

NUOVE APPLICAZIONI DI CAMPI ELETTRICI PULSATI IN MEDICINA

GLI IMPULSI DI CAMPO ELETTRICO ULTRABREVI SONO UNA DELLE NUOVE FRONTIERE DELLA RICERCA BIO-ELETTROMAGNETICA. LE APPLICAZIONI MEDICALI POSSONO INTERESSARE LA TERAPIA DEL CANCRO, LA DEFIBRILLAZIONE, LA CURA DI MALATTIE NEURODEGENERATIVE.

A partire dagli anni '90, sono stati sperimentati sia su colture cellulari (*in vitro*) che su cavie da laboratorio (*in vivo*) segnali elettromagnetici impulsivi con durate tra i millisecondi (ms) e i microsecondi (μ s) e ampiezze elevate dell'ordine dei kV/m [1], [2].

Tali segnali sono in grado, a livello cellulare, di alterare il potenziale di membrana inducendo l'apertura di larghi pori (centinaia di nanometri) idrofili tramite un processo noto come elettroporazione o elettroporazione [2], [3]. Questo fenomeno avviene in regioni della membrana cellulare dove il potenziale indotto dal campo elettrico esterno supera una certa soglia che è caratteristica per ogni tipo cellulare. Se la durata di tali impulsi è estremamente breve dell'ordine dei microsecondi (μ s), questo fenomeno è reversibile (elettroporazione reversibile), in caso contrario la membrana viene definitivamente distrutta (elettroporazione irreversibile), determinando quindi la morte cellulare e di conseguenza la necrosi del tessuto [3], come schematicamente raffigurato in *figura 1*.

L'elettroporazione irreversibile è essenzialmente utilizzata per applicazioni di elettrosterilizzazione *in vitro* [4] e per applicazioni di elettroablazione *in vivo* [3]. L'elettroporazione reversibile invece, è utilizzata per applicazioni *in vitro* come l'elettrofusione di cellule [1]. Un'applicazione *in vivo* particolarmente interessante è l'elettrochemioterapia. In tale ambito, l'azione dell'impulso di campo elettrico è utilizzata per aumentare l'assorbimento tissutale di farmaci chemioterapici [2]. Allo stesso tempo, questi impulsi di campo sono stati utilizzati anche nella terapia genica *in vivo* all'interno di diversi tessuti [5].

Lo studio e l'introduzione in clinica di tale metodica sono stati oggetto di progetti europei appena conclusi nell'ambito del sesto programma quadro, quali ad esempio Angioskin LSHB-CT-2005-512127, FP6: "Life Sciences, Genomics and Biotechnology for Health".

FIG. 1
ELETTROPORAZIONE

Rappresentazione schematica degli effetti indotti dall'elettroporazione irreversibile e reversibile. Solo gli impulsi della durata dei nanosecondi sono in grado di permeabilizzare le membrane intracellulari e quindi di agire sul metabolismo cellulare stesso.

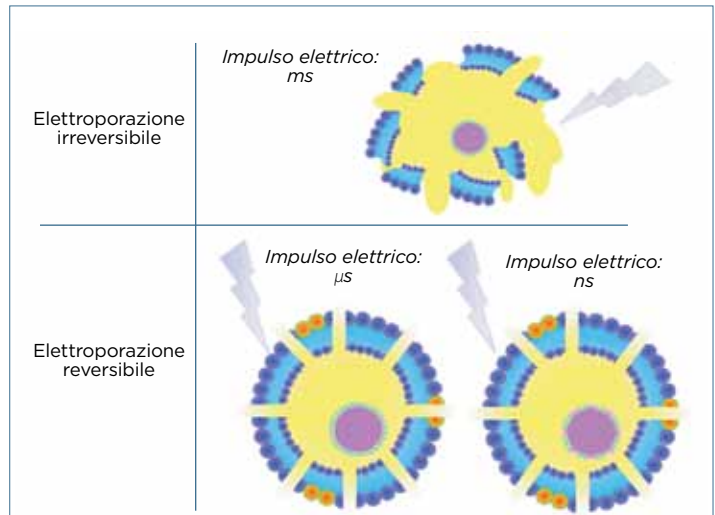
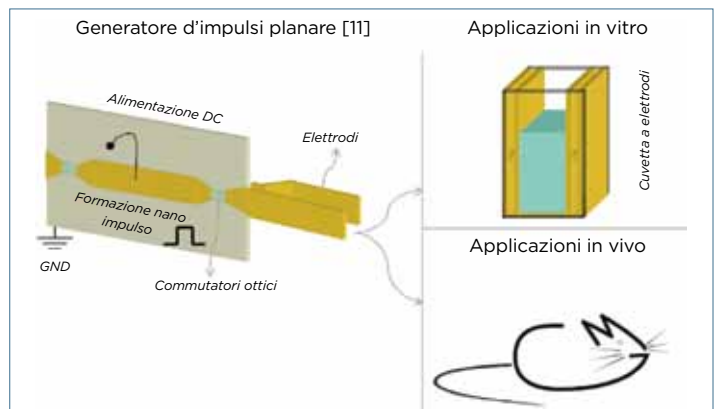


FIG. 2
GENERATORE DI IMPULSI PLANARE

Il generatore planare di nano-impulsi proposto in [11] è schematicamente rappresentato. Con tale sistema sono possibili esposizioni *in vitro* utilizzando delle cuvette a elettrodi, ma anche applicazioni *in vivo*.



Solo recentemente, si sono iniziati ad utilizzare impulsi di campo elettrico ultrabrevi (con durate dell'ordine dei nanosecondi). Questa nuova possibilità ha aperto l'orizzonte per lo sviluppo di applicazioni medicali dei campi elettromagnetici in un'area d'indagine totalmente innovativa, grazie allo sviluppo d'appropriate tecnologie in grado di generare segnali impulsivi di ampiezza elevata (MV/m) e fronti di salita e discesa degli impulsi sempre più rapidi (ns) [6], [7]. Infatti, impulsi con tali caratteristiche sono in grado di permeabilizzare, oltre alla membrana della cellula (con la formazione di piccoli pori idrofili di dimensioni intorno al nm), anche le membrane degli

organelli intracellulari (mitocondri, reticolo endoplasmatico, nucleo), producendo una serie di effetti elettrici a livello cellulare e sub-cellulare già replicati in diversi laboratori. Questi effetti coinvolgono un'alterazione conformazionale delle membrane plasmatiche che dà luogo ad alterazioni delle proteine transmembranalari, alla modulazione delle catene di Dna, a una modificazione del funzionamento metabolico cellulare e all'induzione dell'apoptosi (morte cellulare programmata) [7]. Tali effetti, essendo specifici per ogni tipo di cellula, permettono il bersagliamento selettivo di particolari target in popolazioni cellulari miste [6], [7]. Inoltre, vista la limitata energia rilasciata da questo tipo di

segnali, si tende a escludere la possibilità d'induzione di indesiderati effetti termici (riscaldamento) [7].

Oltre ad un effetto diretto sulla cellula dei segnali impulsivi ultrabrevi è possibile utilizzare tali segnali per la cosiddetta terapia genica, cioè l'inserzione di materiale genetico (Dna) all'interno delle cellule al fine di poter curare delle patologie. Un esempio riguarda le tecniche di trasferimento genetico che combinano l'elettroporazione classica e la nanoporazione indotta dall'uso d'impulsi ultra brevi. Questi ultimi, infatti, aumentano selettivamente il trasporto delle molecole di Dna verso il nucleo [7]. Tali segnali sono già stati testati per terapie innovative del cancro sia tramite esperimenti *in vitro* che *in vivo*. In tale ambito, primi studi *in vivo* hanno evidenziato una completa remissione di metastasi di melanoma trattate con treni d'impulsi di differente durata [8].

I segnali ultrabrevi sono stati sperimentati anche per applicazioni in campo neuromuscolare e cardiologico potendo supportare lo sviluppo di metodiche di defibrillazione alternative [9]. Inoltre, recentemente, è stato provato l'aumento selettivo del rilascio di neurotrasmettitori in cellule sottoposte a tali impulsi, aprendo la strada a una loro applicazione nella cura di malattie neurodegenerative come il Parkinson o l'Alzheimer e anche nel controllo e nella terapia del dolore [10]. Da un punto di vista tecnologico la generazione di segnali elettrici ultrabrevi non è un problema banale. Sono necessari generatori di nano impulsi capaci di rilasciare rapidamente segnali d'elevata intensità con fronti di salita e discesa rapidi, adattati a sistemi d'applicazione *in vitro* (cuvette con elettrodi) o *in vivo* (elettrodi planari o ad aghi) (figura 2). Il carico biologico, rappresentato da colture cellulari o da un tessuto, varia la sua impedenza in frequenza; questo rende necessario un adattamento a larga banda del generatore quando la durata dell'impulso è molto ridotta (pochi ns) [11].

La miniaturizzazione dei generatori, la necessità di produrre impulsi sempre più corti con tempi di salita e discesa dei fronti d'onda rapidi (ps) e di mantenere un adattamento d'impedenza con gli applicatori e il carico biologico sono a oggi sfide importanti per la comunità di fisici e ingegneri coinvolti in questo nuovo e promettente campo della ricerca. Un altro aspetto particolarmente interessante e fondamentale in tale ambito riguarda la comprensione dei meccanismi d'interazione tra l'energia rilasciata dall'impulso e il target biologico. In particolar modo, per investigare rigorosamente quest'interazione su una

scala biologica molecolare è oggi possibile utilizzare degli strumenti di calcolo particolarmente sofisticati basati su simulazioni di dinamica molecolare. La dinamica molecolare è una tecnica computazionale di simulazione che, mediante l'integrazione delle equazioni del moto, permette di studiare la dinamica di evoluzione di un sistema fisico e chimico a livello atomico e molecolare. La dinamica molecolare permette la realizzazione di esperimenti virtuali su scala nanometrica fornendo informazioni sulla riorganizzazione molecolare in presenza o meno di segnali elettrici esterni anche di forma impulsiva [12]. Ad esempio, l'induzione di pori nella membrana lipidica cellulare a causa di un riarrangiamento energetico dei fosfolipidi è un meccanismo piuttosto assestato per il quale le simulazioni molecolari hanno confermato e spiegato il dato sperimentale. Un altro punto importante è la possibilità di definire quantitativamente il campo elettrico indotto fino al livello delle membrane

cellulari (microdosimetria) tramite l'uso di opportuni algoritmi combinabili con modelli avanzati per la descrizione dei fenomeni di porazione, direttamente dipendenti dall'intensità di tale campo locale [13].

Le promettenti opportunità in campo medico, come anche le sfide aperte in campo tecnologico e modellistico, rendono lo studio di questi segnali una delle nuove frontiere della ricerca bio-elettromagnetica odierna.

**Caterina Merla¹, Alessandra Paffi²,
Guglielmo d'Inzeo², Francesca
Apollonio², Micaela Liberti²**

Centro interuniversitario per lo studio delle interazioni tra campi elettromagnetici e biosistemi (ICEmB)

1. Unità Biologia delle radiazioni e salute dell'uomo, Enea, Roma.
2. Dipartimento di Ingegneria dell'informazione, elettronica e telecomunicazioni, Università La Sapienza, Roma

BIBLIOGRAFIA

1. M. Golzio, M. Mora, C. Raynaud, C. Delteil, J. Teissié, M. Rols, "Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells", in *Biophys. J.*, vol. 74, no. 6, pp. 3015-3022, 1998.
2. G. Pucihar, T. Kotnik, J. Teissie, D. Miklavcic, "Electropermeabilization of dense cell suspensions", in *Eur. Biophys. J.*, vol. 36, pp. 173-185, 2007.
3. J. F. Edd, L. Horowitz, R. V. Davalos, L. Mir, B. Rubinsky, "In vivo results of a new focal tissue ablation technique: irreversible electroporation", in *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, vol. 53, no.5, pp. 1409-1415, 2006.
4. D. Knorr, "Novel approaches in food processing technology: new technologies for preserving food and modifying function", in *Curr. Op. Biotechnol.*, vol. 10, pp. 485-491, 1999.
5. L.C. Heller, R. Heller, "In vivo electroporation for gene therapy", in *Human Gene Therapy*, vol. 17, no.9, pp. 890-897, 2006.
6. K.H. Schoenbach, R.P. Joshi, J.F. Kolb, N. Chen, M. Stacey, P.F. Blackmore, E.S. Buescher, S.J. Beebe, "Ultra short electrical pulses open a new gateway into biological cells", *Proceedings of the IEEE*, vol. 92, no. 7, pp. 1122-1137, 2004.
7. R.P. Joshi, K.H. Schoenbach, "Bioelectric effects of intense ultrashort pulses", in *Critical Review in Biomed. Eng.*, vol. 38, no. 3, pp. 255-304, 2010.
8. R. Nuccitelli, K. Tran, S. Sheikh, B. Athos, M. Kreis, P. Nuccitelli, "Optimized nanosecond pulsed electric field therapy can cause murine malignant melanomas to self-destruct with a single treatment", in *Int. J. Cancer*, vol. 127, no. 7, pp. 1727-1736, 2010.
9. J. Zhang, P.F. Blackmore, B.Y. Hargrave, S. Xiao, S.J. Beebe, K.H. Schoenbach, "Nanosecond pulse electric field (nanopulse): A novel non ligand agonist for platelet activation", in *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 471, pp. 240-248, 2008.
10. G.L. Craviso, S. Choe, P. Chatterjee, I. Chatterjee, P.T. Vernier, "Nanosecond electric pulses: a novel stimulus for triggering Ca²⁺ influx into chromaffin cells via voltage-gated Ca²⁺ channels", in *Cell Molecular Neurobiology*, vol. 30, pp. 1259-1265, 2010.
11. C. Merla, S. El-Amari, M. Kanaan, M. Liberti, F. Apollonio, D. Arnaud-Cormos, V. Couderc, P. Leveque, "A 10 ohms high voltage nanosecond pulse generator", in *IEEE Trans. Microwave Theory Techniques*, vol. 58, pp. 4079-4085, Dec. 2010.
12. P. Marracino, A. Amadei, F. Apollonio, G. d'Inzeo, M. Liberti, A. di Crescenzo, A. Fontana, R. Zappacosta, M. Aschi, "Modelling of chemical reactions in micelles: water mediated keto-enol interconversion as a case study", in *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, pp. 8102-8111, 2011.
13. C. Merla, A. Paffi, F. Apollonio, P. Leveque, G. d'Inzeo, M. Liberti, "Microdosimetry for nanosecond pulsed electric field applications: a parametric study for a single cell", in *IEEE Tran. Biomedical Engineering*, vol. 58, no. 5, pp. 1294-1302, 2011.