



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Neuroscienze-DNS

Corso di Laurea Tecniche Audioprotesiche

Presidente Prof. Gino Marioni

**DISEGNO E MESSA A PUNTO DI UN SISTEMA DI  
STIMOLAZIONE ACUSTICA IN VITRO:  
RISULTATI PRELIMINARI**

Relatore:

Prof.ssa Laura Astolfi

Laureanda:

Bianco Alessia

ANNO ACCADEMICO 2022/2023



# RIASSUNTO

Negli anni la stimolazione acustica è stata oggetto di studio in varie ricerche, ci si è chiesto quali erano gli effetti del suono sugli organismi, studiando e mettendo in atto metodologie di stimolazione differenti; si è cercato di comprendere cosa portasse ad ottenere un danno e cosa poteva essere spunto di benefici.

Gli studi precedenti, che analizzeremo nei prossimi capitoli, sono stati raccolti e confrontati dalla letteratura (Kwak et al., 2022); in particolare ci soffermeremo sui parametri, come intensità e frequenza, e sui limiti comuni riscontrati tra i vari articoli, punti fondamentali per la ricerca.

Nel primo capitolo si tratteranno argomenti di letteratura che analizzano il suono, in modo da avere chiari i concetti sui metodi utilizzati, la stimolazione acustica, in quanto funge da elemento portante della ricerca e infine il danno provocato dal rumore, fattore alla quale ci si aspetta di andare incontro con l'utilizzo del sistema disegnato per attuare la stimolazione acustica.

Nel secondo capitolo viene presentata la ricerca, il cui obiettivo è stato disegnare e attuare la messa a punto un sistema per lo studio della stimolazione acustica in vitro. Vengono descritti la nascita dell'idea, la realizzazione con i rispettivi materiali e metodi di costruzione, le verifiche di funzionamento ed efficacia, valutando parametri di vitalità e di danno acustico portando poi ad ottenere i risultati analizzati nel terzo capitolo.

In conclusione, vengono discussi i dati acquisiti in funzione dell'ipotesi, viene mostrato come la vitalità cellulare risulta ridotta per specifiche frequenze.

Infine, vengono messi in luce i limiti riscontrati come stimoli per le ricerche future.



# INDICE

1	INTRODUZIONE .....	1
1.1	Il suono: parametri acustici .....	1
1.2	La stimolazione acustica .....	2
1.3	Il danno da rumore .....	4
1.4	Stimolazione sonora <i>in vitro</i> , stato dell'arte.....	6
2	SCOPO.....	8
3	MATERIALI E METODI .....	9
3.1	Procedura .....	11
4	RISULTATI.....	14
4.1	Messa a punto .....	14
4.2	Test di vitalità.....	16
4.3	Danno da rumore .....	18
5	CONCLUSIONI .....	22
6	BIBLIOGRAFIA .....	24



# 1 INTRODUZIONE

Tutta l'esistenza dell'uomo è accompagnata dal suono, che si tratti di rumore, di voce, o di musica; lo scopriamo ancor prima di nascere e compone la colonna sonora della nostra vita.

## 1.1 Il suono: parametri acustici

Nel IV secolo Pitagora eseguì i primi studi cercando di spiegare cosa fosse il suono, definendolo in termini di “tensione” e “numero di vibrazioni” (Capparelli, 1988).

Si definisce che “qualsiasi tipo di suono è prodotto da un corpo che vibra” (Bersani et al., 2009); esso si propaga attraverso un qualsiasi mezzo, più efficacemente attraverso l'aria, grazie allo spostamento delle molecole e l'intensità delle forze intermolecolari presenti nel mezzo di propagazione determinano la velocità.

I fattori che caratterizzano il suono sono: il timbro, il tono e l'intensità.

- Il timbro: rappresenta la qualità e dipende dalle frequenze sovrapposte alla fondamentale dette armoniche; grazie al timbro ci è permesso riconoscere la voce di una persona conosciuta.
- Il tono: o altezza, determina la frequenza della vibrazione, è indicato dall'unità di misura Hertz e indica i cicli al secondo. L'orecchio umano è in grado di distinguere suoni in un range di frequenze da 20Hz a 20000 Hz, con una maggior sensibilità tra i 1000 e 4000 Hz.
- L'intensità: direttamente proporzionale all'ampiezza dell'onda sonora. L'unità di misura del volume è una misura logaritmica in funzione della soglia udibile e viene definita come il decibel.

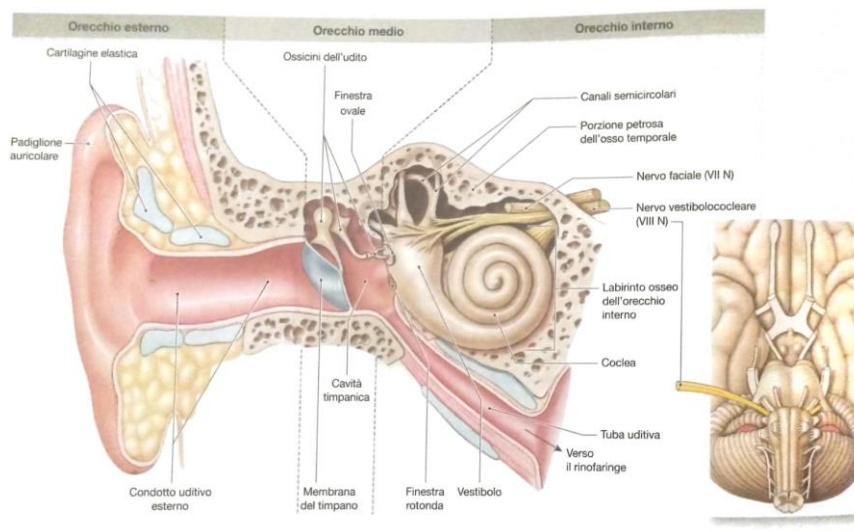
Lo studio della soglia udibile per l'uomo va dai 0 dB fino a 120 dB, definita anche soglia del dolore. (Sherwood, 2012).

## 1.2 La stimolazione acustica

L'orecchio umano percepisce il suono grazie ad una complessa struttura anatomica, esso è in grado di distinguere nello specifico tutti i parametri descritti nel paragrafo precedente, intensità, frequenza e timbro risultano componenti fondamentali per determinare non solo lo stimolo stesso, ma anche per definire la direzione da cui proviene. (Drioli e Orio, 2004).

L'orecchio, come mostrato in *Figura 1*, viene diviso in tre parti principali:

- l'orecchio esterno: composto dal padiglione auricolare e dal condotto uditivo; esso svolge la funzione di convogliare il suono nel meato acustico esterno e di proteggere la membrana timpanica.
- l'orecchio medio: formato dalla cassa timpanica in cui è contenuta la catena degli ossicini (martello, incudine e staffa) che trasmette le vibrazioni della membrana timpanica alla finestra ovale, componente dell'orecchio interno. Inoltre, nell'orecchio medio troviamo la tuba di Eustachio che mette in comunicazione la cavità timpanica con il rinofaringe.
- l'orecchio interno: determinato dalla presenza del vestibolo, dei canali semicirculari e della coclea, nella quale sono contenuti i recettori uditivi che creano lo stimolo nervoso che si propaga fino a raggiungere il complesso cerebrale. (Martini, Nath, e Tallitsch, 2019).



*Figura 1: Organizzazione anatomica dell'orecchio (Martini, Nath, e Tallitsch, 2019)*

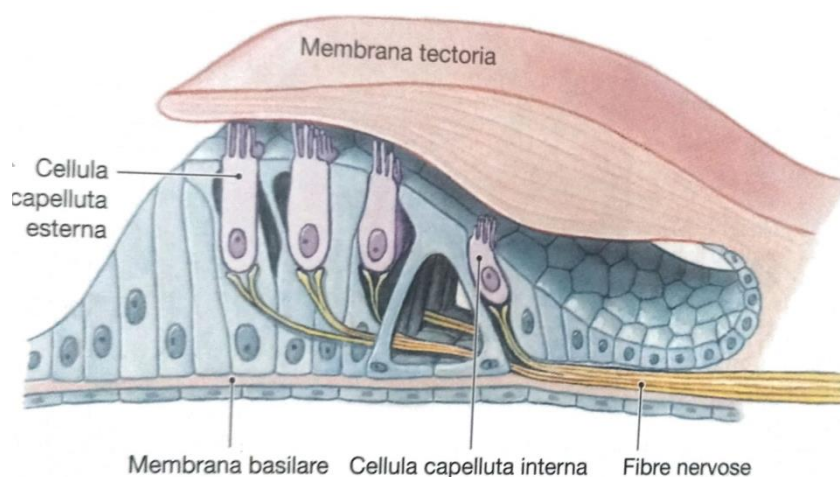


Entrando nei dettagli, la coclea è chiamata così per la sua forma a chiocciola data da un sistema cilindrico lungo circa 30mm che si arrotola su sé stesso per due giri e mezzo, ed è suddivisa in tre scomparti ripieni di liquido, rispettivamente è composta da: scala media, scala timpanica e scala vestibolare.

Nella scala media vi è la membrana basilare, che funge da sostenitore dell'organo del Corti, illustrato in *Figura 2*, definito come organo sensoriale dell'udito grazie alla presenza, nell'uomo, di circa 15.500 cellule ciliate suddivise in: 12.000 cellule ciliate esterne disposte parallelamente in tre file e 3.500 cellule ciliate interne disposte in un'unica fila. Esse sono organizzate in modo tale da percepire le frequenze acute nella porzione basale discendendo fino all'apice dove vengono distinte le frequenze gravi. (Giordano, 2010).

Ogni cellula ciliata uditiva è composta da oltre cento ciglia nella sommità, il cui apice viene chiamato chinociglio, permette alle cellule ciliate di entrare in contatto con la membrana tectoria che sovrasta per l'intera lunghezza l'organo del Corti.

Nel momento in cui la membrana basilare si muove, varia la posizione delle ciglia rispetto alla membrana tectoria che invece rimane stazionaria, questo meccanismo permette l'apertura alternata dei canali ionici e di conseguenza una variazione di potenziale che provoca conseguenti cambiamenti nella trasmissione degli impulsi nervosi da parte del nervo acustico. (Sherwood, 2012).



*Figura 2 Organo del Corti (Martini, Nath, e Tallitsch 2019)*

### 1.3 Il danno da rumore

Il danno da rumore rappresenta la causa di ipoacusia più diffusa in quanto, una prolungata esposizione a fonti sonore superiori a 85 dB per un tempo prolungato rappresenta un vero e proprio pericolo per l'udito. (Sabatino, 2015)

Questo pericolo è aumentato negli anni e la prima causa rilevata è il danno da rumore in luogo di lavoro; altre situazioni che rappresentano un pericolo è il traffico stradale, che raggiunge valori pari circa a 90dB, o l'ascolto di musica ad alto volume durante un concerto o in discoteca che raggiunge anche i 115dB. L'orecchio subisce un aumento di stress a livello metabolico dell'orecchio interno, in particolare dei recettori neurosensoriali provocando una desensibilizzazione uditiva; in alcuni casi l'innalzamento della soglia uditiva può essere temporaneo e viene identificato con la sigla TTS (*Temporary Threshold Shift*), la durata di questo effetto è in proporzione con l'intensità e la frequenza del suono e alla durata di esposizione allo stimolo acustico; quando non avviene il recupero funzionale delle cellule il danno risulta permanente PTS (*Permanent Threshold Shift*).

Una volta avvenuto il danno acustico a livello cellulare esse non si rigenerano e la perdita rimane permanente. Le prime cellule ciliate che solitamente si danneggiano sono quelle situate nella porzione più sensibile ovvero nella zona basale della coclea, corrispondenti alle frequenze dai 3.000 ai 6.000 Hz. (Giordano, 2010)

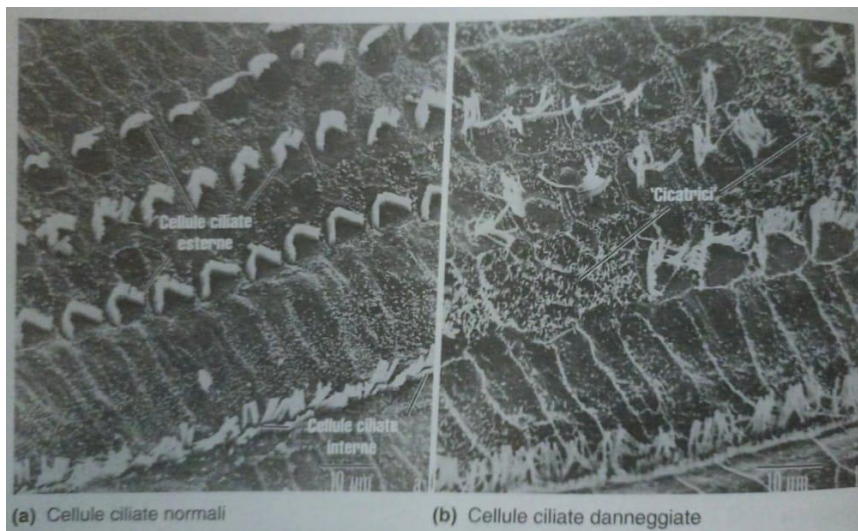
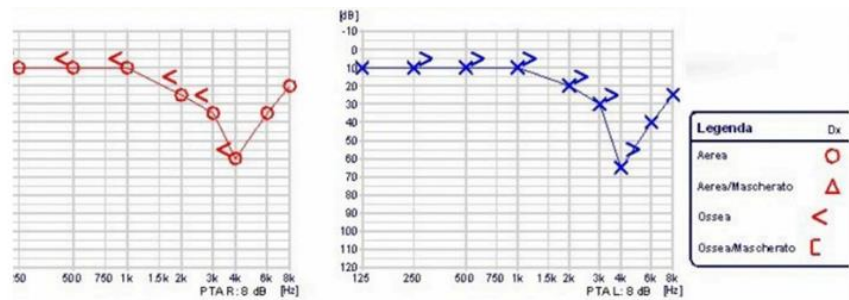


Figura 3 Danno acustico (Giordano, 2010)

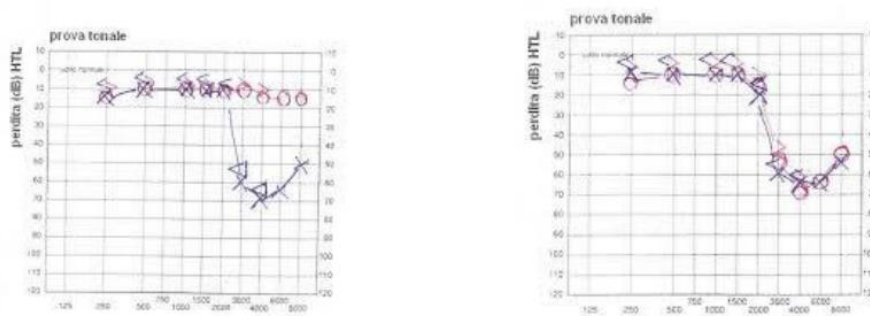
Per la diagnosi di ipoacusia da rumore si effettuano al paziente gli esami audiometrici, in particolare ci si aspetta di essere di fronte alle due situazioni:

- Danno cronico da rumore: insorge negli individui esposti ad un rumore di intensità maggiore o uguale a 80-85 dB per un tempo prolungato. L'audiogramma, dei soggetti in questione mostra, *Figura 4*, la presenza di un'ipoacusia simmetrica neurosensoriale bilaterale con un calo uditivo che interessa per lo più le frequenze 3k-6k Hz per poi risalire verso gli 8k Hz.



*Figura 4 Esame audiometrico: ipoacusia da rumore*

- Trauma acustico acuto: si presenta successivamente ad un'esposizione ad una sorgente sonora di alti livelli, ad esempio un'esplosione, e il quadro audiometrico, come dimostra la *Figura 5*, indica ipoacusia mista monolaterale o bilaterale, con un interessamento particolare per le alte frequenze.



*Figura 5 Esame audiometrico: trauma acustico*

Entrambi i casi riportati riportano un interessamento del danno nelle frequenze acute che, come spiegato nei paragrafi precedenti, caratterizzano la porzione cocleare più sensibile.

## 1.4 Stimolazione sonora *in vitro*, stato dell'arte

Il lavoro esposto in questa tesi ha come punto di partenza l'analisi di un articolo letterario intitolato: "Music for Cells? A Systematic Review of Studies Investigating the Effects of Audible Sound Played Through Speaker-Baed System on Cell Cultures". (Kwak et al., 2022)

Nell'articolo, come mostrato in *Figura 6*, vengono selezionati 12 articoli su 95 selezionati tramite ricerca online sulla base alla complessità dei suoni somministrati.

Author (Year)	Cell type	Sound type	Sound frequency (Hz)	Sound pressure level (dB SPL) /Amplitude ( $\mu\text{m}$ )	Duration	Key outcome
Shaobin et al. (2010)	Bacteria cell ( <i>Escherichia coli</i> )	Sine tone	1,000	90 dB SPL	60 (stimulation) + 180 (break) $\times$ 6 times	Cell colony forming upregulated to 141.6%
			5,000			Cell colony forming upregulated to 130%
			10,000			Cell colony forming upregulated to 131.1%
Aggio et al. (2012)	Yeast cell ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	Sine tone	100	92 dB SPL	14 h	Growth rate 8.7% higher ( $p < .005$ ) <sup>d</sup> , biomass production up to 14% lower ( $p < .05$ )
			10,000	89 dB SPL		Growth rate 11.5% higher ( $p < .005$ ) <sup>d</sup> , biomass production up to 14% lower ( $p < .05$ )
Choi et al. (2016)	Human cell (Human BM-Mesenchymal Stem Cells (hBM-MSCs))	Sine tone	1,000	81 dB SPL <sup>c</sup>	168 h	Induced neural differentiation (increased Pyk2 and CREB level $p < .05$ )
Mohammed et al. (2016)	Human cell (LL24; lung fibroblast)	Sine tone	100	9 $\mu\text{m}^a$	5 min	Increased cell migration by 6% ( $p < .05$ ), diminishes after 2~3 h
			200	5 $\mu\text{m}^a$		Decreased cell migration compared to 100 Hz (no significant change)
			400	2 $\mu\text{m}^a$		Decreased cell migration compared to 400 Hz (no significant change)
			800	<1 $\mu\text{m}^a$		No change in cell migration
			1,600	<1 $\mu\text{m}^a$		Decrease in cell migration by 50% ( $p < .05$ )
Kothari et al. (2018)	Bacteria cell ( <i>Chromobacterium violaceum</i> )	Sine tone	300	70, 89.5 dB SPL	14 h	70 dB SPL: Cell growth of <i>C. Violaceum</i> by 15.02% ( $p < .001$ ); 89.5 dB SPL: QS-regulated pigment production increased by 59.63%
Kumeta et al. (2018)	Mouse cell (ST2; bone marrow)	Sine tone	55	76, 82, 88, 94 dB SPL	120 min	Similar effect to 440 Hz in the same study
			110			Similar effect to 440 Hz in the same study
			4,000			Similar effect to 440 Hz in the same study
			440			Sine: Ptgs2, CTGF, TNC expression downregulated to 60%–80% ( $p < .01$ ), Triangle: downregulated only TNC, Square: no significant effect

*Figura 6* Tabella rappresentante i 12 articoli selezionati (Kwak et al. 2022)

Gli articoli vengono riportati suddivisi in due gruppi, uno raggruppante gli studi che hanno utilizzato i suoni semplici, toni puri, e l'altro con gli studi che hanno somministrato suoni complessi come musica.

Confrontando i vari esperimenti, l'articolo raggruppa le osservazioni ottenute dai 12 studi analizzati, risultando che tra gli effetti ottenuti dai vari test si ha notato:

- una maggiore migrazione
- proliferazione
- formazione della colonia
- regolazione dell'espressione genica

Allo stesso tempo però, ci sono state delle difficoltà nel trovare un punto in comune per poterli confrontare in modo coerente i 12 articoli selezionati.

Questo ha causato differenze statistiche sia sull'utilizzo degli stimoli sonori che ogni studio ha adottato, sia delle misurazioni effettuate, modelli sperimentali utilizzati e strategie di osservazioni che risultano non confrontabili fra loro.

## 2 SCOPO

Lo studio eseguito nella presente tesi ha come obiettivo il disegno e la messa a punto di un sistema di stimolazione acustica *in vitro*.

Alla luce dei risultati riportati nella revisione della letteratura “*Music for Cells? A Systematic Review of Studies Investigating the Effects of Audible Sound Played Through Speaker-Based Systems on Cell Cultures*” come primo approccio si è cercato di prestare la massima attenzione nel ridurre il più possibile le problematiche in essa evidenziate, al fine di avere un ambiente sonoro controllato:

- eseguire analisi ambientali;
- standardizzare i parametri della stimolazione sonora;

Ci si è posti l’obiettivo di creare un sistema di stimolazione il più possibile controllato sia per standardizzare gli esperimenti futuri, sia per preservare la salute e la tutela degli operatori che hanno intenzione di utilizzare tale sistema. Si aspira a creare un ambiente che garantisca l’insonorizzazione sia esterna sia interna, anche per far sì che lo stimolo sonoro, inviato per stimolare le colture cellulari testate, non venga mascherato dai rumori ambientali esterni.

Un secondo obiettivo è quello di validare il sistema di stimolazione sonora *in vitro* messo a punto, mediante la somministrazione del danno da rumore *in vitro*.

### 3 Materiali e Metodi

In questo paragrafo verranno elencati i materiali utilizzati per la realizzazione dell'incubatrice, tenendo conto che saranno necessari più passaggi di costruzione.

Per la descrizione dei materiali utilizzati è importante tenere conto di due punti fondamentali della costruzione del nostro sistema:

- 1) disegnare e creare un ambiente insonorizzato sia dall'interno verso l'esterno che viceversa.
- 2) descrive i materiali necessari per garantire un sistema di stimolazione sofisticato e controllato.

Per la realizzazione dell'incubatore e renderlo il più possibile insonorizzato sia internamente che esternamente è stata utilizzato:

- Un parallelepipedo in plexiglas trasparente, rispettivamente di misure 80x40x40cm;
- Nastro isolante;
- Gomma di piombo spessa 5 mm (figura 7),



*Figura 7 Gomma piombo*

- Piedini in plastica di forma conica;
- Nastro biadesivo;

- Pannelli fonoassorbenti conici 30x30x5 cm con base quadrata, portando la dimensione totale di 7cm., Figura 8;



*Figura 8 Pannello fonoassorbente*

Per determinare il modello di stimolazione invece è stato necessario:

- Computer con installato il software REW e Friture;
- Scatola di polistirolo 15x15x10 cm;
- 2 casse da 45 watt;
- Amplificatore;
- Microfono di precisione Dayton Audio i-MM6 riportato in Figura 9;



*Figura 9 Microfono di precisione*

- Fonometro;
- Linea cellulare mimica del tessuto sensoriale derivante dall'organo del corti di topo immortalizzato, OC-K3



### 3.1 Procedura

Prima di procedere con l'effettiva costruzione del sistema di stimolazione acustica è stato studiato e approfondito quale fosse la miglior disposizione dei vari materiali.

Nell'articolo di letteratura sono stati mostrati, in Figura 10, due modalità di costruzione dei settaggi.

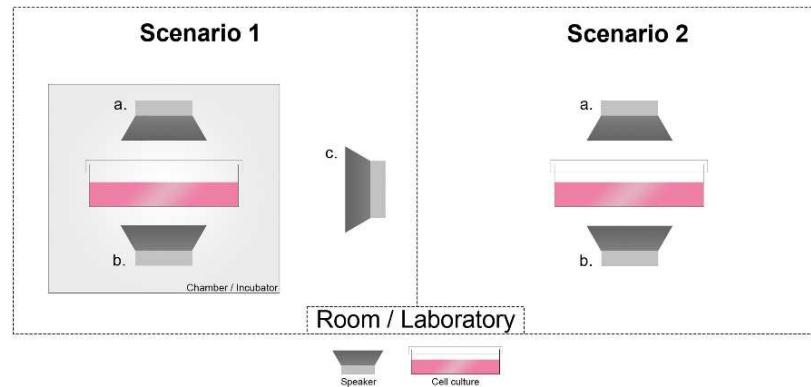


Figura 10 Modelli setup (Kwak et al. 2022)

Inoltre, dall'articolo studiato, evince che dal momento che non tutti gli studi hanno dato indicazioni sul setup utilizzato sarebbe utile avere una linea guida sulla costruzione, in cui si manifesta l'importanza di avere un ambiente controllato a livello acustico, tramite una camera anecoica o una soluzione che riduca il suono. (Kwak et al. 2022)

Partendo da questi spunti, e dallo studio dei settaggi utilizzati nell'articolo è stato disegnato il progetto del sistema di stimolazione acustica, mostrato in Figura 11.

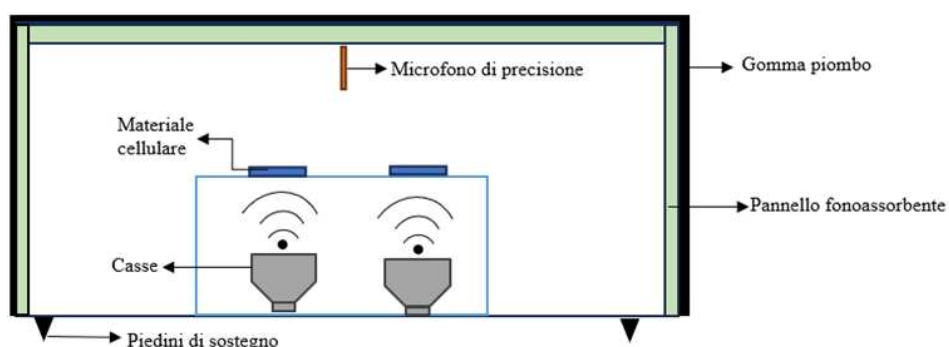


Figura 11 Disegno sistema di stimolazione acustica

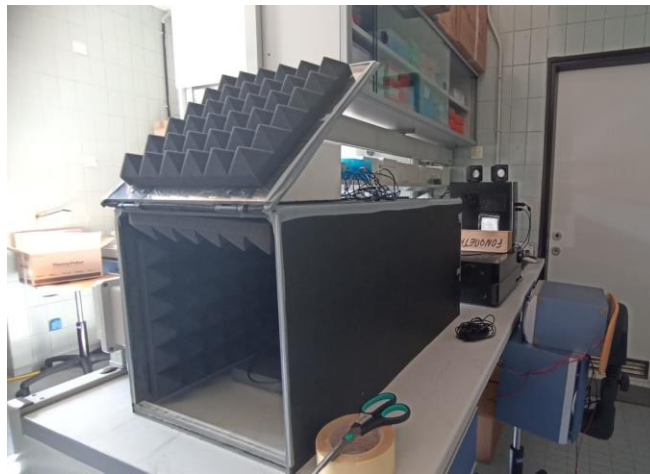
Una volta stilato il disegno del progetto è iniziata la parte di costruzione, suddivisa in vari step in modo da raggiungere un risultato efficace ed efficiente per gli esperimenti.

Come prima cosa sono state prese le misure dell'incubatrice in plexiglas per poi ritagliare in modo preciso il pannello di gomma e fissarla con nastro biadesivo per ricoprire le pareti esterne del parallelepipedo.

Successivamente sono stati inseriti i pannelli fonoassorbenti all'interno dell'incubatrice e i piedini di sostegno.

In particolar modo i piedini sono di forma conica in modo da limitare l'interazione della base dell'incubatore con la superficie del piano di appoggio.

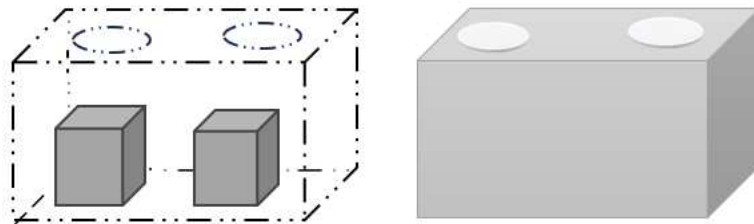
In Figura 12 viene mostrato il risultato ottenuto dalla prima parte di costruzione del sistema di stimolazione acustica incentrata sull'insonorizzazione dell'incubatore.



*Figura 12 Insonorizzazione dell'incubatore*

La seconda fase di costruzione è incentrata per lo più sulla creazione di un sistema idoneo alla stimolazione acustica del materiale cellulare che verrà successivamente testato.

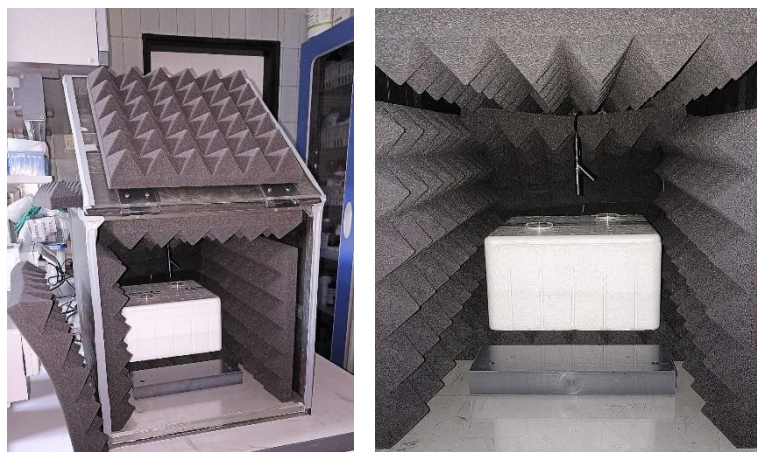
Per garantire un sostegno per le piastre di materiale biologico esposte è stata utilizzata la scatola di polistirolo che, come mostrato in Figura 13, è stata appositamente ritagliata per permetterne l'appoggio sul coperchio e l'inserimento interno delle due casse da 45 watt, sottostanti al sito di collocazione delle piastre cellulari, con una distanza pari a circa 4 cm per permettere una stimolazione diretta e senza ostacoli fisici.



*Figura 13 Progetto collocamento casse e piastrine di materiale cellulare*

Le casse sono state inoltre collegate con l'amplificatore che permetteva il corretto controllo dell'intensità del segnale acustico inviato dal computer attraverso il software REW e Friture.

A seguire, come illustrato da Figura 12, è stato posizionato il microfono di precisione, esso è stato collocato perpendicolarmente rispetto alla scatola di sostegno per le cellule, in modo tale da annullare il più possibile le distanze per ottenere, in risposta dal microfono, la stessa pressione sonora che il materiale cellulare stava ricevendo dalle casse e lo stesso rumore ambientale.



*Figura 14 Posizionamento supporto cellulare e microfono di precisione*

## 4 RISULTATI

Una volta disegnato e realizzato il sistema di stimolazione acustica è di fondamentale importanza testare il suo funzionamento e la sua efficacia.

Come affronteremo nei prossimi paragrafi, il primo passaggio fondamentale per poter dare inizio ai nostri esperimenti è collaudare l'incubatore, verificarne il funzionamento, la correttezza e la corrispondenza tra l'obiettivo posto inizialmente e ciò che effettivamente è stato realizzato.

Una volta constatato il collaudo del sistema di stimolazione si è potuti procedere con la verifica della vitalità cellulare e la loro sopravvivenza nel sistema realizzato, in modo da essere certi che gli esperimenti non fossero condizionati.

Infine, una volta accurato il mantenimento vitale delle cellule si dà inizio alla valutazione del danno da rumore indotto dagli stimoli inviati e controllati dal PC.

### 4.1 Messa a punto

Il sistema di stimolazione acustica costruito aveva bisogno di essere testato e controllato nella sua completezza per poter dichiararne il funzionamento e l'efficienza dei lavori effettuati per ottenerlo.

Il collaudo della struttura è stato fatto controllando il corretto lavoro del software nell'invio degli impulsi sonori, dell'utilizzo delle casse e della resistenza alle alte intensità e dell'abbattimento del rumore ambientale.

Il primo passaggio è stato quello di misurare l'abbattimento dei suoni provenienti dall'esterno; per ottenere questo valore è stato misurato il rumore ambientale della stanza risultando di circa 45-50 dB e successivamente all'interno dell'sistema costruito risultando un valore di 25-30 dB.

Da questa misurazione si evince che il ruolo svolto dalla gomma piombo che ricopre il sistema di stimolazione comporta una riduzione dei suoni pari a 20-25dB.

Allo stesso modo è stata misurata l'azione dei pannelli fonoassorbenti, posizionati all'interno dell'incubatore; è stato inviato uno stimolo sonoro dalle casse pari a 90dB tramite il software REW, e posizionando il fonometro all'esterno dell'incubatore, il suono ambientale risulta aumentato a 65-70 dB.

Ciò ci permette di ricavare che i pannelli fonoassorbenti posti internamente diminuiscono l'impatto sonoro all'esterno di 35-40dB.

In questo modo si permette ai lavoratori, di operare con stimoli sonori molto alti restando in sicurezza senza il rischio di superare il limite di esposizione pari a 80dB.

Procedendo con la messa a punto del sistema di stimolazione sono state testate le casse da 45 watt, in modo tale da verificarne la resistenza ad alte intensità.

Per inviare l'impulso sonoro alle casse è necessario che il software REW, installato al PC e l'amplificatore, collegato al computer e alle casse, siano funzionanti e permettano il corretto passaggio di informazioni del segnale.

Inoltre, bisogna assicurarsi che il software sia calibrato, sono stati quindi inseriti e regolati tutti i valori rilevati con il fonometro, necessari affinché vi fosse una corrispondenza esatta tra la misurazione ottenuta con il fonometro e quella ottenuta dal microfono di precisione.

Le casse sono state testate aumentando di 5 dB fino a raggiungere un'intensità pari a 110 dB. È stato possibile verificare intensità così alte grazie all'abbattimento sonoro dei pannelli fonoassorbenti; la scelta di non testare intensità ancor più intense è stata dettata dalla priorità di non superare i livelli massimi di esposizione per i lavoratori, equivalenti a 80 dB.

Questo test di controllo è servito per avere una certezza riguardo il funzionamento delle casse durante gli esperimenti, che, come vedremo nei prossimi paragrafi, raggiungeranno intensità pari a 100 dB con una pressione sonora nella porzione occupata dalle piastrine di materiale cellulare pari a 105 dB.

## 4.2 Test di vitalità

Prima di procedere con gli esperimenti di induzione di danno da rumore, è fondamentale verificare la resistenza cellulare nell'ambiente pensato e costruito.

L'obiettivo di questa prima parte di esperimenti è testare la vitalità delle cellule, in particolare cellule OC-K3.

In questo modo avremo la possibilità di verificare, con i prossimi esperimenti, che gli effetti causati dal rumore non siano influenzati dall'eventuale minor vitalità delle cellule che sottoposte ai test nel sistema di stimolazione che è stato costruito.

Per semplificare la spiegazione dei procedimenti chiameremo l'incubatrice in cui le cellule vivono abitualmente "*incubatrice 1*", mentre il sistema di stimolazione disegnato e realizzato verrà denominato "*incubatrice 2*".

Per riprodurre le condizioni di vita abituali è stato posto un registratore all'interno dell'*incubatrice 1*, in questo modo abbiamo ottenuto il rumore ambientale interno alla quale le cellule sono abituate.

Una volta ottenuto l'audio di registrazione è stato inserito al PC, confermando un'intensità di segnale continuo di circa 80dB che verrà poi riprodotto all'interno nell'*incubatrice 2*.

Questo passaggio è fondamentale per ottenere dei risultati veritieri e confrontabili con un modello campione.

Il procedimento del test di vitalità è composto da 8 piastrine di cellule OCK3, 4 corrispondono ai nostri campioni di controllo, i restanti invece ai campioni testati.

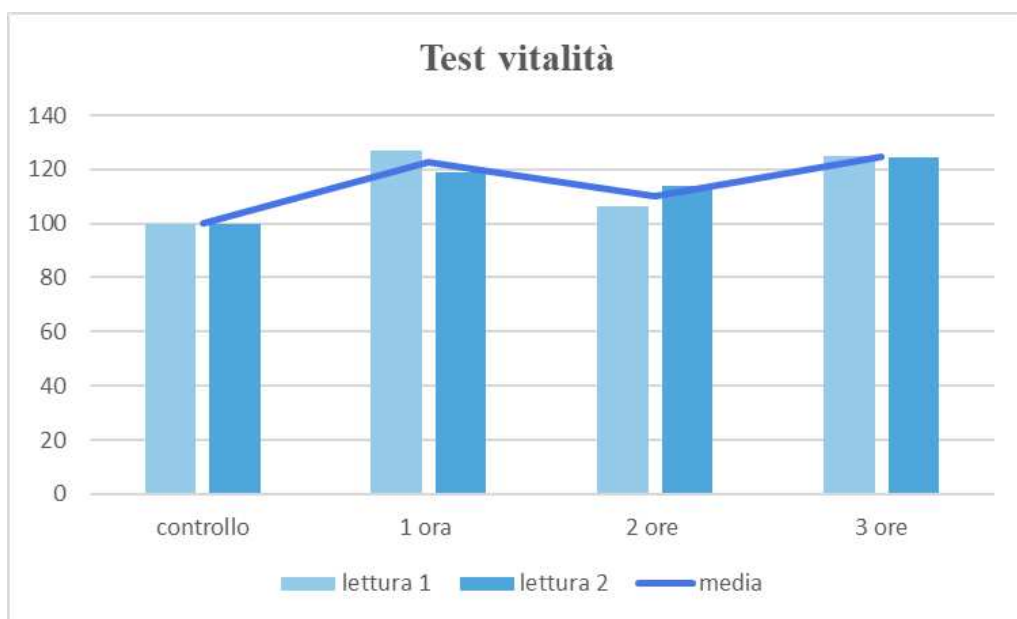
I campioni di controllo vengono posti nell'*incubatrice 1*, quindi non sono sottoposto a nessun nuovo stimolo e nessuna modifica rispetto alla normale situazione di vitalità.

Le altre quattro piastrine vengono poste nell'*incubatrice 2*, e stimolate con il suono registrato in precedenza, corrispondente al rumore ambientale dell'*incubatrice 1*.

I dati riguardanti la vitalità ci vengono forniti inserendo la piastrina in un apposito macchinario.

Dopo 1 ora di tempo, viene controllata la vitalità di una piastrina di controllo, e di una piastrina testata, lo stesso procedimento viene fatto dopo 2 ore e dopo 3 ore, sottoponendole al macchinario per la misurazione di vitalità la piastrina corrispondente all'orario da verificare con il suo rispettivo campione di controllo.

Per tutte le misure viene fatta una seconda lettura in modo tale da ottenere, come mostrato in *Figura 15*, una media dei valori ottenuti.



*Figura 15 Test vitalità*

Come dimostrato dal grafico, la vitalità delle cellule delle piastrine di controllo, lasciate nell'*incubatrice 1* e di quelle testate, poste nell'*incubatrice 2*, non varia. Questo ci permette di procedere con in test successivi con la certezza che eventuali variazioni di dati di vitalità non siano influenzati da problematiche indotte dal sistema di stimolazione costruito ma, come da obiettivo, da danno da rumore indotto.

### 4.3 Danno da rumore

Grazie alla dimostrazione illustrata nel paragrafo precedente, si è potuti procedere con l'induzione di danno da rumore.

Questo test è incentrato su stimoli sonori inviati ad alte intensità, che, secondo le nostre ipotesi, dovrebbero indurre un danno nella vitalità delle cellule testate.

Vengono presi in considerazione due parametri fondamentali, ovvero:

1. La frequenza;
2. Il tempo;

I test sono stati ripetuti tre volte, in modo tale da poter ottenere una media dei valori di vitalità ottenuti dopo l'esposizione al suono.

Sono state utilizzate più piastre cellulari, per avere sempre a disposizione un campione di controllo, non esposto a rumore e posizionato nell'incubatrice 1, dove sono solite a vivere.

Il restare numero di piastrine è stato testato per le seguenti bande frequenziali:

- 1000-2000Hz;
- 2000-4000Hz;
- 4000-8000Hz;

Con un'intensità pari a 100dB per 20 minuti.

Per eseguire il primo esperimento è stata quindi presa una piastrina di cellule OCK3 ed è stata messa in disparte come campione controllo nell'*incubatrice 1*, una seconda piastrina è stata invece inserita nell'*incubatrice 2*, nell'apposito spazio creato con la scatola in polistirolo, ed è stata esposta alla banda frequenziale 1000-2000Hz a 100dBper 20 minuti.

Lo stimolo sonoro era gestito e controllato dal PC, attraverso il software Friture che ci permetteva di selezionare la frequenza dell'impulso sonoro, mentre l'intensità veniva controllata dall'amplificatore.

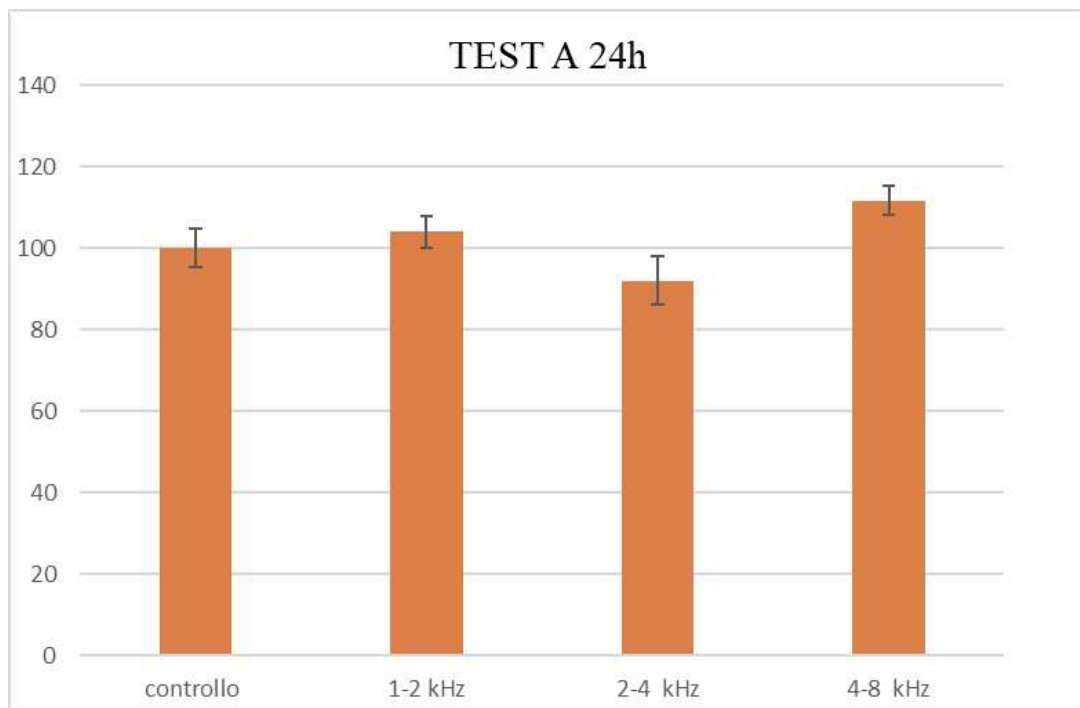


L' amplificatore era stato calibrato precedentemente, come spiegato nel secondo capitolo, e infine tutto il sistema di stimolazione acustica veniva monitorato grazie al microfono di precisione che ci permetteva di essere a conoscenza dei livelli di pressione sonora prodotti all'interno del sistema.

Una volta scaduti i 20 minuti di stimolazione, la piastrina dell'*incubatrice 1* e la piastrina di controllo venivano inseriti nel macchinario per misurare la vitalità.

La valutazione della vitalità viene misurata dopo 24 ore, mostrata in *Figura 16*, 48 ore e dopo 72 ore, in modo tale da ottenere, come mostrati nei prossimi grafici, inoltre ogni test è stato ripetuto 3 volte in modo da ottenere dei grafici statisticamente mediati.

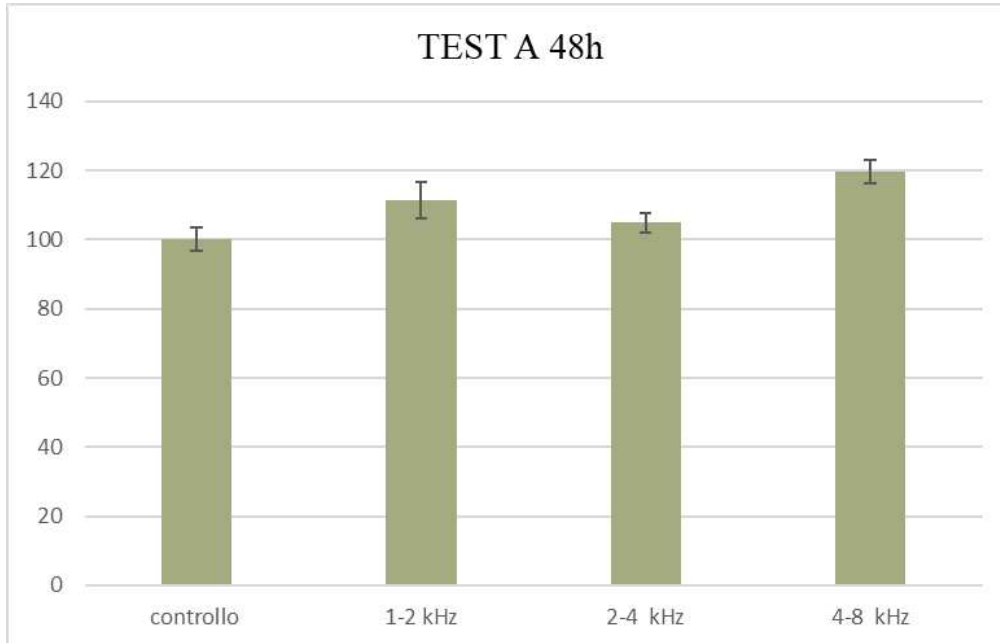
Lo stesso procedimento è stato effettuato per le bande di frequenze 2000-4000Hz e 4000-8000Hz, ognuna con il suo rispettivo campione di controllo.



*Figura 16 Risultati primo test*

Al controllo successivo alle 4 ore si può notare come le differenze vitali evidenziate non risultano significative, pertanto possiamo affermare che dopo 24 ore di stimolazione acustica il materiale biologico non ha subito cali di vitalità.

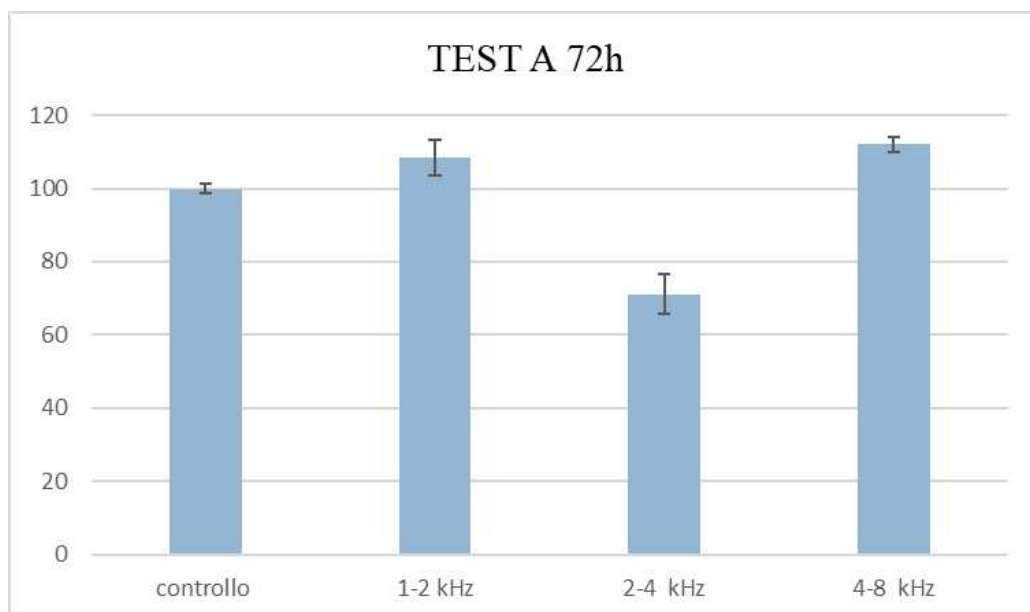
Passate altre 24 ore dalla misurazione, ottenendo un totale di 48 ore dalla stimolazione, i campioni sono stati visionati e i risultati ottenuti sono mostrati in *Figura 17*.



*Figura 17 Risultati secondo test*

Durante l'analisi dei campioni a distanza di 48 ore si nota come l'esposizione a trattamento con rumore accresca la vitalità per le frequenze 4000-8000Hz.

Infine l'ultima l'analisi di vitalità viene effettuata dopo 72 ore dal trattamento e otteniamo i risultati mostrati in *Figura 18*.

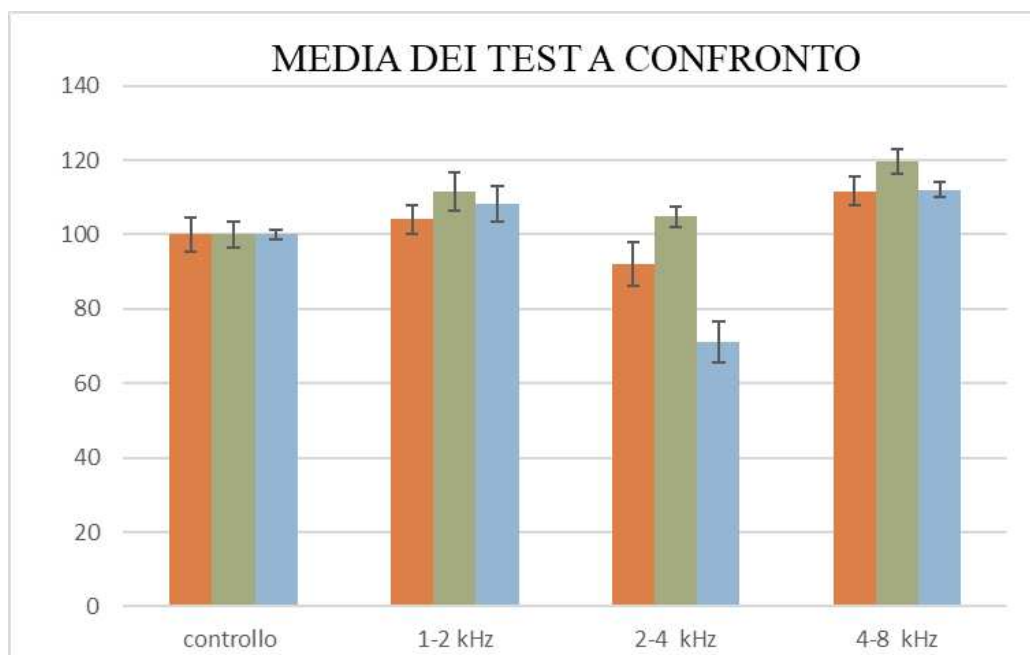


*Figura 18 Risultati terzo test*

I test effettuati a 72 ore dal trattamento dimostrano che il danno da rumore è risultato significativo per il materiale biologico testato per le frequenze 4000-8000Hz.

Dopo aver confrontato i 3 grafici ottenuti dalle analisi di vitalità dopo le rispettive 24, 48 e 72 ore dal trattamento possiamo affermare che successivamente alle 24 ore non vi sono differenze significative, dopo le 48 ore si nota una stimolazione accrescitiva per il materiale testato a 4000-8000Hz e per i dati analizzati dopo le 72 ore si evidenzia un calo significativo della vitalità cellulare per le frequenze 2000-4000Hz.

Dopo aver ottenuto i risultati dei tre test effettuati è stata fatta la media dei valori ottenuti, mostrata in *Figura 19*, in modo tale da avere chiaramente visibile l'effetto che la stimolazione acustica ha avuto sulle cellule.



*Figura 19 Media dei test*

Dal grafico riportato possiamo affermare che il 120% a 48h ed il 112% a 72h sono significativamente più alti del proprio controllo mentre il 71% a 72h è più basso del suo controllo, Inoltre si evince che il 71% a 72h è significativamente più basso del 105 a 48h e del 92 a 24h.

## 5 CONCLUSIONI

Lo scopo di questo studio era di creare un sistema di stimolazione acustica, che fosse efficace.

Come si è visto dai risultati mostrati nel capitolo precedente, l'incubatrice realizzata permetteva il mantenimento vitale delle cellule, ciò è stato dimostrato dal test di vitalità.

Una volta constatato la resistenza del campione biologico, si è potuti procedere con la stimolazione acustica, il cui obiettivo era di indurre danno da rumore. I risultati ottenuti dimostrano un calo di vitalità per le frequenze 2000-4000Hz e questo appare coerente con l'ipoacusia da rumore che spesso molte persone riscontrano, in particolare lavoratori che operano in settori particolarmente rumorosi.

In conclusione, la messa a punto del sistema di stimolazione acustica ideato è risultata efficiente per il lavoro svolto; la vitalità cellulare non ha subito variazioni e lo studio del danno da rumore è stato permesso grazie ai lavori di insonorizzazione dell'incubatrice e di tutto il sistema audio controllato.

Discutendo invece dei risultati ottenuti nei test di induzione di danno da rumore, sono stati riscontrati alcuni limiti che potranno essere nuovi punti di partenza per gli studi futuri.

Tra questi si evidenzia l'intensità del suono inviato, in questo studio sono stati utilizzati impulsi sonori pari a 100 dB, probabilmente non sufficientemente intenso per poter evidenziare un danno totale o quasi del materiale cellulare testato.

Inoltre, sarebbe interessante studiare gli effetti in base al tempo di stimolazione, variandolo e cercando di analizzare situazioni che creano un danno uditivo nelle persone, per esempio soldati o individui soliti ad usare armi da fuoco, in cui l'impulso sonoro è breve e molto intenso.

Altre situazioni che sarebbe utile analizzare, sempre con l'utilizzo di un'incubatrice insonorizzata, potrebbe essere il traffico stradale, rumore di sottofondo per tassisti o autisti di mezzi pubblici.

Lo studio del danno da rumore, ci risulta utile successivamente per avere più chiara le condizioni uditive dei pazienti ipoacusici che ci troviamo di fronte ogni giorno in centro acustico, essere a conoscenza dell'esposizione al rumore in termini di intensità e tempo ci aiuta ad avere un quadro più completo dello stato di salute uditiva del nostro paziente rendendoci conseguente figure professionali pronte e preparate ad affrontare il maggior numero di casi clinici.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- Bersani, F., Bettati F. e Biagi P.F. (2009) "*Fisica Biomedica*", Piccin, Padova
- Capparelli, V. (1988) "*La sapienza di Pitagora*", Edizioni Mediterranee, Roma.
- Drioli, C., e Orio N. (2004) "*Elementi di Acustica e Psicoacustica*".
- Giordano, P. (2010) "*L'epitelio sensoriale uditivo normale e patologico visto al microscopio elettronico a scansione*". Momento Medico, Ferrara.
- Kwak, D., T. Combriat, e C. Wang. (2022) "*Music for Cells? A Systematic Review of Studies Investigating the Effects of Audible Sound Played Through Speaker-Based Systems on Cell Cultures*". Disponibile online al link:<https://doi.org/10.1177/20592043221080965>
- Martini, F., Nath J.L., e Tallitsch R.T. (2019) "*Anatomia umana*", Edises, Napoli.
- Sabatino, R. (2015) "*La Valutazione Del Rischio Rumore*". Tipolitografia INAIL, Milano
- Sherwood. (2012) "*Fondamenti di Fisiologia Umana*", Piccin, Padova.

## **RINGRAZIAMENTI**

*Al termine di questo elaborato, sento di dover ringraziare tutti coloro che hanno avuto per me, una parola di incoraggiamento durante questi anni.*

*In particolare:*

*Grazie alla mia relatrice, Prof.ssa Astolfi Laura per avermi sostenuta nella realizzazione di questo progetto e per aver condiviso con grande professionalità le sue conoscenze.*

*Grazie mamma e papà, per essere stati di continuo supporto durante tutto questo percorso, per avermi insegnato a non mollare e a dare sempre il meglio. Vi voglio bene.*

*Grazie a mia sorella Giada, per avermi teso la mano tutte le volte in cui ne avevo bisogno, per avermi sempre dato coraggio e per avermi strappato una risata anche nei momenti tristi. Per me sei fonte di grande ammirazione.*

*Grazie ai miei amici per tutte le volte in cui avete saputo darmi positività e per avermi regalato momenti di spensieratezza, in particolare, un grazie speciale lo dedico ad Ilaria, Anna e Alice per tutte le volte in cui mi avete ascoltata e dato i consigli più preziosi, grazie per essere sempre state al mio fianco, e per aver brindato con me ad ogni esame superato. Vi porto nel cuore.*

*Grazie a Diana e Alessia, per essere state le mie coach motivazionali, ma anche le migliori compagne di viaggio, di banco e di studio intensivo che potessi avere; questi tre anni non sarebbero stati così belli senza la vostra presenza. Vi auguro di realizzare tutto ciò che desiderate.*

*Grazie alla mia tutor Andreea, per tutte le volte che ha avuto fiducia nelle mie capacità, e per avermi mostrato come si esprime l'amore e la passione per questo lavoro. Ti sarò sempre grata per ciò che mi hai insegnato.*

*E infine ringrazio chi, in passato, non ha creduto in me, non avermi dato ascolto mi ha premesso di raggiungere questo traguardo, con la speranza che sia il primo di tanti altri della vita.*