

## **UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE  
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOINGEGNERIA**

TESI DI LAUREA

### **Magneto Fluido Ipertermia: studio di un set up di misura per valutare l'effetto del calore sulle cellule**

*RELATORE:* Ch.mo Prof. Michele Forzan (DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE)

*CORRELATORI:* Dott. Ing. Elisabetta Sieni (DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA INDUSTRIALE)

Dott.ssa Valentina Gandin (DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO)

*LAUREANDA:* Serena Benetti

MATRICOLA: 1020271

ANNO ACCADEMICO 2012-2013



## MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA

*Ai miei genitori,  
con infinito amore e immensa gratitudine*



## INDICE

<b>1 INTRODUZIONE.....</b>	<b>9</b>
<b>2 L'IPERTERMIA.....</b>	<b>13</b>
2.1 IPERTERMIA.....	13
2.1.1 Ipertermia E Tumore.....	13
2.1.2 Livelli Di Temperatura Utilizzati Per Il Trattamento Di Ipertermia.....	14
2.1.3 Tecniche Di Trattamento Ipertermico .....	15
2.2 MECCANISMO DELL'APOPTOSI .....	19
2.2.1 Via Estrinseca.....	20
2.2.2 Via Intrinseca.....	21
2.3 EFFETTI DELL'IPERTERMIA SULLE CELLULE.....	21
2.3.1 Effetti A Livello Molecolare.....	23
2.3.2 Alterazioni Delle Funzioni Della Cellula.....	24
2.4 HEAT SHOCK PROTEINS.....	24
2.4.1 HSP Intracellulari.....	24
2.4.2 HSP Extracellulari.....	29
<b>3 STUDIO DEGLI EFFETTI DEL CALORE SULLE CELLULE.....</b>	<b>39</b>
3.1 INTRODUZIONE.....	39
3.2 IPERTERMIA IN VITRO: BREVE EXCURSUS.....	39
3.2.1 Studio Degli Effetti Del Calore Sulle Cellule Di Tumore Mammario.....	39
3.2.2 Effetto Dell'ipertermia Sulle HSP27 E Sulle Proteine Di Riparazione Del DNA In Cellule Di Carcinoma Del Colon-retto.....	42
3.2.3 Ruolo Delle HSP27 Nell'apoptosi Di Cellule Di Carcinoma Della Lingua.....	43
3.2.4 Resistenza All'ipertermia Indotta Sulle Cellule Di Neuroblastoma Da Parte Delle HSP72.....	45
3.3 CONSIDERAZIONI.....	47
<b>4 SET UP DEL RISCALDATORE.....</b>	<b>49</b>
4.1 STRUMENTAZIONE UTILIZZATA.....	49
4.2 SET UP SPERIMENTALE.....	52
4.2.1 Preparazione Dello Strumento.....	52
4.2.2 Modalità Di Acquisizione Finale.....	53
4.2.3 Rielaborazione Dei Dati E Valutazione Dell'incertezza Di Misura.....	57
4.2.4 Processo Di Conoscenza Dello Strumento.....	59
4.2.5 Tacche Definitive.....	71
4.2.6 Tacche Scelte.....	73
4.2.7 Prove Con I Terreni Di Coltura.....	76
4.2.8 Misurazioni Effettuate Con Il Cronometro.....	77

<b>5 IPERTERMIA APPLICATA A COLTURE CELLULARI.....</b>	<b>81</b>
5.1 OBIETTIVO.....	81
5.2 MATERIALI E METODI.....	81
5.3 FASI SPERIMENTALI.....	85
5.4 PARAMETRI DELL'ESPERIMENTO .....	87
5.5 RISULTATI.....	87
5.5.1 Trypan Blue.....	88
5.5.2 DOE.....	105
5.5.3 Crescite Clonali.....	109
5.6 CONSIDERAZIONI.....	118
<b>6 CONCLUSIONI.....</b>	<b>121</b>
<b>7 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>125</b>
<b>8 RINGRAZIAMENTI.....</b>	<b>129</b>





## 1 INTRODUZIONE

L'obiettivo di questo lavoro di tesi è lo studio di un set up sperimentale per valutare l'effetto della velocità e della durata del riscaldamento di colture di cellule tumorali in termini di induzione della morte delle cellule trattate.

Per lo svolgimento di questo lavoro di tesi è stato necessario un iniziale studio della letteratura per comprendere i metodi di sperimentazione di ipertermia utilizzati in vitro, i parametri biologici da valutare e i test per esaminarli. Dallo studio di alcuni lavori riportati in letteratura è emerso che i parametri biologici da analizzare sono la vitalità/mortalità cellulare indotta dall'ipertermia, l'induzione all'apoptosi cellulare a causa del calore e la variazione dei livelli di HSP intracellulari ed extracellulari dovuta al trattamento ipertermico. In questa tesi è stato analizzato il parametro di vitalità/mortalità cellulare tramite il test del Trypan Blue e il test della crescita clonale.

Quindi, l'obiettivo della fase sperimentale è la comprensione dei fenomeni indotti su colture cellulari dal riscaldamento, in termini di mortalità/vitalità delle cellule trattate, valutando l'effetto di diverse rampe di temperatura, in particolare tra 37°C e la temperatura massima raggiunta ( $T_{max}$ ), di differenti valori della  $T_{max}$  raggiunta (denominata anche temperatura di mantenimento  $T_m$ , che nel presente lavoro è 43°C o 46°C) e di diverse durate del riscaldamento a  $T_m$  costante (in questo lavoro, 15 minuti, 30 minuti o 60 minuti).

La sperimentazione si è suddivisa in due fasi. La prima fase consiste nel set up del riscaldatore: analizzando i punti critici dei lavori svolti da altri gruppi di ricerca è risultata evidente la necessità di avere condizioni sperimentali controllate. Quindi, dato un riscaldatore (una piastra elettrica) e un becher contenente acqua, si sono trovati i valori a cui configurare lo strumento per ottenere determinati incrementi di temperatura in funzione del tempo (denominati rampe di temperatura, ovvero i °C/min ottenibili agendo sulla manopola di regolazione del riscaldatore), fino a una temperatura massima da raggiungere (Capitolo 4). La successiva incubazione alla  $T_{max}$  è stata ottenuta tramite l'utilizzo di un bagno termostatico a temperatura costante e controllata. La seconda fase è l'ipertermia sulle cellule, ovvero il trattamento ipertermico di cellule tumorali utilizzando le rampe di temperatura individuate nella prima fase sperimentale. In questo caso si sono valutati i fenomeni indotti sulle colture cellulari da diverse modalità di riscaldamento in termini di velocità e durata, valutando in particolare la possibilità di indurre la morte. Questo studio ha permesso di valutare la rampa di temperatura più efficace per ottenere la morte delle cellule tumorali indotta dal calore. (Capitolo 5)

## *MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA*

Si è constatato che all'aumentare della velocità della rampa di temperatura, della temperatura massima raggiunta e del tempo di mantenimento delle sospensioni cellulari trattate e poste nel bagno termico a temperatura massima costante, aumenta anche la mortalità cellulare ottenuta.





## 2 L'IPERTERMIA

### 2.1 IPERTERMIA

L'ipertermia è un trattamento clinico utilizzabile in combinazione con trattamenti di radioterapia e chemioterapia per il trattamento di tumori maligni. In questo tipo di terapia il tessuto tumorale è scaldato dall'esterno a temperature tra 41°C e 46°C per un sufficiente periodo di tempo. [1]

#### 2.1.1 Ipertermia e tumore

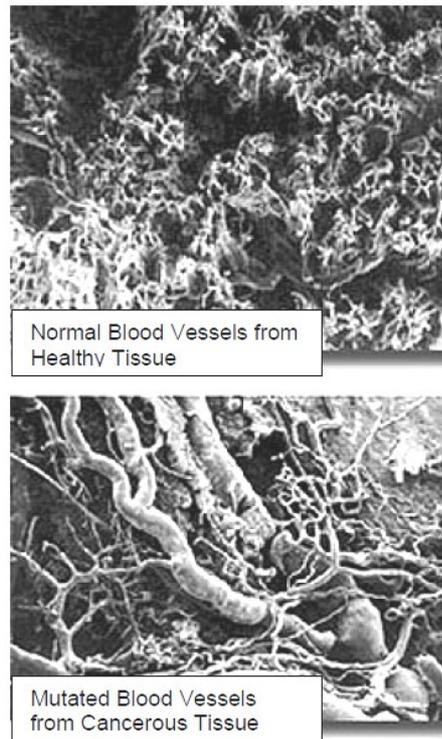
L'idea che la febbre sia un metodo di terapia risale fin dai tempi antichi. Ippocrate 2300 anni fa scriveva 'Datemi la polvere per produrre la febbre e curerò tutte le malattie' [2]. Sulla base di questo principio, la scienza si è evoluta fino all'ideazione del trattamento ipertermico per la cura dei tumori, attualmente utilizzato come terapia adiuvante per altri trattamenti contro il cancro, come la radioterapia e la chemioterapia [1]. Si è, infatti, dimostrato che il calore influenza il flusso sanguigno che è il maggior mezzo di dissipazione del calore e di apporto di ossigeno e nutrienti nei tessuti biologici. Nei tessuti tumorali l'apporto di sangue è caotico a causa di un'angiogenesi non ordinata: sono presenti zone prive di nutrienti, in ipossia o con pH molto acido. In queste condizioni le cellule sono molto sensibili all'effetto citotossico del calore. [3]

In particolare:

- alle alte temperature (>43°C) si presentano:
  - diminuzione del flusso sanguigno con conseguente 'intrappolamento' delle molecole di farmaco per chemioterapia;
  - diminuzione del pH e quindi aumento della sensibilità ad alcuni farmaci.
- Con la 'mild hyperthermia' (42-43°C) si notano:
  - incremento della perfusione del sangue nel tessuto con conseguente miglioramento della distribuzione del farmaco;
  - incremento dell'ossigenazione del tumore, quindi un aumento della sensibilità alla radioterapia<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup>La distruzione delle cellule tumorali avviene attraverso la formazione di radicali di ossigeno che attaccano il DNA della cellula tumorale. [4]



*Figura 1: vascolarizzazione del tessuto normale (sopra) e tumorale (sotto)[4].*

In figura 1 è rappresentata la vascolarizzazione del tessuto normale (sopra) e tumorale (sotto) [4].

### **2.1.2 Livelli di temperatura utilizzati per il trattamento di ipertermia**

Per centinaia di anni sono stati usati dei bisturi incandescenti per incidere i più piccoli tumori superficiali. Ciò comportava numerosi vantaggi: [1]

- l'ipertermia scaldava le cellule marginali al tumore, impedendone un eventuale accrescimento;
- si bloccava l'emorragia;
- il bisturi veniva sterilizzato direttamente con il calore.

Attualmente, l'uso terapeutico di trattamenti oncologici con il calore prevede differenti livelli di temperatura:

**1) Temperature  $\geq 50^{\circ}\text{C}$ : termoablazione**

In questo range di temperature le proteine coagulano rapidamente così le cellule tumorali vengono distrutte dopo un breve periodo di tempo. Le alte temperature sono ottenute mediante l'uso di laser o radiazioni elettromagnetiche, applicate direttamente sulla massa tumorale (trattamento invasivo). La difficoltà maggiore risiede nel preservare i tessuti circostanti il tumore.

**2) 41-45°C: ipertermia classica**

Con tali temperature è necessario un tempo più lungo di riscaldamento, ma i tessuti adiacenti al tumore sono più facilmente preservati. Solitamente il riscaldamento è ottenuto utilizzando una radiazione elettromagnetica.

**3) 40-43°C: 'mild hyperthermia'**

Questa fascia di temperature è utilizzata unicamente per migliorare i trattamenti radioterapici o chemioterapici. Usualmente il calore è generato mediante radiazione elettromagnetica.

### **2.1.3 Tecniche di trattamento ipertermico**

Nell'ambito dell'ipertermia clinica sono utilizzate alcune tecniche classiche per ottenere il riscaldamento dei tessuti. Essendo una materia di ricerca attuale, vi sono continuamente nuovi sviluppi che affinano e migliorano le tecniche di trattamento. Questi due aspetti saranno messi in luce nel presente paragrafo. [1]

**1) Tecniche di riscaldamento classiche**

In tabella 1 si riportano le diverse tecniche classiche attualmente in uso, la fonte di energia per creare il riscaldamento dei tessuti, le modalità d'esecuzione delle tecniche stesse e alcuni esempi di applicazione.

Tabella 1: tecniche classiche

<b>Tecnica</b>	<b>Fonte di energia</b>	<b>Modalità d'esecuzione</b>	<b>Esempi di applicazione</b>
Ipertermia superficiale	Microonde, radiofrequenza, ultrasuoni	Posizionamento di un applicatore esterno sulla massa tumorale presente sulla pelle o lo strato subcutaneo. La profondità terapeutica è di pochi centimetri.	In combinazione con la radioterapia: recidive non resecabili al torace dopo mastectomia, recidive locali e metastasi di melanomi, cancro locale alla testa e al collo.
Ipertermia interstiziale e endocavitaria/intraluminale	Antenne	Posizionamento delle antenne nelle cavità e nella massa tumorale. Quando è accompagnata da brachiterapia: inserimento di cateteri nel tessuto maligno e conseguente inserimento delle antenne in questi cateteri.	In combinazione con la brachiterapia (radioterapia interna), radioterapia e chemioterapia: cancro all'ano e all'esofago.
Ipertermia regionale	Microonde, radiofrequenza	- Posizionamento di applicatori esterni attorno alla cavità corporea o attorno all'organo. - Tecnica a perfusione: riscaldamento di parte di sangue corporeo e reimmissione nello stesso, con addizione di farmaci.	- Carcinoma cervicale, rettale, sarcoma. In combinazione con radioterapia e chemioterapia: cancro rettale, anale, prostatico, gastrico, vescicale. - Cancro al braccio, alle gambe, al peritoneo, melanomi, tumori ad organi come fegato e polmoni, stomaco.
Ipertermia all'intero corpo		Uso di camere termiche o coperte di acqua calda che alzano la temperatura corporea fino a 41.5-42°C.	Trattamento delle metastasi.

## 2) Nuovi sviluppi nell'ambito dell'ipertermia

L'ambito dell'ipertermia è in continua evoluzione e gli sviluppi più recenti riguardano la termometria non invasiva con l'uso di scanners MRI, la magneto fluido ipertermia e i liposomi termosensibili. Nel presente paragrafo verrà fornita una descrizione dettagliata degli sviluppi riportati.

- **Termometria non invasiva con scanners MRI<sup>2</sup>**

Combinando l'ipertermia regionale profonda con una risonanza magnetica MRI a 1.5 Tesla, si possono ottenere informazioni dettagliate, a tre dimensioni, sulla temperatura e sulla perfusione<sup>3</sup> sanguigna. Dopo poche misurazioni ottenute con la risonanza magnetica, l'operatore trasferisce i dati dell'immagine ad una workstation apposita e, in meno di due minuti, vengono ricostruite delle immagini colorate che mostrano la distribuzione di temperatura ottenuta con il trattamento ipertermico. In questo modo è possibile effettuare dei controlli per limitare i danni ai tessuti circostanti al tumore.

In figura 2 si riporta un esempio di termometria non invasiva con scanners MRI. L'MRI non invasiva in tempo reale mostra l'aumento graduale della temperatura interna al tumore nel caso di 'mild hyperthermia'. [5]

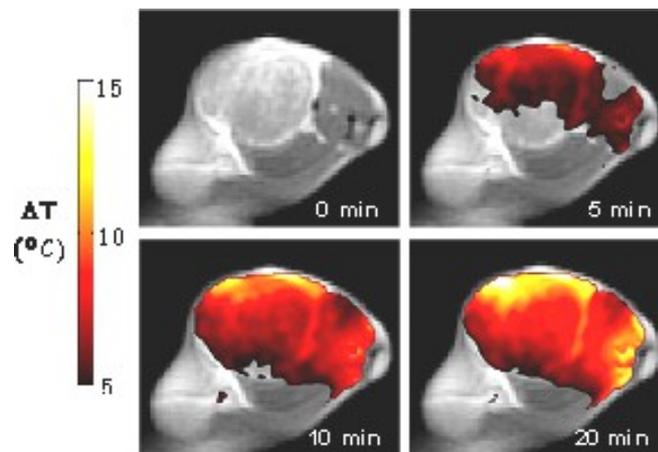


Figura 2: esempio di termometria non invasiva con scanners MRI [5].

- **Magneto fluido ipertermia**

Si inietta negli interstizi della regione tumorale un colloide stabile di nanoparticelle (dimensione di 10-50 nm circa) rivestite di zucchero<sup>4</sup>, disperse in una matrice a pH

<sup>2</sup>L'imaging a risonanza magnetica (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI), detta anche tomografia a risonanza magnetica (*Magnetic Resonance Tomography* o *Magnetresonanztomographie*, MRT), risonanza magnetica tomografica (RMT) oppure semplicemente RM, è una tecnica di generazione di immagini usata prevalentemente a scopi diagnostici in campo medico e basata sul principio fisico della risonanza magnetica nucleare. ([http://it.wikipedia.org/wiki/Imaging\\_a\\_risonanza\\_magnetica](http://it.wikipedia.org/wiki/Imaging_a_risonanza_magnetica))

<sup>3</sup>In medicina, somministrazione, in cospicua quantità, di una soluzione medicamentosa, isotonica o ipertonica, oppure di sangue, di solito per via venosa, o più raramente, qualora si intenda esporre un organo o distretto corporeo (per es., un arto) a una più alta concentrazione di un farmaco, per via arteriosa (p. regionale selettiva) (<http://www.treccani.it/enciclopedia/perfusione/>)

<sup>4</sup>Solitamente destrano (polimero di glucosio). Tale scelta è sostenuta dalla tesi che il tumore richiede più glucosio degli altri tessuti e, quindi, ricoprire le nanoparticelle con destrano potrebbe far sì che le nanoparticelle vengano selettivamente inglobate solo nella massa tumorale.

neutro e salinità fisiologica. Tale regione (si parla per questo della categoria di ipertermia regionale) viene riscaldata da un campo magnetico provocato da una corrente alternata: il campo, oscillando velocemente, fa ruotare le nanoparticelle e il loro momento magnetico e, per attrito, le nanoparticelle generano calore.

- La posizione e il volume del fluido magnetico di ogni punto di iniezione vengono monitorati da un sistema di imaging collegato ad un software apposito, in modo da ottenere un'ottimale concentrazione di nanoparticelle nella zona tumorale.
- Le nanoparticelle vengono iniettate in un'unica volta, mentre l'applicazione del campo magnetico per ottenere il riscaldamento dei tessuti è ripetuta due volte alla settimana per 6 volte totali.
- Il metodo si basa su un definito ed efficiente trasferimento di potenza sulle nanoparticelle magnetiche al tessuto da trattare. Tale trasferimento è determinato:
  - dal tipo di nanoparticelle;
  - dalla frequenza (compresa tra 50kHz e 10 MHz<sup>5</sup>, nella fascia delle onde radio FM);
  - dall'intensità del campo magnetico.

Il tutto ha come risultato la generazione locale di calore. Questo calore può distruggere direttamente le cellule tumorali (termoablazione) o rinforzare l'effetto delle radiazioni se somministrato con la radioterapia.

- Effetti collaterali:
  - l'iniezione con conseguente accumulo di fluido nel tumore;
  - riscaldamento disomogeneo a causa di una concentrazione non omogenea delle nanoparticelle;
  - il permanere delle nanoparticelle nel paziente che potrebbe provocare problemi a lungo termine.

---

<sup>5</sup>>50 kHz per evitare il problema dell'elettrostimolazione neuromuscolare; <10 MHz per ottenere un'adeguata profondità di penetrazione del campo a radiofrequenza.

- **Liposomi termosensibili**

Sono stati creati dei liposomi specifici, ovvero vescicole contenenti un farmaco, stabili a temperature corporee (37°C-38°C), che rilasciano il loro contenuto a temperature di circa 40°C-43°C. Questo consente il rilascio di farmaci anti-tumorali in combinazione con trattamenti di ipertermia regionale.

- I liposomi non contengono colesterolo e sono composti di palmitoil lecitine con una temperatura di transizione di fase ( $T_m$ ) di 41.5°C. Il riscaldamento dei liposomi oltre la temperatura  $T_m$  porta ad un aumento della mobilità delle catene di lipidi e idrocarburi, rendendo la membrana permeabile alle piccole molecole (Figura 3). Aggiungendo tali liposomi con lisolecitina, si verifica un rilascio del farmaco molto veloce dopo il riscaldamento e un rilascio totale del farmaco entro 20 secondi.
- Il farmaco maggiormente usato è la dexorubicina: può essere tranquillamente rilasciata mediante gradiente di pH con un'efficienza superiore al 95%.

In figura 3 si può notare un esempio di rilascio di dexorubicina da parte dei liposomi, una volta superata la temperatura  $T_m$  [6].

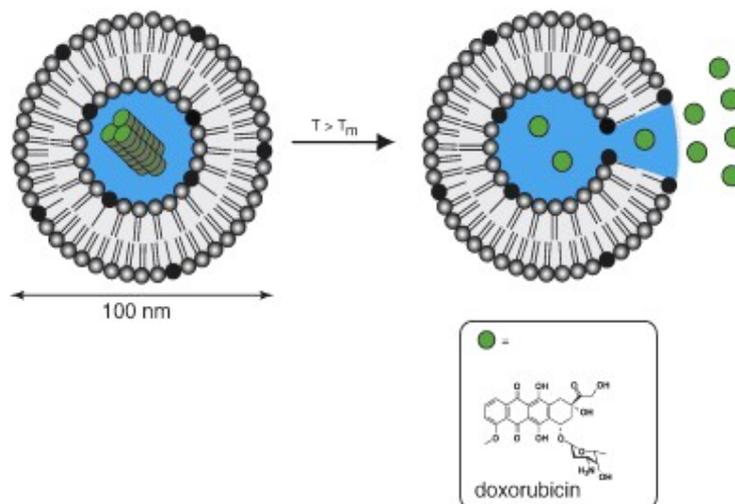


Figura 3: rilascio di dexorubicina da parte dei liposomi [6].

## 2.2 MECCANISMO DELL'APOPTOSI

L'apoptosi o morte cellulare programmata è un programma intracellulare attivato spontaneamente per regolare il numero di cellule presenti in un tessuto. Questo processo

differisce dalla necrosi cellulare, causata da un danneggiamento acuto e caratterizzata da rigonfiamento cellulare, lisi e rilascio extracellulare del contenuto citoplasmatico. Ciò provoca una risposta infiammatoria potenzialmente pericolosa. Nell'apoptosi, invece, la cellula si restringe e si addensa, il suo citoscheletro collassa, la membrana nucleare si dissolve e il DNA nucleare si frammenta. La superficie cellulare si altera, esponendo sul foglietto esterno del doppio strato fosfolipidico la fosfatidilserina, un fosfolipide tipicamente presente nel foglietto interno della membrana. Questo attira i macrofagi che fagocitano la cellula in apoptosi per rilasciare, poi, nell'ambiente extracellulare, i prodotti della digestione. I costituenti verranno recuperati dalle altre cellule vicine.

L'attivazione e la regolazione del processo apoptotico possono essere innescate sia da segnali estrinseci (provenienti dall'esterno della cellula), sia intrinseci e richiedono il coinvolgimento di proteine che partecipano alla regolazione del ciclo cellulare. [7,8]

### 2.2.1 Via estrinseca

I fattori (segnali di morte) che danno avvio all'apoptosi sono molteplici:

- Fattore di necrosi tumorale (TNF): è un gruppo di citochine ( $TNF\alpha$ ,  $TNF\beta$ ) prodotte dalle cellule del sistema immunitario e dai macrofagi stimolati dalla presenza di tossine batteriche, aventi come bersaglio le cellule tumorali.
- Ligando di Fas (Fas-L): una proteina presente sulla membrana dei linfociti T attivati dagli antigeni<sup>6</sup>.
- Variazioni dei livelli di ormoni steroidei.

Tali fattori interagiscono con specifici recettori proteici attivando la trasduzione del segnale che porta la cellula, che esprime lo specifico recettore, alla morte per apoptosi: la combinazione del segnale di morte con il dominio extracellulare determina una modifica conformazionale del corrispondente dominio intracellulare (denominato dominio di morte) che può, così, formare un complesso multi proteico con altre proteine citosoliche come TRADD<sup>7</sup> o FADD<sup>8</sup> e una specifica proteasi<sup>9</sup> (caspasi 8). Questa attiva in cascata la caspasi 3 la quale taglia una proteina, ICAD<sup>10</sup>, che libera la Dnasi: essa è il fattore che inizia la degradazione del DNA intranucleosomico e ciò porta alla morte cellulare.

<sup>6</sup>Sostanza riconosciuta dal sistema immunitario.

<sup>7</sup>TNF Receptor-Associated Death Domain.

<sup>8</sup>Fas receptor-Associated Death Domain.

<sup>9</sup>Enzima che frammenta le proteine. Con effetto a cascata, attiva altre proteine.

<sup>10</sup>Inhibitor of Caspase-Activated Dnase.

### 2.2.2 Via intrinseca

Questa via di attivazione dell'apoptosi ha origine dai mitocondri e si attiva in particolare in risposta alla presenza di anomalie intracellulari.

L'evento centrale è la fuoriuscita nel citosol del citocromo c dallo spazio intermembrana dei mitocondri. Qui forma un complesso con altre proteine citosoliche e la caspasi 9, denominato apoptosoma, che attiva la caspasi 3.

La fuoriuscita del citocromo c può anche essere favorita da una proteina citosolica, Bid, dovuta all'attivazione proteolitica da parte della caspasi 8.

In figura 4 sono rappresentate le due vie apoptotiche: la via estrinseca e quella intrinseca.

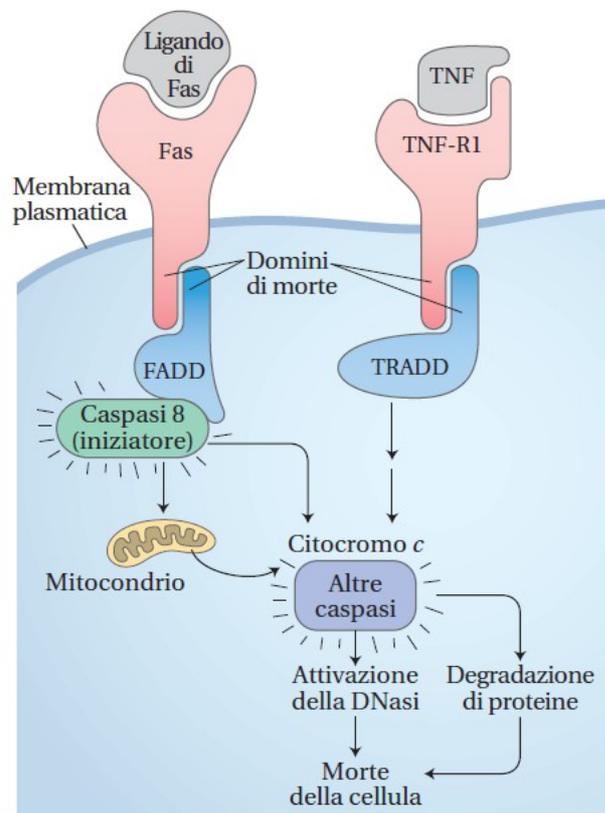


Figura 4: le due vie apoptotiche: la via estrinseca e quella intrinseca [8].

### 2.3 EFFETTI DELL'IPERTERMIA SULLE CELLULE

Per valutare l'effetto del riscaldamento su tessuti cellulari si possono costruire delle curve dose-effetto come quelle in figura 5. In ascissa è riportato il tempo di applicazione del

trattamento ipertermico. Ciascuna curva rappresenta una temperatura applicata. In particolare in figura 5 sono rappresentate le curve tra 42°C e 43.5°C. In ordinata è riportata la frazione di cellule sopravvissute al trattamento ipertermico.

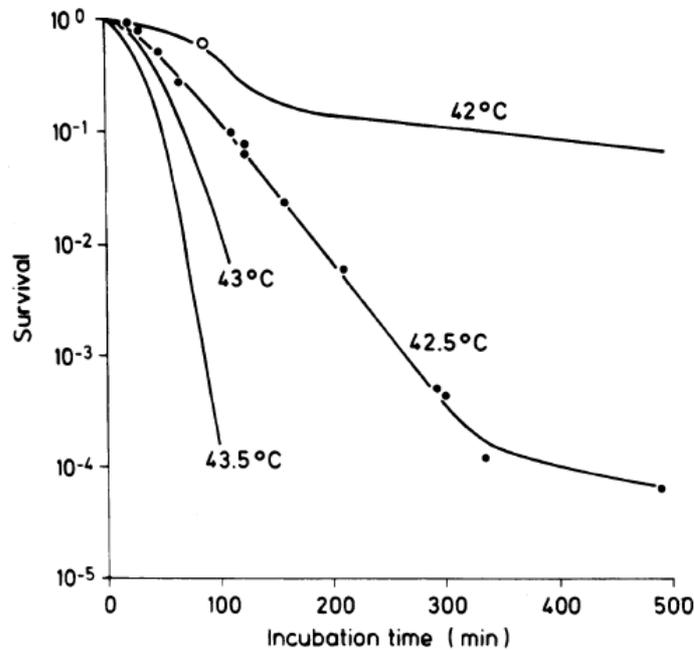


Figura 5: curve dose-effetto [10].

In figura 5 si può notare che le curve mostrano una tipica 'spalla' che identifica i due passaggi del fenomeno di morte cellulare:

- l'arresto lineare della crescita cellulare (replicazione), all'inizio dell'esposizione al calore: indica un danno termico reversibile, non letale;
- induzione alla morte cellulare con andamento esponenziale.

La dose di calore per indurre la morte cellulare mediante ipertermia varia dipendentemente da:

- tipologia di tessuto trattato;
- durata del trattamento;
- temperatura scelta. In particolare, per temperature <42.5°C la capacità di indurre la morte cellulare è molto più bassa rispetto a quella ottenuta con una temperatura >43°C.

Un altro dato interessante è il fatto che la dose di calore richiesta per indurre una morte cellulare con andamento esponenziale è strettamente correlata a quella richiesta per la denaturazione delle proteine cellulari e corrisponde a 140 kcal/mol in vitro, coincidente con quella utilizzata nella sperimentazione effettuata su tumori in vivo. Questo fatto conferma l'ipotesi che l'effetto citotossico dell'ipertermia è principalmente basato sulla denaturazione delle proteine citoplasmatiche e di membrana. [10]

### 2.3.1 Effetti a livello molecolare

Nel paper di Hildebrandt et Al [10] sono descritti diversi effetti a livello molecolare causati da trattamenti di ipertermia.

- **Effetti sulla membrana cellulare/citoscheletro:**
  - cambiamenti nella fluidità e stabilità della membrana cellulare;
  - cambiamenti della forma cellulare;
  - diminuzione del trasporto transmembrana;
  - cambiamenti nel potenziale di membrana;
  - modulazione delle pompe per il trasporto di sostanze transmembrana;
  - blebbing (formazione di bolle d'aria sulla membrana), uno dei segnali apoptotici; [9]
  - riorganizzazioni nel citoscheletro (actina e microtubuli), causanti l'arresto del ciclo cellulare (porta ad apoptosi).
- **Effetti sulle proteine intracellulari:**
  - riduzione della sintesi proteica;
  - denaturazione delle proteine;
  - legame delle proteine denaturate alla matrice nucleare, dovuta all'insolubilità delle proteine cellulari dopo l'apertura delle stesse indotta dal calore. Questo comporta un incremento della concentrazione delle proteine nucleari e condiziona numerose funzioni molecolari (es: la sintesi e la riparazione del DNA);
  - induzione della sintesi delle HSPs (Heat Shock Proteins).
- **Effetti sugli acidi nucleici:**
  - riduzione della sintesi di DNA/RNA;
  - inibizione degli enzimi di riparazione del DNA;

- alterazione della conformazione del DNA.

### 2.3.2 Alterazioni delle funzioni della cellula

L'ipertermia induce anche modifiche ad alcune funzioni cellulari:

- metabolismo dei diversi compartimenti;
- espressione genica;
- trasduzione dei segnali.

## 2.4 HEAT SHOCK PROTEINS

Uno degli effetti molecolari prodotti dall'ipertermia è proprio l'induzione della sintesi delle Heat Shock Proteins (HSP). Esse sono proteine che vengono prodotte in condizioni di stress termico.

Tale famiglia di proteine è divisa in sottofamiglie in base al peso molecolare. Tra le principali si ricordano:

- HSP100 (con peso molecolare di 100 kDa);
- famiglia HSP70 (con peso molecolare di 70 kDa), tra cui si ricordano: le HSP70 sintetizzate in abbondanza in condizioni di stress termico o ossidativo (in caso di mancato equilibrio fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti), le HSC70 che sono proteine costitutive all'interno delle cellule, le HSP75 localizzate nei mitocondri, le GRP78 situate nel reticolo endoplasmatico;
- famiglia HSP90 (con peso molecolare di 90 kDa): HSP90 $\alpha$ , HSP90 $\beta$ , GRP94;
- HSP60 (con peso molecolare di 60 kDa);
- Piccole HSP (con peso molecolare tra 10 kDa e 30 kDa), tra cui si ricordano: HSP27 e HSP10.

Si distinguono, inoltre, le HSP intracellulari e quelle extracellulari.

### 2.4.1 HSP intracellulari

Le HSP intracellulari possono avere un duplice effetto: citoprotettivo<sup>11</sup> e pro-apoptotico<sup>12</sup>. Nel seguente paragrafo verranno esposti i dettagli di questa duplicità.

**1)** Le HSP intracellulari hanno un ruolo fondamentale nell'indurre un effetto **citoprotettivo** in condizioni di stress (ipertermia, ischemia, ipossia,..).

---

<sup>11</sup>Effetto di protezione della cellula in situazioni di diversi tipi di stress (ipertermia, ischemia, ipossia,..).

<sup>12</sup>Effetto di induzione all'apoptosi cellulare.

- Funzione di chaperones molecolari: ripristinano l'equilibrio in situazioni di stress acuto o cronico [11,12]
  - trasportando le proteine nei compartimenti cellulari,
  - ripiegando le proteine nel citosol, nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri,
  - degradando le proteine instabili e i complessi proteici,
  - prevenendo l'aggregazione delle proteine,
  - controllando le proteine regolatorie.
  
- Ruolo antiapoptotico<sup>13</sup> in quanto sono in grado di provocare interferenza con i fattori pro-apoptotici nella fase pre o post mitocondriale. [13]

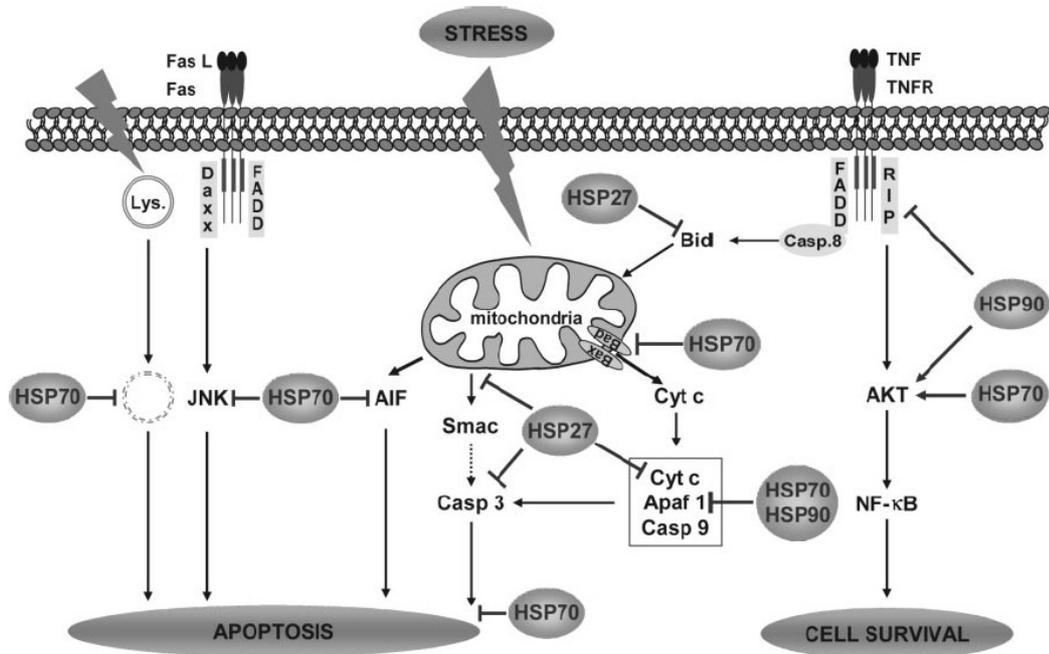


Figura 6: interferenze che le HSP possono produrre nella vie apoptotiche [13].

In figura 6 sono rappresentate tutte le possibili interferenze che le HSP possono produrre nella vie apoptotiche estrinseca (pre-mitocondriale) e intrinseca (post-mitocondriale).

In particolare:

- HSP27:
  - prevengono l'attivazione delle caspasi;
  - stabilizzano i filamenti di actina del citoscheletro;

<sup>13</sup>Effetto di inibizione dell'apoptosi cellulare.

- incrementano la difesa antiossidante delle cellule diminuendo le specie reattive all'ossigeno contenute nella cellula e neutralizzano l'effetto tossico delle proteine ossidate;
  - regolano fattori di sopravvivenza cellulare (ad esempio favorendo la sopravvivenza del fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B<sup>14</sup>, stimolando la degradazione del suo inibitore, I $\kappa$ B $\alpha$ , da parte del proteasoma).
- HSP70:
- riducono o bloccano l'attivazione delle caspasi, grazie alla modulazione dell'apoptosoma (complesso multiproteico formato dal citocromo c, le proteine citosoliche e la caspasi 9) e all'inibizione del rilascio del citocromo c mitocondriale;
  - riducono i danni mitocondriali e la frammentazione nucleare;
  - inibiscono le catepsine, proteasi coinvolte nell'apoptosi;
  - in fase premitocondriale inibiscono i segnali di stress (inibizione delle chinasi attivate dallo stress, di Bid<sup>15</sup>, di TNF, di p53<sup>16</sup>);
  - a livello mitocondriale prevengono la permeabilizzazione della membrana dei mitocondri bloccando la traslocazione di una proteina transmembrana proapoptotica, Bax;
  - a livello postmitocondriale interagiscono con AIF<sup>17</sup> e Apaf-1<sup>18</sup>.
- HSP90:
- promuovono la formazione e maturazione dei recettori e delle chinasi come Raf-1<sup>19</sup>;
  - prevengono l'attivazione delle caspasi in estratti citosolici trattati con citocromo c;
  - hanno un effetto negativo su Apaf-1;
  - fosforilano I $\kappa$ B chinasi, promuovendo l'inibizione dell'apoptosi da parte di NF- $\kappa$ B;
  - interagiscono con p53;

<sup>14</sup>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells.

<sup>15</sup>Proteina transmembrana proapoptotica.

<sup>16</sup>Proteina considerata un soppressore tumorale e considerato come un fattore anti-crescita e anti-oncogenico.

<sup>17</sup>Apoptosis Inducing Factor: proteina mitocondriale che induce l'apoptosi provocando la condensazione della cromatina e la degradazione del DNA.

<sup>18</sup>Apoptose Protease Activating Factor -1, proteina citoplasmatica.

<sup>19</sup>Enzimi oncosoppressori dell'apoptosi.

- inibiscono l'azione delle proteasi calpaine, calcio dipendenti.

2) Per contro le HSP intracellulari hanno anche un ruolo **pro-apoptosi**<sup>20</sup>:

- le HSP intracellulari sono coinvolte nella processazione degli antigeni e nella loro presentazione sulla membrana, passaggio fondamentale per il reclutamento dei linfociti T citotossici che distruggono le cellule esprimenti gli antigeni tumorali sulla membrana, grazie all'introduzione di granuli citolitici o al meccanismo fas/fas ligando o alla liberazione delle citochine, richiamanti macrofagi e incentivanti la proliferazione dei linfociti T citotossici.

In particolare, le HSP70 (costitutive e inducibili) e le HSP90 sono associate ai peptidi antigenici del citosol e mediano la loro traslocazione e processazione.

Inoltre le HSP sono associate al proteasoma, che degrada le proteine cellulari e produce peptidi antigenici: proprio questi verranno presentati alle MHC I (complesso maggiore di istocompatibilità di classe 1) consentendo il riconoscimento della cellula tumorale infetta da parte dei linfociti T citotossici i quali si legano con il recettore CD8 al complesso MHC I + antigene presente sulla membrana. [11,14,15,16]

In figura 7 [11] è rappresentato il ruolo delle HSP intracellulari nella presentazione dell'antigene tumorale ai complessi MHC di classe I nel reticolo endoplasmatico. Le proteine cellulari sono degradate dal proteasoma, con conseguente produzione di peptidi antigenici. I peptidi vengono trasportati dal citosol nel reticolo endoplasmatico (ER) da trasportatori connessi con l'elaborazione dell'antigene (TAP), cui segue il legame delle molecole alle MHC di classe I e la loro presentazione sulla superficie cellulare. In questa modalità le HSP (chaperones molecolari) si associano a peptidi antigenici, al proteasoma, a TAP e MHC di classe I.

---

<sup>20</sup>Le tre osservazioni presentate valgono ognuna in riferimento a linee cellulari tumorali specifiche.

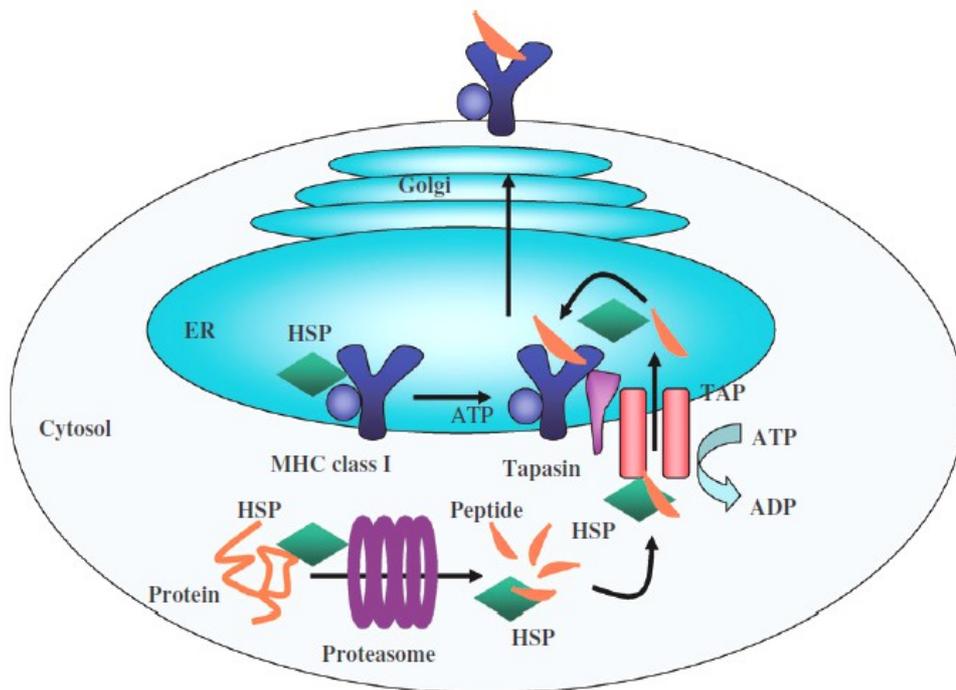


Figura 7: ruolo delle HSP intracellulari nella presentazione dell'antigene tumorale ai complessi MHC di classe I [11].

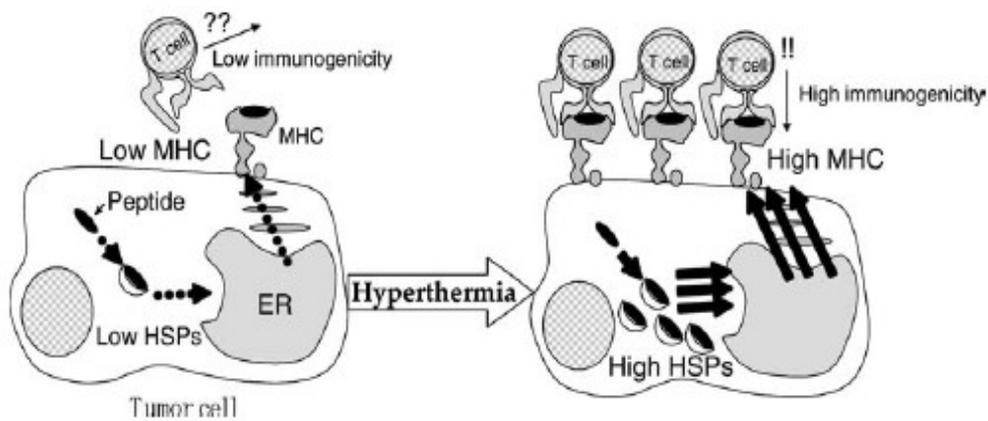


Figura 8: stimolazione della produzione di HSP intracellulari [15].

In figura 8 [15] è osservabile il fatto che l'ipertermia stimola la produzione di HSP intracellulari, con una conseguente immunogenicità ai linfociti T citotossici indotta dalla presentazione di numerosi complessi MHC sulla membrana cellulare.

- Le HSP60 e HSP10 mitocondriali, a dispetto di quelle citosoliche, favoriscono l'attivazione della procaspasi-3, associandovisi, e portando la cellula tumorale alla morte. [12]
- Alcuni studi riportano che l'immunogenicità delle HSP intracellulari sia legata a una loro bassa espressione o sottoregolazione, tanto che uno degli approcci

terapeutici riguarda proprio l'inibizione delle HSP intracellulari nelle cellule tumorali [13]. Ciò è in apparente discordanza con la teoria descritta in precedenza.

### 2.4.2 HSP extracellulari

Le HSP extracellulari producono un effetto **immunogenico** in condizioni di stress termico.

1) Le HSP extracellulari provengono: [13,15]

- dal trasporto effettuato dagli esosomi dal compartimento endosomiale, verso la membrana plasmatica e l'ambiente extracellulare;
- dalla necrosi di cellule che hanno subito uno shock termico prodotto mediante ipertermia ablativa che incrementa i livelli intracellulari di HSP che portano a una maggior processazione degli antigeni endogeni e ad un incremento nella densità di complessi MHC I sulla membrana, cosicchè tali cellule tumorali sono riconosciute direttamente dai linfociti T citotossici. Le cellule che muoiono rilasciano il loro contenuto nell'ambiente extracellulare, incluse le HSP e gli antigeni<sup>21</sup>.

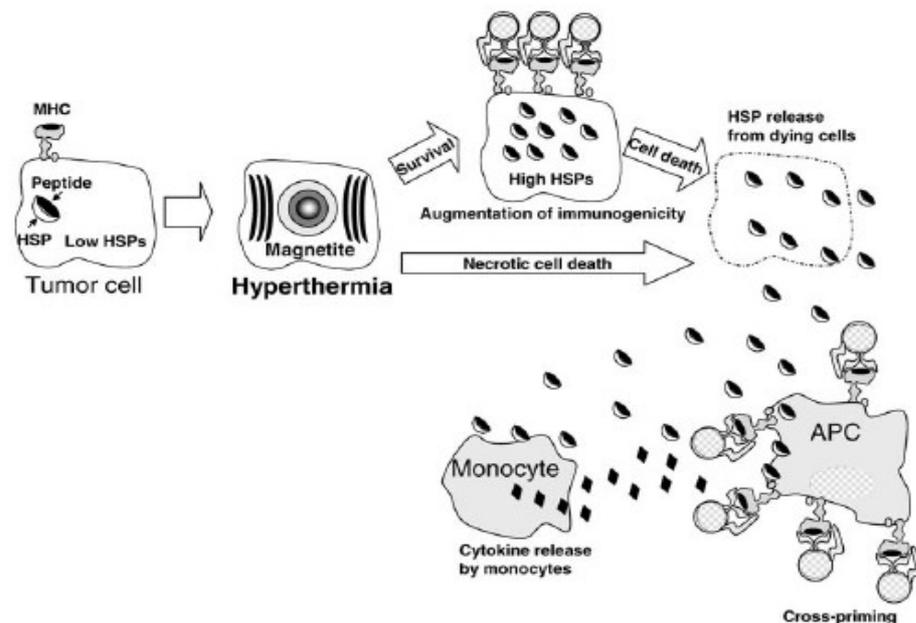


Figura 9: effetto citotossico prodotto dalla liberazione di HSP intracellulari nell'ambiente extracellulare [15].

<sup>21</sup>La necrosi cellulare ha, quindi, anche un aspetto immunogenico positivo, ma gli effetti collaterali sulle cellule circostanti sono consistenti (instaurazione di una risposta infiammatoria). È consigliabile, quindi, l'uso della 'mild hyperthermia' che induce l'apoptosi delle cellule.

In figura 9 [15] si può notare l'effetto citotossico prodotto dalla liberazione di HSP intracellulari nell'ambiente extracellulare, in seguito alla necrosi della cellula 'malata' sottoposta ad ipertermia.

**2) Esplicazione dell'effetto immunogenico delle HSP extracellulari (stimolazione immunità innata<sup>22</sup> e adattativa o acquisita<sup>23</sup> delle cellule):**

- Funzione di carrier peptidici (stimolazione immunità adattativa): le HSP (in particolare le HSP70 e le HSP90) formano dei complessi con gli antigeni e, tramite endocitosi, vengono assorbiti dalle APC (Antigen Presenting Cells), definite professionali (cellule dendritiche, macrofagi), presentanti i recettori per HSP (CD91, CD40, Toll-Like Receptor TLR2/4 ± CD14, CD35, LOX-1, SR-A). Dopo l'assorbimento e la processazione da parte del proteasoma, i peptidi antigenici sono presentati sulle molecole MHC I. Questo processo è definito cross presentation: solitamente, infatti, sono coinvolti i complessi MHC II per tali cellule immunitarie, suscitanti una risposta anticorpale o dei T-helper piuttosto che dei linfociti T-citotossici. Tale meccanismo (coinvolgente HSP+antigene+MHC I) è considerato più efficiente del meccanismo indotto dal complesso antigene+MHC II. [11,13,20]

In figura 10 si può notare il meccanismo di cross-presentation in una cellula dendritica [11].

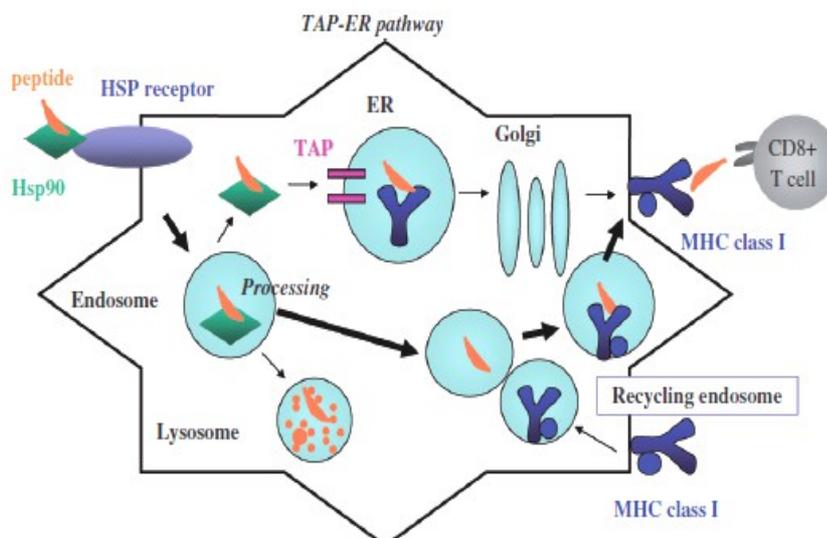


Figura 10: meccanismo di cross-presentation in una cellula dendritica [11].

<sup>22</sup>Riguardante NK, macrofagi, cellule dendritiche.

<sup>23</sup>Relativa ai linfociti T e B.

- Stimolazione immunità innata: [13]
  - gli antigeni portano a un'attivazione delle cellule fagocitarie circostanti, mentre in assenza di legami con peptidi antigenici tumorali, le HSP70 e HSP90 possono comunque legarsi alle APC tramite particolari siti recettori (Toll Like Receptor TLR2/4+CD14), inducendo il rilascio di citochine proinfiammatorie, tra cui il TNF (Tumor Necrosis Factor).

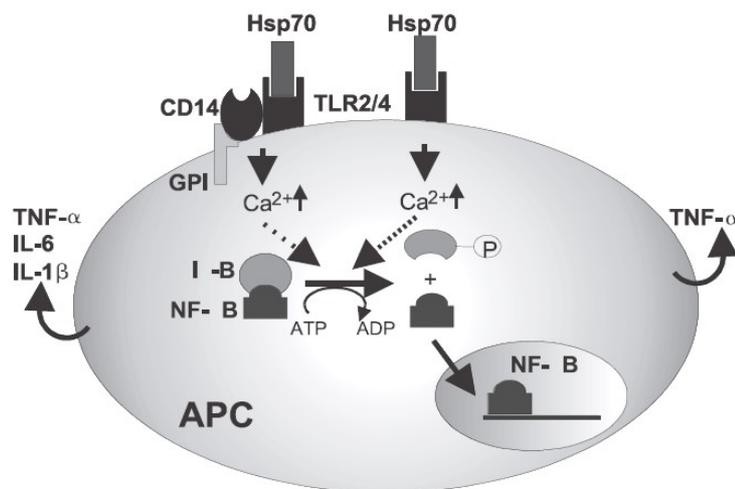


Figura 11: legame delle HSP70 con i TLR2/4 in una APC [13].

In figura 11 [13] è raffigurato il legame delle HSP70 con i TLR2/4 in una APC. Questo legame induce il rilascio di fattori pro-infiammatori.

- Per le cellule tumorali che non presentano MHC I o hanno una sottoregolazione del complesso stesso (teoria del Missing Self), è previsto un attacco da parte delle Natural Killer, cellule del sistema immunitario particolarmente importanti nel riconoscimento e nella distruzione di cellule tumorali o infette da virus.

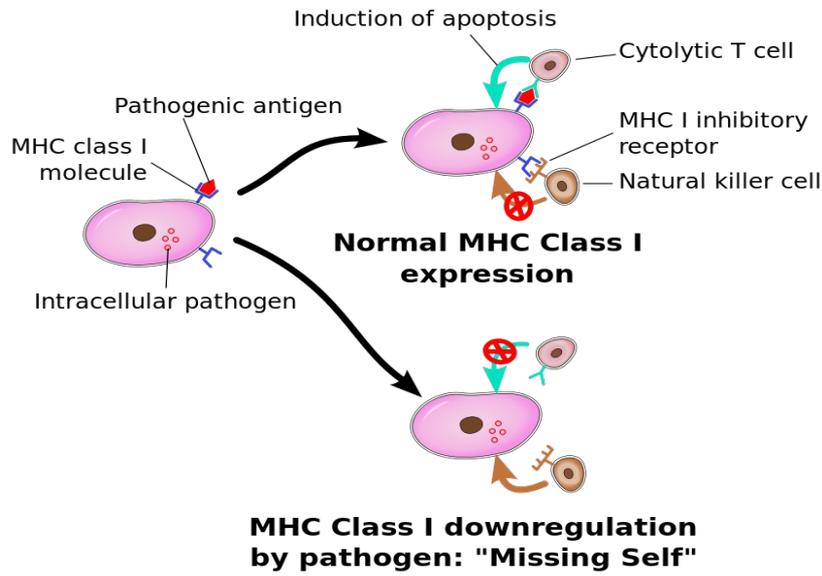


Figura 12: meccanismo del missing-self [http://en.wikipedia.org/wiki/Natural\_killer\_cell].

In figura 12<sup>24</sup> è riportato il meccanismo del missing-self.

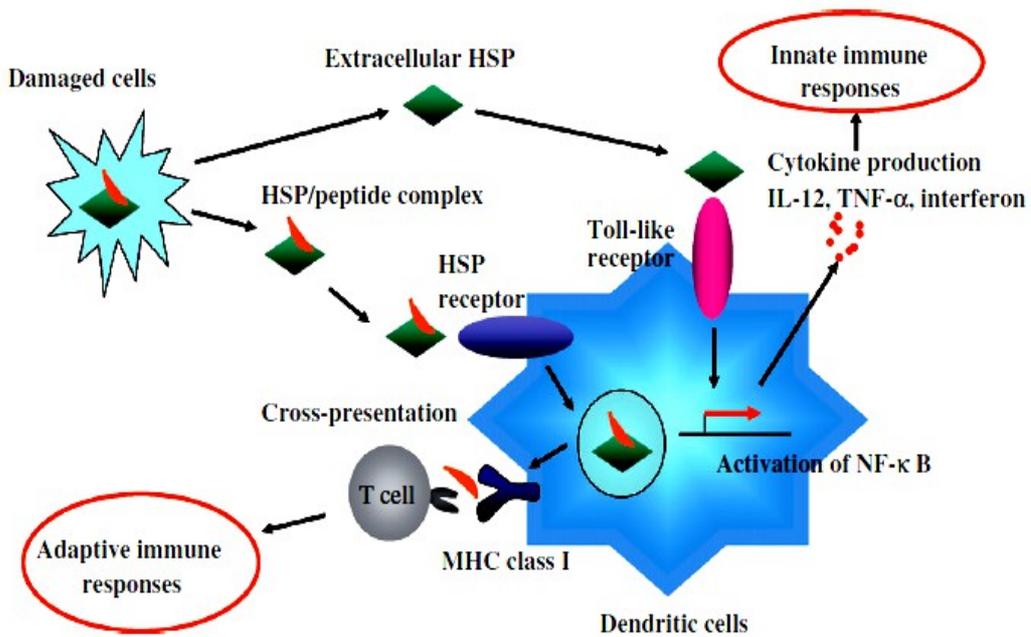


Figura 13: immunità adattativa e innata indotta dalle HSP extracellulari [11].

<sup>24</sup>http://en.wikipedia.org/wiki/Natural\_killer\_cell

La figura 13 [11] è riassuntiva e rappresenta il meccanismo di immunità adattativa e innata indotta dalle HSP extracellulari<sup>25</sup>.

Anche per le HSP extracellulari valgono le considerazioni effettuate prima per le HSP intracellulari (nota 20): gli effetti reali delle HSP valgono relativamente a linee cellulari specifiche. In tabella 2 sono riportati gli effetti che le HSP extracellulari inducono su determinate cellule [17].

---

<sup>25</sup>Numerosi studi stanno cercando di capire le modalità per incrementare le HSP extracellulari visto il loro effetto immunogenico. [13]

Tabella 2: effetti che le HSP extracellulari inducono su determinate cellule [17].

Model used	Hsps used	Results
<i>In vitro</i>		
Liposomes loaded with calcein	hum-Hsc/Hsp70, myco-Hsp65 & 71	Leakage of calcein
Liposomes	recom bov-Hsc70 or recom hum-Hsp70	Enhanced fusion of liposomes
Planar artificial membrane	hum-Hsc/hsp70	K <sup>+</sup> -conducting channel
Planar artificial membrane	recom bov-Hsc70	Cation-selective channel
Rabbit and monkey arterial smooth muscle cells	bov brain Hsc70	Increased survival during nutrient deprivation
Neuroblastoma cells	bov skeletal muscle Hsc/Hsp70	Increased survival after heat stress and resistance to drug-induced apoptosis
Motor neurons	recom bov-Hsc70 or hum-Hsp70	Reduced apoptosis in absence of trophic factor
Rat cortical neurons	recom bov-Hsc70	Inhibition of ischemia-induced Hsp70 increase
Rat microglia	hum-Hsp90, recom hum-Hsp70, recom rat-Hsp32, recom hum-Hsp27	All Hsps except Hsp27 stimulated cytokine production and phagocytosis of $\beta$ -amyloid
Rat brain slice	recom hum-Hsp70	Synaptic transmission preserved during hyperthermia
PC12 cells	recom bov-Hsc70, recom hum-Hsp70	Increased apoptosis
Pre-B 70Z/3 (murine cell line) and human peripheral blood lymphocytes	recom hum Hsp70 and various hum Hsp70-NF- $\kappa$ B fusion proteins	Uptake of Hsp70 into cytoplasm and Hsp70-NF- $\kappa$ B fusion proteins into nucleus with expression of inflammatory cytokines
<i>In vivo</i>		
Mouse sciatic nerve axotomy	bov brain Hsc70, bov skeletal muscle Hsc/Hsp70, recom bov-Hsc70, recom hum-Hsp70	Reduction of axotomy-induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons and spinal motor neurons
Rat retina	bov skeletal muscle Hsc/Hsp70	Reduction of light-induced photoreceptor degeneration

Abbreviations used: bov = bovine; hum = human, rec = recombinant.

Nelle tabelle 3 e 4 sono schematizzate le famiglie di HSP intracellulari ed extracellulari con la relativa funzione [18,19].

Tabella 3: famiglie di HSP intracellulari con la relativa funzione

Famiglie e membri	Localizzazione intracellulare	Funzione intracellulare
<b>Piccole HSP</b>		
HSP10	Mitocondri	<i>Pro-apoptosi:</i> favoriscono l'attivazione della procaspasi-3.
$\alpha$ B-crystallin	Citoplasma	Concorrono alla stabilizzazione del citoscheletro.
HSP27	Citoplasma/nucleo	Interagiscono con la dinamica dell'actina; prevengono l'attivazione delle caspasi; incrementano la difesa antiossidante della cellula; regolano alcuni fattori di sopravvivenza cellulare (es. NF-kB).
Eme ossigenasi, HSP32	Citoplasma	Interagiscono con il catabolismo dell'eme; proprietà antiossidanti.
<b>HSP40</b>		
HSP40	Citoplasma/nucleo	Regolano l'attività delle HSP70; si legano a proteine non native.
HSP47	Reticolo Endoplasmatico (ER)	Contribuiscono alla processazione del pro-collagene e alla processazione e/o secrezione del collagene.
<b>HSP60 (o chaperonine)</b>		
HSP60	Mitocondri	Si legano ai polipeptidi parzialmente ripiegati e assistono al loro corretto ripiegamento; assemblano complessi multimerici. <i>Pro-apoptosi:</i> le HSP60 favoriscono l'attivazione della procaspasi-3.
TCP-1	Citoplasma	
<b>HSP70</b>		
Inducibili: HSP70	Citoplasma/nucleo	Riducono o bloccano l'attivazione delle caspasi; sopprimono i danni mitocondriali e la frammentazione nucleare; inibiscono le catepsine; inibiscono i segnali di stress (fase premitocondriale); prevengono la permeabilizzazione della membrana mitocondriale (livello mitocondriale); interagiscono con AIF e Apaf1 (livello post-mitocondriale); si legano a polipeptidi estesi; prevengono l'aggregazione di proteine non ripiegate; dissociano alcuni oligomeri; si legano all'ATP; hanno attività ATPasica. Le HSP70 provocano una sottoregolazione dell'attività dell'HSF1 (Heat Shock Factor). <i>Pro-apoptosi:</i> le HSP inducibili mediano la traslocazione e processazione dei peptidi antigenici nel citosol.
Costitutive: HSC70	Citoplasma/perossisoma	
Grp78/BiP	ER	
mtHSP70/Grp75	Mitocondri	
<b>HSP90</b>		

MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA

HSP90 ( $\alpha$ e $\beta$ )	Citoplasma	Promuovono la formazione e maturazione dei recettori e delle chinasi oncogene; prevengono l'attivazione delle caspasi; hanno un effetto negativo su Apaf-1; fosforilano l'I $\kappa$ B chinasi; interagiscono con le p53; inibiscono l'azione delle proteasi calpaine; si legano ad altre proteine; regolano l'attività delle proteine; prevengono l'aggregazione delle proteine ripiegate; assemblano e ripiegano correttamente le proteine neo-sintetizzate. Le HSP90 assistono al mantenimento dello state monomero dell'HSF1 in condizioni normali (non di stress). <i>Pro-apoptosi:</i> mediano la traslocazione e processazione dei peptidi antigenici nel citosol.
Grp94/gp96/Hsp100	ER	
<b>HSP110</b>		
HSP110 (umana)	Nucleolo/citoplasma	Funzione di termotolleranza.
Apg-1 (topo)	Citoplasma	Ripiegano le proteine.
HSP105	Citoplasma	/

Tabella 4: famiglie di HSP extracellulari con la relativa funzione

Famiglie e membri	Funzione extracellulare
HSP27	Anti-infiammatoria
HSP60	Pro-infiammatoria <sup>26</sup>
HSP70	Agonista (promotore) neuronale, immunoregolatorio, proinfiammatorio (legame con APC tramite i recettori Toll TLR2/4+CD14)
HSP90	Pro-immune <sup>27</sup> , proinfiammatorio (legame con APC tramite i recettori Toll TLR2/4+CD14)
HSP110	Pro-immune
grp78	Anti-infiammatorio
Grp94	Immunoregolatorio
Grp170	Pro-immune

<sup>26</sup>Stimola l'infiammazione.

<sup>27</sup>Stimola il sistema immunitario.





## 3 STUDIO DEGLI EFFETTI DEL CALORE SULLE CELLULE

### 3.1 INTRODUZIONE

La letteratura riguardante esperimenti che valutano gli effetti dell'ipertermia su tessuti tumorali è molto vasta. Qui di seguito verranno presentati i risultati descritti in alcuni articoli considerati significativi per questo lavoro di tesi. In particolare il primo articolo riportato è stato analizzato in maggior dettaglio in quanto è stato una guida per l'effettuazione degli esperimenti svolti in laboratorio (capitolo 5). Per ogni articolo verrà posta l'attenzione sui seguenti aspetti: gli obiettivi, i materiali e i metodi usati, i risultati e le conclusioni.

### 3.2 IPERTERMIA IN VITRO: BREVE EXCURSUS

#### 3.2.1 Studio degli effetti del calore sulle cellule di tumore mammario

Il paper di Theriault et Al [21] presenta i risultati di uno studio in vitro effettuato su cellule di tumore mammario trattate con ipertermia.

##### 1) Obiettivo

Verificare gli effetti dell'ipertermia isotermica continuativa e di quella ripetuta ciclicamente su cellule di tumore mammario.

##### 2) Materiali e metodi

- Linea cellulare MDA-MB-231 (cellule di carcinoma mammario);
- saggio ioduro di propidio<sup>28</sup>: per valutare l'ammontare delle cellule morte, la formazione di corpi apoptotici e la loro localizzazione;
- metodo ELISA<sup>29</sup>: per rilevare la presenza delle HSP.
- Il trattamento ipertermico è stato eseguito mediante l'utilizzo di un dispositivo a resistenza.

##### 3) Esperimenti eseguiti

Sono state eseguite due tipologie di esperimenti:

---

<sup>28</sup>Colorazione fluorescente che marca le cellule degenerate.

<sup>29</sup>*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ovvero Saggio Immuno-Assorbente legato ad un Enzima. Si tratta di un metodo d'analisi immunologica usato per rilevare la presenza di una sostanza usando uno o più anticorpi ad uno dei quali è legato un enzima. La sostanza da rilevare può essere un antigene appartenente ad un patogeno o ad una molecola più piccola, chiamata aptene. (<http://it.wikipedia.org/wiki/ELISA>)

1. ipertermia isoterma (per la spiegazione dettagliata dei metodi qui nominati si consulti il paragrafo 5.2):

- valutazione della vitalità cellulare mediante il test del Trypan Blue: in questo caso il test del Trypan Blue è usato per analizzare la crescita cellulare nelle condizioni di ipertermia continuativa. I campioni di cellule sono stati esposti a quattro diverse temperature (37°C, 41°C, 43°C, 45°C) per intervalli di tempo da 24 ore fino a 72 ore. Ogni 24 ore si conteggiavano le cellule morte tramite un emocitometro<sup>30</sup> eseguendo un saggio Trypan Blue.
- Valutazione della vitalità cellulare mediante crescita clonale: questo test è usato per valutare la vitalità delle cellule osservando la capacità delle cellule di formare colonie cellulari dopo il trattamento di ipertermia continuativa. I campioni di cellule di partenza sono stati esposti ad una delle quattro condizioni isoterme (37°C, 41°C, 43°C, 45°C) per intervalli di tempo da 24 ore fino a 72 ore. Esse sono state, poi, raccolte e contate con una penna apposita dopo 24, 48 e 72 ore nel caso di trattamento ipertermico a 37°C, 41°C e 43°C oppure dopo 6 e 12 ore nel caso di trattamento ipertermico a 45°C.

2. Ipertermia ciclica:

- ogni ciclo di trattamento consiste in 45 minuti di esposizione alle temperature ipertermiche (45°C e 37±3°C), seguito da un periodo di incubazione a 37°C di 12 ore. Sono stati eseguiti cicli in cui il trattamento ipertermico è stato ripetuto per 5, 10, 20 volte.
- Valutazione degli effetti della temperatura (37°C, 41°C, 43°C, 45°C) sull'espressione delle heat shock proteins intracellulari: sono stati preparati dei pozzetti con le cellule di carcinoma e sono stati scaldati per 30 minuti in un bagno termico alle quattro temperature suddette. Tale procedura è stata ripetuta ogni 12 ore per 5 volte. Il conteggio delle cellule trattate è stato effettuato tramite:
  - il metodo ELISA;
  - il metodo del Trypan Blue.

---

<sup>30</sup>Camera contaglobuli impiegata per il conteggio microscopico delle cellule del sangue.

### 3) Risultati e conclusioni.

- Nel caso di ipertermia isoterma continuativa si sono rilevate le seguenti osservazioni:
  - necrosi cellulare sopra i 43°C;
  - apoptosi nelle zone a temperature inferiori a 43°C relative al dispositivo a resistenza usato per il trattamento ipertermico delle cellule;
  - già dopo 30 minuti di esposizione a 43°C le cellule mostrano deterioramenti nel citoscheletro (actina e microtubuli) che aumentano al crescere del tempo di esposizione. Queste modificazioni strutturali portano all'apoptosi<sup>31</sup>;
  - dopo 60 minuti di esposizione a 43°C, si osservano cambiamenti nel nucleo (per solo un terzo dei campioni esposti): si ha formazione dei corpi apoptotici indicanti l'inizio della fase apoptotica;
  - la temperatura ideale per il trattamento ipertermico rilevata con questo esperimento è a 43°C.
- Nel caso dell'ipertermia ciclica le osservazioni evidenziate sono le seguenti:
  - la forma di morte cellulare prevalente è l'apoptosi;
  - a temperature progressivamente più alte nella fascia 41°C-47°C sono necessari meno cicli per condurre alla morte le cellule (prevalentemente apoptosi);
  - l'espressione delle HSP<sup>32</sup> aumenta al crescere della temperatura da 41 a 47°C.
  - Tale trattamento può provocare l'arresto del ciclo cellulare, portando la cellula alla morte dopo più di 5 giorni di trattamenti.

---

<sup>31</sup>Dopo 5 giorni di arresto del ciclo cellulare, le cellule MDA-MB-231 vanno incontro all'apoptosi, come diretta conseguenza dell'arresto del ciclo cellulare stesso o del blocco mitotico.

<sup>32</sup>Si parla prevalentemente di HSP70 inducibili. La loro interazione con i recettori delle APC comporta una maggiore risposta immunitaria coinvolgente i linfociti T citotossici, portando le cellule alla morte.

### 3.2.2 Effetto dell'ipertermia sulle HSP27 e sulle proteine di riparazione del DNA in cellule di carcinoma del colon-retto

Il paper di Nadin et Al [22] descrive l'effetto del calore sulle cellule tumorali del colon-retto con particolare attenzione alle conseguenze sulle proteine cellulari (HSP e proteine di riparazione del DNA).

#### 1) Obiettivo

Esaminare le conseguenze della 'mild hyperthermia' (41°C-42°C) su linee cellulari tumorali umane prive o non prive del sistema di riparazione del mismatch del DNA (MMR)<sup>33</sup> per capire la relazione tra l'MMR e le heat shock proteins.

#### 2) Materiali e metodi

- Linee cellulari di carcinoma del colon: HCT116 (cellule parentali, ovvero della prima linea cellulare originata), HCT116+ch2 (prive di MMR) e HCT116+ch3 (non prive di MMR).
- Le concentrazioni di Hsp27, Hsp72, hMLH1 e hMSH2 (proteine riparatrici del DNA) sono state valutate tramite western blot<sup>34</sup> in frazioni nucleari e citoplasmatiche.
- Per valutare il danno al DNA è stata usata la tecnica denominata comet assay<sup>35</sup>.

#### 3) Esperimento

Le cellule venivano incubate a 41°C e 42°C per 1 ora in un bagno termico e poi mantenute a 37°C per 4 e 24 ore.

#### 4) Risultati

- La 'mild hyperthermia' aumenta significativamente i livelli di espressione proteica delle HSP27 e HSP72 in tutte le linee cellulari utilizzate in questo esperimento. Questa modifica di concentrazione è stata rilevata soprattutto nel nucleo e nel citoplasma delle HCT116+ch3.

---

<sup>33</sup>Il sistema MMR è uno dei meccanismi di riparazione del DNA che contribuisce al mantenimento dell'integrità del genoma e previene la carcinogenesi.

<sup>34</sup>Il western blot o immunofissazione o immunoblot è una tecnica biochimica che permette di identificare una determinata proteina in una miscela di proteine, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. ([http://it.wikipedia.org/wiki/Western\\_blot](http://it.wikipedia.org/wiki/Western_blot))

<sup>35</sup>Il Single Cell Gel Electrophoresis assay (noto anche come test della cometa) è una tecnica semplice e sensibile per la rilevazione del danno al DNA a livello della cellula eucariotica singola. ([http://en.wikipedia.org/wiki/Comet\\_assay](http://en.wikipedia.org/wiki/Comet_assay))

- Nelle cellule della linea HCT116+ch3 il calore induce la traslocazione delle proteine hMLH1 e hMSH2 dal nucleo al citoplasma.
- Il comet assay ha rivelato che le HCT116 sono più resistenti al danno (non è precisato il tipo di danno) al DNA causato dal calore. Comunque, in questo esperimento si è evidenziato che sia le cellule munite sia quelle prive di MMR riparano i danni al DNA allo stesso modo.

## 5) Conclusioni

- L'ipertermia nelle cellule della linea HCT116+ch3 induce l'accumulo nucleare di Hsp27 e Hsp72 e influenza la localizzazione subcellulare delle proteine riparatrici del DNA, hMLH1 e hMSH2.
- Nelle cellule HCT116 il sistema MMR non è un fattore che determina una diversa risposta da parte delle HSP quando sottoposte a ipertermia.

### 3.2.3 Ruolo delle HSP27 nell'apoptosi di cellule di carcinoma della lingua

Il paper di Jiang et Al [23] presenta i risultati relativi all'ipertermia su cellule di carcinoma della lingua.

#### 1) Obiettivo

Si cerca di spiegare il meccanismo che porta le cellule tumorali all'apoptosi tramite il percorso apoptotico mitocondriale<sup>36</sup> indotto dall'ipertermia. La scramblasi <sup>37</sup> (PLS3) risiede nei mitocondri e gioca un ruolo fondamentale nel regolare la risposta apoptotica. La PLS3, quando attivata, facilita la traslocazione della cardiolipina<sup>38</sup> (CL) dalla parte interna a quella esterna della membrana mitocondriale, innescando l'apoptosi.

---

<sup>36</sup>Si faccia riferimento al paragrafo 2.2.2

<sup>37</sup>Enzima adibito allo spostamento dei fosfolipidi da un monostrato all'altro del doppio strato lipidico all'interno della membrana plasmatica di una cellula. (<http://it.wikipedia.org/wiki/Scramblasi>)

<sup>38</sup>La **cardiolipina** (difosfatidil-glicerolo) è un lipide che rappresenta il 20% circa delle molecole della membrana interna mitocondriale. La cardiolipina è responsabile della forte impermeabilità della membrana interna ai protoni. (<http://it.wikipedia.org/wiki/Cardiolipina>)

## 2) Materiali e metodi

- Linee cellulari del carcinoma della lingua (cellule squamose) Tca8113 trasfettate<sup>39</sup> o co-trasfettate usando lipofectamina 2000 con plasmidi pCMV-6xHis-PLS3, pCMV-6xHis-PLS3 (T21A), pHA-PKC- $\delta$ , pHA-PKC-  $\delta$ -KD (K376R), pHA-Hsp27 e un plasmide di controllo pcDNA3.1.
- Le valutazioni dell'apoptosi e la redistribuzione della cardiolipina mitocondriale sono state effettuate mediante citometria a flusso, tecnica che permette la misurazione e la caratterizzazione di cellule sospese in un mezzo fluido.
- PLS3, PKC-  $\delta$ , Hsp27, la fosforilazione della PLS3 e l'interazione tra PLS3 e PKC-  $\delta$  sono state controllate mediante western blot.

## 3) Esperimento

Le cellule trasfettate sono state scaldate in un bagno termico a 43°C per 20, 40 e 60 minuti.

## 4) Risultati

- Si sono rilevati elevati livelli di PLS3 non mutato che incrementano la traslocazione della cardiolipina e l'apoptosi, entrambi indotti dall'ipertermia. Non è stata notata la presenza del mutante del PLS3 (T21A).
- Il plasmide PKC-  $\delta$  non mutato facilita le seguenti modificazioni che promuovono l'apoptosi:
  - la fosforilazione della PLS3;
  - l'interazione tra PLS3 e PKC-  $\delta$ ;
  - la traslocazione della CL.
- Le Hsp27, invece, producono i seguenti effetti che inibiscono l'apoptosi:
  - ostacola la fosforilazione della PLS3 indotta dal PKC-  $\delta$ ;
  - sopprime l'interazione tra PLS3 e PKC-  $\delta$ ;
  - inibisce la traslocazione della CL.

---

<sup>39</sup>Per trasfezione si intende il processo di introduzione di materiale biologico esogeno in cellule eucariotiche e nella gran parte dei casi di mammifero. È più frequente l'inserimento di materiale genetico, tra cui solitamente DNA e siRNA, breve molecola di RNA, ma, in generale, possono essere trasfettate anche proteine (come ad esempio anticorpi). (<http://it.wikipedia.org/wiki/Trasfezione>)

## 5) Conclusioni

La fosforilazione della PLS3 da parte del PKC-  $\delta$  è coinvolta nel percorso di trasduzione del segnale apoptotico provocato dall'ipertermia nelle cellule della linea Tca8113, mentre le Hsp27 bloccano tale percorso per inibire l'apoptosi indotta dall'ipertermia.

### 3.2.4 Resistenza all'ipertermia indotta sulle cellule di neuroblastoma da parte delle HSP72

Il paper di Cheng et Al [24] mostra i risultati ottenuti applicando l'ipertermia sulle cellule di tumore del sistema nervoso autonomo.

#### 1) Obiettivo

In questo lavoro si è cercato di comprendere se la differenziazione delle cellule progenitrici in neuroni è accompagnata dalla sovra-regolazione delle Hsp72, con l'acquisizione di una maggiore termotolleranza dovuta al processo di differenziazione stesso.

#### 2) Materiali e metodi

- Linee cellulari SH-SY5Y di neuroblastoma umano. Gli stati cellulari delle linee SH-SY5Y analizzati sono:
  - la forma indifferenziata;
  - la forma differenziata in cellule neuronali.
- Linea cellulare SH-SY5Y trasfettata (linea 5YHSP72.1), contenente elevati livelli di Hsp72. Anche per questa linea cellulare gli stati analizzati sono quello indifferenziato e quello differenziato.
- L'ammontare di Hsp72 è stato misurato tramite western blot.
- Per determinare la termotolleranza delle cellule, sono stati effettuati dei test a tre temperature di shock termico: 45°C, 46°C, 47°C. Lo shock termico è stato realizzato mediante immersione in un bagno termico.

#### 3) Esperimento

I test di termotolleranza sono stati condotti esponendo le cellule a varie temperature (45°C, 46°C, 47°C) per 30 minuti, monitorando la morfologia nucleare

come indice di morte cellulare. Le cellule morte venivano conteggiate dopo 18 h di mantenimento a 37°C.

In seguito sono stati condotti gli stessi test di termotolleranza sulla stessa linea cellulare (nei due stati analizzati, indifferenziato e differenziato) in seguito ad un preriscaldamento delle cellule a 43°C per 30 minuti e 8 h a 37°C.

#### **4) Risultati**

- La differenziazione delle SH-SY5Y è accompagnata da un aumento dell'espressione di Hsp72. Dopo la differenziazione, le SH-SY5Y sono più resistenti allo stress ipertermico rispetto alle cellule nello stato indifferenziato, in correlazione con l'aumento stesso dei livelli di Hsp72.
- Si è notato che l'esposizione allo stress ipertermico moderato (43°C per 30 minuti) precedentemente agli shock termici previsti dal test di termotolleranza (45°C, 46°C, 47°C) aumenta l'espressione di Hsp72 in entrambi gli stati cellulari analizzati (cellule differenziate e non differenziate).
- L'espressione esogena stabile di Hsp72 nelle cellule della linea cellulare trasfettata 5YHSP72.1 (contenente elevati livelli di Hsp72) ha portato a una maggiore termotolleranza, soprattutto nella linea indifferenziata.
- Il trattamento delle cellule con KNK437, un soppressore dell'induzione delle Hsp72, ha portato ad una maggiore termosensibilizzazione per tutte le linee cellulari testate, in qualsiasi stato cellulare (differenziato o indifferenziato).

#### **5) Conclusioni**

- Lo stress ipertermico moderato incrementa i livelli di HSP72 intracellulari.
- Le Hsp72 hanno un ruolo chiave nell'aumento della termotolleranza acquisita durante la differenziazione delle cellule SH-SY5Y in cellule neuronali che risultano, quindi, resistenti allo stress termico.

### 3.3 CONSIDERAZIONI

Dalla letteratura si è visto che il riscaldamento di colture cellulari provoca effetti sul ciclo cellulare.

Dai lavori in vitro esaminati si nota che l'ipertermia è applicata sulle cellule mediante l'uso di:

- dispositivi che realizzano un riscaldamento mediante una resistenza interna;
- bagni termici utilizzati sia per un mantenimento di temperatura, sia per uno shock termico.

In questo lavoro si propone un controllo del processo di riscaldamento.



## 4 SET UP DEL RISCALDATORE

Questa prima fase sperimentale è dedicata alla configurazione dello strumento per controllare l'incremento di temperatura di una massa nota di acqua in funzione del tempo.

### 4.1 STRUMENTAZIONE UTILIZZATA

Di seguito si descrivono le caratteristiche della strumentazione utilizzata nel set up sperimentale.

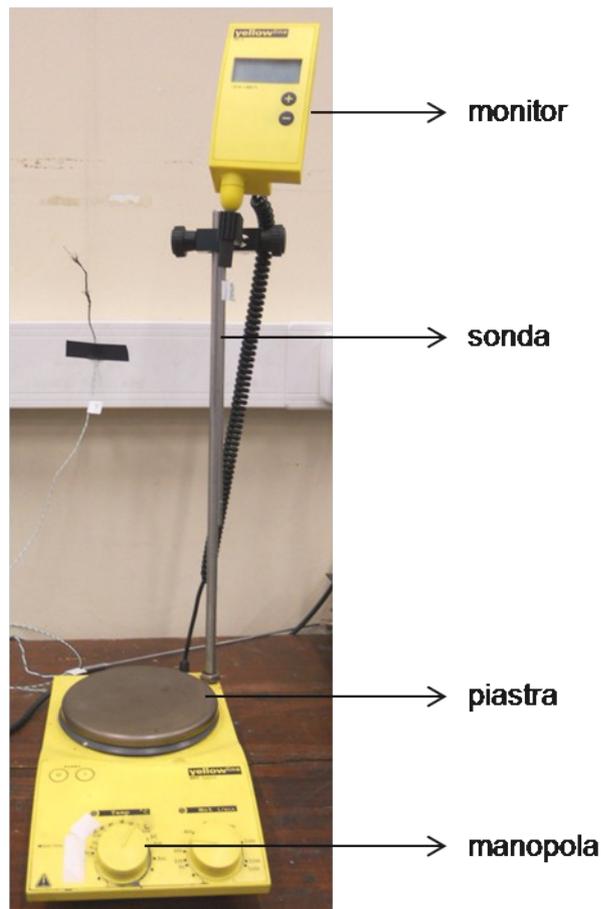


Figura 14: Yellow Line MST Basic.

1) YELLOW LINE MST BASIC: piastra scaldante utilizzata per scaldare una massa d'acqua variando la velocità di riscaldamento (rampe di temperatura).

Lo strumento è composto da:

- una piastra scaldante (con regolazione della temperatura fino a  $310^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$ );
- un dispositivo di controllo elettronico della temperatura tra  $-10$  e  $400^{\circ}\text{C}$ , con display digitale (monitor);
- una sonda di temperatura di tipo Pt1000 (classe B) in acciaio.

In riferimento al dispositivo di controllo elettronico si descrivono due tipologie di soglie di temperatura impostabili manualmente nello strumento, tramite i pulsanti + e -:

- 'soglia di temperatura **massima** raggiungibile' (figura 17): riferita alla globalità degli esperimenti eseguiti. Questa soglia è impostata alla prima accensione dello strumento. Nel caso degli esperimenti effettuati essa influenza la velocità di riscaldamento in termini di aumento di temperatura ( $^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ ). Questa velocità di riscaldamento è anche definita rampa di temperatura.
- 'Soglia di temperatura dell'**esperimento**' (valore in alto a destra in figura 16): è il maggior fattore di influenza della velocità di riscaldamento ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) nell'esperimento e indica, inoltre, il valore di temperatura su cui è effettuato un controllo di tipo retroattivo.



Figura 15: soglia di temperatura dell' esperimento .



Figura 16: soglia di temperatura massima.

2) BECHER Schott Duran graduato in vetro pirex da 600 ml, con coperchio in polistirolo e isolamento in polistirolo e sughero.

3) Cinque PROVETTE in vetro pyrex con tappo di gomma.

4) BILANCIA Radwag WTB 2000: bilancia digitale con portata di 2000 g ed incertezza di  $\pm 0.01\text{g}$ .

5) PIANO COTTURA AD INDUZIONE con 9 livelli di potenza per scaldare l'acqua fino a una temperatura di 37°C (temperatura iniziale della maggior parte degli esperimenti eseguiti in questa fase sperimentale).

6) ANELLO DI RAME: per mantenere il becher sulla piastra anche nel caso di moto oscillatorio della piastra.<sup>40</sup>

## 7) STRUMENTI DI MISURA

Per i primi esperimenti sono stati usati:

- un cronometro per misurare il tempo;
- un multimetro digitale, collegato a una termocoppia per registrare la temperatura dell'acqua. In seguito, è stato sostituito il multimetro con:
  - un termometro digitale Kane-May con termocoppia di tipo K<sup>41</sup> (figura 18) ;
  - un data logger (HP-34970A, figura 19) con termocoppie di tipo K, connesso a un PC e comandato mediante il software BenchLink Data Logger.



Figura 17: Kane-May KM 340.



Figura 18: Agilent HP-34970A.

<sup>40</sup> Negli esperimenti con le cellule la piastra sarà posta su un piano basculante per garantire il mescolamento delle cellule in sospensione.

<sup>41</sup> Tipo K (Chrome (Ni-Cr) (+)/ Alumel (Ni-Al) (-)):

sono termocoppie di uso generale, economiche e disponibili in una grande varietà di formati. Il loro intervallo di misura va da -200°C a 1260°C. La sensibilità è di circa 41µV/°C. (<http://it.wikipedia.org/wiki/Termocoppia>)

## 4.2 SET UP SPERIMENTALE

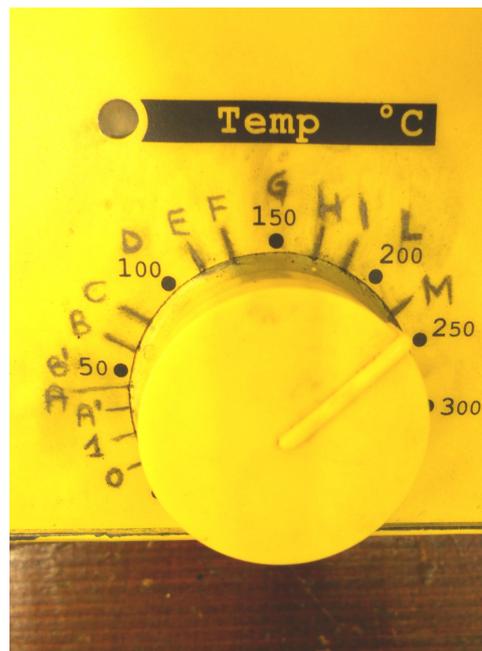
In questo paragrafo sarà descritto l'esperimento che è servito a determinare le rampe di temperatura utilizzate nella seconda fase sperimentale (ipertermia applicata alle cellule) che prevede il riscaldamento di colture cellulari in condizioni controllate.

### 4.2.1 Preparazione dello strumento

Si considera il becher contenente acqua in quantità nota in cui è immersa la sonda di temperatura dello Yellow Line (strumento raffigurato in figura 14). La sonda di temperatura è sorretta da un supporto metallico sul quale sono stati definiti dei precisi punti (figura 20) per rendere riproducibili le misure di temperatura dell'acqua nel becher, ponendo la sonda sempre al medesimo livello.



*Figura 20: punti definiti sul supporto metallico.*



*Figura 19: posizioni della manopola (tacche).*

Per regolare le velocità di riscaldamento dell'acqua del becher, sono state individuate delle posizioni (tacche) attorno alla manopola dello Yellow Line indicate con le lettere da A a M. (Figura 19). In corrispondenza di ciascuna tacca sono state effettuate diverse misurazioni al fine di individuare la rampa effettuabile con ciascuna posizione della manopola. Le rampe individuate sono riferite a un becher da 600 ml contenente ~384.5 g

d'acqua e 5 provette di diametro esterno 14 mm, lunghezza 100 mm contenenti ciascuna 4 ml di acqua.

#### 4.2.2 Modalità di acquisizione finale

La procedura per individuare le rampe di temperatura ottenibili con le diverse tacche della manopola di regolazione in dipendenza dalle condizioni dell'acqua del becher, segue il seguente schema (figure 21 e 22):

- 1) Si scalda l'acqua ad un valore di temperatura fissato (circa 39-40°C) tenendo conto che la temperatura di partenza dell'esperimento è circa 37°C<sup>42</sup> e della dispersione di calore dovuta al travaso dell'acqua nel becher (punto 2 di seguito).
- 2) Si pesa una quantità nota di acqua a una temperatura di partenza fissata (~37°C).
- 3) Si inseriscono le provette nel becher e le si riempiono con 4ml di acqua a 37°C.
- 4) Si appoggia il becher sulla piastra inizialmente fredda.
- 5) Si posizionano le sonde di temperatura e si avvia il data Logger: inizia la registrazione.
- 6) Si accende lo Yellow Line e si regola il suo controllo di temperatura tramite i tasti + e – presenti sul monitor (si veda la figura 14).
- 7) Si arresta l'acquisizione dei dati e si spegne lo strumento al raggiungimento della temperatura desiderata.
- 8) Si elaborano i risultati.

Di seguito si descrivono i dettagli delle suddette fasi delle misurazioni di temperatura effettuate.

##### 1) Riscaldamento dell'acqua (punto 1 dello schema).

Tramite una pentola in acciaio inox, si scalda una quantità d'acqua arbitraria, la cui temperatura è monitorata tramite il termometro digitale (mediante l'utilizzo del piano cottura ad induzione regolato al livello 5 o 6) fino a 39°C. Infatti durante il processo di pesata del liquido nel becher e nelle provette, il calore disperso porta la temperatura finale dell'acqua a 37°C circa.

---

<sup>42</sup>Poichè le cellule sono mantenute a 37°C si è stabilito che la temperatura di partenza per questo esperimento fosse ~37°C.

**2) Misura della quantità d'acqua e iniezione dell'acqua nelle provette (punti 2-3 dello schema).**

La quantità d'acqua complessiva nel becher e nelle provette è pari a circa 452 g. Tramite bilancia, si pesa la quantità di acqua contenuta nel becher e pari a  $384.7 \pm 0.3$  g d'acqua. Quindi, si inseriscono le provette nel becher e ognuna viene riempita con 4 ml d'acqua. Il peso complessivo è quello desiderato, circa 452 g.

**3) Preparazione della misura (punti 4 e 5 dello schema).**

Ogni provetta è tappata con un tappo in gomma per evitare dispersioni di calore.

In ogni provetta<sup>43</sup> si pone una termocoppia per misurare la temperatura dell'acqua in essa contenuta. Una seconda termocoppia è posta al centro del becher facendo in modo che sia alla medesima altezza delle termocoppie nelle provette (in particolare a metà dei 4 ml d'acqua); una terza termocoppia, sempre all'altezza della termocoppia nella provetta, è posta tra due provette consecutive. Le termocoppie possono essere individuate nella figura 21. La verifica della temperatura nelle provette è stata fatta per assicurare che la temperatura del contenuto delle provette seguisse quella dell'acqua del becher. Infatti, quando nelle provette saranno contenute le cellule, non sarà possibile posizionare la termocoppia per non danneggiarle. In figura 23 è riportato un esempio di sovrapposizione degli andamenti della temperatura dell'acqua delle provette e del becher (misurata con la termocoppia all'altezza delle termocoppie delle provette, si veda la figura 21). Si notano:

- sovrapposizione degli andamenti delle curve, quindi la temperatura dell'acqua nel becher e nelle provette presenta lo stesso andamento della temperatura nel tempo;
- una zona piatta<sup>44</sup> iniziale indicata con 'A' e una rampa indicata con 'B'. La posizione della manopola dello Yellow Line è la D5046 (si veda il par. 4.2.5).

Alcune misurazioni sono state effettuate senza la termocoppia al centro del becher, per eliminare ogni possibile elemento aggiuntivo rispetto la situazione riprodotta, poi, negli esperimenti con le cellule in cui si monitorerà la temperatura dell'acqua del becher solo con la sonda dello Yellow Line, per il controllo retroattivo della temperatura, e la termocoppia collegata al termometro digitale. Si faccia riferimento alla figura 22.

---

<sup>43</sup>La temperatura è stata rilevata in più punti e con termocoppie differenti per sicurezza di acquisirne il valore corretto.

<sup>44</sup>Si veda il paragrafo 4.2.3.

## MAGNETO FLUIDO IPERtermia

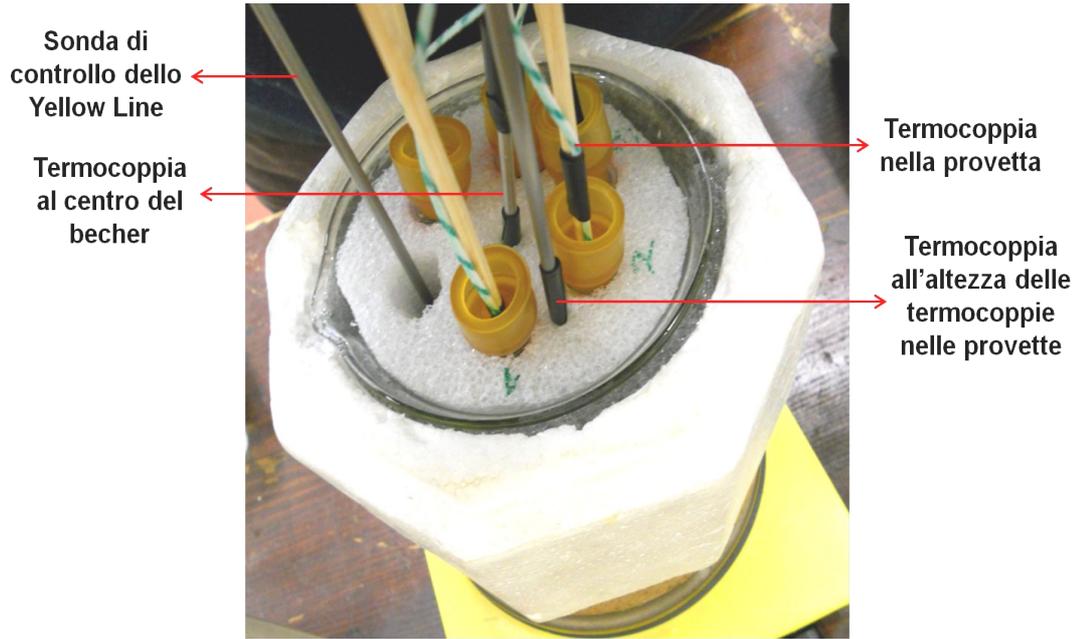


Figura 21: termocoppie di misura.

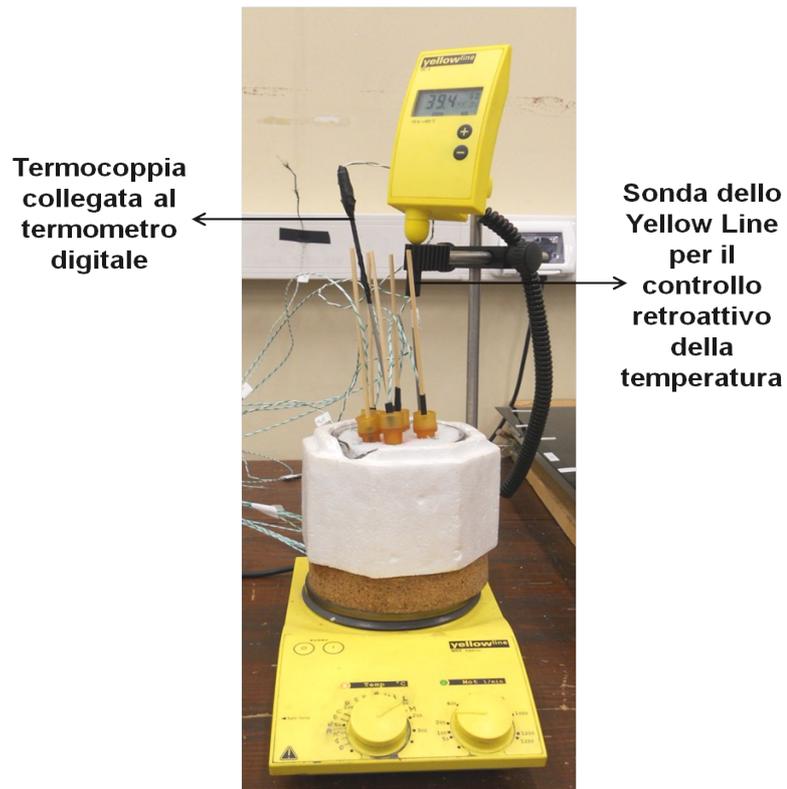


Figura 22: termocoppie.

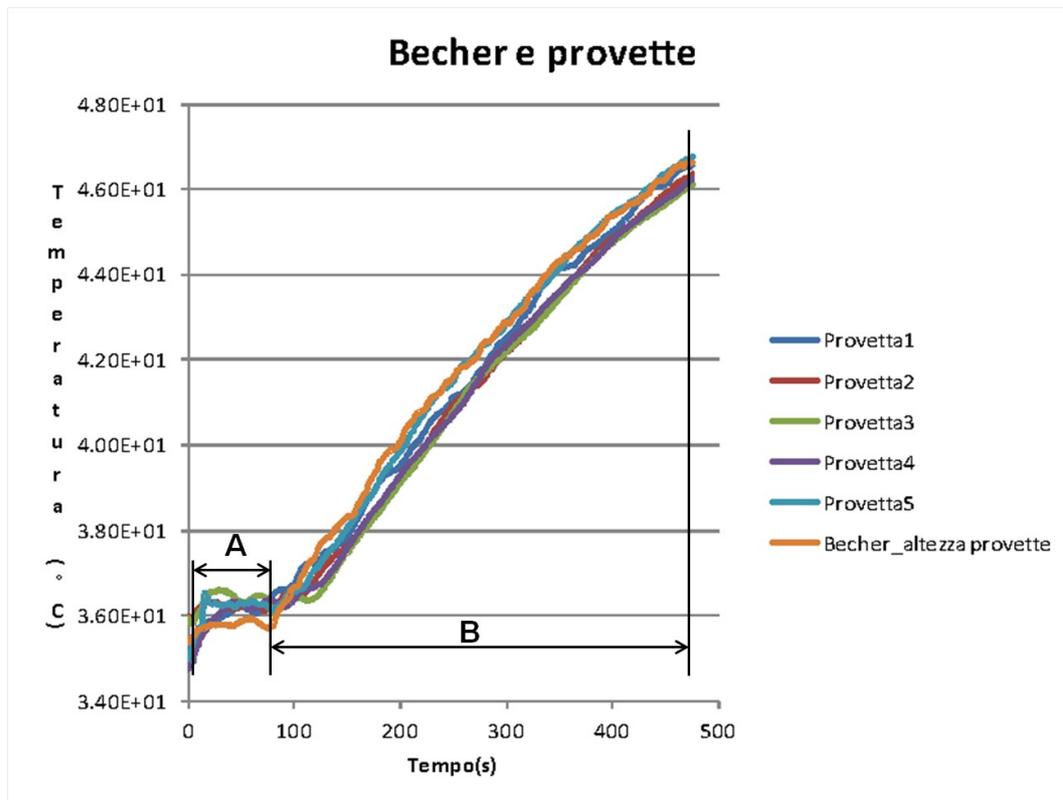


Figura 23: esempio di sovrapposizione degli andamenti della temperatura dell'acqua delle provette e del becher.

#### 4) Misura (punti 5,6,7 dello schema).

Al fine di esaminare l'andamento delle rampe fin dall'inizio dell'esperimento, come prima cosa si fa partire l'acquisizione delle temperature con il data logger e subito dopo si procede con l'accensione della piastra. Poi si procede con la scelta della tacca da valutare, impostando i valori di soglia 'massima' e soglia dell'esperimento'.

Osservando le misure di temperatura effettuate con diversi strumenti si è visto che indicavano valori diversi. In particolare si è visto che la sonda di temperatura dello Yellow Line forniva una misura della temperatura più alta di 2.5°C rispetto a quella misurata con le termocoppie connesse al data logger. Quindi, si è visto che la temperatura dell'acqua del becher raggiunge 45.4°C (temperatura misurata con il Data Logger) quando il monitor del riscaldatore segna 48°C.

### 4.2.3 Rielaborazione dei dati e valutazione dell'incertezza di misura

Per *rielaborare i dati* si è scelto di utilizzare il programma **Microsoft Excel 2010**.

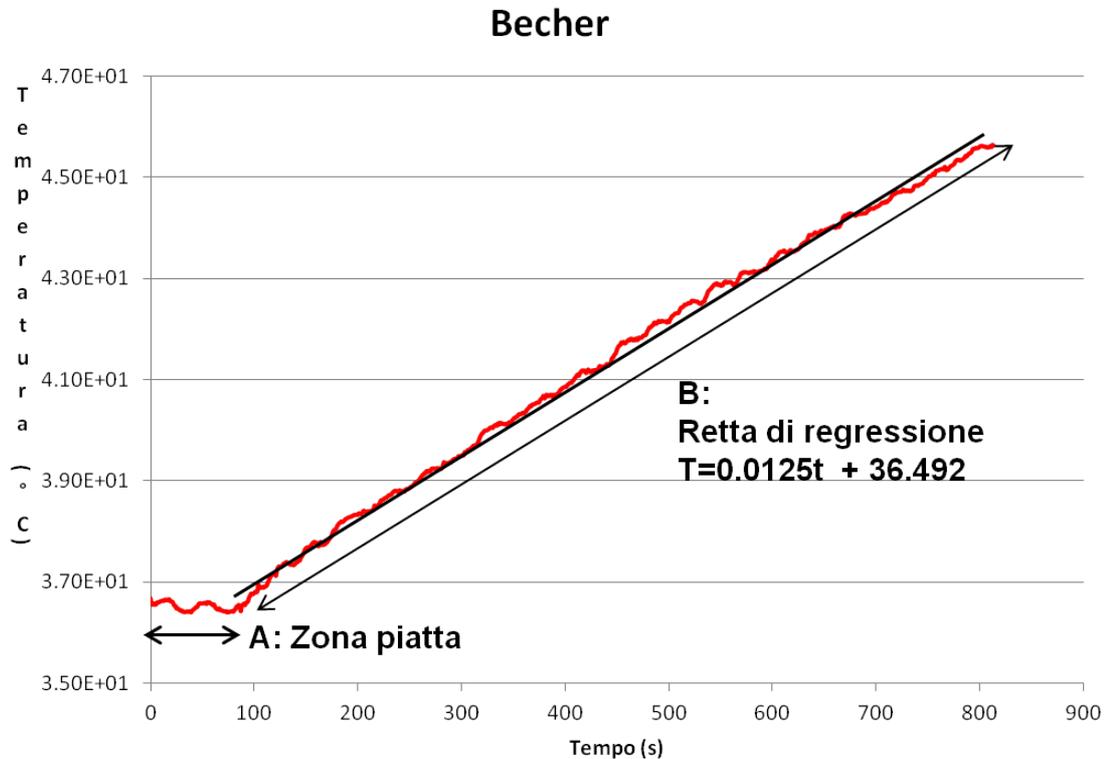


Figura 24: andamento della temperatura relativo ad un set di misura della tacca D.

In figura 24 è rappresentato l'andamento della temperatura relativo ad un set di misura della tacca D. I valori di temperatura sono rilevati dalla termocoppia (posta tra due provette consecutive) nel becher posizionata alla stessa altezza della termocoppia nella provetta. Saranno questi i valori utilizzati nella rielaborazione dei dati a seguito delle affermazioni riportate nel paragrafo 4.2.2<sup>45</sup>. Osservando il grafico in figura 24, la prima parte indicata con A presenta un andamento costante nel tempo, mentre la seconda è l'incremento di temperatura dell'acqua del becher che nell'intervallo considerato può essere ipotizzato lineare. Per questo motivo nel seguito si descrive il procedimento con cui è valutato il coefficiente angolare del segmento di retta B.

Il valore di incremento di temperatura, espresso in °C/min, è ricavabile dal coefficiente angolare 'm' del tratto di retta indicato con B in figura 25, moltiplicato per 60 (i secondi contenuti in 1 minuto). Il coefficiente che si ottiene rappresenta la rampa di temperatura relativa a ciascuna tacca:

$$\mathbf{Cr = coefficiente\ della\ rampa_i\ di\ temperatura = \text{°C/minuto} = m \cdot 60 \text{ °C/min} \quad (1)}$$

<sup>45</sup>Preparazione della misura.

dove  $m$  è la variazione di temperatura  $\Delta T$  in un intervallo di tempo  $\Delta t$ ,  $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ , con  $\Delta T$  intervallo di temperatura (in °C) e  $\Delta t$  intervallo di tempo (in secondi).

In pratica il coefficiente 'm' è calcolato applicando il metodo della regressione lineare<sup>46</sup> di Excel al segmento di dati indicato con B in figura 24. Quindi, per ogni ripetizione dell'esperimento è calcolato un coefficienti  $m_i$ ,  $i = 1, \dots, N_r$  con  $N_r$  numero totale delle ripetizioni. Infine dai valori dei coefficienti  $m_i$ ,  $i = 1, \dots, N_r$ , ottenuti per ciascuna ripetizione dell'esperimento con una determinata impostazione della piastra si è calcolata la media. Quindi il coefficiente utilizzato poi nell'esperimento è la media di più coefficienti  $m_i$  ottenuti ripetendo più volte (in giorni diversi) lo stesso esperimento. In sintesi, per ciascuna rampa di temperatura in corrispondenza di una tacca ed una data impostazione delle soglie di temperatura,  $m$  è valutato come la media di  $N_r$  ripetizioni.

Osservando la figura 24, il coefficiente  $m$  coincide con il valore 0.0125 °C/sec che moltiplicato per 60 fornisce il valore della rampa dell'esperimento, ovvero  $CR = 0.75^\circ C/min$ .

L'**incertezza di misura** del coefficiente  $m$  è stata calcolata utilizzando le stime di  $m$  ottenute dalle misure di temperatura nel tempo fornite dalla termocoppia nel becher, ad altezza provette, tra due provette consecutive. Il motivo di tale scelta è dato dal fatto che tali misure sono rappresentative della temperatura all'interno delle provette.

La deviazione standard delle misure è calcolata utilizzando la funzione di Excel

$$\text{DEV.ST.P}(\text{data}) \quad (2)$$

Tale funzione calcola la deviazione standard sull'intera popolazione, considerando i vari processi di misura come eventi indipendenti di un processo:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n} * \sum (m_k - m_{medio})^2} * 60 \text{ } ^\circ C/min \quad (3)$$

per  $k = 1, \dots, N_r$  e  $N_r =$  numero di misure (solitamente 4 per ogni tacca e ogni impostazione dello strumento). Tale valore è moltiplicato per 60 per la commensurabilità con il valore di  $CR$  derivato da (1).

<sup>46</sup>Dati  $n$  punti  $(x_i, y_i)$ ,  $i=1, \dots, n$ , la *retta di regressione* è la retta di equazione

$$y = mx + q$$

che minimizza la *somma dei quadrati degli scarti*, cioè per la quale è minima la quantità (che è funzione di  $m$  e  $q$ )

$$S(m, q) = \sum_{i=1}^n (mx_i + q - y_i)^2$$

('La retta di regressione', Michele Impedovo)

La stima delle rampe di temperatura fornita per ogni tacca è, quindi, espressa nella forma:

$$\text{TACCA X: } C_R \pm 2\sigma \text{ (}^\circ\text{C/min)} \quad (4)$$

### Media e fascia d'incertezza per la tacca I

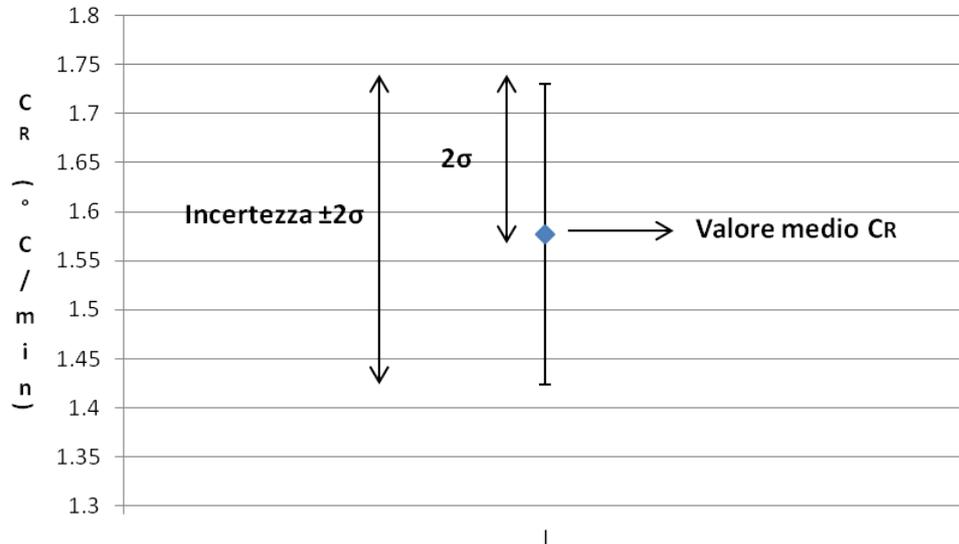


Figura 25: esempio relativo alla tacca I: valore medio e fascia d'incertezza.

In figura 25 è riportato un esempio relativamente alla tacca I: è presente il valore medio relativo alla rampa di temperatura effettuabile con tale tacca (1.577°C/min) e la sua fascia d'incertezza ( $\pm 0.153$  °C/min).

Si noti che alcune sorgenti possibili di incertezza di questo processo sono:

- la differenza di quantità d'acqua nel becher tra una misura e l'altra;
- la non perfetta adesione dei tappi in gomma su tutte le provette e la conseguente dispersione di calore;
- la temperatura dell'ambiente (solitamente 18-20°C).

#### 4.2.4 Processo di conoscenza dello strumento

Nel paragrafo seguente, si vuole mettere in evidenza come è stato possibile definire il funzionamento della piastra in esame per giungere alla modalità di acquisizione finale e all'obiettivo preposto: poter avere un dispositivo con cui eseguire il riscaldamento delle cellule in modo controllato.

Tale obiettivo è stato raggiunto mediante l'esecuzione di alcune tipologie di misura.

### 1ª TIPOLOGIA DI MISURE

**Obiettivo:** calcolo del coefficiente  $C_R$  della rampa di temperatura per ogni tacca esaminata (0,1,A',B',C,D), in corrispondenza di un aumento della temperatura dell'acqua nel becher di 10°C (da 20°C a 30°C e da 35°C a 45°C).

**Condizioni sperimentali:**

- temperatura iniziale dell'acqua nel becher pari a quella dell'ambiente.

**Strumenti:**

- becher privo di provette;
- cronometro;
- multimetro.

**Grandezze rilevate:**

- temperatura iniziale della piastra (prima della misurazione);
- temperatura finale della piastra (dopo la misurazione);
- temperatura iniziale dell'acqua nel becher;
- temperatura finale dell'acqua nel becher;
- durata della rampa.

**Risultati:**

**1) Aumento di temperatura da 20°C a 30°C:**

le prime misure effettuate sono state necessarie per individuare la tacca di accensione della piastra. Escluse le 0,1 e A' (comparsa sullo schermo digitale di 'Er 5', presumibilmente errore di accensione), la tacca A è stata individuata come tacca di accensione dello strumento. I set di misura successivi hanno valutato le rampe delle tacche A, B', C, D e sono stati ripetuti quattro volte.

**2) Aumento di temperatura da 35°C a 45°C:**

questa tipologia di rampa ha dimostrato che le tacche A e B erano insufficienti per garantire il corretto funzionamento della piastra (frequente spegnimento di questa). Le misure sono state effettuate, pertanto, sulle sole tacche C e D.

Entrambi gli esperimenti sono stati eseguiti senza controllare la temperatura iniziale della piastra. I risultati hanno dimostrato quanto questa, invece, influisse sulle misurazioni. Infatti si è vista una variazione delle stime del coefficiente della rampa di temperatura di una tacca al variare della temperatura iniziale della piastra. Il risultato di queste misure è stato, quindi, la conferma sperimentale dell'influenza della temperatura iniziale della piastra. Le successive misure sono, quindi, state effettuate portando sempre la piastra a

temperatura ambiente. Questo è stato possibile utilizzando una pentola con acqua fredda posta sulla piastra calda, cambiata più volte per velocizzare il raffreddamento della piastra.

Un'altra osservazione importante riguarda il calcolo del valore del coefficiente  $C_R$  delle rampe di temperatura. In questa tipologia di misure, avendo a disposizione solo il cronometro e il multimetro, il valore del coefficiente  $m$  non è stato calcolato tramite la retta di regressione fornita da Excel come indicato nel paragrafo 4.2.3, ma nel seguente modo:

$$m = \frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{T_2 - T_1}{t_2 - t_1} \quad (5)$$

dove

$T_1$  = valore di temperatura iniziale dell'acqua del becher;

$T_2$  = valore di temperatura finale dell'acqua del becher;

$t_1$  = valore del tempo all'inizio della rampa;

$t_2$  = valore del tempo alla conclusione della rampa.

Questo sarà il metodo utilizzato anche nelle misure della velocità di riscaldamento nell'esperimento con le cellule.

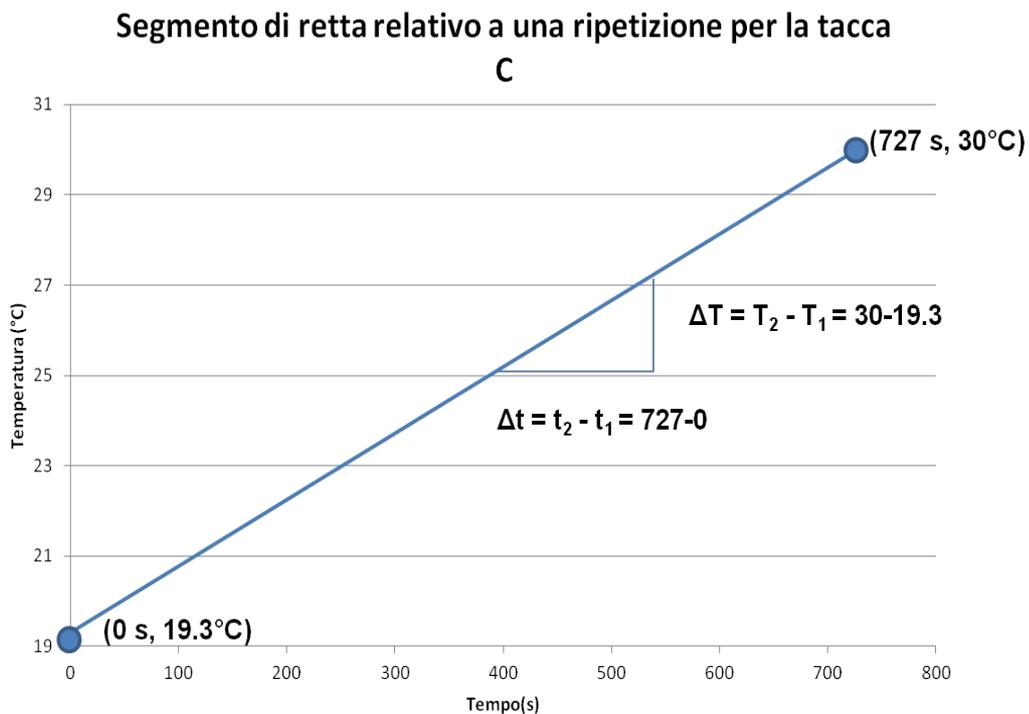


Figura 26: esempio relativo ad una misura fatta posizionando la manopola dello Yellow Line sulla tacca C.

In figura 26 è riportato un esempio relativo ad una misura fatta impostando la manopola dello Yellow Line sulla tacca C. Si nota che il coefficiente m è calcolato come coefficiente angolare di un segmento di retta **identificato dai due punti estremi**. Quindi:

$$C_R = \text{coefficiente della rampa di temperatura} = m \cdot 60 = \frac{\Delta T}{\Delta t} * 60 =$$

$$\frac{T_2 - T_1}{t_2 - t_1} * 60 = \frac{30 - 19.3}{727 - 0} * 60 = 0.883 \text{ } ^\circ\text{C/min}$$

Di seguito si riportano le tabelle con i valori dei coefficienti delle rampe calcolati con la modalità appena descritta. In particolare, in tabella 5 sono presenti i valori relativi all'aumento di temperatura dell'acqua del becher da 20°C a 30°C, mentre nella tabella 6 quelli riferiti all'intervallo 35°C-45°C.

Tabella 5: valori relativi all'aumento di temperatura dell'acqua del becher da 20°C a 30°C.

TACCA	$C_R \pm 2\sigma$ (°C/min)
A	0.201 ± 0.013
B'	0.337 ± 0.106
C	0.825 ± 0.04
D	1.18 ± 0.072

Tabella 6: valori relativi all'aumento di temperatura dell'acqua del becher da 35°C a 45°C.

TACCA	$C_R \pm 2\sigma$ (°C/min)
C	0.594 ± 0.025
D	1.1 ± 0.109

## 2ª TIPOLOGIA DI MISURE

**Obiettivo:** calcolo del coefficiente  $C_R$  della rampa di temperatura riferibile a ogni tacca esaminata (C, D, E, F), in corrispondenza di un aumento di temperatura dell'acqua nel becher da temperatura ambiente a 50°C (temperatura indicata dalla sonda dello Yellow Line).

**Condizioni sperimentali:**

- soglia di temperatura massima: 50°C;
- soglia di temperatura dell'esperimento: 49°C (piastra staccata a 48°C);
- temperatura iniziale dell'acqua nel becher pari alla temperatura ambientale;
- piastra a temperatura ambiente (circa 20°C).

**Strumenti:**

- becher senza provette, ma con coperchio in polistirolo;
- termocoppia posta tra la piastra e il becher;
- BenchLink Data Logger;
- termometro digitale.

**Grandezze rilevate:**

Andamento della temperatura:

- dell'acqua del becher;
- della piastra (tramite una termocoppia posizionata tra la piastra e il becher);
- dell'ambiente circostante (condizioni al contorno).

**Risultati:**

Per le tacche B e C sono state escluse perchè il display dello Yellow Line indicava un errore di funzionamento (Er 5). Sono stati, quindi, rielaborati i dati delle tacche D, E, F, ottenuti ripetendo le misure quattro volte (per le tacche E e F) o cinque volte (per la tacca D).

Nelle tabelle 7 e 8 sono riportati i valori medi del coefficiente angolare 'm' e dell'intercetta 'q' relativi alla retta di regressione lineare dei dati elaborati e di  $Cr \pm 2\sigma$ . In particolare, la tabella 7 si riferisce ai dati relativi all'aumento di temperatura 35°C-45°C, mentre la tabella 8 ai dati relativi all'aumento di temperatura tra 20°C e 50°C.

*Tabella 7: dati relativi all'aumento di temperatura 35°C-45°C.*

TACCA	M	Q	$Cr \pm 2\sigma$ (°C/min)
D	0.0061	36.719	$0.368 \pm 0.018$
E	0.009	36.657	$0.537 \pm 0.022$
F	0.0117	36.49	$0.704 \pm 0.031$

Tabella 8: dati relativi all'aumento di temperatura 20°C-50°C.

TACCA	$C_R \pm 2\sigma$ (°C/min)
D	$0.437 \pm 0.026$
E	$0.596 \pm 0.033$
F	$0.774 \pm 0.026$

I coefficienti  $C_R$  ottenuti per i due intervalli di temperatura considerati (tabelle 7 e 8) sono confrontabili.

### 3ª TIPOLOGIA DI MISURE

**Obiettivo:** calcolo del coefficiente  $C_R$  della rampa di temperatura riferibile alle tacche D, E, F, G, H, I, in corrispondenza di un aumento di temperatura dell'acqua nel becher da 36,5°C (temperatura dell'acqua a inizio esperimento) a 45,4°C .

#### **Condizioni sperimentali:**

- soglia di temperatura massima: 50°C;
- soglia di temperatura dell'esperimento: 49°C (piastra staccata a 48°C);
- piastra a temperatura ambiente (circa 20°C).

#### **Strumenti:**

- becher con provette;
- termocoppia posta tra la piastra e il becher;
- BenchLink Data Logger;
- termometro digitale.

#### **Grandezze rilevate:**

Andamento della temperatura:

- dell'acqua nel becher;
- della piastra (tramite una termocoppia posizionata tra la piastra e il becher);
- dell'ambiente circostante (condizioni al contorno).

**Risultati:***Tabella 9: valori medi dei coefficienti delle rampe di temperatura e incertezza.*

TACCA	$C_R \pm 2\sigma$ (°C/min)
D	$0.382 \pm 0.027$
E	$0.506 \pm 0.034$
F	$0.623 \pm 0.05$
G	$0.846 \pm 0.033$
H	$1.011 \pm 0.05$

In tabella 9 sono riportati i valori medi dei coefficienti delle rampe di temperatura e la loro deviazione standard.

**4<sup>a</sup> TIPOLOGIA DI MISURE**

Sono state effettuate delle prove singole, identiche alla 3<sup>a</sup> tipologia per condizioni sperimentali, per grandezze rilevate e per l'obbiettivo, ma variando l'oggetto posto tra il becher e la piastra. Lo scopo è stato capire quanto un corpo interposto tra il becher e la piastra possa variare le misure. Come tacche di riferimento, sono state esaminate la H e la I. In particolare sono stati utilizzati i seguenti materiali: lastra di vetro, cartone intagliato (con buco per il becher), pannolino termico in lana di vetro, anch'esso intagliato.

**Risultati:**

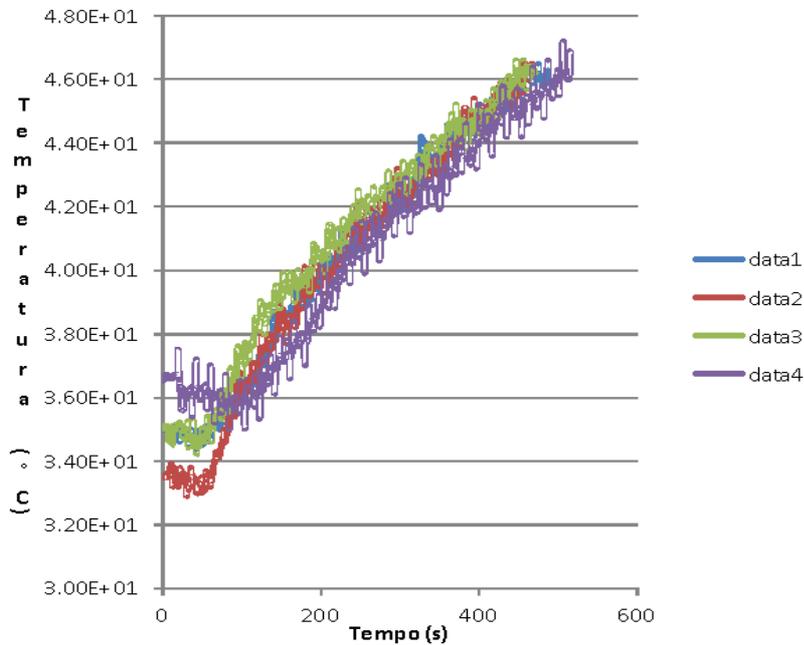
Nella tabella 10 sono riportati i risultati relativi alle medie dei coefficienti delle rampe di temperatura calcolati tramite la suddetta tipologia sperimentale, al variare dei materiali utilizzati:

*Tabella 10: medie dei coefficienti delle rampe di temperatura al variare dei materiali utilizzati.*

ELEMENTO	TACCA	$C_R$ (°C/min)
Termocoppia	H	1.000
Senza termocoppia	H	1.338
Lastra di vetro	H	0.378
Cartone intagliato (con buco per il becher)	H	0.534
Pannolino termico-in lana di vetro- intagliato (con buco per il becher)	I	0.594

Da tali esperimenti si sono evidenziate alcune osservazioni:

**1) Variazione della temperatura con lo Yellow Line impostato sulla tacca H, senza termocoppia posta tra la piastra e il becher:**



*Figura 27: andamento della temperatura della tacca H, senza termocoppia tra la piastra e il becher.*

Osservazioni relative alla figura 27, riguardo la zona iniziale e le rampe:

- si nota una zona iniziale costante o con pendenza negativa, probabilmente dovuta:
  - agli scambi termici tra becher (caldo, tra i 33°C e i 36°C) e piastra (a temperatura ambiente, all'incirca 20°C) che dura circa 50 s per data 1 e 3 ( $T_{iniz\_becher} = 35^{\circ}\text{C}$ ) e data 2 ( $T_{inizi\_becher} = 33,5^{\circ}\text{C}$ ) e 90 s per data 4 ( $T_{iniz\_becher}=36.5^{\circ}\text{C}$ );
  - al ritardo dell'inizio della rampa rispetto l'avvio dell'acquisizione dei dati, dovuta al fatto che la registrazione viene avviata prima dell'accensione della piastra.

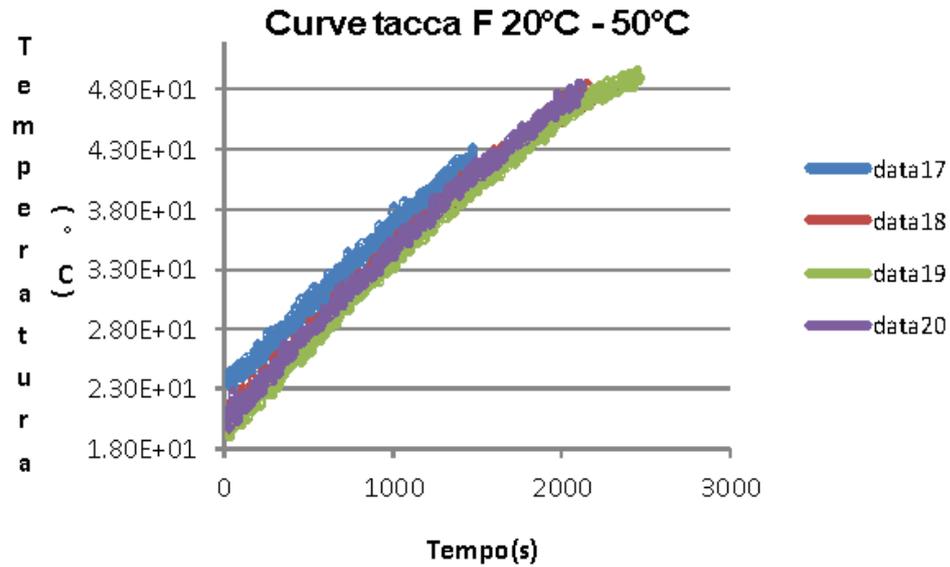


Figura 28: esempio di andamento della temperatura nel tempo della tacca F.

Il grafico in figura 28, relativo alla 2<sup>a</sup> tipologia di misure, rappresenta l'andamento della temperatura nel tempo in riferimento alla tacca F. La temperatura dell'acqua nel becher subisce un aumento da temperatura ambiente a 50°C. Il grafico conferma che la fase iniziale sopra riportata dipende dagli scambi termici tra becher e piastra: qui, infatti, piastra e becher hanno all'incirca la medesima temperatura iniziale (20°C) e, non essendoci alcuno scambio termico dovuto a una differenza di temperatura tra le due superfici a contatto (fondo del becher e piastra), ne consegue che non vi sia alcuna zona costante o a pendenza negativa iniziale.

- Le rampe successive a tale zona piatta hanno la medesima pendenza. Il calcolo della retta di regressione relativo a ogni curva ha fornito, infatti, il medesimo coefficiente della rampa di temperatura ( $0.774 \pm 0.026$  °C/min).

2) Andamento della temperatura con lo Yellow Line impostato sulla tacca H, con termocoppia posta tra la piastra e il becher

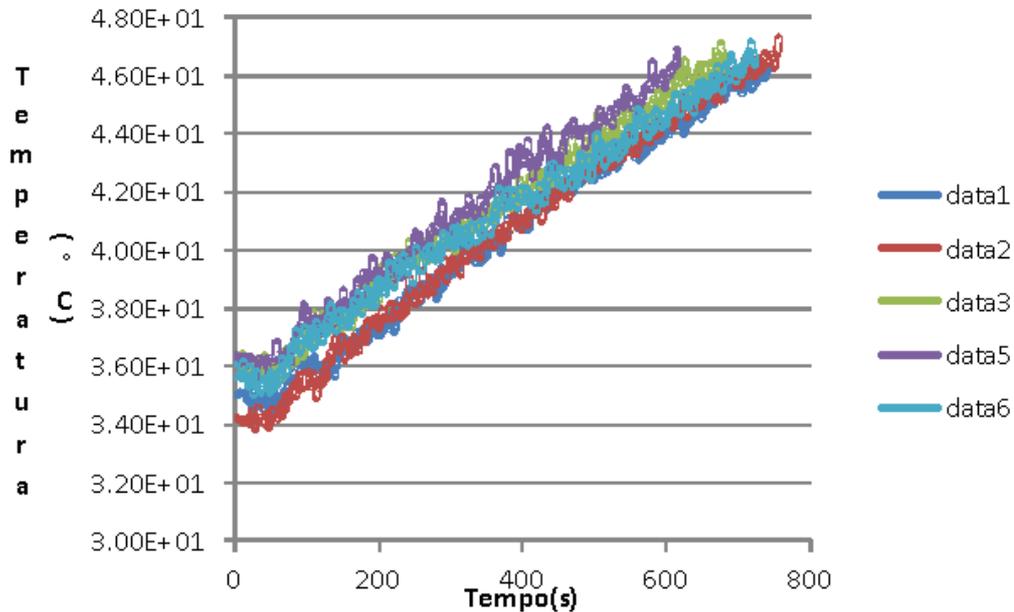


Figura 29: andamento della temperatura della tacca H, con termocoppia tra la piastra e il becher.

Osservazioni relative alla figura 29, raffigurante l'andamento della temperatura dell'acqua del becher nel tempo in acquisizioni distinte:

- si nota che la zona iniziale (costante o in pendenza probabilmente negativa) dovuta agli scambi termici tra becher (caldo, tra i 34°C e i 36°C) e piastra (a temperatura ambiente, all'incirca 20°C) è meno marcata (probabilmente a causa dello strato isolante millimetrico d'aria tra la piastra e il becher, per la presenza della termocoppia posizionata in corrispondenza del centro della piastra stessa).
- le rampe successive a tale zona iniziale hanno la medesima pendenza. Il calcolo della retta di regressione relativo a ogni curva ha fornito, infatti, il medesimo coefficiente della rampa di temperatura ( $1.011 \pm 0.05$  °C/min).

#### CONCLUSIONI:

- E' presente una **differenza di pendenza della rampa** (e quindi un differente valore del coefficiente  $C_R$ ) tra le misure effettuate con la termocoppia e senza.
- E' importante effettuare le misure con **T\_iniz\_becher a 36,5°C-37°C** (temperatura cui saranno le cellule) perchè l'andamento della fase iniziale (sia relativamente alla durata, e soprattutto alla pendenza) differisce a seconda della temperatura iniziale

dell'acqua del becher. Le rampe di temperatura presentano, invece, la *stessa* pendenza ovvero il medesimo coefficiente  $C_R$  calcolato a partire dalla retta di regressione di ogni curva.

Si veda, ad esempio, la figura 28 a conferma di queste due osservazioni.

Data la variabilità sulla valutazione delle rampe per la presenza della termocoppia sotto il becher, si è scelto di effettuare tutti gli esperimenti successivi appoggiando il becher direttamente sulla piastra (tipologia 'Senza termocoppia' della Tabella 10). Si è, inoltre scelto di analizzare la sola rampa, indipendentemente dalla variabile zona piastra. Tipicamente l'inizio della rampa coincide con una temperatura sul monitor dello Yellow Line maggiore di 39°C.

#### 5ª TIPOLOGIA DI MISURE

**Obiettivo:** calcolo del coefficiente della rampa di temperatura riferibile alle tacche D, E, F, G, H, I, L, M, in corrispondenza di un aumento di temperatura dell'acqua nel becher da 36,5°C (temperatura dell'acqua a inizio esperimento) a 45,4°C .

**Condizioni sperimentali:**

- soglia di temperatura massima: 50°C;
- soglia di temperatura dell'esperimento: 49°C (piastra staccata a 48°C);
- piastra a temperatura ambiente (circa 20°C);

**Strumenti:**

- becher con provette;
- BenchLink Data Logger;
- termometro digitale.

**Grandezze rilevate:**

Andamento della temperatura:

- dell'acqua nel becher;
- della piastra (tramite una termocoppia posizionata tra la piastra e il becher);
- dell'ambiente circostante (condizioni al contorno).

**Risultati:**

Prove ripetute e una selezione delle rilevazioni attendibili hanno portato ai valori dei coefficienti  $C_R$  delle rampe di temperatura riportati in tabella 11.

Tabella 11: valori dei coefficienti  $C_R$  delle rampe di temperatura.

TACCA	$C_R \pm 2\sigma$ ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )
D	$0.745 \pm 0.142$
E	$0.931 \pm 0.051$
F	$1.006 \pm 0.269$
G	$1.2 \pm 0.3$
H	$1.491 \pm 0.21$
I	$1.577 \pm 0.153$
L	$1.511 \pm 0.24$
M	$1.456 \pm 0.352$

**6ª TIPOLOGIA DI MISURE**

**Obiettivo:** ricerca delle rampe di temperatura  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $2.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (utilizzando la formula (1)) variando, oltre alla posizione della manopola dello Yellow Line, anche i valori di soglia di temperatura massima e dell'esperimento considerando una variazione della temperatura dell'acqua nel becher da  $36,5^{\circ}\text{C}$  (temperatura dell'acqua a inizio esperimento) a  $45,4^{\circ}\text{C}$ .

**Condizioni sperimentali:**

- soglia di temperatura massima: variabile;
- soglia di temperatura dell'esperimento: variabile;
- piastra a temperatura ambiente (circa  $20^{\circ}\text{C}$ );

**Strumenti:**

- becher con provette;
- BenchLink Data Logger;
- termometro digitale.

**Grandezze rilevate:**

Andamento della temperatura:

- dell'acqua nel becher;
- della piastra (tramite una termocoppia posizionata tra la piastra e il becher);
- dell'ambiente circostante (condizioni al contorno).

**Risultati:**

In questo esperimento si è osservato che la pendenza della rampa dipende effettivamente dalle condizioni impostate sul regolatore di temperatura dello strumento. In particolare, differenti scelte di soglia di temperatura massima e dell'esperimento producono diverse rampe di temperatura, in corrispondenza della stessa tacca.

*Tabella 12: valori di  $C_R$  impostando diversi valori di soglia.*

TACCA	SOGLIA_MAX	SOGLIA_ESP	$C_R \pm 2\sigma$ (°C/min)
D	50°C	46°C	$0.619 \pm 0.112$
I	82°C	80°C	$2.295 \pm 0.332$
M	82°C	80°C	$2.728 \pm 0.346$
M	85°C	85°C	$2.995 \pm 0.342$

In tabella 12 sono riportati alcuni risultati. Si vede che impostando diversi valori di soglia per la tacca M si trovano diversi valori per il coefficiente angolare  $m_e$ , di conseguenza, per il coefficiente  $C_R$  della rampa.

**4.2.5 Tacche definitive**

In figura 30 sono riportati i valori medi del coefficiente  $C_R$  trovato per le diverse tacche o impostazioni del regolatore di temperatura in funzione della tacca. Inoltre, sono riportati gli intervalli individuati dalla deviazione standard (indicati con sup e inf).

# MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA

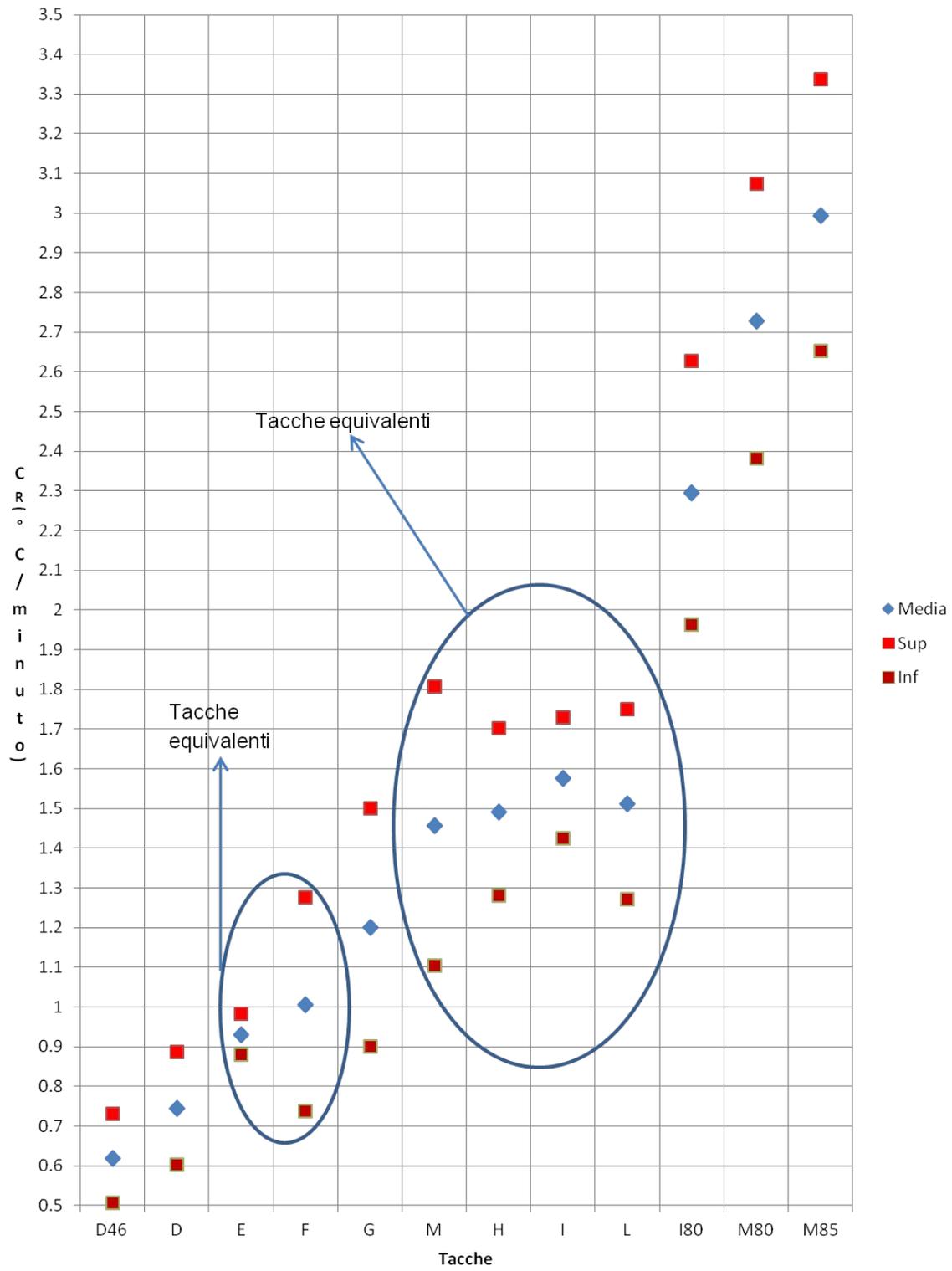


Figura 30: valori medi del coefficiente  $C_R$  trovato per le diverse tacche.

#### 4.2.6 Tacche scelte

Osservando la figura 30, sono state esaminate quelle tacche che fornivano un valore medio  $C_R$  comparabile a una configurazione diversa dello strumento. In particolare, le tacche E ed F (insieme 1) presentano un valore medio di  $C_R$  confrontabile, così come le tacche M, H, I ,L (insieme 2). Per ogni insieme di tacche con medie comparabili ne è stata scelta una da utilizzare nella seconda fase sperimentale (ipertermia applicata alle cellule). La scelta è ricaduta su quella tacca che presentava una minor variabilità nel range di misura.

In figura 31 sono presenti il valore medio di  $C_R$  e la deviazione standard delle tacche scelte a seguito della suddetta selezione.

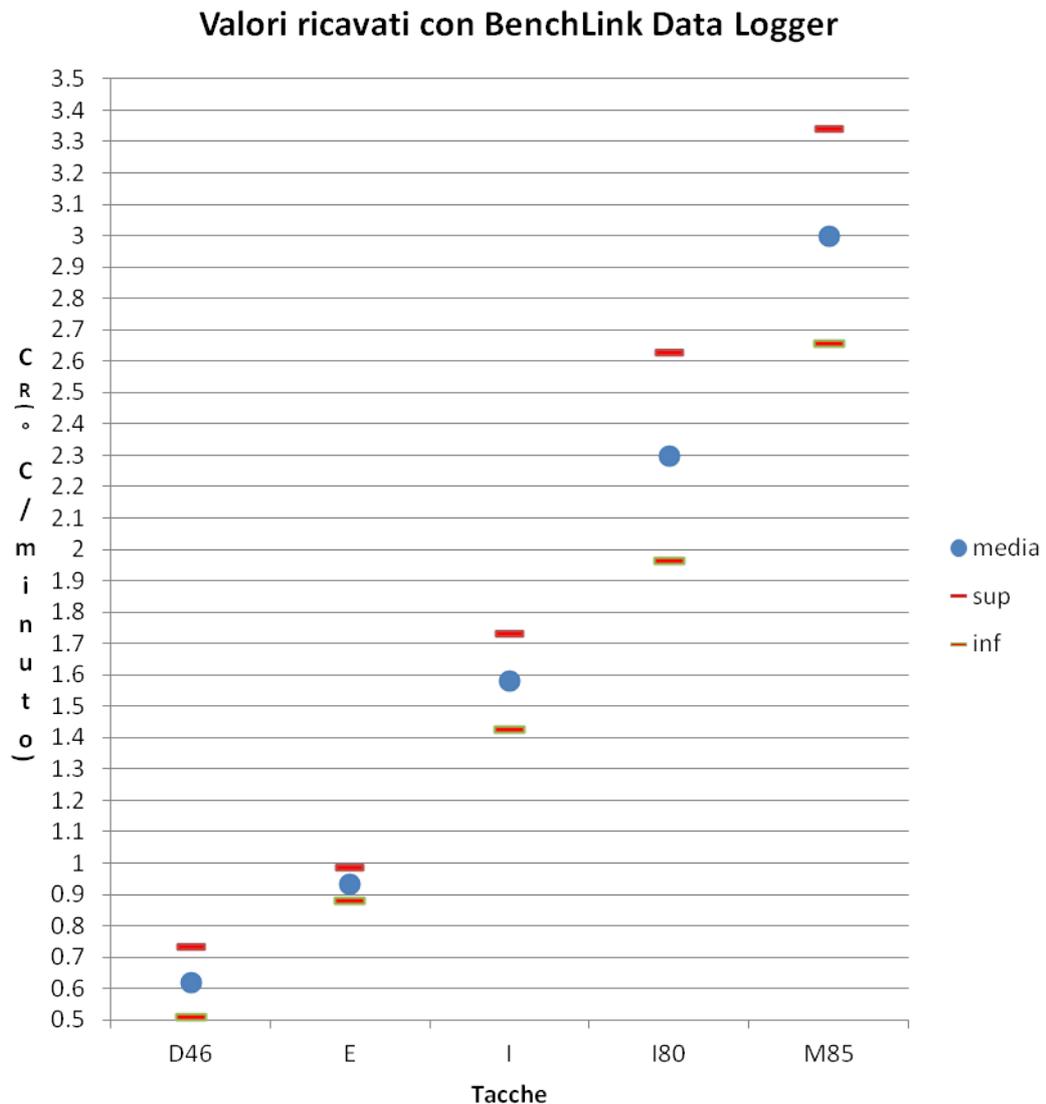


Figura 31: valore medio di  $C_R$  e deviazione standard delle tacche scelte.

Per le configurazioni dello Yellow Line scelte sono state effettuate ulteriori prove ripetute a conferma dei range forniti. La dispersione di tali valori è osservabile nelle seguenti figure:

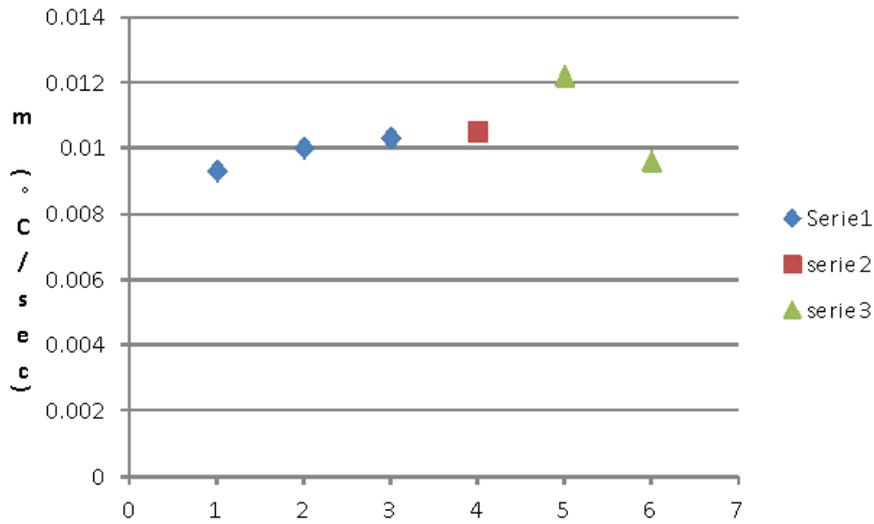


Figura 32: posizione D46 ( $0.619 \pm 0.112^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ).

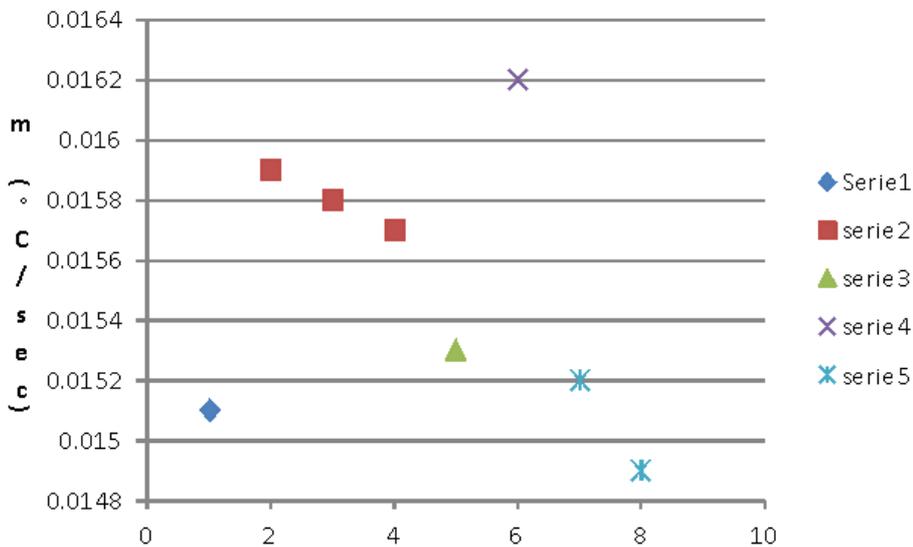


Figura 33: posizione E ( $0.931 \pm 0.051^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ).

Osservando le figura 32 e 33, che riportano i valori di misura delle posizioni D46 ed E, si nota che i valori relativi alle misure di temperatura per le tacche esaminate sono contenuti

in una fascia limitata. Questo si riflette, infatti, in una minore incertezza quantificata mediante il parametro  $2\sigma$  in figura 31.

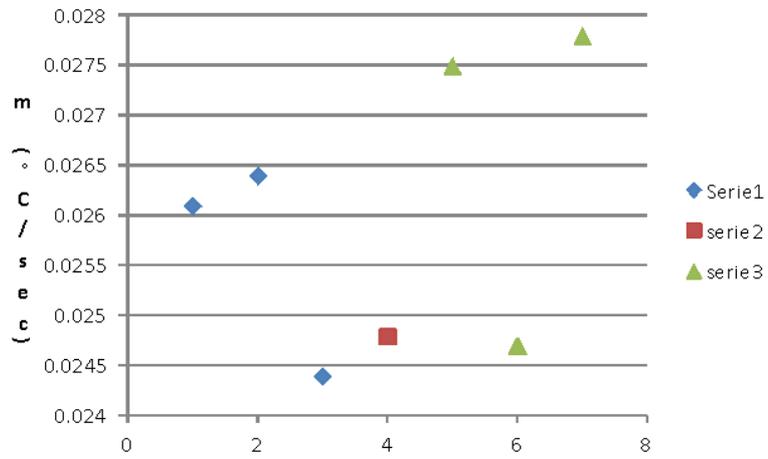


Figura 34: posizione I ( $1.577 \pm 0.153 \text{ }^\circ\text{C/min}$ ).

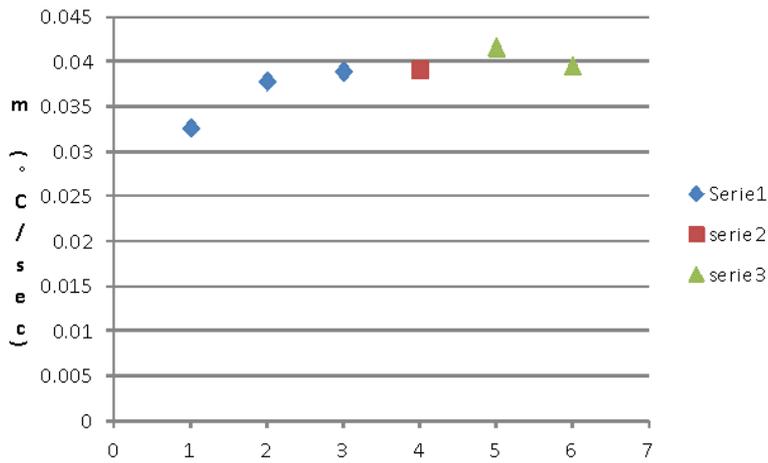


Figura 35: posizione I80 ( $2.295 \pm 0.332 \text{ }^\circ\text{C/min}$ ).

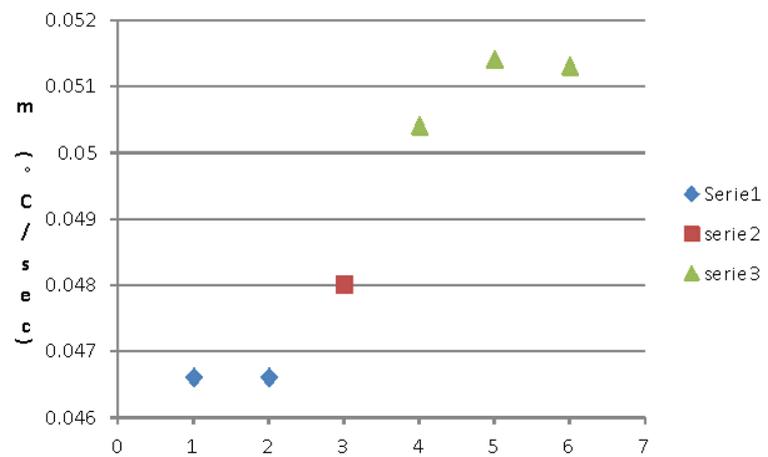


Figura 36: posizione M85 ( $2.995 \pm 0.342 \text{ }^\circ\text{C/min}$ ).

Osservando le figure 34, 35 e 36, che riportano la dispersione dei valori misurati per le tacche I, I80 e M85, si nota una dispersione maggiore dei valori misurati rispetto alle due tacche precedentemente analizzate.

#### 4.2.7 Prove con i terreni di coltura

Poichè le cellule saranno sospese in un terreno di coltura (RPMI<sup>47</sup>), le prove presentate nei paragrafi precedenti sono state ripetute sostituendo all'acqua delle provette il terreno di coltura al fine di confermare i risultati presentati nel paragrafo 4.2.6. I terreni testati sono:

- DMEM<sup>48</sup>, comparabile all'RPMI;
- HAM<sup>49</sup>.

Le prove sono svolte con le stesse modalità esposte, dipendentemente dalla tacca esaminata, con l'unico accorgimento di riempire una provetta con acqua da frigorifero (il controllo<sup>50</sup>), due provette con terreno DMEM e altre due con HAM. Queste venivano, poi, tutte portate a 37°C immergendole in acqua a 37°C. La provetta contenente acqua (alla stessa temperatura iniziale del terreno di coltura) è servita anche a verificare il raggiungimento della temperatura di partenza dell'esperimento (37°C).

In figura 37 è rappresentato l'andamento della temperatura nel tempo relativo alle provette con terreni di coltura, relativamente alla tacca E. Esso segue esattamente quello della provetta di controllo (con acqua) e, quindi, i risultati esposti nel paragrafo 4.2.6 possono essere considerati attendibili anche per la fase di sperimentazione con le cellule (capitolo 5).

---

<sup>47</sup>Terreno composto da terreno di base RPMI1640, 5.0 ml Penicillin(10,000 U)-Streptomycin(10 mg)-L-Glutamine(200 mM) solution (Sigma G-1146), 5.0 ml of Sodium Pyruvate (100 mM, Sigma S-8636), 5.0 ml of 1 M HEPES (pH 7.0), 0.5 ml of 2-Mercaptoethanol solution (50 mM), 50 ml of heat inactivated Fetal Calf Serum (HyClone SH30070.03, heat inactivate for 40 min at 56 degrees Celsius) (<http://www.celldeath.de/apometh/rpmi.html>)

<sup>48</sup>Dulbecco's Modified Eagle Medium, contenente 2 mM L-glutamina, 0.6% glucosio, sodio bicarbonato 0,1%, Hepes 5mM, 9.6 ng/ml putrescina, 6.3 ng/ml progesterone, 5.2 ng/ml sodio selenite, 0.025 mg/ml insulina, 2 µg/ml eparina, 4mg/ml albumina bovina (BSA) e i fattori di crescita FGF-2 (10 ng/ml; Peprotech,) e EGF (20 ng/ml; Peprotech) terreno basale. (<http://dSPACE-unipr.cilea.it/bitstream/1889/792/3/Materiali%20e%20Metodi.pdf.pdf>)

<sup>49</sup>Terreno composto da terreno di base Ham F-10, 20% di siero fetale bovino, gentamicina, L-Glutamina (<http://www.masciabrunelli.it/masciabrunelli/upload/file/Schede/84R11-821-HAMSF10MIX.PDF>)

<sup>50</sup>Infatti anche il terreno di coltura era conservato in frigo.

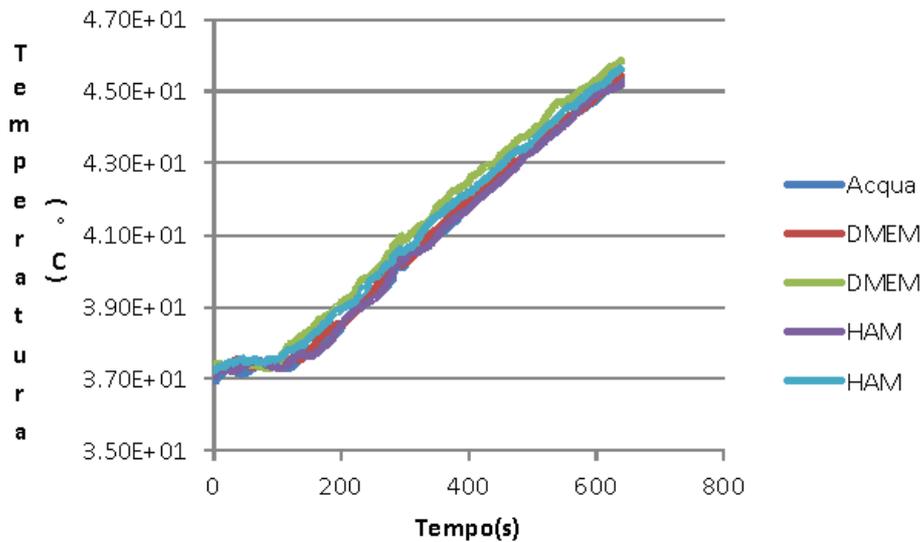


Figura 37: andamento della temperatura nel tempo relativo alle provette con terreni di coltura, relativamente alla tacca E.

#### 4.2.8 Misurazioni effettuate con il cronometro

Poichè nella fase di sperimentazione successiva non sarebbe stato possibile l'utilizzo del BenchLink Data Logger, si è scelto di effettuare delle misure della rampa utilizzando in contemporanea anche il cronometro, già usato nelle prime tipologie di sperimentazione.

In particolare, si avviava il cronometro in coincidenza dell'inizio della rampa di temperatura, ovvero nel momento in cui sul monitor dell'agitatore riscaldante non si osservava più una stasi o in decremento dei °C misurati, ma piuttosto un crescere più o meno rapido (dipendentemente dalla tacca scelta). Tipicamente, come accennato in precedenza, l'avvio del cronometro coincideva con una temperatura sul monitor maggiore di 39°C.

Lo stop è stato fissato al raggiungimento della temperatura massima o di mantenimento desiderata, tenendo conto che la sonda di temperatura dello Yellow Line forniva una misura della temperatura più alta di 2.5°C rispetto a quella misurata con le termocoppie connesse al data logger (paragrafo 3.2.2). Quindi, ad esempio, volendo una  $T_{max}$  pari a 45.4°C, lo stop era fissato in corrispondenza di un valore sul monitor dello Yellow Line pari a 48°C.

I dati sono stati rielaborati utilizzando la formula (5). I risultati forniti sono riportati in tabella 13 e sono stati ottenuti ripetendo le misure 3 volte (per le tacche D46 e I80) o 4 volte (per le altre tacche).

Tabella 13: valori del coefficiente della rampa  $C_R$  e della relativa deviazione standard.

TACCA	$C_R \pm 2\sigma$ ( $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ )
D46	$0.586 \pm 0.07$
E	$0.937 \pm 0.135$
I	$1.476 \pm 0.152$
I80	$2.432 \pm 0.086$
M85	$2.863 \pm 0.28$

In figura 38 sono graficati i risultati ottenuti con il cronometro (il nome della tacca è accompagnato dalla sigla cr), confrontati con quelli ottenuti con il data logger (il nome della tacca è accompagnato dalla sigla dl) e riportati anche in figura 31. In particolare, si nota che le medie di  $C_R$  ottenute con il cronometro o con il data logger sono confrontabili, eccetto la tacca I80.

## Confronto valori del cronometro vs Data Logger

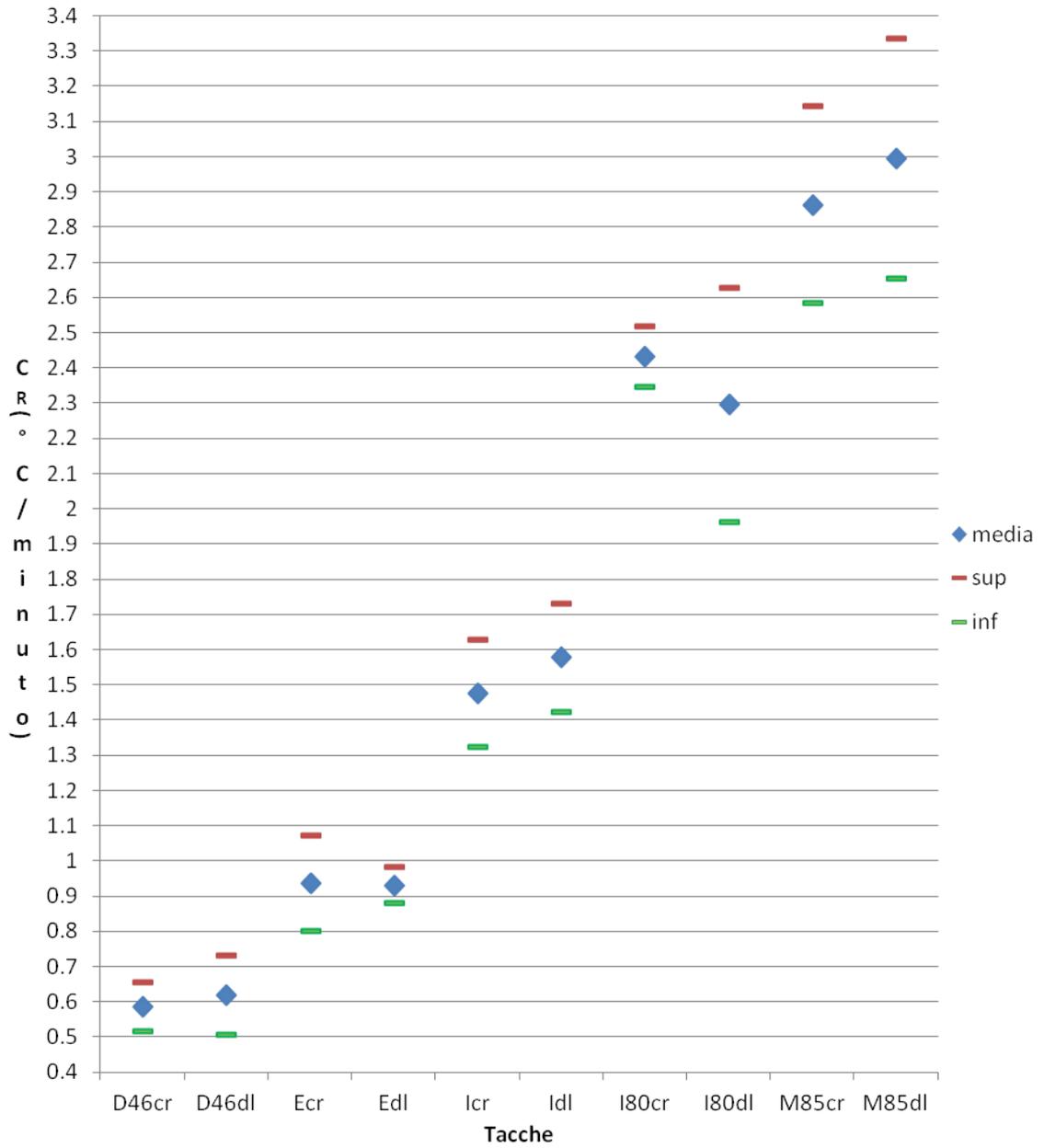


Figura 38: risultati ottenuti con il cronometro e con il data logger.



## 5 IPERTERMIA APPLICATA A COLTURE CELLULARI

### 5.1 OBIETTIVO

L'obiettivo di questa seconda fase sperimentale è lo studio di alcuni fenomeni indotti dal calore su colture cellulari, in termini di mortalità/vitalità delle cellule trattate, valutando l'effetto di:

- diverse rampe di temperatura, in particolare tra 37°C e la temperatura massima raggiunta (T\_max);
- differenti valori della T\_max raggiunta (denominata anche temperatura di mantenimento T\_m);
- diverse durate del riscaldamento a T\_m costante.

Questo esperimento è stato utilizzato al fine di individuare la rampa più efficace per il trattamento ipertermico cui sottoporre le colture di cellule tumorali per indurle la morte.

### 5.2 MATERIALI E METODI

#### 1) Cellule MCF-7

La linea cellulare MCF-7 (ottenuta dall'American Type Culture Collection (ATCC), Canada) corrisponde ad una linea cellulare umana di tumore alla mammella avente tempo di duplicazione di circa 36 ore. Queste cellule vengono mantenute in coltura con terreno RPMI-1640 addizionato di antibiotici (penicillina/streptomina) e del 10% di siero fetale bovino scomplementato, cioè mantenuto per mezz'ora a 57°C, allo scopo di denaturare le proteine del complemento<sup>51</sup>. Le cellule crescono in adesione in monostrato e le colture sono allestite in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> e mantenute in fase logaritmica a 37 °C in stufa termostatica a flusso continuo di aria arricchita con il 5% di CO<sub>2</sub> e fortemente umidificata (Figura 18). Per l'allestimento delle subcolture e per il conteggio delle popolazioni cellulari, i monostrati vengono staccati a 37°C con tripsina 0.25% cui segue la neutralizzazione dell'enzima con terreno addizionato di siero al 10%.

#### 2) Gli **strumenti** utilizzati nell'esperimento sono:

- un RISCALDATORE (YELLOW LINE MST BASIC) con BECHER da 600 ml contenente ~452 g di acqua e 5 provette in vetro. Due provette contenevano 4 ml di acqua a 37°C, mentre le altre tre contenevano le cellule sospese in terreno di

---

<sup>51</sup>Elementi essenziali del sistema immunitario umorale contro gli agenti infettivi. ([http://it.wikipedia.org/wiki/Sistema\\_del\\_complemento](http://it.wikipedia.org/wiki/Sistema_del_complemento))

coltura RPMI-1640, sempre a 37°C. Il sistema del riscaldatore con il becher è stato posto su una PEDANA BASCULANTE impostata a 40 rpm (figura 39);

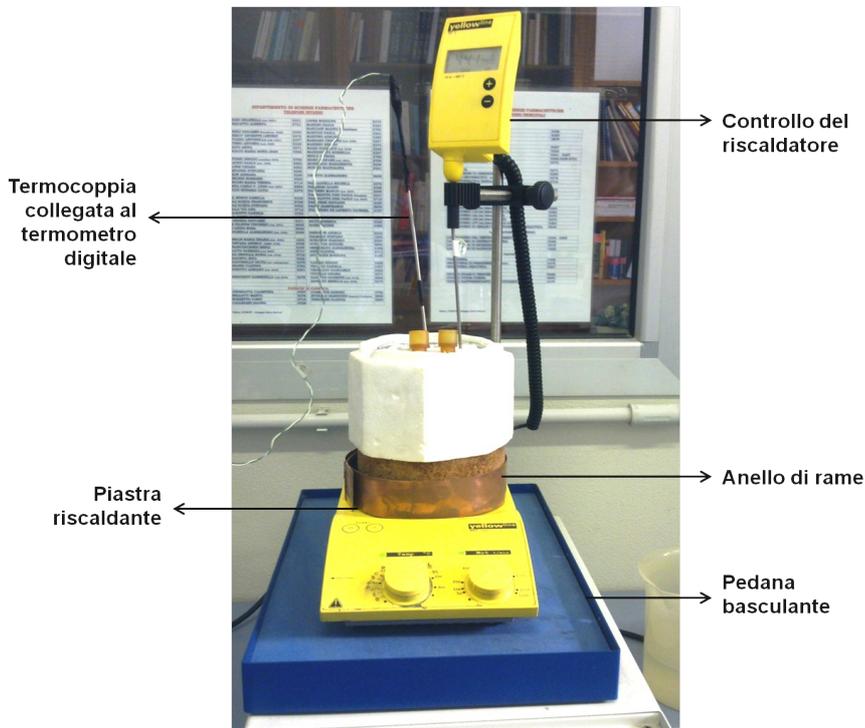


Figura 39: sistema di Yellow Line, becher e pedana basculante.

- Un TERMOMETRO DIGITALE (Kane-May, si faccia riferimento alla Figura 17 del capitolo 4) con termocoppia di tipo K;
- un BAGNO TERMOSTATICO<sup>52</sup> (Figura 40<sup>53</sup>) GTR 190 Thermoregulation.



Figura 40: bagno termostatico [nota 53].

<sup>52</sup>I **bagni termostatici** sono costituiti da vasche in acciaio inox contenenti acqua termostata nella quale vengono immersi recipienti da riscaldare. ([http://www.chimica-online.it/download/bagni\\_termostatici.htm](http://www.chimica-online.it/download/bagni_termostatici.htm))

<sup>53</sup>[[http://img.medicaexpo.it/images\\_me/photo-g/bagno-d-acqua-termostatico-controllato-per-laboratorio-68257-129149.jpg](http://img.medicaexpo.it/images_me/photo-g/bagno-d-acqua-termostatico-controllato-per-laboratorio-68257-129149.jpg)]

3) I metodi di indagine utilizzati per valutare gli effetti del calore sulle cellule sono:

- **Test del Blu di Tripano (esclusione del colorante vitale) o del Trypan Blue:**

questo test si basa sulla capacità delle cellule “vitali” (che non hanno danno a livello della membrana citoplasmatica) di non permettere la penetrazione attraverso la loro membrana di alcuni coloranti, che, proprio per questo motivo, vengono detti vitali<sup>54</sup>. Per questo motivo le cellule con membrana danneggiata risultano colorate. Il campione del Blu di Tripano è stato impiegato per valutare la citotossicità dell'ipertermia: 100 µL di sospensione cellulare derivante dagli esperimenti con l'ipertermia sono incubati per 2 minuti in presenza di blu di tripano. Le cellule vitali si identificano in base alla loro capacità di escludere il colorante che, invece, è in grado di permeare e di colorare le cellule “non vitali”. Mediante microscopio e la camera di Burker<sup>55</sup> è possibile valutare le cellule vitali e non vitali nel seguente modo:

- si prelevano 15 µl di sospensione cellulare incubata con Trypan Blue e si iniettano nella camera di Burker. Per capillarità la sospensione si distribuisce nello schema della camera. Di questo, verranno considerati 5 dei 9 quadranti disponibili (figura 42, in nero).

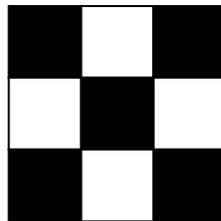


Figura 42: schema della camera di Burker.

<sup>54</sup> [Durkin *et al.*, 1979]

<sup>55</sup>Il reticolo della camera di Burker è strutturato in nove quadrati più grandi delimitati da tre righe parallele con all'interno quadrati e rettangoli delimitati da due righe parallele. Tale reticolo è utilizzato per la conta delle cellule. ([http://www.selfpediatrico.it/il\\_reticolo\\_della\\_camera\\_di\\_burker.html](http://www.selfpediatrico.it/il_reticolo_della_camera_di_burker.html))

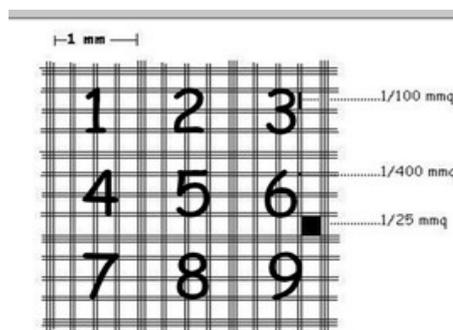


Figura 41

## MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA

- In ogni quadrante della camera di Burker si conteggiano le cellule trasparenti (ovvero intatte e quindi non colorate di blu) e quelle blu (quindi presentanti danno alla membrana). Successivamente:
  - ✓ si calcola il totale di cellule presenti nel quadrante = n° cellule trasparenti + n° cellule blu;
  - ✓ si imposta la proporzione:

$$\text{n° cellule\_blu} : \text{n° cellule\_totali} = x : 100 \quad (6)$$

dove x è un valore percentuale indice della mortalità delle cellule considerate nella conta, ovvero è un dato medio ottenuto considerando i 5 quadranti selezionati in figura 42.

Il valore 1-x è indice della vitalità (da qui il fatto che il Trypan Blue è un test che indica la vitalità cellulare).

Riguardo il test del Trypan Blue sono necessarie alcune osservazioni:

- la sospensione cellulare non deve presentare dei cluster: le cellule devono essere omogeneamente sospese nel mezzo di coltura per garantire la correttezza del conteggio;
- la persona addetta al conteggio deve essere sempre la stessa, per non variare la sensibilità della conta. Il test si basa, infatti, su un'indagine di tipo visivo ed è, quindi, soggetto a variabilità individuale.

- **Test della crescita clonale:**

Le cellule MCF-7 (in numero di circa  $2 \cdot 10^2$  cellule) derivanti dagli esperimenti di ipertermia vengono seminate in doppio in piastre Petri da 5 cm di diametro in 4 ml di terreno di coltura e incubate per 10 giorni a 37 °C in atmosfera controllata al 5% di CO<sub>2</sub>. Le colonie formatesi vengono poi colorate con violetto di genziana e contate, scartando quelle con meno di 50 cellule. A questo punto si può calcolare l'efficienza della crescita clonale, intesa come rapporto tra il numero di colonie formatesi (n° colonie\_trattato) e il numero di colonie presenti nelle Petri di controllo (n° colonie\_controllo), derivate dalla semina delle cellule contenute nelle provette non trattate. Si imposterà, quindi, la seguente proporzione:

$$\text{n° colonie\_trattato} : \text{n° colonie\_controllo} = x : 100 \quad (7)$$

I risultati vengono espressi in termini di frazione sopravvivate, cioè in base al rapporto tra il numero delle colonie dei campioni trattati mediante ipertermia e quello delle colonie dei campioni di controllo.

Alcuni accorgimenti riguardo il test della crescita clonale sono:

- l'utilizzo di una penna contacolonia per segnare sulle Petri le cellule già considerate nel conteggio;
- la persona addetta al conteggio deve essere sempre la stessa, per non variare la sensibilità della conta. Il test si basa, infatti, su un'indagine di tipo visivo ed è, quindi, soggetto a variabilità individuale.

### 5.3 FASI SPERIMENTALI

#### 1) Preparazione delle provette

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti con una concentrazione di  $5 \cdot 10^5$  cellule/ml per ciascuna provetta. Per ogni esperimento venivano preparate 4 provette: una di controllo, mantenuta nell'incubatore a  $37^\circ\text{C}$  (stufa termostatica), e altre 3 che venivano sottoposte ad ipertermia.

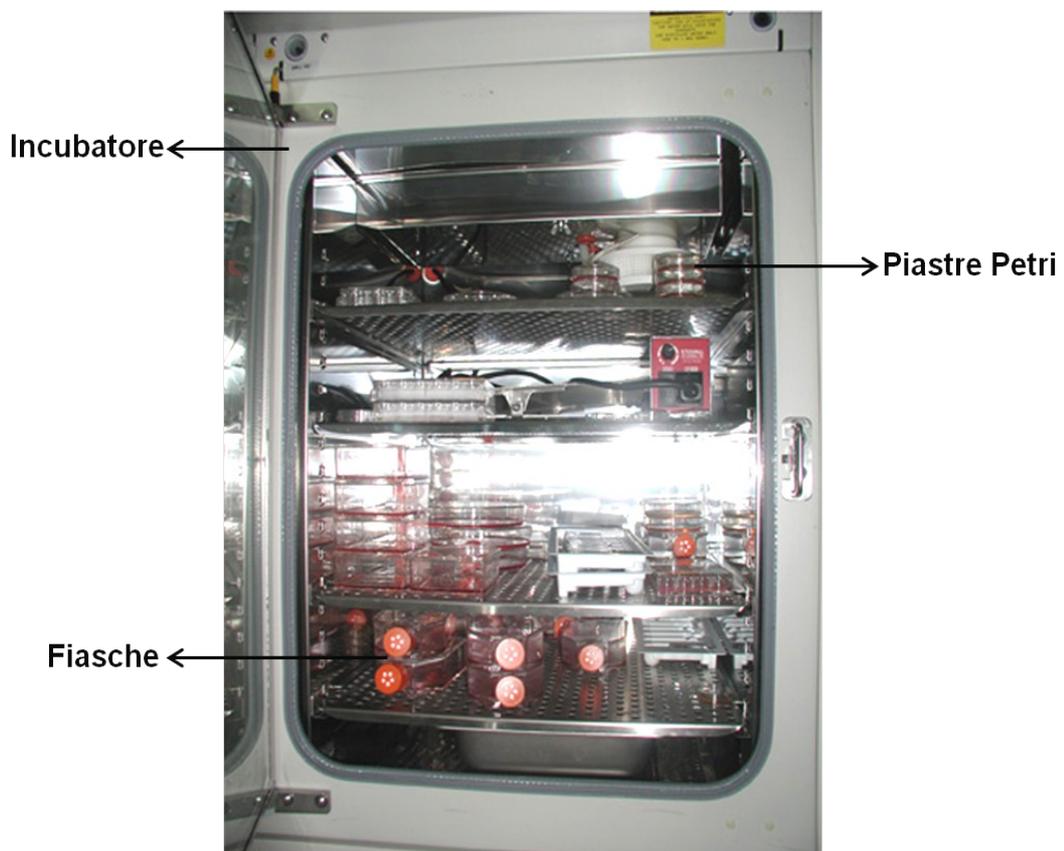


Figura 43: incubatore [<http://www.crib.unina.it/JPGschede/ilab0402.jpg>].

## 2) Trattamento di ipertermia

Nel momento in cui l'acqua nel becher e delle due provette di controllo raggiungeva i 37°C, le tre provette contenenti le colture cellulari venivano prelevate dall'incubatore (in cui venivano poste per circa 30 minuti dopo la loro preparazione) e sottoposte alla rampa di temperatura scelta per quell'esperimento. In particolare, il processo di riscaldamento con ciascuna delle rampe di temperatura considerate è stato ripetuto due volte. Gli esperimenti eseguiti sono riportati nella tabella 14.

*Tabella 14: rampe di temperatura considerate*

<b>Velocità di riscaldamento (°C/min)</b>	<b>Intervallo di temperatura (T_iniziale-T_max)</b>	<b>Test n°</b>
0.5°C/min	37°-43°C	1
3°C/min	37°-43°C	2
0.5°C/min	37°-46°C	3
1.5°C/min	37°-46°C	4
3°C/min	37°-46°C	5

Le modalità per la realizzazione della rampa di temperatura sono quelle esposte nel Capitolo 4. Operativamente si monitoravano i valori forniti dal termometro digitale e dal monitor del riscaldatore per l'avvio e l'arresto della rampa per verificare che non vi fossero scostamenti significativi nella velocità di riscaldamento ottenuta rispetto a quanto visto in precedenza (paragrafo 4.2.8). Si valutava il tempo trascorso a partire da circa 39°C fino al termine della rampa. In questo modo era possibile avere una stima della rampa impostata. In ogni caso le rampe effettive sono risultate comparabili a quelle precedentemente studiate.

## 3) Immersione nel bagno termostatico

Terminata la rampa di temperatura, ovvero raggiunta la temperatura massima dell'esperimento, le provette contenenti le colture cellulari venivano poste in un bagno termostatico impostato a T\_max (la temperatura dell'acqua interna era portata a 43°C o 46°C a seconda dell'esperimento). L'immersione delle provette durava 15 minuti (provetta 1), 30 minuti (provetta 2) o 60 minuti (provetta 3). Allo scadere del tempo dell'immersione a temperatura costante, il contenuto di ogni provetta veniva sottoposta al test del Trypan Blue ogni 0, 1, 3, 6 ore e venivano preparati i campioni per la crescita clonale.

## 5.4 PARAMETRI DELL'ESPERIMENTO

I parametri variabili dell'esperimento esposto nel precedente paragrafo sono i seguenti:

### 1) VELOCITÀ DI RISCALDAMENTO

Sono state scelte tre rampe di temperatura **Cr**:

1. 0.5°C/min;
2. 1.5°C/min;
3. 3°C/min.

### 2) TEMPERATURA MASSIMA RAGGIUNTA ( $T_{max}$ )

Le temperature di mantenimento sono due:

1. 43°C;
2. 46°C.

### 3) DURATA DEL BAGNO TERMICO ( $t_{mantenimento}$ , ovvero tempo di mantenimento)

Si sono provate tre diverse durate di mantenimento delle provette a temperatura costante:

1. 15 minuti (provetta 1);
2. 30 minuti (provetta 2);
3. 60 minuti (provetta 3).

In particolare sono stati analizzati i test riportati in tabella 14.

## 5.5 RISULTATI

Nel seguente paragrafo verranno esposti i risultati ottenuti in questa fase sperimentale, distinguendo i risultati riguardanti il Trypan Blue da quelli relativi alle crescite clonali. Il nome delle rampe sarà quello seguito nella reale successione ed esecuzione degli esperimenti in giorni distinti. Si potrà quindi notare, ad esempio, che la ripetizione della rampa 1 corrisponderà alla rampa eseguita nel giorno 9 (rampa 9).

Nei grafici e nelle tabelle di questo paragrafo si utilizza la seguente dicitura:

- provetta 1: provetta mantenuta a  $T_{max}$  per 15 minuti;
- provetta 2: provetta mantenuta a  $T_{max}$  per 30 minuti;

- provetta 3: provetta mantenuta a  $T_{max}$  per 1 ora.

### 5.5.1 Trypan Blue

I grafici riportati per ogni singolo caso sono quattro:

- due grafici, uno per ciascuna delle singole rampe (la prima prova e la prova ripetuta in un giorno differente). In ordinata sono riportati i tassi di mortalità cellulare in funzione del tempo (istanti  $t_i$ ). I valori  $t_i$  si riferiscono agli istanti in cui è stato eseguito il test del Trypan Blue:
  - $t_0$ : test eseguito appena si prelevano le provette dal bagno termico;
  - $t_1$ : test eseguito dopo 1 h;
  - $t_2$ : test eseguito dopo 3 h;
  - $t_3$ : test eseguito dopo 6 h.

Questi grafici servono per confrontare il comportamento delle colture cellulari nelle singole provette, in funzione del tempo, nei due esperimenti eseguiti.

I dati raccolti per ciascun esperimento di Trypan Blue sono stati riportati nelle tabelle 15-24. In esse si presentano i valori percentuali relativi alla mortalità delle cellule trattate in funzione delle provette analizzate e degli istanti in cui è stato effettuato il test del Trypan Blue ( $t_i$ ).

Tabella 15: percentuale di mortalità relativa alla rampa 1 ( $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $T_{max}=43^\circ\text{C}$ ).

Rampa 1	Controllo (%)	15min a $43^\circ\text{C}$ (%)	30min a $43^\circ\text{C}$ (%)	1h a $43^\circ\text{C}$ (%)
$t_0$	0.00	0.00	2.60	7.30
$t_1$	0.00	0.00	6.40	8.10
$t_2$	1.44	3.03	4.16	2.43
$t_3$	1.40	0.00	0.00	4

MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA

Tabella 16: percentuale di mortalità relativa alla rampa 2 (3°C/min, T<sub>max</sub>=43°C).

Rampa 2	Controllo (%)	15min a 43°C (%)	30min a 43°C (%)	1h a 43°C (%)
t <sub>0</sub>	0.00	5.50	4.30	7.50
t <sub>1</sub>	2	7.5	10	9.43
t <sub>2</sub>	2.38	0	0	0
t <sub>3</sub>	1.39	2.85	6.12	1.75

Tabella 17: percentuale di mortalità relativa alla rampa 3 (0.5°C/min, T<sub>max</sub>=46°C).

Rampa 3	Controllo (%)	15min a 46°C (%)	30min a 46°C (%)	1h a 46°C (%)
t <sub>0</sub>	5.60	16.00	15.80	14.00
t <sub>1</sub>	6.8	12	12.7	9.4
t <sub>2</sub>	3.5	8.9	8.8	25
t <sub>3</sub>	4	15.4	7.1	22

Tabella 18: percentuale di mortalità relativa alla rampa 4 (1.5°C/min, T<sub>max</sub>=46°C).

Rampa 4	Controllo (%)	15min a 46°C (%)	30min a 46°C (%)	1h a 46°C (%)
t <sub>0</sub>	3.4	12.70	7.56	8.80
t <sub>1</sub>	13.7	18.9	7.4	17.3
t <sub>2</sub>	2.32	6.55	7.05	35.52
t <sub>3</sub>	2.63	13.79	15.79	24.32

Tabella 19: percentuale di mortalità relativa alla rampa 5 (3°C/min, T<sub>max</sub>=46°C).

Rampa 5	Controllo (%)	15min a 46°C (%)	30min a 46°C (%)	1h a 46°C (%)
t <sub>0</sub>	3.5	7.50	10.00	12.50
t <sub>1</sub>	3.7	11	8	10
t <sub>2</sub>	3.2	12.6	9.4	9.3
t <sub>3</sub>	3.5	16	9.6	29.6

MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA

Tabella 20: percentuale di mortalità relativa alla rampa 6 (3°C/min, T<sub>max</sub>=46°C).

Rampa 6	Controllo (%)	15min a 46°C (%)	30min a 46°C (%)	1h a 46°C (%)
t <sub>0</sub>	2.16	6.56	2.63	1.75
t <sub>1</sub>	1.78	9.72	6.25	5.12
t <sub>2</sub>	2	10.44	4.69	6.06
t <sub>3</sub>	0	3	8.14	10.3

Tabella 21: percentuale di mortalità relativa alla rampa 7 (1.5°C/min, T<sub>max</sub>=46°C).

Rampa 7	Controllo (%)	15min a 46°C (%)	30min a 46°C (%)	1h a 46°C (%)
t <sub>0</sub>	6	6.50	7.50	8.30
t <sub>1</sub>	4.76	2.4	9.8	9.3
t <sub>2</sub>	4.3	7	5	18.75
t <sub>3</sub>	5.9	4.41	8.7	11.1

Tabella 22: percentuale di mortalità relativa alla rampa 8 (0.5°C/min, T<sub>max</sub>=46°C).

Rampa 8	Controllo (%)	15min a 46°C (%)	30min a 46°C (%)	1h a 46°C (%)
t <sub>0</sub>	3.9	2.90	8.80	12.90
t <sub>1</sub>	4.2	12.5	20	11.5
t <sub>2</sub>	4.1	12.66	12.5	9.5
t <sub>3</sub>	3.44	8	8.9	11.8

Tabella 23: percentuale di mortalità relativa alla rampa 9 (0.5°C/min, T<sub>max</sub>=43°C).

Rampa 9	Controllo (%)	15min a 43°C (%)	30min a 43°C (%)	1h a 43°C (%)
t <sub>0</sub>	3.85	7.40	5.54	4.80
t <sub>1</sub>	1.50	11.10	4.48	1.90
t <sub>2</sub>	0.00	12.50	6.45	4.87
t <sub>3</sub>	0.00	7.14	9.60	7.20

Tabella 24: percentuale di mortalità relativa alla rampa 10 (3°C/min, T<sub>max</sub>=43°C).

Rampa 10	Controllo (%)	15min a 43°C (%)	30min a 43°C (%)	1h a 43°C (%)
t <sub>0</sub>	6.55	10.56	8.57	5.40
t <sub>1</sub>	7.77	14.70	10.34	9.26
t <sub>2</sub>	10.64	18.18	24.00	8.33

- Gli altri due grafici riportati per ogni esperimento sono quelli relativi alla media e all'incertezza di misura. Queste sono calcolate a partire dai dati delle due singole rampe. I grafici sono di due tipologie:
  - uno riporta il tasso di mortalità delle provette in funzione dei diversi istanti t<sub>i</sub>;
  - l'altro grafico relativo alla rielaborazione dei dati e alla media e incertezza di misura riporta l'andamento del tasso di mortalità nel tempo, in base alla provetta analizzata (il controllo, o le tre provette distinte dalla durata del bagno termico). I risultati medi percentuali sono riportati nella tabella 31 del paragrafo 4.5.2.

I commenti relativi a queste due tipologie di grafici sono effettuati considerando le tre provette trattate escludendo, quindi, la provetta di controllo.

I dati relativi al test del Trypan Blue e riportati nelle tabelle 15-24 sono stati mediati in base alle coppie di rampe di temperatura aventi C<sub>R</sub> e T<sub>max</sub> corrispondenti. I risultati sono riportati nelle tabelle 25-29, in base alla classificazione seguita in tabella 14. Nelle tabelle 25-29 si presentano i valori percentuali medi (con deviazione standard) relativi alla mortalità delle cellule trattate in funzione delle provette analizzate e degli istanti in cui è stato effettuato il test del Trypan Blue (t<sub>i</sub>).

Tabella 25: percentuale di mortalità media relativa al test n°1 (0.5°C/min, T<sub>max</sub>=43°C).

Test n° 1	Controllo (%)	15min a 43°C (%)	30min a 43°C (%)	1h a 43°C (%)
t <sub>0</sub>	1.93±1.93	3.70±3.7	4.07±1.47	6.05±1.25
t <sub>1</sub>	0.75±0.75	5.55±5.55	5.44±0.96	5.00±3.2
t <sub>2</sub>	0.72±0.72	7.77±4.74	5.31±1.145	3.65±1.22
t <sub>3</sub>	0.70±0.7	3.57±3.57	4.80±4.8	5.60±1.6

MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA

Tabella 26: percentuale di mortalità media relativa al test n°2 (3°C/min, T<sub>max</sub>=43°C).

Test n° 2	Controllo (%)	15min a 43°C (%)	30min a 43°C (%)	1h a 43°C (%)
t <sub>0</sub>	3.28±3.28	8.03±2.53	6.44±2.14	6.45±1.05
t <sub>1</sub>	4.89±2.89	11.10±3.6	10.17±0.17	9.35±0.09
t <sub>2</sub>	6.51±4.13	9.09±9.09	12.00±12	4.17±4.17

Tabella 27: percentuale di mortalità media relativa al test n°3 (0.5°C/min, T<sub>max</sub>=46°C).

Test n° 3	Controllo (%)	15min a 46°C (%)	30min a 46°C (%)	1h a 46°C (%)
t <sub>0</sub>	4.75±0.85	9.45±6.55	12.30±3.5	13.45±0.55
t <sub>1</sub>	5.50±1.3	12.25±0.25	16.35±3.65	10.45±1.05
t <sub>2</sub>	3.80±0.3	10.78±1.88	10.65±1.85	17.25±7.75
t <sub>3</sub>	3.72±0.28	11.70±3.7	8.00±0.9	16.90±5.1

Tabella 28: percentuale di mortalità media relativa al test n°4 (1.5°C/min, T<sub>max</sub>=46°C).

Test n° 4	Controllo (%)	15min a 46°C (%)	30min a 46°C (%)	1h a 46°C (%)
t <sub>0</sub>	4.7±1.3	9.60±3.1	7.53±0.03	8.55±0.25
t <sub>1</sub>	9.23±4.47	10.65±8.25	8.60±1.2	13.30±4
t <sub>2</sub>	3.31±0.99	6.78±0.23	6.03±1.03	27.14±8.39
t <sub>3</sub>	4.27±1.64	9.10±4.69	12.25±3.55	17.71±6.61

Tabella 29: percentuale di mortalità media relativa al test n°5 (3°C/min, T<sub>max</sub>=46°C).

Test n° 5	Controllo (%)	15min a 46°C (%)	30min a 46°C (%)	1h a 46°C (%)
t <sub>0</sub>	2.83±0.67	7.03±0.47	6.34±3.69	7.13±5.38
t <sub>1</sub>	2.74±0.96	10.36±0.64	7.13±0.88	7.56±2.44
t <sub>2</sub>	2.6±0.6	11.52±1.08	7.05±2.36	7.68±1.62
t <sub>3</sub>	1.75±1.75	9.5±6.5	8.87±0.73	19.95±9.65

Si riportano, ora, i risultati ottenuti nei vari test di Trypan Blue, in riferimento alla tabella 14.

1) TEST n° 1

I parametri per il test n°1 sono:

- velocità di riscaldamento: 0.5°C/min;
- T\_max raggiunta: 43°C.

Rampa 1

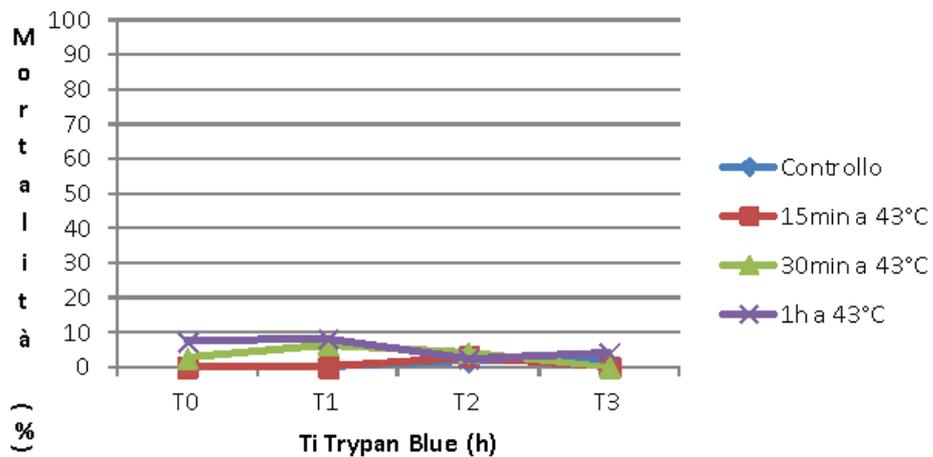


Figura 44: percentuale di mortalità media relativa alla rampa 1 (0.5°C/min, T\_max=43°C). Esperimento 1

Rampa 9

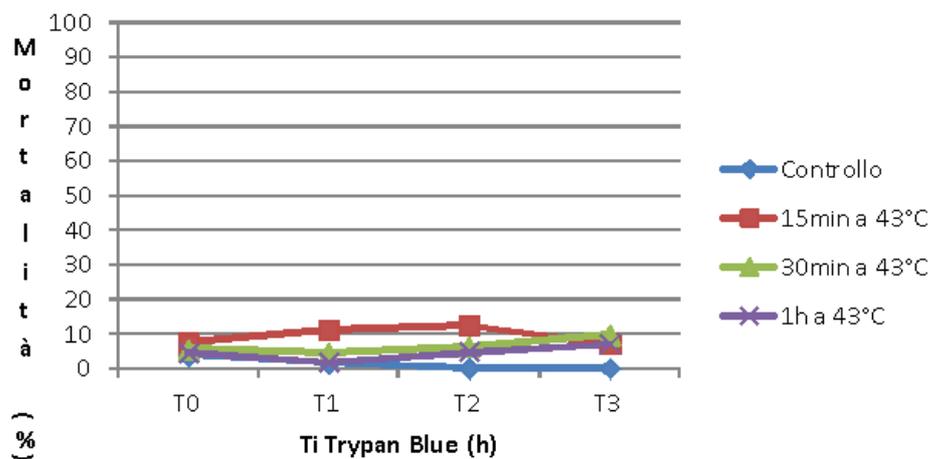


Figura 45: percentuale di mortalità media relativa alla rampa 9 (0.5°C/min, T\_max=43°C). Esperimento 2

I grafici in figura 44 e 45 rappresentano la percentuale di mortalità cellulare in funzione degli istanti di lettura  $t_i$  relativamente alle quattro provette analizzate (controllo, provette 1, 2, 3). Si può notare che il comportamento delle colture cellulari nelle singole provette in relazione al tempo varia da un esperimento all'altro. Ad esempio, la provetta 1 (15 min a 43°C) presenta un valore minimo dello 0% (istante di lettura  $t_0$ ) nella rampa 1, mentre nella rampa 9 il minimo della stessa provetta è a 7.14% (istante di lettura  $t_3$ ) (tabelle 15 e 23).

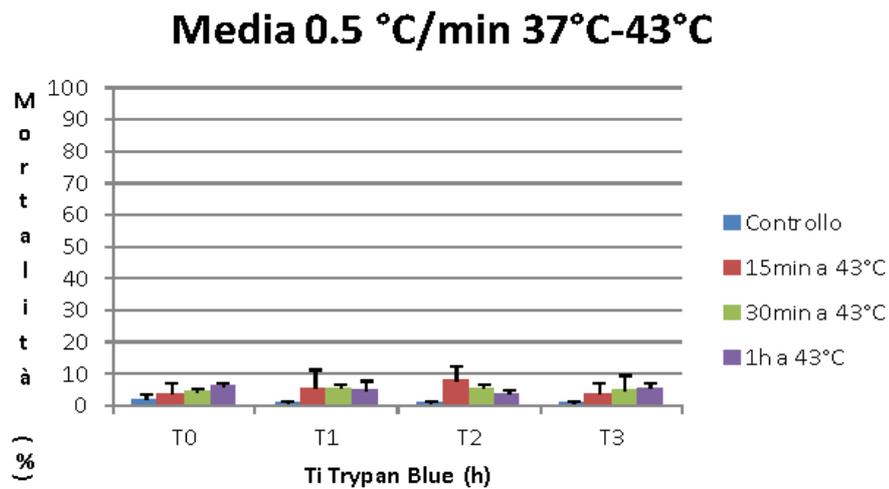
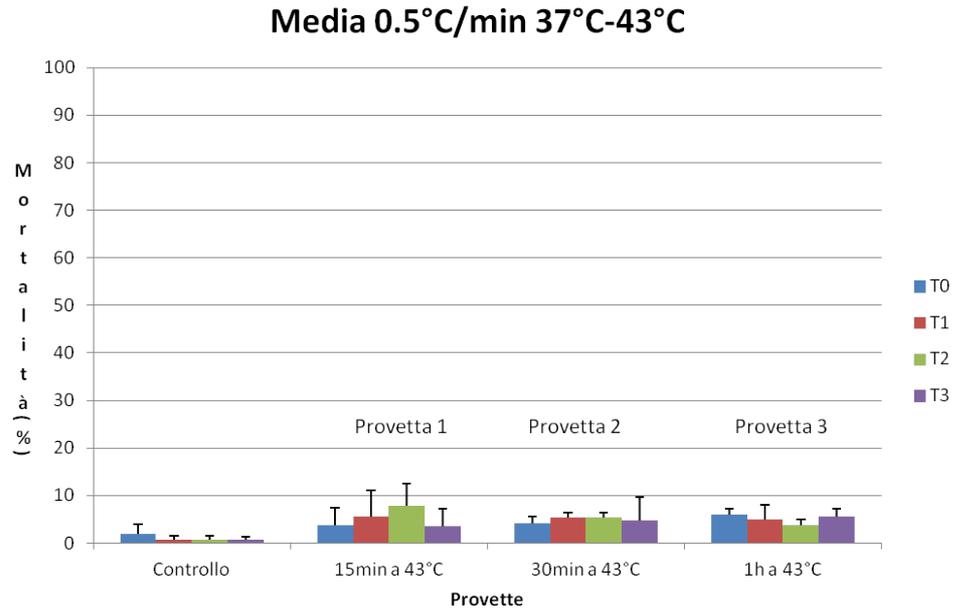


Figura 46: media e incertezza del tasso di mortalità in funzione dell'istante di lettura del test del Trypan Blue.

In figura 46 è rappresentata la mortalità percentuale media per ogni provetta analizzata in funzione dei diversi istanti  $t_i$ . Si nota che il tasso di mortalità è abbastanza costante per ogni istante analizzato, provetta di controllo esclusa. Si nota, ad esempio, che all'istante di lettura  $t_1$  il valore percentuale minimo corrisponde a  $5 \pm 3.2$  % (provetta 3, 1h a 43°C), mentre quello massimo è  $5.55 \pm 5.55$  % (provetta 1, 15min a 43°C) (tabella 25).



*Figura 47: media e incertezza del tasso di mortalità in funzione della durata del riscaldamento nel bagno termico.*

Osservando il grafico in figura 47 che riporta la percentuale di mortalità media delle colture cellulari in funzione delle provette analizzate, si nota che il tasso di mortalità indotto nelle cellule nel TEST n°1 è mediamente inferiore al 10% per tutte le provette analizzate (tabella 31 del paragrafo 5.5.2). Ad esempio il valore massimo osservabile è quello della provetta 1 e corrisponde a  $7.77 \pm 4.74$  % (istante di lettura  $t_2$ ) (tabella 25).

## 2) TEST n° 2

I parametri per il test n°2 sono:

- velocità di riscaldamento: 3°C/min;
- T\_max raggiunta: 43°C.

## Rampa 2

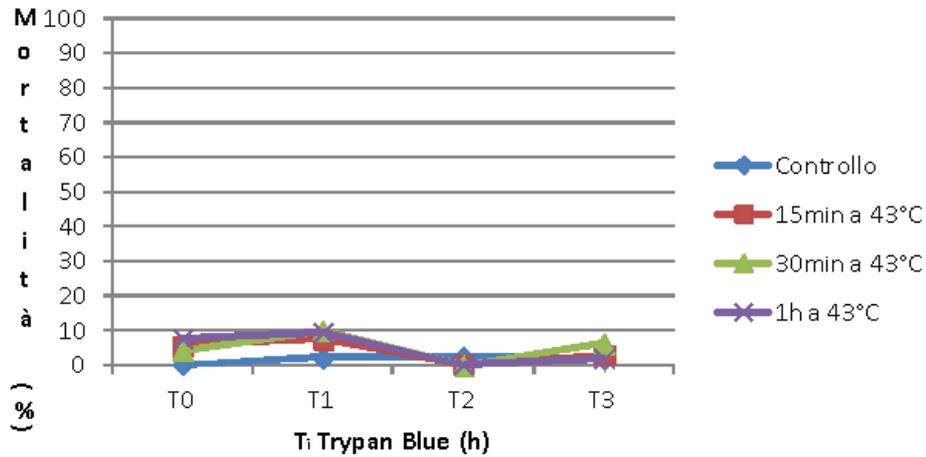


Figura 48: percentuale di mortalità media relativa alla rampa 2 ( $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $T_{\text{max}}=43^{\circ}\text{C}$ ). Esperimento 1

## Rampa 10

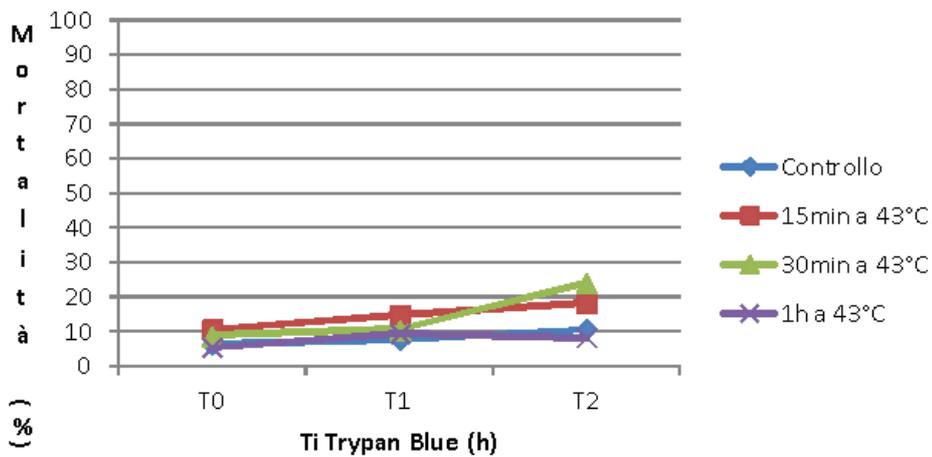


Figura 49: percentuale di mortalità media relativa alla rampa 10 ( $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $T_{\text{max}}=43^{\circ}\text{C}$ ). Esperimento 2

Osservando le figure 48 e 49, che riportano i risultati di mortalità media di due esperimenti in funzione degli istanti di lettura del test del Trypan Blue  $t_i$ , si può notare che la mortalità delle cellule contenute nelle singole provette è differente nei due esperimenti eseguiti. Ad esempio, considerando la provetta 1 (15 min a  $43^{\circ}\text{C}$ ), il valore percentuale massimo nella

rampa 2 è 7.5% (istante di lettura  $t_0$ ), mentre nella rampa 10 è 18.18 % (istante di lettura  $t_2$ ) (tabelle 16 e 24).

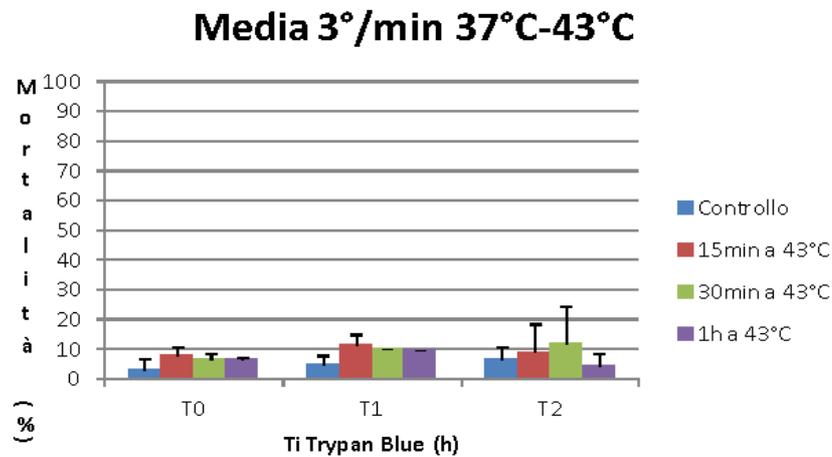


Figura 50: media e incertezza del tasso di mortalità in funzione dell'istante di lettura del test del Trypan Blue.

In figura 50 è riportata la percentuale media di mortalità delle cellule nelle diverse provette in funzione degli istanti in cui è stato effettuato il test del Trypan Blue. Si nota che la percentuale di mortalità delle cellule è abbastanza costante per ogni istante analizzato, con variabilità dei valori dipendentemente dalle provette analizzate solo per l'istante di lettura  $t_2$ . Considerando, ad esempio, l'istante  $t_1$  di lettura del Trypan Blue il valore percentuale minimo corrisponde a  $9.35 \pm 0.09$  % (provetta 3, 1h a 43°C), mentre quello massimo è  $11.1 \pm 3.6$  % (provetta 1, 15 min a 43°C) (tabella 26).

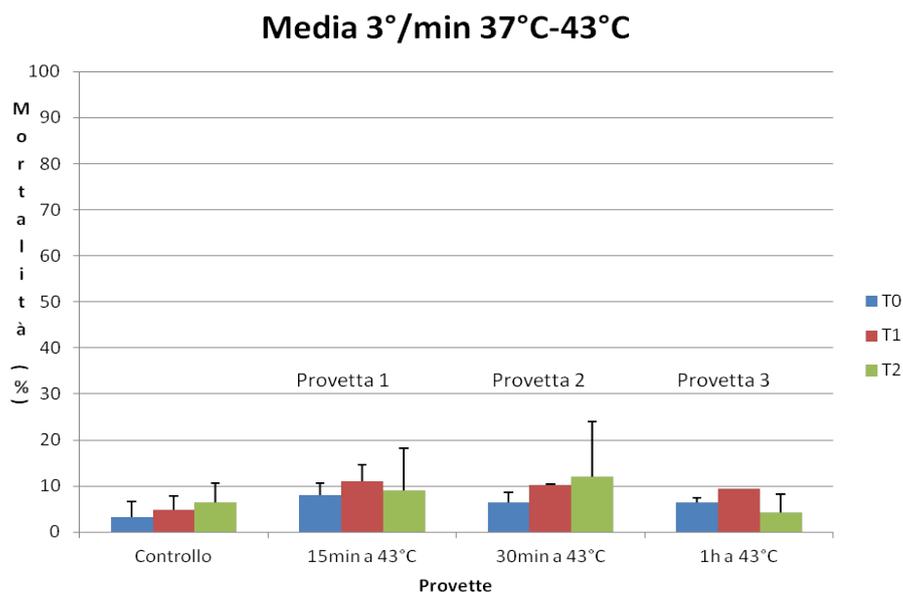


Figura 51: media e incertezza del tasso di mortalità in funzione della durata del riscaldamento nel bagno termico.

Osservando il grafico in figura 51 che riporta la percentuale di mortalità delle cellule contenute nelle provette in funzione delle provette analizzate, si nota che nel TEST n°2 il tasso di mortalità cellulare indotto è inferiore al 10% per la provette di controllo e la provetta 3 (applicazione dell'ipertermia continuativa per 1h a 43°C, mortalità media di  $6.65 \pm 2.12$  %), mentre le provette 1 (bagno a 43°C di 15 minuti, mortalità media di  $9.41 \pm 1.27$  %) e 2 (bagno a 43°C di 30 minuti, mortalità media di  $9.54 \pm 2.32$ %) hanno una mortalità media del 10% circa (tabella 31 del paragrafo 5.5.2).

### 3) TEST n° 3

I parametri per il test n°3 sono:

- velocità di riscaldamento:  $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ ;
- $T_{\text{max}}$  raggiunta:  $46^\circ\text{C}$ .

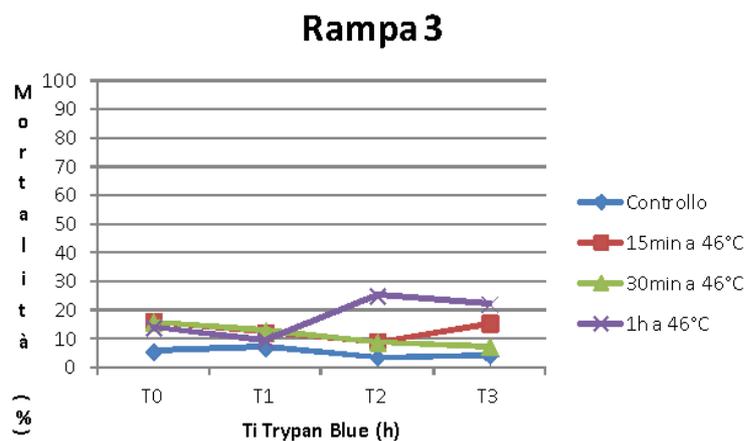


Figura 52: percentuale di mortalità media relativa alla rampa 3 ( $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $T_{\text{max}}=46^\circ\text{C}$ ). Esperimento 1

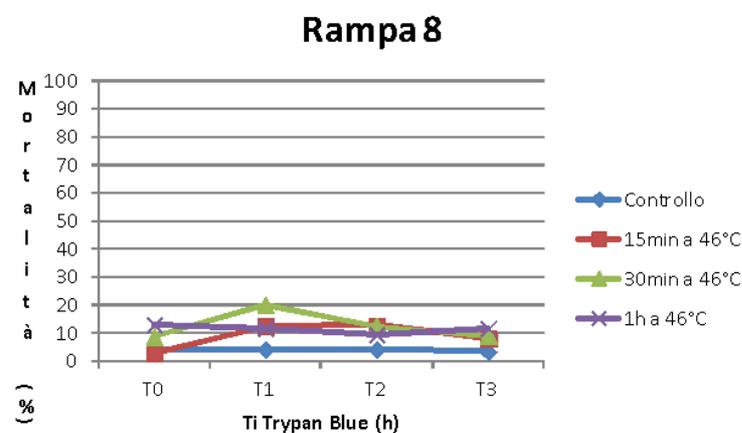


Figura 53: percentuale di mortalità media relativa alla rampa 8 ( $0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $T_{\text{max}}=46^\circ\text{C}$ ). Esperimento 2

Osservando le figure 52 e 53 che riportano la percentuale di mortalità delle cellule sottoposte al trattamento di ipertermia in funzione degli istanti di lettura del test del Trypan Blue  $t_i$ , si può notare che il comportamento delle colture cellulari nelle singole provette in funzione del tempo è diverso per i due esperimenti eseguiti. Ad esempio, considerando la provetta 3 (1h a 46°C), si nota che il suo valore percentuale massimo è 25% (istante di lettura  $t_2$ ) nella rampa 3 e 12.9% (istante di lettura  $t_0$ ) nella rampa 8 (tabelle 17 e 22).

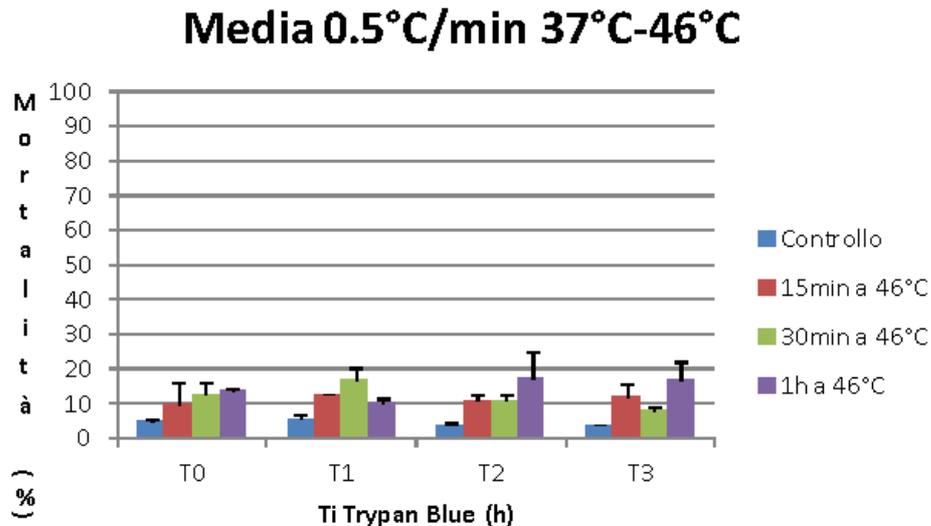


Figura 54: media e incertezza del tasso di mortalità in funzione dell'istante di lettura del test del Trypan Blue.

Dal grafico in figura 54, che rappresenta la percentuale di mortalità delle cellule in funzione degli istanti temporali analizzati, si nota che la percentuale di mortalità cellulare è variabile per ogni istante analizzato, indipendentemente dalla provetta scelta. Ad esempio all'istante di lettura  $t_3$  il valore di mortalità percentuale minimo è  $8 \pm 0.9\%$  (provetta 2, 30 min a 46°C) e il massimo è  $16.9 \pm 5.1\%$  (provetta 3, 1h a 46°C) (tabella 27).

Osservando il grafico in figura 55, che riporta la percentuale di mortalità delle cellule sottoposte a trattamento in funzione delle provette analizzate, si nota che mediamente la mortalità indotta nel TEST n°3 è inferiore al 10% per la provetta di controllo e superiore al 10% per le altre provette. In particolare corrisponde a  $11.05 \pm 1.06\%$  per la provetta 1 (15 min a 46°C),  $11.83 \pm 3.03\%$  per la provetta 2 (30 min a 46°C),  $14.51 \pm 2.78\%$  per la provetta 3 (1h a 46°C) (tabella 31).

Media 0.5°C/min 37°C-46°C

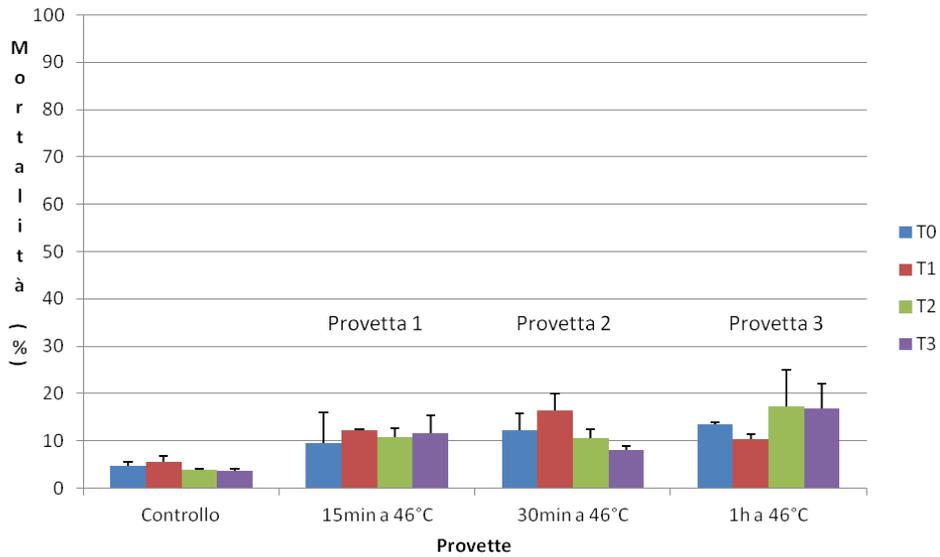


Illustrazione 55: media e incertezza del tasso di mortalità in funzione della durata del riscaldamento nel bagno termico.

4) TEST n° 4

I parametri per il test n°4 sono:

- velocità di riscaldamento: 1.5°C/min;
- T\_max raggiunta: 46°C.

Rampa 4

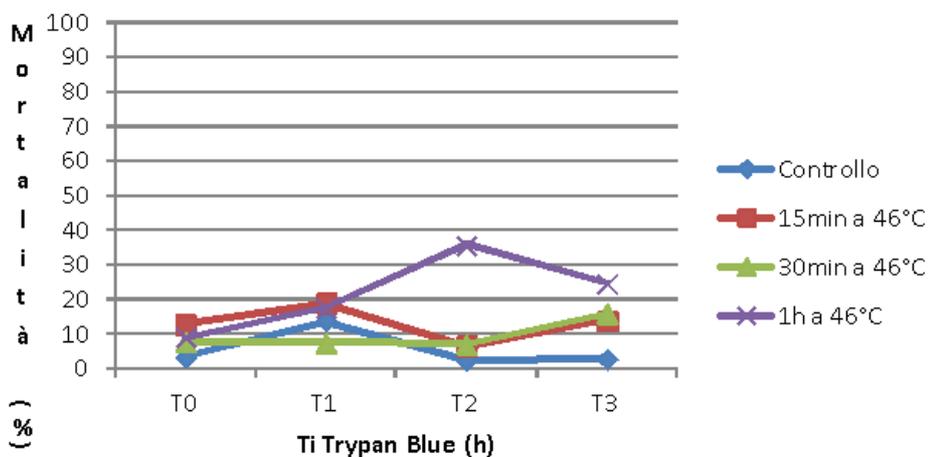


Figura 56: percentuale di mortalità media relativa alla rampa 4 (1.5°C/min, T\_max=46°C). Esperimento 1

## Rampa 7

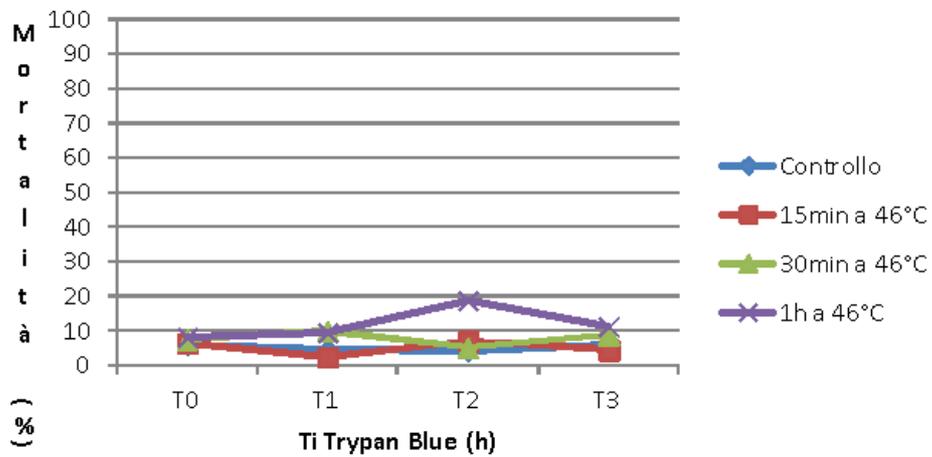


Figura 57: percentuale di mortalità media relativa alla rampa 7 (1.5°C/min,  $T_{max}=46^{\circ}\text{C}$ ). Esperimento 2

Osservando le figure 56 e 57, che riportano la percentuale di mortalità cellulare in funzione degli istanti di lettura del test del Trypan Blue  $t_i$ , si può notare che il comportamento delle colture cellulari nelle singole provette in funzione del tempo varia a seconda degli esperimenti eseguiti. Ad esempio, il valore massimo di mortalità per la provetta 3 è 35.52% (istante di lettura  $t_2$ ) nella rampa 4 è 18.75% (istante di lettura  $t_2$ ) nella rampa 7 (tabelle 18 e 21).

In figura 58 è rappresentata la percentuale di mortalità media delle cellule tumorali in funzione del tempo. La mortalità varia dipendentemente dall'istante analizzato, infatti considerando l'istante di lettura  $t_2$  il valore minimo è  $6.03 \pm 1.025\%$  (provetta 2, 30min a  $46^{\circ}\text{C}$ ), mentre il massimo è  $27.14 \pm 8.39\%$  (provetta 3, 1h a  $46^{\circ}\text{C}$ ) (tabella 28).

Media 1.5°C/min 37°C-46°C

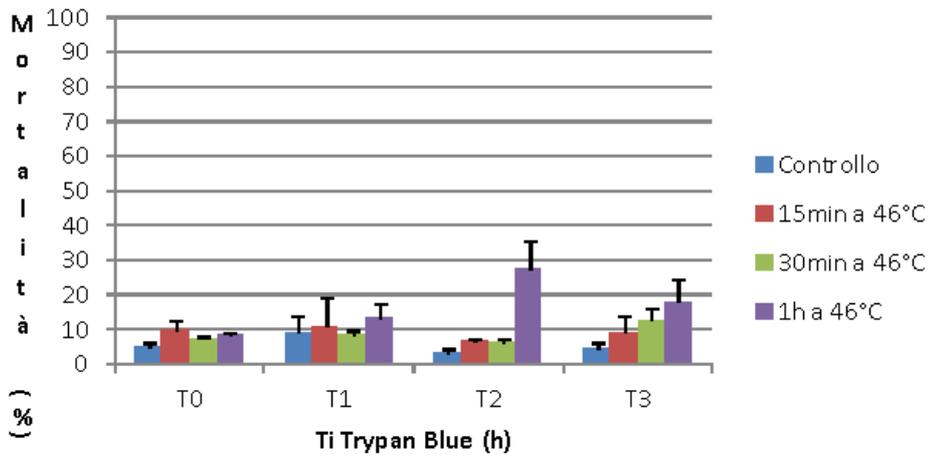


Figura 58: media e incertezza del tasso di mortalità in funzione dell'istante di lettura del test del Trypan Blue.

Media 1.5°C/min 37°C-46°C

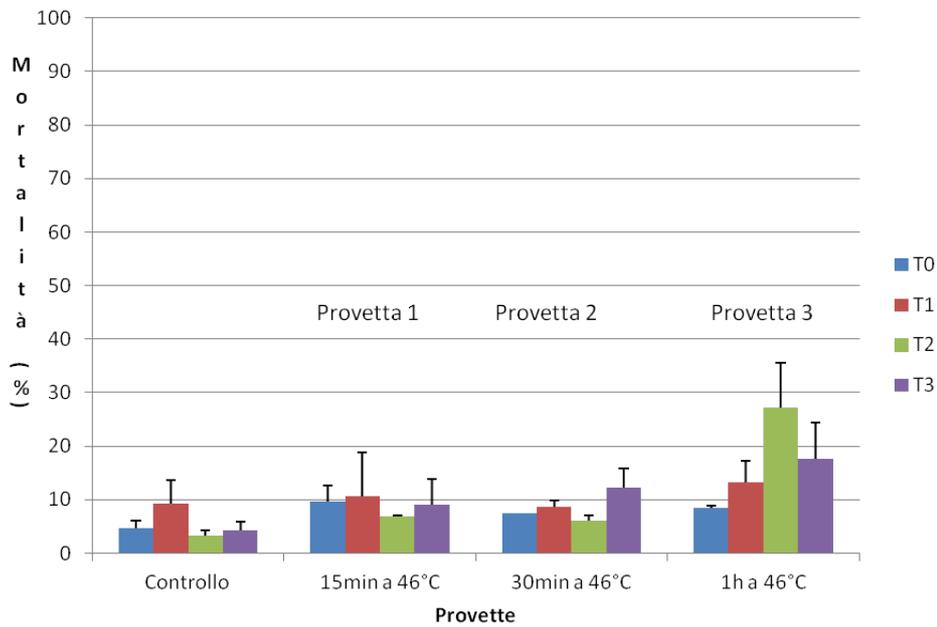


Figura 59: media e incertezza del tasso di mortalità in funzione della durata del riscaldamento nel bagno termico.

Osservando il grafico in figura 59, che riporta la percentuale di mortalità delle cellule sottoposte ad ipertermia in funzione della provetta analizzata, si nota che mediamente la percentuale di mortalità indotta nel TEST n°4 è inferiore al 10% per la provetta di controllo e le provette 1 ( $9.03 \pm 1.42\%$ ) e 2 ( $8.6 \pm 2.3\%$ ), mentre è superiore al 10% per la provetta 3 ( $16.67 \pm 6.85\%$ ) (tabella 31).

### 5) TEST n° 5

I parametri per il test n°5 sono:

- velocità di riscaldamento:  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ;
- $T_{\text{max}}$  raggiunta:  $46^{\circ}\text{C}$ .

Osservando le figure 60 e 61 che riportano la percentuale di mortalità delle cellula in funzione del tempo, si può notare che il comportamento delle colture cellulari nelle singole provette varia tra gli esperimenti effettuati. Ad esempio, osservando l'andamento della provetta 1 (15 min a  $46^{\circ}\text{C}$ ), si nota che il valore massimo è  $29.6\%$  (istante di lettura  $t_3$ ) nella rampa 5 e  $10.3\%$  (istante di lettura  $t_2$ ) nella rampa 6 (tabelle 19-20).

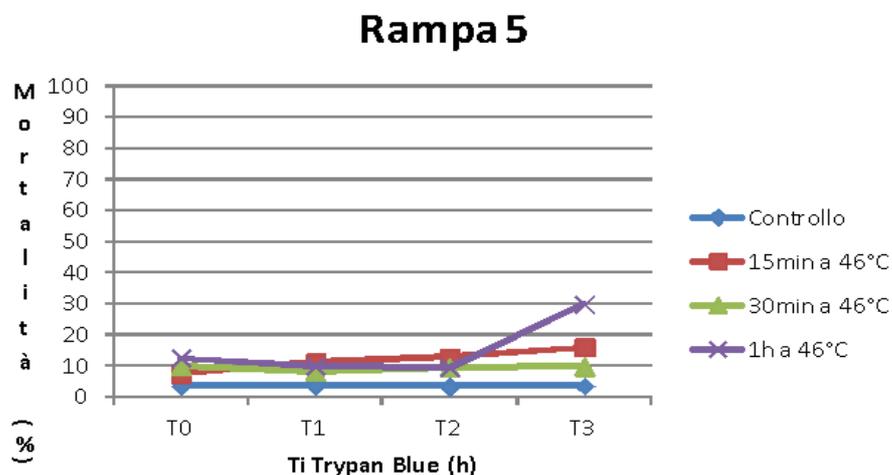


Figura 60: percentuale di mortalità media relativa alla rampa 5 ( $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $T_{\text{max}}=46^{\circ}\text{C}$ ). Esperimento 1

### Rampa 6

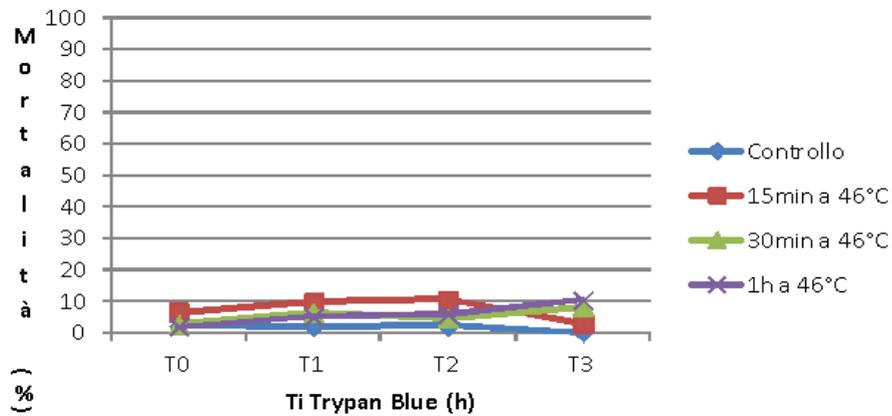


Figura 61: percentuale di mortalità media relativa alla rampa 6 (3°C/min,  $T_{max}=46^{\circ}\text{C}$ ). Esperimento 2

Il grafico in figura 62 riporta la percentuale di mortalità media delle cellule in funzione del tempo. Si osserva che la percentuale media per ogni istante di lettura del test del Trypan Blue analizzato è abbastanza costante (ad esclusione di  $t_3$ ). Ad esempio, nell'istante di lettura  $t_1$  il valore minimo è  $7.13 \pm 0.88\%$  (provetta 2, 30 min a  $46^{\circ}\text{C}$ ) e quello massimo è  $10.36 \pm 0.64\%$  (provetta 1, 15 min a  $46^{\circ}\text{C}$ ) (tabella 29).

### Media 3°C/min 37°C-46°C

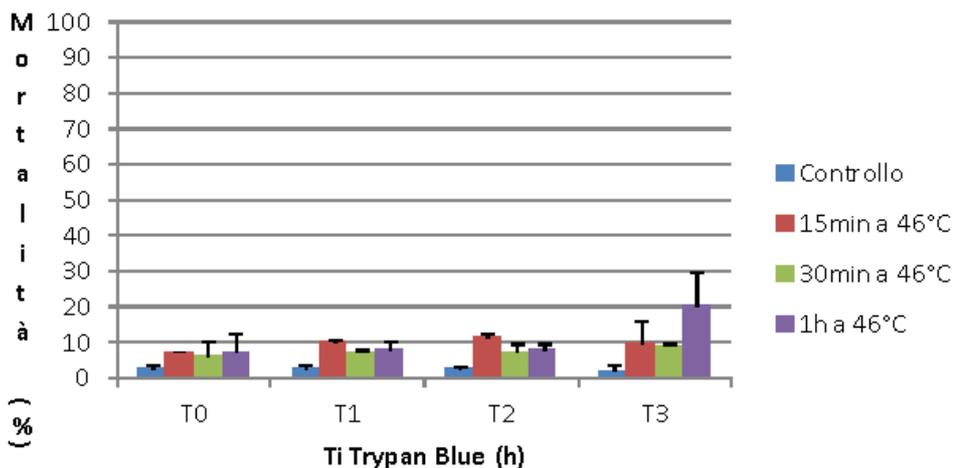


Figura 62: media e incertezza del tasso di mortalità in funzione dell'istante di lettura del test del Trypan Blue.

Dal grafico in figura 63, che riporta la mortalità media delle cellule in funzione della durata del bagno termico a temperatura costante, si nota che mediamente la mortalità indotta sulle cellule nel TEST n° 5 è nettamente inferiore al 10% per la provetta di controllo, intorno al 10% per le altre provette analizzate:  $9.6 \pm 1.65\%$  per la provetta 1 (15 min a  $46^\circ\text{C}$ ),  $7.34 \pm 0.94\%$  per la provetta 2 (30 min a  $46^\circ\text{C}$ ),  $10.58 \pm 5.41\%$  per la provetta 3 (1h a  $46^\circ\text{C}$ ) (tabella 31).

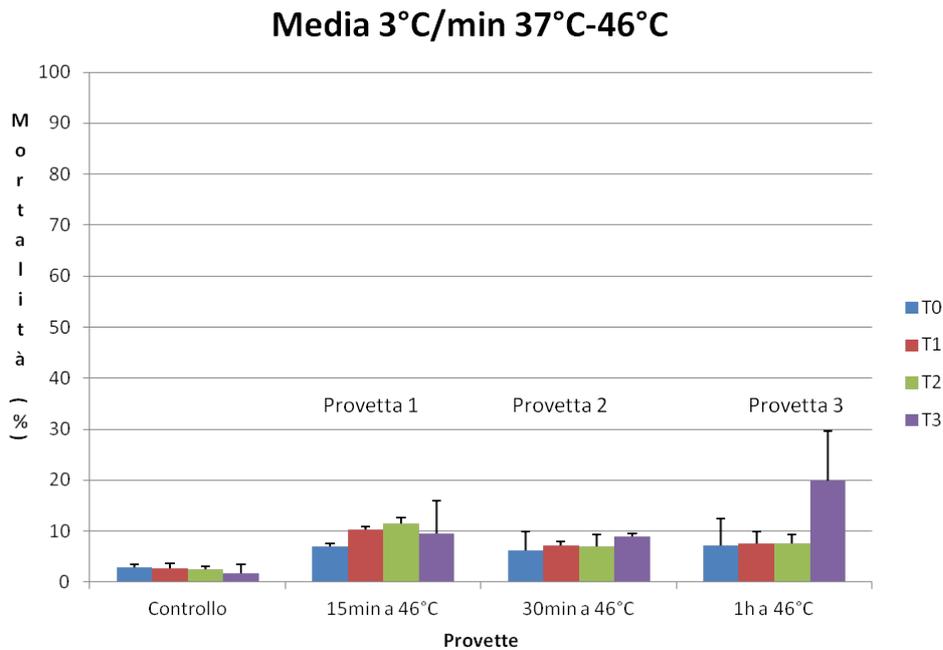


Figura 63: media e incertezza del tasso di mortalità in funzione della durata del riscaldamento nel bagno termico.

## 5.5.2 DOE

Nel precedente paragrafo è stato possibile notare molta variabilità nei risultati relativi a esperimenti con il metodo del Trypan Blue. Per questo motivo, si è scelto di effettuare il test denominato DOE<sup>56</sup>. Esso evidenzia l'incidenza di un determinato fattore in un

<sup>56</sup>Design Of Experiments: si considerino un numero n di fattori con un range di variabilità tra [a,b] e per ogni fattore venga individuato il valore più alto (caratterizzato solitamente con '+') e il valore più basso (caratterizzato solitamente con '-') che esso può assumere nel suo range di variabilità. Si effettuino poi tante prove quante sono le combinazioni possibili tra i fattori, ovvero  $2^n$  prove. Occorre infine confrontare tra loro gli effetti, ovvero le risposte dei singoli fattori per individuare in che misura ognuno influisce sul processo. Il calcolo dell'effetto del singolo fattore è la differenza tra la media delle risposte ottenute con il valore alto e la media delle risposte con valore basso:

Es: Effetto di A =  $\frac{|(\text{somma delle risposte con A = +}) / (\text{n}^\circ \text{risposte con A = +}) - (\text{somma delle risposte con A = -}) / (\text{n}^\circ \text{risposte con A = -})|}{2}$  (8)

Il fattore, considerato in modulo, sarà tanto più significativo, quanto più tale differenza è elevata. (<http://www.qualityi.it/doe.htm>)

esperimento e solitamente vengono selezionati alcuni parametri dell'esperimento e viene stabilito un range di variazione di cui si considerano solo i valori estremi. Anche in questo lavoro di tesi si è effettuate tale scelta, in particolare i fattori analizzati sono tre ( $C_R$ ,  $T_{max}$ ,  $t_{mantenimento}$ ) e per ognuno è stato stabilito un valore più alto e uno più basso, in ogni test. In questo modo è stato possibile, grazie all'applicazione del DOE, capire l'influenza dei parametri selezionati sui risultati sperimentali a partire dai casi riportati in tabella 30. Per ogni DOE sono state analizzate 8 ( $2^n$ ,  $n=3$ ) prove.

Tabella 30: DOE

$C_R$ (°C/min)	$T_{max}$ (°C)	$t_{mantenimento}$	DOE n°
0.5 – 3	43 - 46	15 - 60	1
0.5 – 3	43 - 46	15 - 30	2
0.5 – 3	43 - 46	30 - 60	3

Seguendo le regole del DOE, è stato possibile capire l'effetto delle varie combinazioni dei fattori. La risposta considerata in questo caso è la percentuale di mortalità media per ogni provetta analizzata. Le risposte sono, quindi, calcolate a partire dai grafici del paragrafo 5.5.1 (la seconda tipologia di grafici relativi alle medie, ad es. il grafico in figura 63) e sono riportate in tabella 31, in base alla rampa scelta (definita nei progressivi test 1-5, individuati a loro volta da  $C_R$  e  $T_{max}$ ):

Tabella 31: percentuali di mortalità media per ogni provetta analizzata.

TEST n°	$C_R$ (°C/min)	$T_{max}$ (°C)	Provetta 1 (%)	Provetta 2 (%)	Provetta 3 (%)
1	0.5	43	5.15 ± 1.7	4.9 ± 0.54	6.05 ± 5.08
2	3	43	9.41 ± 1.27	9.54 ± 2.32	6.65 ± 2.12
3	0.5	46	11.05 ± 1.06	11.83 ± 3.03	14.51 ± 2.78
4 <sup>57</sup>	1.5	46	9.03 ± 1.42	8.6 ± 2.3	16.67 ± 6.85
5	3	46	9.6 ± 1.65	7.34 ± 0.94	10.58 ± 5.41

Si propone di seguito lo schema seguito per ogni test DOE di tipo 'full factorial' per calcolare l'effetto percentuale di ogni fattore. Come esempio si riporta lo svolgimento per il DOE n°1 della tabella 30.

- Si scelgono i valori alti e bassi per ogni fattore, riportati in tabella 32.

<sup>57</sup>Non considerato nel test di DOE.

Tabella 32: valori alti e bassi per ogni fattore

Fattore	Valore alto	Valore basso
CR (°C/min)	3	0.5
T_max (°C)	46	43
t_mantenimento (min)	60	15

- Si compila una tabella con le diverse prove possibili. In tabella 33 si riportano le risposte delle combinazioni di fattori.

Tabella 33: risposte dei tre fattori analizzati (CR, T\_max e t\_mantenimento).

CR (°C/min)	T_max (°C)	t_mantenimento (min)	Risposta = Effetto = Mortalità media (%)
0.5	43	15	5.15
0.5	43	60	5.08
0.5	46	15	11.05
0.5	46	60	14.51
3	43	15	9.41
3	43	60	6.65
3	46	15	9.6
3	46	60	10.58

- Si calcola l'effetto di ogni singolo fattore utilizzando la formula (8) della nota 56:

Effetto di A = |(somma delle risposte con A = +)/(n°risposte con A = +) - (somma delle risposte con A = -)/(n°risposte con A = -)| (8)

– effetto di CR = (media delle risposte con CR = valore alto) - (media delle risposte con CR = valore basso) =  $|(9.41+6.65+9.6+10.58)/4 - (5.15+5.08+11.05+14.51)/4| = 0.11$

– effetto di T\_max =  $|(11.05+14.51+9.6+10.58)/4 - (5.15+5.08+9.41+6.65)/4| = 4.86$

– effetto di t\_mantenimento =  $|(5.08+14.51+6.65+10.58)/4 - (5.15+11.05+9.41+9.6)/4| = 0.4$

MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA

Da tali risultati si nota che il fattore T\_max per il test n°1 ha un effetto maggiore rispetto agli altri perchè la formula (8), per esso, fornisce un valore maggiore.

I successivi test DOE seguono lo stesso schema svolto per il test n°1. I valori considerati per i DOE n°2 e n°3 sono riportati nelle tabelle 34 e 35.

Tabella 34: DOE n°2 ( $CR= 0.5^{\circ}C/min$  e  $3^{\circ}C/min$ ,  $T_{max} = 43^{\circ}C$  e  $46^{\circ}C$ ,  $t_{mantenimento} = 15 min$  e  $30 min$  ).

<b>CR (<math>^{\circ}C/min</math>)</b>	<b>T_max (<math>^{\circ}C</math>)</b>	<b>t_mantenimento (min)</b>	<b>Risposta = Effetto = Mortalità media (%)</b>
0.5	43	15	5.15
0.5	43	30	4.9
0.5	46	15	11.05
0.5	46	30	11.83
3	43	15	9.41
3	43	30	9.54
3	46	15	9.6
3	46	30	7.34

Tabella 35: DOE n°3 ( $CR= 0.5^{\circ}C/min$  e  $3^{\circ}C/min$ ,  $T_{max} = 43^{\circ}C$  e  $46^{\circ}C$ ,  $t_{mantenimento} = 30 min$  e  $60 min$  ).

<b>CR (<math>^{\circ}C/min</math>)</b>	<b>T_max (<math>^{\circ}C</math>)</b>	<b>t_mantenimento (min)</b>	<b>Risposta = Effetto = Mortalità media (%)</b>
0.5	43	30	4.9
0.5	43	60	5.08
0.5	46	30	11.83
0.5	46	60	14.51
3	43	30	9.54
3	43	60	6.65
3	46	30	7.34
3	46	60	10.58

I risultati di tutti i test di DOE sono riportati in tabella 36. In ogni test (si faccia riferimento alla tabella 30) sono stati definiti alti i valori in modulo maggiori tra i due progressivamente

a confronto (come effettivamente è stato fatto anche per il test n°1) e bassi i valori in modulo minori.

*Tabella 36: effetti dei fattori del DOE.*

DOE n°	Effetto di CR	Effetto di T_max	Effetto di T_mantenimento
1	0.11	4.86	0.4
2	0.74	2.71	0.4
3	0.55	4.52	0.8

I risultati ottenuti e riportati nella tabella 36 evidenziano che il parametro T\_max influenza maggiormente la mortalità cellulare, mentre la velocità di riscaldamento (CR) e la temperatura di mantenimento (t\_mantenimento) influiscono in modo minore.

### 5.5.3 Crescite clonali

I risultati ottenuti dalle crescite clonali in termini di frazione sopravvivate sono riportati in tabella 37.

*Tabella 37: risultati ottenuti con le crescite clonali. Frazione sopravvivate.*

CR (°C/min)	T_max (°C)	Data esecuzione rampa di temperatura	Provetta 1 (%)	Provetta 2 (%)	Provetta 3 (%)
0.5	43	07/02/13	100	100	100
		12/03/13	100	97.4 ± 0.9	93.08 ± 2.69
3	43	08/02/13	100	100	100
		13/03/13	75.48 ± 18.24	19.98 ± 24.89	0
0.5	46	18/02/13	0	0	0
		11/03/13	28.86 ± 20.44	0	0
1.5	46	19/02/13	32.25 ± 3.65	0	0
		27/02/13	8.47 ± 2.12	0	0
3	46	20/02/13	33.1 ± 3.2	0	0
		26/02/13	19.58 ± 1.87	0.375 ± 0.125	0

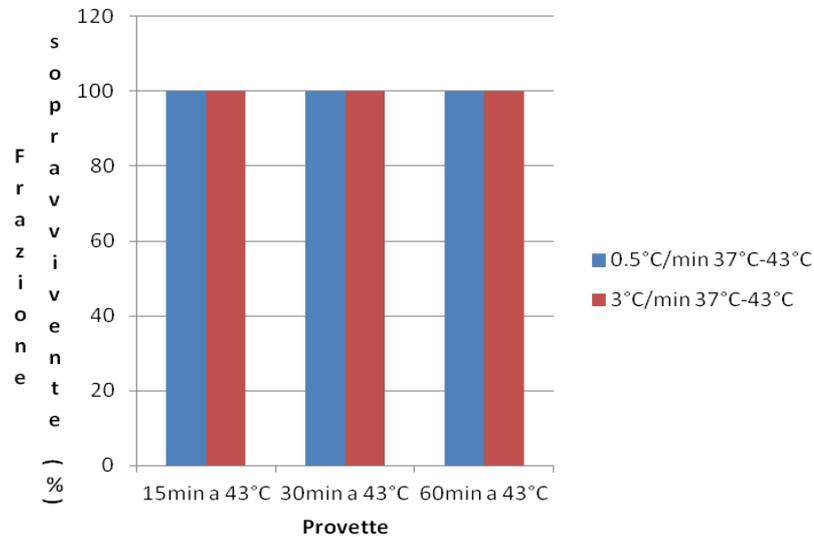
L'esperimento per ciascuna rampa di temperatura (definita da CR e T\_max) è stato eseguito in doppio e ad ogni ripetizione sono state preparate delle Petri tramite semina

delle sospensioni cellulari contenute nelle provette: due Petri di test per il controllo e due Petri per ciascuna provetta corrispondente ad una diversa durata del bagno a temperatura costante. Quindi i risultati riportati in corrispondenza delle voci 'Provetta 1, 2, 3', ovvero le provette tenute nel bagno termico rispettivamente per 15 minuti, 30 minuti e 60 minuti, sono ciascuno una media dei 2 valori di conteggi delle colonie cresciute in ciascuna Petri. Le percentuali riportate corrispondono alla frazione sopravvivate, ovvero alla percentuale di colonie formatesi nel trattato rispetto alle colonie contate nel controllo. È riportata anche la deviazione standard per ogni media calcolata.

L'analisi dei risultati ottenuti nei primi giorni di sperimentazioni ha fatto capire i punti critici dell'esperimento. Si osservi il grafico in figura 64 che presenta in ordinata la frazione sopravvivate (%) in funzione della durata del bagno termico. Tale grafico evidenzia un'analogia dei risultati ottenuti utilizzando rampe diverse: le cellule presentano vitalità al 100% pur essendo state trattate con diverse velocità di riscaldamento. Quindi, si è dedotto che questa apparente insensibilità al calore poteva essere dovuta al fatto che la temperatura iniziale del contenuto delle provette era a circa 20°C (temperatura ambiente) e non a 37°C, per cui la temperatura massima raggiunta non era quella desiderata.

Da esperimenti precedenti si è visto che mantenere le provette in incubatore a 37°C per 30 minuti dopo la loro preparazione, normalizza la temperatura del loro contenuto a 37°C. Questo permette di rendere le condizioni al contorno costanti tra esperimenti condotti in giorni differenti. Quindi, a seguito dell'iniziale apparente inefficienza delle rampe di temperatura (figura 64: sopravvivenza cellulare del 100%), si è scelto di eseguire tutti i successivi esperimenti prevedendo l'incubazione delle sospensioni cellulari a 37°C per 30 minuti. I risultati ottenuti utilizzando le rampe di temperatura con  $C_R=0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  e  $C_R=3^\circ\text{C}/\text{min}$  e  $T_{\text{max}}=43^\circ\text{C}$  nei due distinti giorni di sperimentazione (effettuazione della rampa senza pre-incubazione e ripetizione della stessa rampa, a seguito delle constatazioni riportate, con pre-incubazione) non possono essere confrontati: ne conseguirebbe, altrimenti, una deviazione standard elevata data dalla diversità dei risultati ottenuti in condizioni sperimentali diverse. Per questo motivo i risultati sono stati presentati in due grafici distinti (figure 64 e 65).

### Medie rampe di temperatura 37°C-43°C - senza incubazione a 37°C



*Figura 64: medie delle rampe di temperatura con intervallo di temperatura 37°C-43°C, senza pre-incubazione delle provette (7-8/02/2013).*

In figura 64 si riporta la percentuale di frazione sopravvissute in funzione della durata nel bagno termico a temperatura costante. Si nota una totale sopravvivenza delle cellule, qualsiasi sia la rampa di temperatura a cui sono sottoposte le provette contenenti le sospensioni cellulari.

Il grafico in figura 65 riporta la percentuale di frazione sopravvissute in funzione delle provette analizzate, mantenendo le provette in incubatore prima dell'esecuzione della rampa di temperatura (giorni 12-13/03/2013). Si nota che la rampa di temperatura con  $CR=0.5^\circ\text{C}/\text{min}$  (12/03/2013) non ha effetti particolarmente dannosi sulle cellule, mentre per la rampa di temperatura con  $CR=3^\circ\text{C}/\text{min}$  (13/03/2013) si nota una mortalità crescente in corrispondenza di un maggior tempo di mantenimento a temperatura costante.

### Medie rampe di temperatura 37°C-43°C - con incubazione a 37°C

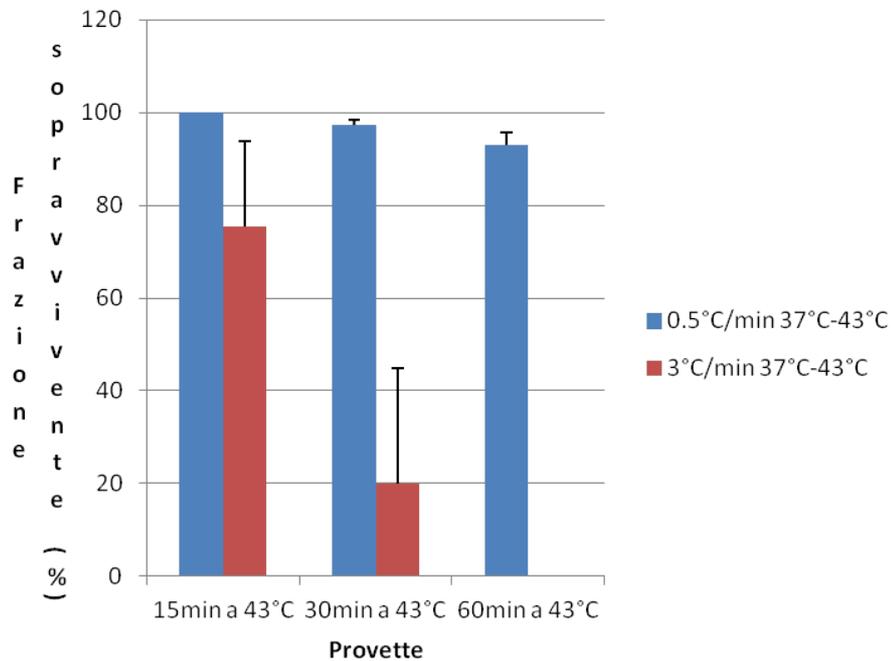


Figura 65: medie delle rampe di temperatura con intervallo di temperatura 37°C-43°C, con pre-incubazione delle provette.

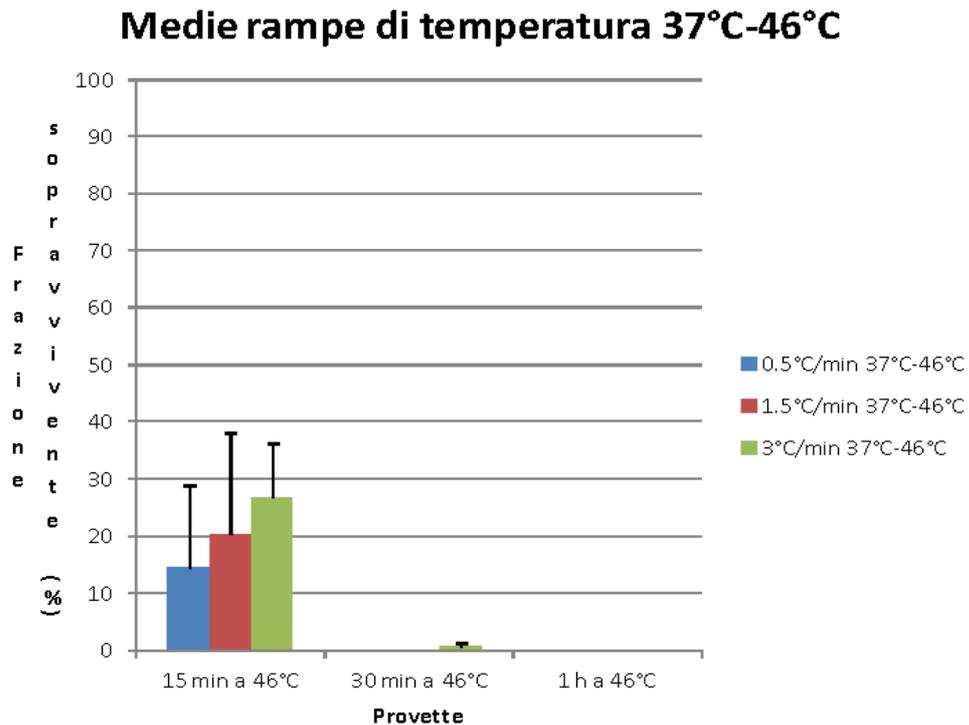
In tabella 38 sono presenti i risultati ottenuti con le rampe di temperatura  $CR=0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $CR=1.5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $CR=3^\circ\text{C}/\text{min}$  e  $T_{\text{max}}=46^\circ\text{C}$ . I risultati riportati in tabella 38 sono le medie e le deviazioni standard relative alle frazioni sopravvissute delle 4 Petri esaminate nei due giorni di sperimentazione differenti. Per questi test le condizioni sperimentali sono omogenee in quanto si è sempre effettuata l'incubazione delle sospensioni cellulari prima dell'esecuzione della rampa di temperatura.

Tabella 38: risultati delle crescite clonali dei due giorni di sperimentazione. Frazione sopravvissute

CR ( $^\circ\text{C}/\text{min}$ )	T_max ( $^\circ\text{C}$ )	Provetta 1 (%)	Provetta 2 (%)	Provetta 3 (%)
0.5	46	14.43 $\pm$ 14.45	0	0
1.5	46	20.45 $\pm$ 17.77	0	0
3	46	26.27 $\pm$ 9.61	0.67 $\pm$ 0.7	0

Il grafico in figura 66 riporta la percentuale di frazione sopravvissute in funzione delle provette analizzate, per tutte le rampe di temperatura eseguite. Si può notare che le

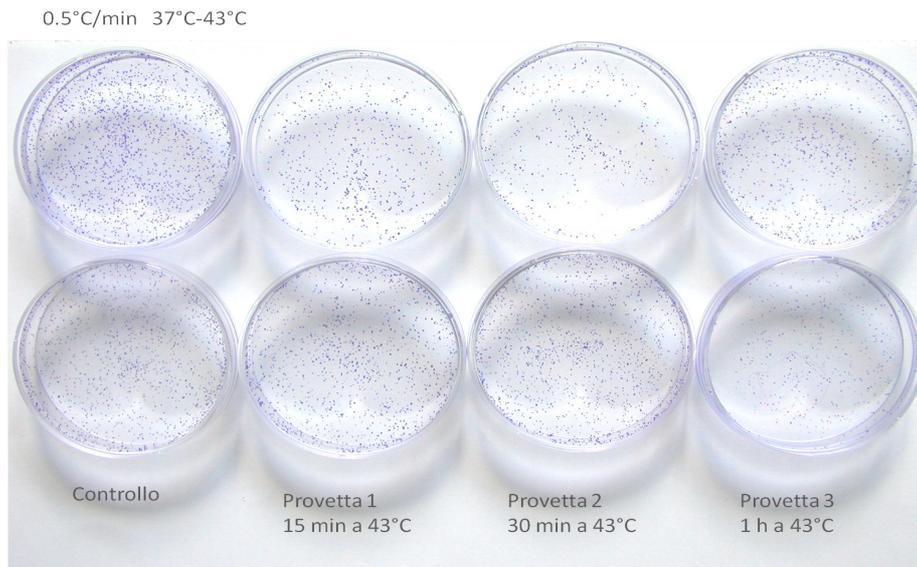
cellule sopravvivono solamente nel caso di mantenimento nel bagno termico limitato nel tempo (15 minuti a 46°C). Osservando i valori medi e la deviazione standard delle frazioni sopravvissute ottenute con diverse rampe di temperatura, si può vedere un'indipendenza dalla velocità di riscaldamento. Con tempi di mantenimenti della temperatura costante più lunghi, come 30 minuti a 46°C o 1 h a 46°C, la mortalità è totale.



*Figura 66: percentuale di frazione sopravvissute in funzione delle durate nel bagno termico, per tutte le rampe di temperatura eseguite.*

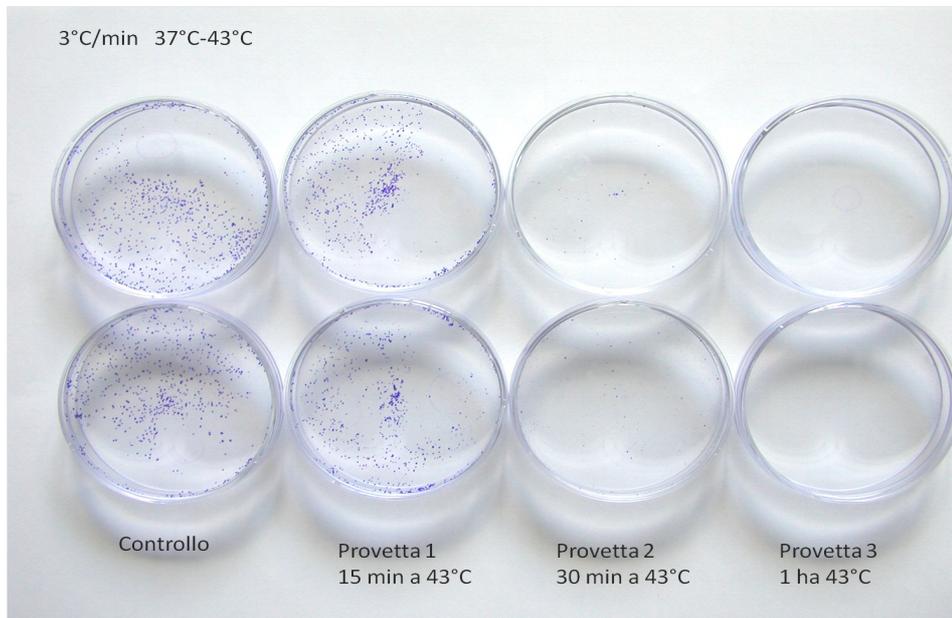
Nelle figure 67-73 si possono osservare le foto delle Petri contenenti le crescite clonali ottenute con le rampe di temperatura riportate in tabella 37.

## MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA



*Figura 67: crescita clonale per la rampa a 0.5°C/min e T\_max 43° con pre-incubazione (12/03/2013).*

In figura 67 si notano le Petri preparate in doppio per la crescita clonale relativa alla rampa 0.5°C/min con T\_max 43°C, effettuata il 12/03/2013. È evidente la sopravvivenza massima ottenuta per qualsiasi mantenimento nel bagno termico.

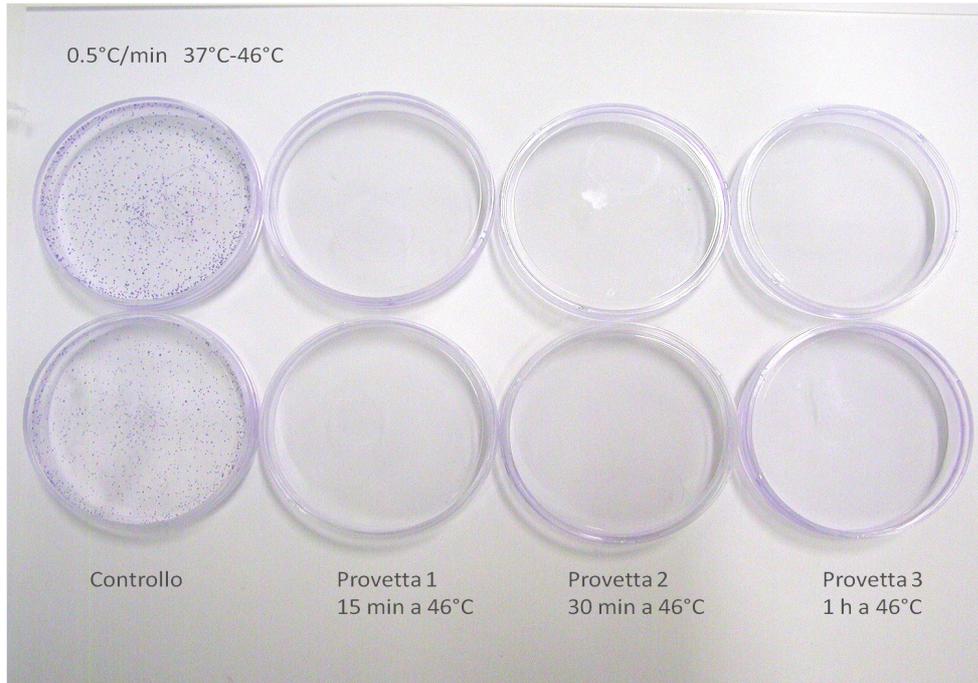


*Figura 68: crescita clonale per la rampa a 3°C/min e T\_max 43° con pre-incubazione (13/03/2013).*

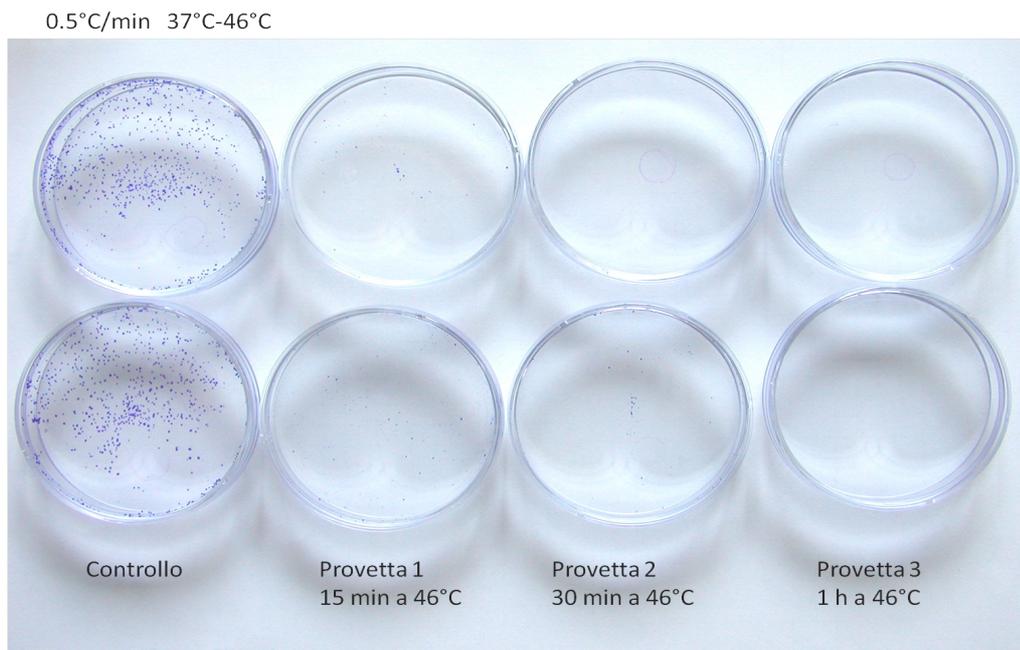
In figura 68 sono riportate le Petri relative alla crescita clonale ottenuta dalla semina delle sospensioni cellulari sottoposte alla rampa di temperatura con  $C_R=3^\circ\text{C}/\text{min}$  e  $T_{\text{max}} 43^\circ$ . Si nota, in accordo con i risultati riportati in tabella 37, che vi sono colonie cellulari sia in corrispondenza delle cellule provenienti dalla provetta 1 che da quelle provenienti dalla provetta 2.

## MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA

In figura 69 si notano le Petri preparate in doppio per la crescita clonale relativa alla rampa  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $T_{\text{max}} 46^{\circ}\text{C}$ , effettuata il 18/2/2013. È chiara la mortalità massima ottenuta per qualsiasi mantenimento nel bagno termico. La prova è stata ripetuta in data 11/3/2013 con risultati differenti (figura 70): si notano formazioni di colonie anche relativamente alle cellule mantenute a  $46^{\circ}\text{C}$  per 15 minuti.



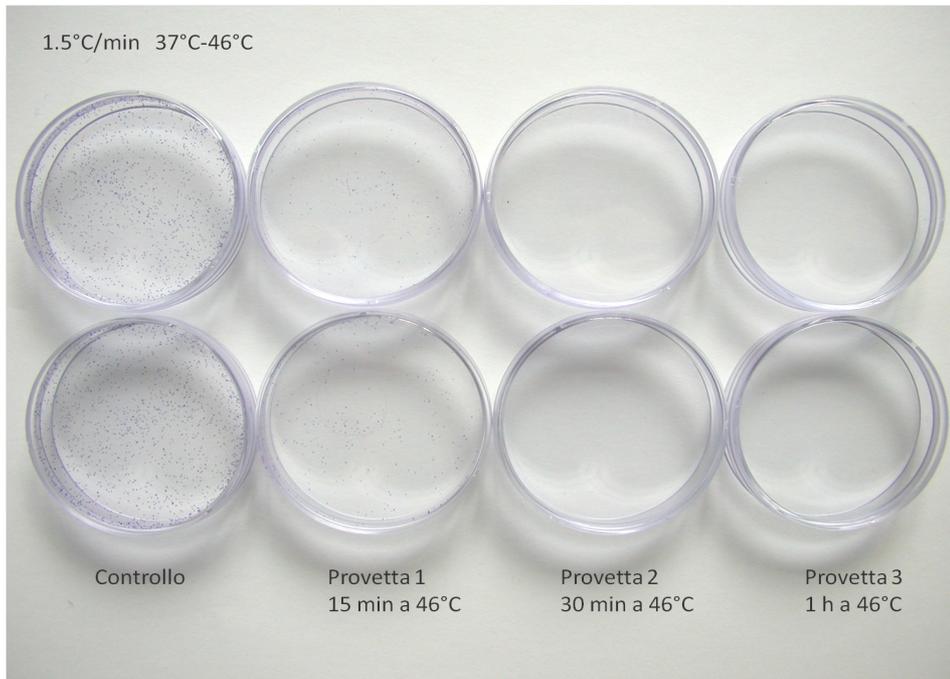
*Figura 69: crescita clonale per la rampa a  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $T_{\text{max}} 46^{\circ}\text{C}$  (18/02/2013).*



*Figura 70: crescita clonale per la rampa a  $0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $T_{\text{max}} 46^{\circ}\text{C}$  (11/03/2013).*

## MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA

Le Petri in figura 71 sono relative alla rampa  $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  con  $T_{\text{max}}$  pari a  $46^{\circ}\text{C}$ . La prova relativa al 19/2/2013 è stata ripetuta il 27/2/2013. In entrambi i giorni si sono presentate colonie cellulari solo nelle Petri relative alla provetta 1.



*Figura 71: crescita clonale per la rampa a  $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  e  $T_{\text{max}}$   $46^{\circ}\text{C}$  (19/02/2013).*

In figura 72 sono presenti le Petri preparate in doppio per la crescita clonale relativa alla rampa a  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  con  $T_{\text{max}}$   $46^{\circ}\text{C}$ , effettuata il 20/2/2013. Essa è stata ripetuta il 26/2/2013. A differenza delle altre rampe di temperatura analizzate relative a  $T_{\text{max}}=46^{\circ}\text{C}$ , il 26/2 si è osservata la formazione di colonie non solo nelle Petri relative al mantenimento nel bagno a temperatura costante con durata di 15 minuti, ma anche per quelle relative al bagno termico con durata di 30 minuti (tabella 37).



Figura 72: crescita clonale per la rampa a 3°C/min e  $T_{max}$  46°C (20/02/2013).

### Medie a confronto

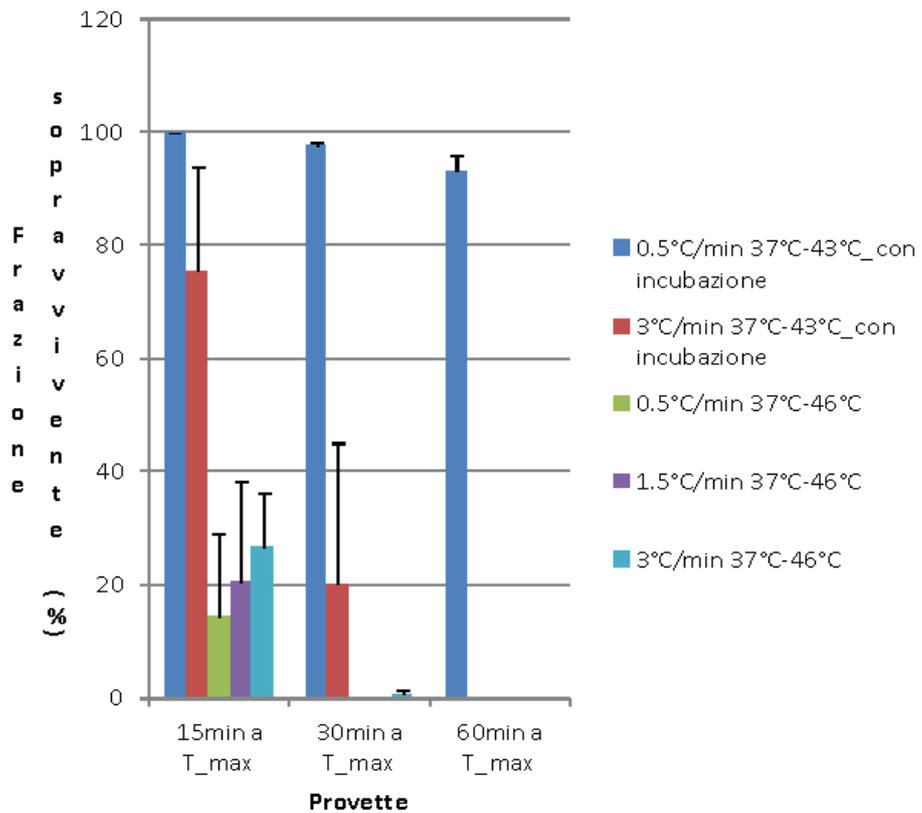


Figura 73: medie a confronto.

## 5.6 CONSIDERAZIONI

Osservando i risultati riportati nel grafico in figura 73, con le relative deviazioni standard, si possono effettuare delle considerazioni:

- Considerando le rampe di temperatura relative agli aumenti di temperatura da 37°C a 43°C, si può osservare che sia la scelta della velocità della rampa di temperatura (3°C/min piuttosto che 0.5°C/min), sia la scelta della durata del mantenimento delle provette nel bagno termico sono fattori importanti per quanto riguarda la mortalità indotta sulle cellule trattate. In particolare, all'aumentare della velocità di incremento della temperatura e della durata del bagno termico delle provette, la mortalità aumenta.
- Considerando le rampe di temperatura relative agli aumenti di temperatura da 37°C a 46°C, si può osservare che la durata del mantenimento delle provette nel bagno a temperatura costante è un fattore nettamente più rilevante rispetto la scelta della rampa di temperatura da eseguire. In particolare, all'aumentare della durata del bagno termico delle provette, la mortalità aumenta fino a diventare massima in corrispondenza del bagno termico di durata 60 minuti a temperatura massima costante.

Quindi, confrontando i trattamenti di ipertermia con una temperatura massima  $T_{max} = 43^{\circ}\text{C}$  e  $T_{max} = 46^{\circ}\text{C}$ , si nota che il trattamento con  $T_{max}$  pari a  $46^{\circ}\text{C}$  porta ad una mortalità cellulare massima.

In conclusione, considerando i risultati ottenuti con il test del Trypan Blue (test relativo alla **vitalità** cellulare) e con le crescite clonali (test definito 'di crescita', legato alla capacità delle cellule di **riprodursi**), si può assumere che all'aumentare della velocità della rampa di temperatura, della  $T_{max}$  (temperatura massima raggiunta) e del  $t_{\text{mantenimento}}$  (il tempo di mantenimento delle provette trattate nel bagno termico, a  $T_{max}$  costante), aumenta anche la mortalità cellulare ottenuta. In particolare, è stata data maggiore affidabilità ai risultati ottenuti con le crescite clonali per i seguenti motivi:

- le crescite clonali hanno consentito la messa a punto del set sperimentale grazie alla netta evidenza, data dall'analisi delle colonie formatesi sulle Petri, della necessità di pre-incubare le sospensioni cellulari a 37°C per 30 minuti prima di sottoporle al trattamento di ipertermia;
- il conteggio delle colonie formatesi avviene 10 giorni dopo la semina. Questo periodo consente alle cellule di esprimere l'eventuale danno subito che incide sul

ciclo cellulare e, quindi, sulla capacità della cellula di riprodursi: il danno porta la cellula alla morte. Questo evidenzia la necessità di analizzare il reale effetto dell'ipertermia non nell'immediato, ma piuttosto almeno dopo 36 h (tempo di replicazione delle MCF-7, le cellule considerate in questo lavoro di tesi). Ciò spiega il motivo per cui nel test del Trypan Blue si nota ancora vitalità cellulare dopo 60 minuti di bagno termico a  $T_{max}$  costante: è un test effettuato nell'immediato. Inoltre, la morte che avviene nel breve periodo dopo il trattamento è generalmente per necrosi, in quanto in pochi minuti la cellula non ha il tempo di esprimere il danno influenzante il suo ciclo riproduttivo, ma solamente un danno di tipo citotossico. Infine, in letteratura è riportato l'aumento delle HSP pro-apoptotiche (intracellulari ed extracellulari) come effetto del trattamento ipertermico. Affinchè la cellula possa esprimere questo aumento di HSP, è necessario del tempo.

- Il test del Trypan Blue è stato difficile da analizzare perchè gli andamenti ottenuti dai risultati e riportati nei grafici sono apparsi molto appiattiti (soprattutto per  $T_{max}=46^{\circ}C$ ). Solamente per  $T_{max}=43^{\circ}C$  si è notata una maggiore efficacia per la rampa di temperatura a  $3^{\circ}C/min$ , fatto confermato anche dalle crescite clonali. Per questo tipo di test sono comunque stati mediati i singoli valori ottenuti dalle sospensioni cellulari pre-incubate e non pre-incubate, in quanto nell'immediato il risultato non è particolarmente influenzato da tale accorgimento. I grafici relativi alle rampe di temperatura successive (tutte effettuate su sospensioni cellulari pre-incubate), infatti, hanno dimostrato ugualmente variabilità tra i risultati ottenuti.



## 6 CONCLUSIONI

In questo lavoro di tesi si è studiato un set up sperimentale per valutare l'effetto della velocità e della durata del riscaldamento di colture di cellule tumorali.

Per lo svolgimento di questo lavoro di tesi è stato necessario un iniziale studio della letteratura per comprendere i metodi di sperimentazione di ipertermia utilizzati in vitro, i parametri biologici da valutare e i test per esaminarli. Dallo studio di alcuni lavori riportati in letteratura è emerso che i parametri biologici da analizzare sono la vitalità/mortalità cellulare indotta dall'ipertermia, l'induzione all'apoptosi cellulare a causa del calore, la variazione dei livelli di HSP intracellulari ed extracellulari dovuta al trattamento ipertermico. In questa tesi è stato analizzato il parametro di vitalità/mortalità cellulare tramite il test del Trypan Blue e il test della crescita clonale.

Inoltre, analizzando i punti critici dei lavori svolti da altri gruppi di ricerca è risultata evidente la necessità di avere condizioni sperimentali controllate. È, quindi, fondamentale far precedere l'esperimento vero e proprio da una fase di set up del sistema scaldante scelto (piastra elettrica) per ottenere gli aumenti di temperatura desiderati. L'obiettivo principale della fase di set up del dispositivo per ottenere le rampe di temperatura è stato, quindi, configurare lo strumento per generare calore e ottenere una determinata velocità di riscaldamento fino ad una temperatura massima da raggiungere. La successiva fase di incubazione alla  $T_{max}$  è stata ottenuta tramite l'utilizzo di un bagno termostatico a temperatura costante e controllata.

Il set up della piastra riscaldante ha permesso di effettuare la sperimentazione sulle colture cellulari in modo quanto più possibile controllato. In particolare, le cellule sono state inizialmente sottoposte ad incrementi di temperatura da 37°C a 43°C o 46°C seguiti da un'incubazione alla temperatura massima raggiunta (43°C o 46°C) per un predeterminato intervallo di tempo (15 minuti, 30 minuti o 60 minuti). I risultati ottenuti nella fase di sperimentazione sulle cellule hanno permesso di studiare l'effetto che diverse modalità di riscaldamento in termini di velocità e durata del riscaldamento possono avere se applicate a colture cellulari, valutando in particolare la possibilità di indurre la morte. Questo studio ha permesso di valutare la rampa più efficace per ottenere la morte delle cellule tumorali indotta dal calore. Si è constatato che all'aumentare della velocità della rampa di temperatura, della temperatura massima raggiunta e del tempo di mantenimento delle sospensioni cellulari trattate e poste nel bagno termico a temperatura massima costante, si riduce il numero di cellule che sopravvivono.

## *MAGNETO FLUIDO IPERTERMIA*

Vi sono dei possibili sviluppi futuri per questo lavoro. In particolare potrebbe essere di notevole interesse l'individuazione della rampa di temperatura cui sottoporre le cellule per indurle ad apoptosi certa, escludendo la necrosi immediata. Si renderebbero, quindi, opportuni ulteriori test per verificare la reale causa di morte cellulare, ad esempio test di crescita clonale (test di crescita) e alcuni test di vitalità non immediata.





## 7 BIBLIOGRAFIA

- [1] O. J. Ott, R.D Issels, R. Wessalowski, *Hyperthermia in Oncology – Principles and Therapeutic Outlook*, UNI-MED, 2010.
- [2] W. Bierman, *The history of fever therapy in the treatment of disease*, The Bulletin, 1942.
- [3] R. Horsman, *Tissue physiology and the response to heat*, International Journal of Hyperthermia, 2006.
- [4] BSD Medical Corporation, *Hyperthermia as a Cancer Therapy*, 2002.
- [5] S. Krishnan, P. Diagaradjane, Vascular-focused hyperthermia using gold nanoshells enhances radiotherapy efficacy, Experimental Radiation Oncology -The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center Houston, TX, 2008.
- [6] H. Gröll, S. Langereis, *Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound*, Journal of Controlled Release, 2012.
- [7] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Waalter, *L'essenziale di biologia molecolare della cellula*, Zanichelli, 2005.
- [8] Stefani, Taddei, *Percorsi di biochimica*, Zanichelli, 2011.
- [9] M.J. Borrelli, R.S.L. Wong, W.C. Dewey, *A Direct Correlation Between Hyperthermia-Induced Membrane Blebbing and Survival in Synchronous G<sub>1</sub> CHO Cells*, Journal of Cellular Physiology, 1986.
- [10] B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, H. Riess, *The cellular and molecular basis of hyperthermia*, Critical Reviews in Oncology/Hematology 43, 2002.
- [11] T. Torigoe, Y. Tamura, N. Sato, Noriyuki, *Heat shock proteins and immunity: Application of hyperthermia for immunomodulation*, International Journal of Hyperthermia, 2009.
- [12] A. Parcellier, S. Gurbuxani, E. Schmitt, E. Solary, C. Garrido, *Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways*, Biochemical and Biophysical Research Communications 304, 2003.
- [13] E. Schmitt, M. Gehrman, M. Brunet, G. Multhoff, C. Garrido, *Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy*, Journal of Leukocyte Biology 81, 2007.
- [14] T. Ishii, H. Udono, T. Yamano, H. Ohta, A. Uenaka, T. Ono, A. Hizuta, N. Tanaka, P.K. Srivastava, E. Nakayama, *Isolation of MHC Class I-Restricted Tumor Antigen Peptide and*

*Its Precursors Associated with heat Shock Proteins hsp70, hsp90 and gp96*, The Journal of Immunology 162, 1999.

[15] A. Ito, H. Honda, T. Kobayashi, *Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of 'heat-controlled necrosis' with heat shock protein expression*, Cancer Immunology Immunotherapy 55, 2006.

[16] A.D. Wells, S.K. Rai, M.S. Salvato, H. Band, M. Malkovsky, *Hsp72-mediated augmentation of MHC class I surface expression and endogenous antigen presentation*, International Immunology 10, n.5, 1998.

[17] M. Tytell, *Release of heat shock proteins (Hsps) and the effects of extracellular Hsps on neural cells and tissues*, International Journal of Hyperthermia 21(5), August 2005.

[18] G. Pockley, *Heat shock proteins as regulators of the immune response*, The Lancet, 2003.

[19] S.K. Calderwood, S.S. Mambula, P.J. Gray Jr., J.R. Theriault, *Extracellular heat shock proteins in cell signaling*, Department of Radiation Oncology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston (USA), 2007.

[20] S.K. Calderwood, J.R. Theriault, J. Gong, *Message in a bottle: Role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity*, European Journal of Immunology 35, 2005.

[21] C. Theriault, E. Paetzell, R. Chandrasekar, C. Barkey, Y. Oni, W.O. Soboyejo, *An in-vitro study of the effects of temperature on breast cancer cells: experiments and models*, Materials Science and Engineering C 32, 2012.

[22] S.B. Nadin, F.D. Cuello-Carrion, M.L. Sottile, D.R. Ciocca, L.M. Vargas-Roig, *Effects of hyperthermia on Hsp27, Hsp72 and DNA repair proteins hMLH1 and hMSH2 in human colorectal cancer hMLH1-deficient and hMLH1-proficient cell lines*, International Journal of Hyperthermia 28, 2012.

[23] W. Jiang, L. Bian, L. Ma, R. Tang, S. Xun, Y. He, *Hyperthermia-induced apoptosis in Tca8113 cells is inhibited by heat shock protein 27 through blocking phospholipid scramblase 3 phosphorylation*, International Journal of Hyperthermia 26, 2010.

[24] L. Cheng, D.J. Smith, R.L. Anderson, P. Nagley, *Human neuroblastoma SH-SY5Y cells show increased resistance to hyperthermic stress after differentiation, associated with elevated levels of Hsp72*, International Journal of Hyperthermia 27, 2011.





## **8 RINGRAZIAMENTI**

Voglio ringraziare con profonda gratitudine tutte quelle persone che mi hanno aiutata e supportata negli ultimi sette mesi dandomi la possibilità di realizzare il mio progetto. Per questo ringrazio il Prof. Michele Forzan, l'Ing. Elisabetta Sieni, il Prof. Fabrizio Dughiero e i ragazzi del LEP, la Prof.ssa Roberta Bertani e la Dott.ssa Valentina Gandin insieme alla Prof.ssa Cristina Marzano, Eleonora Cella e Luca Bizzotto. Grazie per la vostra disponibilità e il vostro amore per ciò che fate.