neuroni sono messi in comunicazione con i capillari, impedendo il passaggio di sostanze dannose e lasciando passare le sostanze nutritive; essi fanno parte infatti della barriera ematoencefalica insieme alle cellule endoteliali. Inoltre hanno una funzione protettiva in quanto in seguito a lesioni si va in contro ad un processo chiamato gliosi in cui le cellule gliali proliferano rigenerando la parte lesa.

Un altro fondamentale aspetto dell'azione degli astrociti è la regolazione del flusso ionico, in particolare di sodio e potassio, allo scopo di adattare la concentrazione ionica extracellulare dei neuroni. Essi inoltre controllano il riassorbimento dei neurotrasmettitori, regolando ad esempio la concentrazione del glutammato, che se presente in quantità troppo elevate è causa di morte cellulare. Di recente si è scoperta una partecipazione attiva degli astrociti nella trasmissione nervosa, anche queste cellule sono infatti eccitabili e quindi in grado di trasmettere e ricevere impulsi. Questa eccitabilità permette loro una comunicazione sia tra astrociti che con i neuroni stessi, attraverso le così dette sinapsi tripartite: gli astrociti sembrano essere in grado di rilasciare essi stessi neurotrasmettitori attraverso cui interagiscono con i neuroni coinvolti nelle sinapsi.

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

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

Esistono anche delle cellule dette precursori degli oligodendrociti, in quanto in fase di sviluppo del sistema nervoso agiscono come tali, ma in parte rimangono anche nel cervello sviluppato. La loro funzione non è però nota. Della macroglia fanno parte inoltre le cellule gliali radiali, che rappresentano la principale popolazione progenitrice neuronale della corteccia cerebrale. Le cellule gliali radiali sono fondamentali nello sviluppo del sistema nervoso in quanto consentono la migrazione dei neuroni.

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

Gli *ependimociti* secernono il liquido cerebrospinale ed hanno ciglia e microvilli

che ne aiutano la circolazione.

La **nevrogliia periferica** comprende le *cellule gliali del tessuto nervoso periferico*:

- *cellule di Schwann*;
- *cellule satelliti*.

Le *cellule di Schwann* hanno una funzione simile a quella degli oligodendrociti in quanto formano la guaina mielinica degli assoni del sistema nervoso periferico. A differenza degli oligodendrociti, tuttavia, ogni cellula può ricoprire un tratto di un unico assone. Hanno anche la funzione di ripulire dai residui cellulari per via fagocitaria.

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

## 1.2 Neoplasie gliali

I tumori cerebrali si distinguono in:

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

I *tumori primari* comprendono due grandi tipologie: tumori gliali (o gliomi) e tumori non gliali.

I primi sono i tumori cerebrali più diffusi, in quanto costituiscono circa il 40% dei tumori cerebrali primari.

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

Le diverse tipologie di gliomi sono:

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

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

Le neoplasie astrocitarie vengono distinte a seconda del grado di malignità, in base alla scala di grading introdotta nel 1993 dalla **OMS** (*Organizzazione Mondiale della Sanità*).

Al grado 1 corrispondono i tumori meno aggressivi ed al grado 4 i più maligni. Ai gradi di maggior malignità sono associate ipercellularità, atipia nucleare e citoplasmatica, proliferazione endoteliale, attività mitotica e necrosi.

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

La classificazione secondo i gradi di malignità[2] distingue:

### 1. Grado 1:

- *Astrocitoma Pilocitico*

Si tratta un tumore benigno a crescita lenta, ben differenziato e circoscritto. Raramente riscontrato in età adulta, e più frequente in bambini e giovani di età inferiore ai 20 anni[3].

La prognosi è generalmente favorevole, dipendente essenzialmente dalla possibilità o meno di una asportazione chirurgica radicale.

Le sedi più frequenti in cui si sviluppa sono lobo temporale e cervelletto. Molto spesso è cistico.

- *Astrocitoma subependimale a cellule giganti*

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

- *Xantoastrocitoma pleiomorfo*

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

## 2. Grado 2:

- *Astrocitoma a basso grado*

Glioma a crescita lenta, si distingue da quello di grado 1 per i contorni non nitidi che rendono l'asportazione chirurgica più complessa e difficilmente radicale[4].

Spesso presenta mutazioni nel tempo che lo rendono più aggressivo.

La sopravvivenza media è di 5-6 anni.

## 3. Grado 3:

- *Astrocitoma anaplastico*

Una neoplasia che si caratterizza per una crescita rapida ed un'alta recidività. E' un tumore infiltrante e quindi la totale escissione chirurgica è impossibile.

Può insorgere come degenerazione maligna di tumori di grado inferiore e tendenzialmente vira a glioblastoma multiforme. Si presenta maggiormente in pazienti tra i 50 e i 60 anni.

La sopravvivenza è del 50% a due anni e del 18% a cinque anni dalla diagnosi.

## 4. Grado 4:

- *Glioblastoma multiforme*

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

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

Il primo è caratterizzato da cellule molto grandi, con un diametro che

raggiunge anche i  $400\mu m$ , e multinucleate; il secondo presenta una componente astrocitaria ed una mesenchimale.

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



Figura 1.2: Glioblastoma

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

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

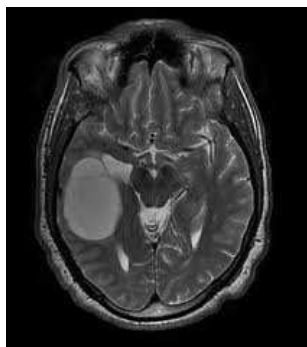


Figura 1.3: Oligodendroglioma



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

Gli *ependimomi* sono gliomi che originano dalle cellule dei ventricoli cerebrali e del canale centrale del midollo spinale. Maggiormente riscontrati nelle prime due decadi di vita, rappresentano il 10% dei tumori cerebrali di infanzia ed adolescenza ed il 2-3% dei tumori del sistema nervoso centrale.

Essi sono generalmente a crescita lenta e virano in senso maligno meno frequentemente rispetto agli astrocitomi.

Il grado di malignità dipende dalla tipologia.

Si distinguono in ordine crescente di grado:

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

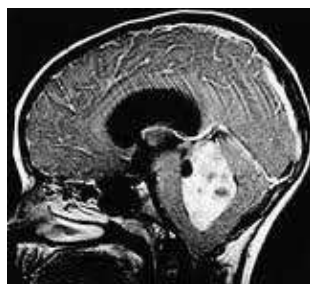


Figura 1.4: Ependimoma

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

## 1.3 Campi elettromagnetici e tessuti biologici

Le interazioni bio-elettromagnetiche[5] rivestono un ruolo importante nel funzionamento dei sistemi biologici e assumono un rilievo via via più complesso negli organismi viventi superiori.

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

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

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

E' necessario distinguere le radiazioni ionizzanti da quelle che non lo sono. Le prime hanno una frequenza molto elevata, sopra il limite dell'ultravioletto. La lunghezza d'onda associata è dell'ordine delle dimensioni molecolari ed atomiche, questo implica un'interazione con gli elettroni dei legami che può causare la ionizzazione degli atomi, con conseguenti danni alle strutture del DNA. Le radiazioni non ionizzanti, invece, hanno frequenze molto minori ed i loro effetti sono molteplici ed attualmente oggetto di studio.

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

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

Per quel che riguarda i campi statici, gli studi mirati ad analizzare gli effetti sui tessuti biologici hanno tendenzialmente portato alla conclusione che tali campi

non siano in generale rilevanti per basse intensità.

Un maggiore interesse hanno invece riscontrato le sperimentazioni su campi variabili, le cui interazioni con sistemi biologici sono più evidenti[6].

Tali interazioni possono essere distinte in interazioni di tipo termico e non termico.

La prima tipologia è legata alla trasformazione dell'energia elettromagnetica in calore, con conseguente innalzamento della temperatura delle cellule sottoposte al campo. Nel momento dell'interazione l'energia può essere trasmessa agli ioni, certamente presenti nelle cellule in quanto ricche di soluzioni saline. Questi ultimi vengono sollecitati a muoversi con velocità più elevate causando un aumento della temperatura.

Altro schema di assorbimento energetico riguarda l'interazione in risonanza fra la frequenza del campo eccitante ed una delle frequenze tipiche di oscillazione delle molecole sottoposte al campo. Questo processo consente una cessione selettiva di energia elettromagnetica mirata ad alcuni tipi di strutture cellulari preservandone altri, con effetti termici limitati. Di questa seconda tipologia non sono ancora del tutto chiari i meccanismi quantistici che ne stanno alla base.

Gli effetti termici sono stati per molto tempo l'unica tipologia considerata; recentemente, molti studi hanno iniziato ad indagare le interazioni a livello cellulare con limitato scambio termodinamico di energia. Queste interazioni rivestono interesse nel campo biomedico in quanto gli eventuali utilizzi associati risultano poco invasivi per i tessuti.

Sono numerosi gli studi sperimentali in vitro volti ad analizzare gli effetti di campi elettromagnetici, a diverse frequenze, su vari parametri biologici. In questi studi vengono monitorate le variazioni nella cinetica della proliferazione cellulare, nell'attività enzimatica, nei fusi ionici intermembrana e nel corredo cromosomico. Per quanto riguarda i campi variabili a basse frequenze, molti studi hanno riscontrato un'influenza di tali campi sulla proliferazione cellulare. E' interessante sottolineare che già da qualche tempo gli effetti biologici dei campi elettromagnetici a bassa frequenza sono sfruttati a livello terapeutico nella stimolazione della ricrescita ossea in alcune tipologie di fratture, con l'obiettivo di aumentare l'osteogenesi.

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

In alcune sperimentazioni in vitro sono state riscontrate alterazioni delle proprietà dei canali ionici di membrana e variazioni di flussi ionici in corrispondenza di alcuni **SAR** (*tasso di assorbimento specifico*)[7].

Altri studi hanno rilevato un aumento dell'attività dell'enzima **ODC** (*ornitina decarbossilasi*, coinvolto nella proliferazione) in colture di fibroblasti di topo[8].

I risultati di test, che prevedevano di sottoporre a campi elettromagnetici cellule di mammifero, hanno evidenziato che a seconda del tipo di cellule e delle condizioni di esposizione, la proliferazione risultava incrementata o diminuita.

In questo secondo caso il test fu svolto irradiando con un campo elettromagnetico ad alta frequenza cellule di astrocitoma umano: la proliferazione risultava diminuita a seguito di un'interazione non esclusivamente termica[9].

Altri studi hanno rivelato un'inibizione della proliferazione di cellule tumorali sottoposte a campi elettrici alternati a medie frequenze[10]. Nasce quindi l'ipotesi di un futuro utilizzo di campi elettromagnetici a media ed alta frequenza a scopo terapeutico.

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

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

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

## 1.4 Risonanza quantica molecolare

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

La teoria della risonanza molecolare riguarda gli effetti dei campi elettrici variabili sulle cellule[11]. Essa afferma l'esistenza nelle molecole di particolari frequenze tipiche dei legami molecolari che, come già dimostrato per gli scambi energetici atomici, permettono un trasferimento energetico con meccanismo di risonanza.

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

I campi utilizzati per la generazione dei quanti energetici devono quindi avere precise frequenze affinché abbia luogo il fenomeno della risonanza. Lo scambio energetico può avvenire tramite fotoni. Si ricorda a questo proposito che l'energia associata al fotone è proporzionale alla frequenza dell'onda elettromagnetica, secondo la legge:  $E = hf$ , con  $h =$  costante di Plank.

Affinchè ci sia interazione tra il fotone e la molecola bersaglio è necessario che la lunghezza d'onda ( $l = c/f$ ) sia confrontabile con le dimensioni molecolari.

Questa condizione richiede di impiegare lunghezze d'onda molto piccole, tipiche della radiazioni ionizzanti. Inoltre, regolare la frequenza dei fotoni in modo da renderla vicina a quella di risonanza risulta complesso, essendo il fotone privo di massa a riposo.

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

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

Per il trasporto dell'energia vengono utilizzate microcorrenti, di frequenza elevata

e bassa intensità così che il tessuto non subisca danno termico.

Gli effetti che si osservano sono dovuti solo all'interazione tra cellule ed elettroni che oscillano a specifiche frequenze. Lo spettro di frequenze da utilizzare va da 4 a 64 MHz, ovvero nel campo delle medie-alte frequenze.

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

### 1.4.1 Vesalius e Rexon-age

Il bisturi **Vesalius** è un particolare tipo di bisturi elettronico, in grado di tagliare i tessuti umani senza portarli a necrosi per surriscaldamento, tipico inconveniente dell'elettrobisturi classico[12].

I danni termici vengono evitati perchè la temperatura è mantenuta sotto i 50°C, limite di sopravvivenza cellulare, quindi le cellule vicine a quella tagliata non vengono danneggiate. Le cellule infatti non si rompono a seguito del surriscaldamento, ma perchè entrano in risonanza ed i legami molecolari si scindono. L'evidente vantaggio clinico è quello di una guarigione più veloce e meno dolorosa[13].

La teoria della risonanza quantica molecolare è stata sfruttata anche per un'applicazione con fini molto diversi da quelli del bisturi Vesalius, ossia la rigenerazione tessutale. Il **Rexon-age** è infatti un'innovativa tecnologia che mediante l'uso delle piccole correnti generate dall'applicazione del campo elettrico variabile al tessuto biologico stimola un rinnovamento delle cellule.

Questo effetto è dovuto all'uso di uno spettro di frequenze leggermente più ampio di quello sfruttato dal Vesalius e di un'intensità del campo elettrico minore.

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

Dalle sperimentazioni su colture di mioblasti e fibroblasti e su proteine in soluzione si è potuto innanzitutto escludere un eventuale danneggiamento della struttura proteica e l'apoptosi[14].

In altri studi si sono potuti osservare i processi rigenerativi su muscoli pellicciai

di topo, e l'ipotesi è che derivino dall'iniziale piccolo danno che le correnti hanno causato alle cellule.

La stimolazione di fibre muscolari murine ha permesso poi di osservare che l'applicazione delle microcorrenti su cellule eccitabili è legata ad una depolarizzazione della membrana cellulare e ad un rilascio di calcio, non tale da innescare la contrazione, ma indicativo di una aumentata attività cellulare[15].

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

Dall'osservazione della sua azione a livello cellulare nasce quindi l'ipotesi della possibile influenza di una stimolazione con risonanza molecolare anche nel trattamento di tumori cerebrali: è possibile che l'applicazione del campo elettrico alle particolari frequenze usate dal Rexion-age sia in grado di introdurre una variazione nel tasso di proliferazione delle cellule tumorali[16].

## 1.5 Precedenti sperimentazioni

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

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

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

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

I primi test sono stati effettuati con stimolazioni di pochi giorni (tre) ed una potenza nominale di 40, corrispondente a una potenza efficace di 3,47 Watt. Dai risultati è emersa una leggera diminuzione del tasso di crescita delle cellule.

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

E' stato infine deciso di proseguire con nuovi test che prevedevano un aumento della potenza applicata e possibilmente anche della durata del periodo di stimolazione. In questa fase si sono ottenuti dei risultati decisamente migliori rispetto alle prime sperimentazioni. Essi infatti si riferiscono a stimolazioni sempre di 3 o 4 giorni ma con potenza aumentata ad un valore nominale di 50(6,56 Watt) e rispecchiano un'effettiva diminuzione del tasso di proliferazione delle cellule trattate rispetto ai controlli non trattati nonostante una significativa deviazione standard sulla misura.





# Capitolo 2

## Materiali e metodi

### 2.1 Obiettivo della sperimentazione

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

La tecnologia su cui si basa il *Rexon-age* svolge un'intensa e dimostrata attività a livello cellulare, che però non è stata ancora completamente studiata ed i cui effetti potrebbero essere più ampi di quelli per cui è attualmente utilizzata.

Da questa considerazione è nata l'ipotesi di una possibile influenza del trattamento sulla proliferazione delle cellule tumorali.

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

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

In particolare lo studio qui affrontato è volto a verificare e quantificare la diminuzione del tasso di crescita cellulare dovuto all'applicazione di una potenza efficace di 11,74 Watt, ossia leggermente superiore a quella dei test precedenti.

## 2.2 Cellule H4

Per la sperimentazione sono state utilizzate *cellule H4*, ossia un particolare tipo di astrocitoma umano. Tali cellule sono caratterizzate da una forma poligonale epiteliale ed una durata del ciclo di divisione cellulare di 48 ore circa.

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

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

Il *D-MEM* è un terreno di coltura liquido con adeguato contenuto di amminoacidi, vitamine, sali e zuccheri. Ad esso si aggiunge siero bovino fetale ricco di proteine plasmatiche, fattori di crescita, ormoni ed altri elementi come transferrina albumina, colesterolo, acidi grassi e glucocorticoidi.

Infine gli antibiotici, che sono necessari per evitare la contaminazione delle petri da parte dei batteri.

## 2.3 Dispositivo Raxon-age

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

Le caratteristiche tecniche del Raxon-age sono le seguenti:

- Tensione d'alimentazione: 230V
- Frequenza d'alimentazione: 50/60Hz
- Potenza massima assorbita dalla rete: 250VA
- Potenza massima in uscita: 40Watt/1500 $\Omega$

- Frequenza in uscita: spettro (brevettato) in frequenze da 4MHz a 64MHz
- Grado di protezione contro ingresso di liquidi: IPX0

## 2.4 Test svolti

Ogni sperimentazione è stata effettuata utilizzando 20 petri di diametro pari a 35mm, suddivise in due gruppi: “stimolate”, a cui viene effettivamente applicato il trattamento, e “controlli”, utilizzate come confronto.

Ogni stimolazione, applicata una volta al giorno, ha avuto una durata di 10 minuti ed una potenza nominale impostata a 60, corrispondente in valore efficace ad una tensione di 119,6 Volt, una corrente di 0,098 A, per una potenza efficace di 11,74 Watt.

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

La petri va posizionata sopra l’elettrodo adesivo di terra, mentre all’interno della stessa si posiziona l’elettrodo di stimolazione, direttamente a contatto con il terreno di coltura.

Dopo ogni stimolazione, le petri vengono riposte nell’incubatore, con condizioni ideali per la riproduzione cellulare.

Tale incubatore mantiene una temperatura di 36,5°C ed una concentrazione di anidride carbonica del 5%.

Le condizioni delle petri vengono mantenute costanti per tutta la durata del trattamento. Quando necessario, in generale al terzo giorno, si rinfresca il terreno di coltura.

All’inizio ed alla fine del periodo di stimolazione le cellule vengono fotografate tramite fotocamera CCD applicata ad un *microscopio Nikon Eclipse 80i* in campo chiaro, che fornisce un ingrandimento di 4x, su tali foto è stato poi effettuato il conteggio delle cellule presenti.

Per ogni test sono quindi necessari:

- 20 petri da 35 mm di diametro l’una, contenenti cellule H4 e terreno di coltura;

- Dispositivo Rexon-age con opportuni elettrodi;
- Cappa a fusso laminare;
- Incubatore;
- Microscopio ottico.

### 2.4.1 Primo tipo di test

Il primo test ha previsto un periodo di trattamento di 4 giorni ed è stato ripetuto, in due settimane diverse, su gruppi di petri diversi. Durante la prima settimana è stata applicata una potenza nominale di 50. Durante la seconda invece si è scelto di aumentare la potenza a 60. In questo modo si è potuto fare un confronto tra i tassi di crescita medi calcolati per i due diversi gruppi a parità delle altre condizioni a cui erano sottoposte le petri, come: la durata della singola stimolazione (pari a 10 minuti) e la durata del trattamento (4 giorni).

Inoltre per ogni stimolazione, le due petri (stimolata e controllo) identificate come coppia, sono state manipolate sempre insieme in modo da essere sottoposte a sbalzi termici equivalenti.

L'elettrodo viene lasciato giornalmente in immersione per 10 minuti anche nelle petri segnate come controlli, senza avviare la stimolazione al fine di sottoporre ciascun gruppo di cellule alle medesime condizioni. L'unico parametro che differenzia "petri stimulate" da "petri controllo" risulta essere infatti che nelle prime avviene un passaggio di corrente, mentre nelle seconde non avviene. Prima e dopo l'intero periodo del trattamento le cellule sono state fotografate, riprendendo per ogni petri sei zone casualmente scelte e contrassegnate in linea retta sul fondo della capsula stessa con un pennarello all'inizio della settimana in modo da poter monitorare sempre lo stesso campo. Protocollo sperimentale:

- Allestimento di 20 petri contenenti le cellule da analizzare ed il rispettivo terreno di coltura, suddivise in 10 coppie "stimolata/controllo";
- Segnalazione su ognuna delle petri dei sei campioni scelti;
- Monitoraggio delle cellule prima della stimolazione nelle 6 zone campione;

- Stimolazione giornaliera delle dieci petri indicate come “stimolate” con il Rexon-age regolato a 50/60 per una durata di 10 minuti, per 4 giorni;
- Immersione giornaliera dell’elettrodo nelle 10 petri indicate come controlli, dieci minuti l’una per ogni giorno di stimolazione ;
- Al terzo giorno il terreno viene rinfrescato;
- Monitoraggio delle cellule nelle 6 zone campione dopo la stimolazione.

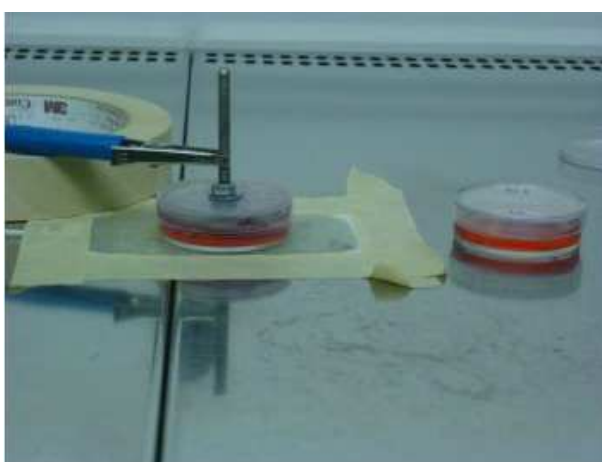


Figura 2.1: Stimolazione petri sotto cappa sterile

### 2.4.2 Secondo Test

Il secondo test si è svolto similmente al primo ma con una differenza determinante riguardo alla durata del periodo di stimolazione. Entrambi i trattamenti infatti sono proseguiti per 12 giorni, per un totale di 9 giorni effettivi di stimolazione (escludendo i weekend e il secondo venerdì in cui sono state effettuate le fotografie finali).

Con questa tipologia di test si è ottenuto un numero più elevato di campioni da confrontare infatti, per il primo gruppo di petri si sono rilevate le immagini all’inizio della prima settimana, al venerdì, all’inizio della seconda settimana e al venerdì della seconda settimana ottenendo  $120 * 4 = 480$  immagini.

Per il secondo gruppo di petri la rilevazione è stata effettuata oltre che per questi

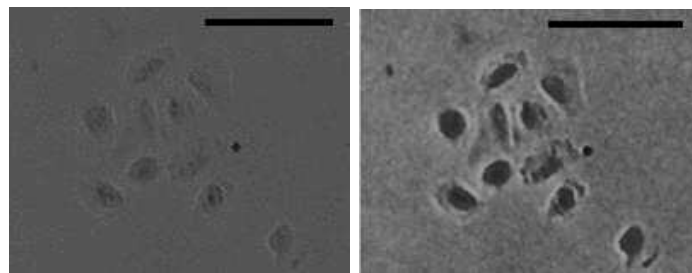
giorni anche i mercoledì in modo da ottenere una stima ancora più precisa dell'andamento dei tassi di crescita delle cellule, per un totale di  $120 * 6 = 720$  immagini. Entrambi i gruppi sono stati trattati con una potenza nominale di 60. Il protocollo sperimentale eseguito per questi due tipi di test segue quello descritto per i due test precedenti apportando le modifiche sopra indicate (potenza per entrambi a 60, durata di stimolazione di 9 giorni effettivi).

# Capitolo 3

## Risultati

### 3.1 Elaborazione dei dati

Per rendere più semplice ed accurata la conta delle cellule, l'immagine è stata migliorata tramite *filtri sw* realizzati in *Matlab* volti ad aumentare il contrasto, in modo da poter distinguere più chiaramente i nuclei delle singole cellule. Nelle immagini migliorate si sono poi contate le cellule presenti (prima, durante e dopo i trattamenti), con l'aiuto del programma *ImageJ*.



(a) Prima applicazione filtro (b) Dopo applicazione filtro

Figura 3.1: Ottimizzazione delle immagini-Scale Bar  $100\mu m$

A titolo di esempio si riportano nella pagina seguente 4 immagini: 2 appartenenti a una petri stimolata (una all'inizio della settimana e una alla fine della stimolazione) e 2 appartenenti al rispettivo controllo, (anche in questo caso le immagini sono relative al giorno di inizio e fine trattamento).

La stimolazione in questione riguarda il secondo tipo di test, quello da 9 giorni,



e si può notare come nelle immagini sia particolarmente in evidenza la riduzione del tasso di crescita nelle stimulate piuttosto che nei controlli.

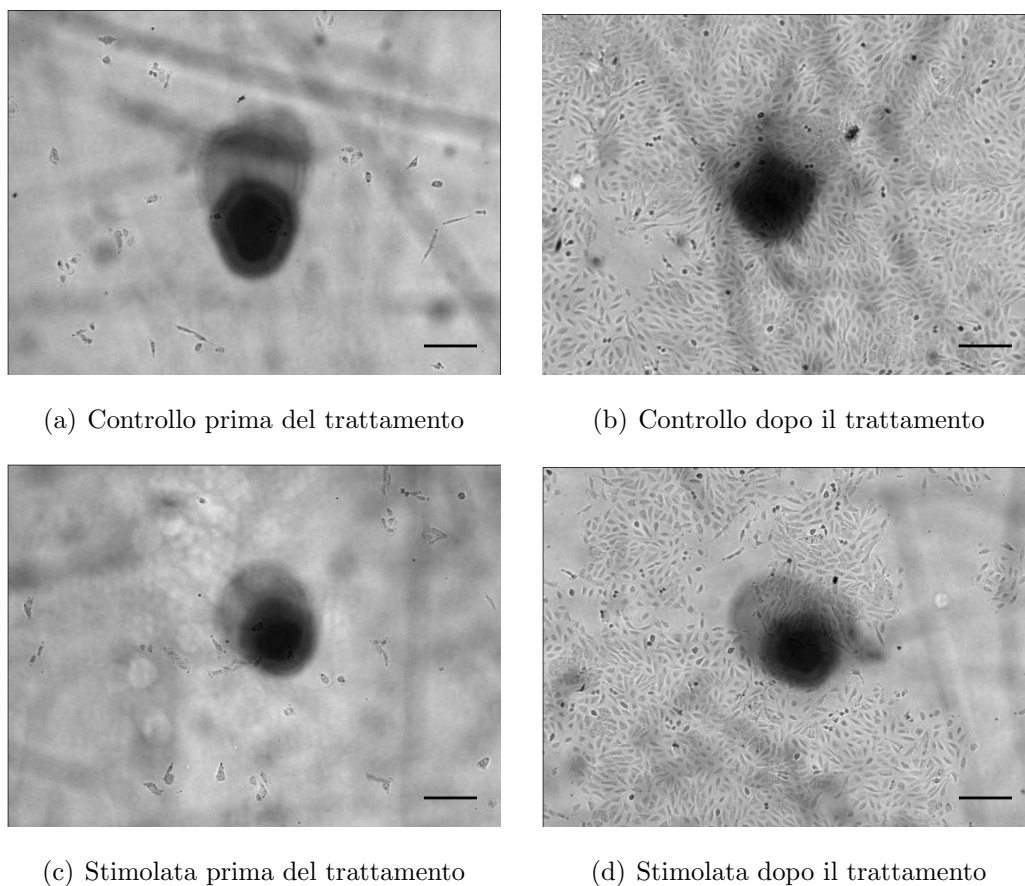


Figura 3.2: *Confronto tra controlli e cellule stimulate in un test di trattamento da due settimane-Scale Bar 100 $\mu$ m*

Una volta contate tutte le cellule per ogni immagine, sono stati calcolati i tassi di crescita, secondo la formula:

$$T = \left( \frac{N_f - N_i}{N_i} \right) \times 100$$

dove  $N_f$  indica il numero di cellule presenti dopo il periodo di trattamento ed  $N_i$  il numero di cellule presenti prima dell'inizio del trattamento. Per valutare la variabilità statistica dei risultati, legata alla variabilità dei tassi di crescita degli  $N$  campioni considerati intorno al valore medio  $X_m$ , si è considerato l'errore

standard di misura, calcolato secondo la formula:

$$SEM = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - X_m)^2}{N}}}{\sqrt{N}}$$

Questo tipo di errore si utilizza per esprimere l'attendibilità di un test identificandosi come una stima della variabilità dello stimatore, in questo caso la media campionaria dei singoli tassi. La SEM rappresenta quindi una misura di precisione: minore risulta il suo valore, maggiore risulta l'attendibilità del test.

## 3.2 Primo Test

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

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

Primo trattamento:

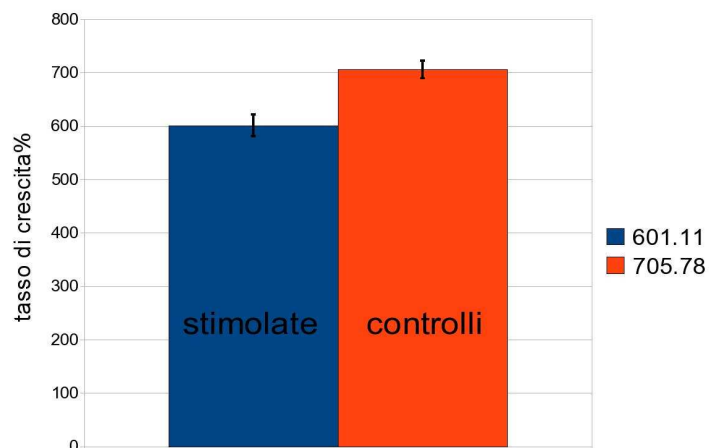


Figura 3.3: Trattamento da una settimana con Potenza Nominale pari a 50

Dopo 5 giorni dalla data in cui sono state prese le prime immagini, le cellule presenti nei controlli sono aumentate del 705,78%, mentre quelle delle petri stimolate del 601,11%. Si nota quindi una diminuzione nel tasso di crescita delle petri stimolate.

La differenza tra i tassi di crescita di controlli e stimolate è pari a 104,67%. Pur non essendo molto elevata, essa risulta comunque significativa rispetto al valore dell'errore standard di misura.

Tale considerazione induce a verificare questa evidenza in successivi test.

Secondo trattamento:

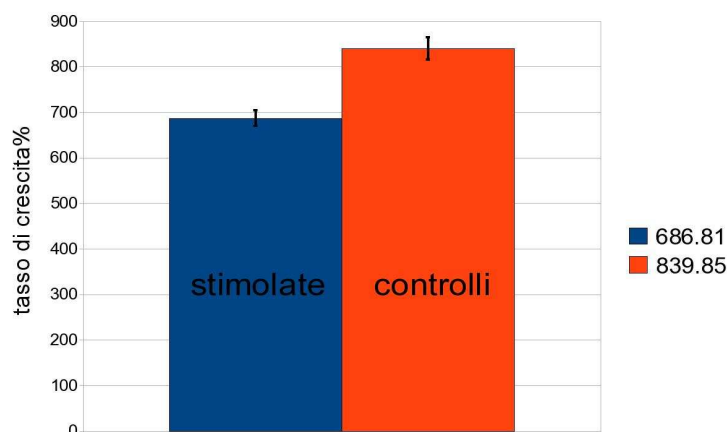


Figura 3.4: Trattamento da una settimana con Potenza Nominale pari a 60

Dopo 5 giorni dalla data in cui sono state prese le prime immagini, le cellule presenti nei controlli sono aumentate del 839,85%, mentre quelle delle petri stimolate del 686,81%.

La diminuzione del tasso di crescita delle cellule stimolate è superiore rispetto al test in cui la potenza applicata era pari a 6,56 Watt.

Questo può far supporre che l'aumento della potenza fornita durante la stimolazione, a parità di durata del periodo di trattamento e delle altre condizioni, induca una diminuzione della proliferazione delle cellule di astrocitoma. Anche in questo caso, considerando la variabilità statistica data dalla SEM, le differenze

tra i valori dei tassi sono visibili e si nota un notevole dislivello tra le due colonne dell'istogramma.

### 3.3 Secondo Test

Terzo trattamento:

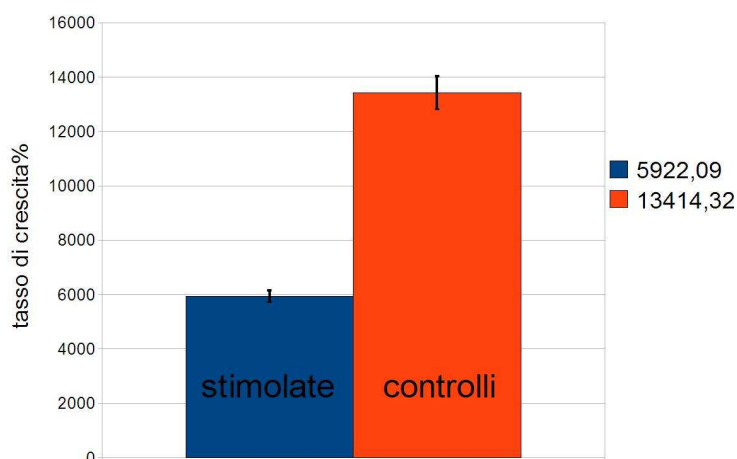


Figura 3.5: Trattamento da due settimane con Potenza Nominale pari a 60

Osservando l'istogramma sopra rappresentato si può notare chiaramente come la differenza tra i tassi di crescita tra “cellule stimolate” e “cellule controllo” sia di un valore decisamente rilevante e pari a 7492.23%.

Anche in questo caso il valore della SEM è quasi trascurabile rispetto al valore della misura. Ciò sta a significare che il test e la rielaborazione dei dati sono stati svolti in maniera precisa e accurata, senza estendere troppo la variabilità statistica del risultato finale. La differenza sostanziale tra gli esiti di questo test e quelli dei test precedenti è circa pari a un ordine e mezzo di grandezza

In base a tali risultati è possibile dedurre una prima considerazione: l'aumento della durata del trattamento cellulare ci permette di ricavare esiti sperimentali migliori.

Per assodare le conclusioni tratte dalla seguente tipologia di test, ne è stato effettuato un altro alle medesime condizioni di sperimentazione qui ora esposto.

Quarto trattamento:

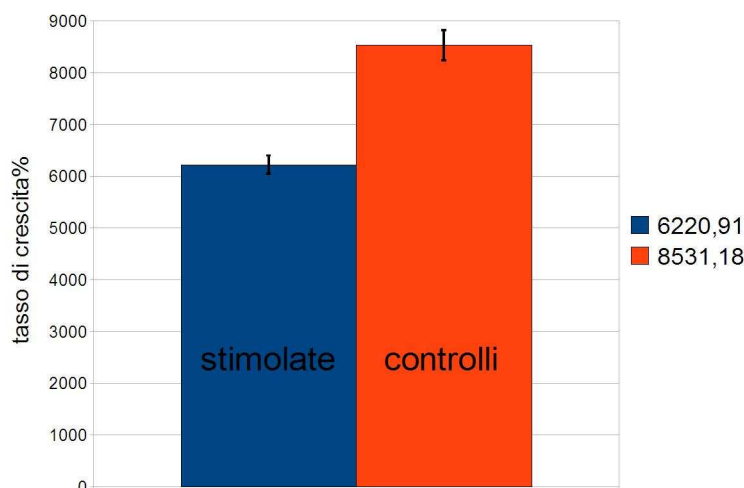


Figura 3.6: Trattamento da due settimane con Potenza Nominale pari a 60

La differenza tra i tassi di crescita dei due diversi gruppi “stimolate” e “controlli” è notevole anche in questo caso, ed è pari a 2310,27%.

Il valore dei tassi non è elevato come quello del test precedente in quanto all’inizio delle due settimane sono state piastrate sulle petri più cellule rispetto alle due settimane precedenti e quindi la crescita è stata più veloce, tanto che la maggior parte delle cellule è arrivata a confluenza già al mercoledì della seconda settimana.

Per questo motivo, nel calcolo del tasso di crescita, è stato preso come valore rappresentativo del numero di cellule finali (nella formula indicato con  $N_f$ ) il corrispondente valore del mercoledì della seconda settimana.

In questo modo è stato possibile arrivare ad un risultato più preciso evitando di esprimere il numero di cellule finali  $N_f$  in maniera troppo approssimativa.

Durante questo test, le cellule sono state fotografate a intervalli di due giorni in modo tale da poter calcolare i tassi a intervalli brevi e regolari ottenendo così un

andamento reale della crescita.

I risultati sono rappresentati nel seguente grafico:

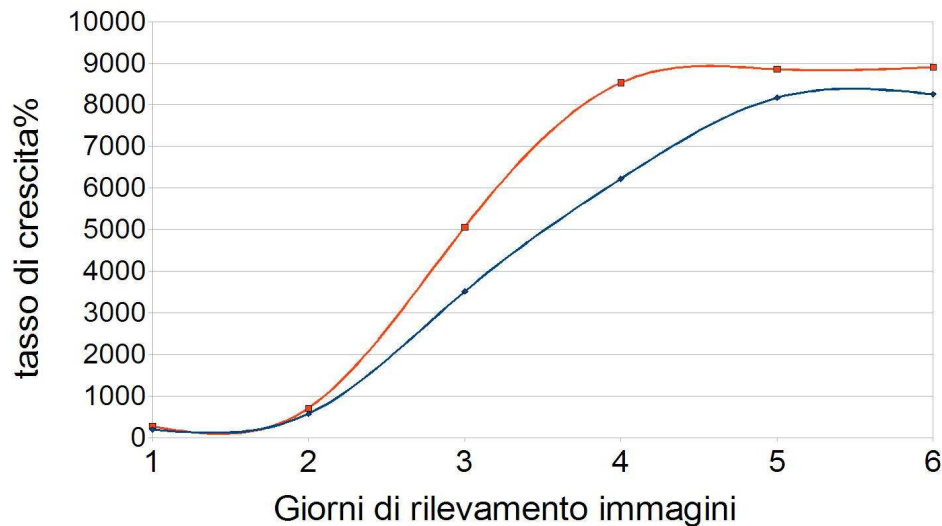


Figura 3.7: Andamento reale dei tassi di crescita per controlli (*blu*) e stimolate (*rosso*)

In questo grafico è rappresentato l'andamento dei tassi di crescita calcolati durante la sperimentazione e relativi ai giorni in cui sono state scattate le fotografie delle cellule. Nell'asse orizzontale sono riportati infatti dei numeri in ordine crescente rappresentanti ognuno un intervallo di due giorni.

Le cellule stimolate sono rappresentate dalla linea rossa mentre i controlli da quella blu.

Si può notare come alla fine delle due settimane entrambi i gruppi di petri siano giunti a confluenza. Questo è evidente osservando il valore dei tassi all'ultimo giorno saturo per entrambi i gruppi a un livello costante.

Un ulteriore aspetto rilevante è rappresentato da "quando" avviene questa saturazione: i controlli, considerando la durata complessiva del trattamento, giungono a confluenza dai 2 ai 3 giorni prima delle stimolate, e ciò ci permette di appurare che il loro tasso di crescita è nettamente superiore.



# Conclusioni

Test precedentemente effettuati hanno evidenziato come cellule di astrocitoma umano, se stimolate dall'applicazione di un campo elettromagnetico esterno, riducono il loro tasso di crescita. Risulta fondamentale sottolineare come tale riduzione sia causata esclusivamente dal campo elettrico in questione e non da altri fattori esterni.

La tesi sperimentale da me trattata conferma le valutazioni fatte nei lavori precedenti ed in aggiunta evidenzia come la proliferazione delle cellule diminuisca maggiormente per stimolazioni di durata più lunga.

Tali considerazioni vengono avvalorate dagli esiti dei due test eseguiti: gli istogrammi, che mettono a confronto i tassi di proliferazione di cellule stimolate e quelli di cellule controllo, presentano un dislivello molto evidente soprattutto nella tipologia di test durata due settimane.

La diminuzione del tasso di crescita è accompagnata da una variabilità statistica rappresentata dall'*errore standard di misura*.

Tale valore risulta per ogni test molto più piccolo del valore dei tassi tanto che, anche considerando il caso peggiore in cui la variabilità riduce la differenza tra i tassi di controlli e stimolate, l'altezza tra le due rispettive colonne risulta comunque molto diversa.

Per questo motivo si possono considerare tutti gli esiti ottenuti attendibili e molto precisi.

Essendo questa una valutazione statistica, sarebbe opportuno in ogni caso effettuare ulteriori test volti a diminuirne, per quanto possibile, la variabilità.

Per la prima tipologia di test si potrebbe pertanto utilizzare un numero maggiore di campioni per ciascuna petri, garantendo in questo modo una media dei tassi



più precisa.

Per la seconda tipologia di test invece si potrebbero piastrare meno cellule all'inizio della prima settimana di stimolazione, così da evitare che durante l'intero trattamento, si rischi di arrivare ad una confluenza di cellule nella petri. In questo modo si garantirebbe una più elevata precisione nella determinazione del numero esatto di cellule presenti ed una possibilità di prolungare ulteriormente il periodo di stimolazione, valutandone i corrispettivi effetti.

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

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

Saranno svolti inoltre dei trattamenti su cellule gliali sane per verificare la presenza di eventuali effetti sulla loro proliferazione.

# Bibliografia

- [1] F. W. Pfrieder, *Role of glia in synapse development*, 2002.
- [2] *Classificazione Internazionale delle malattie per l'Oncologia*, copyright 2000.
- [3] Harrison, *Principi di medicina interna*, el sevier ed.
- [4] Robbins and Cotran, *Le basi patologiche delle malattie*, mcgrow hill ed.
- [5] W.R.Adey, "Biological effects of electromagnetic fields," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 51, pp. 410–416, 1993.
- [6] M. R. Scarfi, *Effetti biologici dei campi elettromagnetici nella sperimentazione in vitro*.
- [7] S.K.Dutta, A.Subramoniam, B.Ghosh, and R.Parshad, "Microwave radiation-induced calcium ion efflux from human neuroblastoma cells in culture," *Bioelectromagnetics*, vol. 5, pp. 71–78, 1984.
- [8] T.A.Litovitz, D.Krause, M.Panafiel, E.C.Elson, and J.M.Mullins, *The role of coherence time in the effect of microwaves on ornithine the carboxylase activity*, 1993.
- [9] P.W.French, M.Donnelland, and D.R.McKenzie, "Electromagnetic radiation at 835mhz changes the morphology and inhibits proliferation of a human astrocytoma cell line," *Bioelectrochem and Bioenerg.*, vol. 43, pp. 13–18, 1997.
- [10] E.D.Kirson, Z.Gurvich, R.Schneiderman, E.Dekel, A.Itzhaki, Y.Wasserman, R.Schatzberger, and Y.Palti, *Disruption of cancer cell replication by alternative electric fields*, 2004.

- 
- [11] P. L. Corti and I. G. Pozzato, *Risonanza Quantica Molecolare e le sue applicazioni cliniche*.
- [12] P. C. Reggiani, *Comments on Vesalius and Rexionage, two applications of high frequency electrical fields, and preliminary experimental results*, 2007.
- [13] “Sito dell’azienda: [www.vesalius.it](http://www.vesalius.it).”
- [14] P. C. Reggiani, *Effetti di correnti ad alta frequenza e bassa intensità: biostimolazione e rigenerazione cellulare*, 2005.
- [15] P. C. Reggiani, “Biophysical effects of high frequency electrical field (4-64 mhz) on muscle fibers in culture,” *Basic and Applied Myology*, vol. 49, pp. 107–115, 2009.
- [16] “Sito dell’azienda: [www.rexon-age.it](http://www.rexon-age.it).”

# Ringraziamenti

Qua vanno messi i ringraziamenti