



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

**Corso di Laurea Magistrale in
Biologia Molecolare e Applicata**

**Valutazione degli effetti dei campi elettromagnetici a bassa
frequenza sull'assorbimento di farmaci chemioterapici in
modelli cellulari**

**Evaluation of effects deriving from low-frequency
electromagnetic fields on the uptake of chemotherapeutic drugs
in cellular models**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Noemi Antonelli

Relatore
Chiar.mo Dott. Francesco Piva

Correlatore:
Dott.ssa Giulia Occhipinti

Sessione Estiva: Luglio 2019

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Patologie tumorali pancreatiche	1
1.1.1 Microambiente dell'adenocarcinoma duttale	4
1.1.2 Fattori di rischio	6
1.1.3 Trattamento e strategie sperimentali	8
1.2 Doxorubicina	13
1.2.1 Biosintesi	14
1.2.2 Meccanismo di azione e metabolismo	16
1.2.3 Effetti collaterali: la cardiotoxicità della doxorubicina	19
1.2.4 Assorbimento nelle cellule	22
1.3 Il campo elettromagnetico	25
1.4 Sorgenti naturali dei campi elettromagnetici	32
1.5 Sorgenti artificiali dei campi elettromagnetici	35
1.6 Effetti biologici e sanitari dei campi elettromagnetici	41
1.7 Effetti dei campi magnetici a bassa frequenza: studi su sistemi in vitro e in vivo	44
2. SCOPO DELLA TESI	49

3. MATERIALI E METODI	50
3.1 Colture cellulari	50
3.2 La bobina di Helmholtz e le procedure di esposizione ai campi elettromagnetici	52
3.3 Citofluorimetria	54
3.3.1 Protocollo sperimentale per gli studi di assorbimento della doxorubicina	59
3.4 Microscopio a fluorescenza	61
3.4.1 Protocollo sperimentale per gli studi di assorbimento della doxorubicina	64
3.5 Saggio della vitalità con trypan blue	65
3.6 Analisi statistica	66
4. RISULTATI	68
4.1 Verifica della proporzionalità tra concentrazioni di doxorubicina e l'intensità di fluorescenza emessa a tempo costante	68
4.2 Verifica della proporzionalità tra il tempo di esposizione e l'intensità di fluorescenza emessa alla concentrazione di 10 μM di doxorubicina	69

<i>4.3 Gli effetti del campo elettromagnetico 50 Hz, 1 mT nel modulare l'assorbimento e il rilascio della doxorubicina in cellule cancerose e non del dotto pancreatico, a 1 ora di trattamento</i>	71
<i>4.4 Gli effetti del campo elettromagnetico a 50 Hz, 1 mT nel modulare l'assorbimento e il rilascio della doxorubicina in cellule cancerose e non del dotto pancreatico, a 2 ore di trattamento</i>	78
<i>4.5 Il campo elettromagnetico a 50 Hz, 1 mT riduce l'ingresso della doxorubicina nelle due linee cellulari pancreatiche</i>	85
<i>4.6 Un minore assorbimento di doxorubicina nella cellula corrisponde effettivamente ad una minore mortalità cellulare</i>	88
5. DISCUSSIONI	92
6. BIBLIOGRAFIA	97

1. INTRODUZIONE

1.1 Patologie tumorali pancreatiche

Il cancro è uno dei principali problemi di salute mondiale per cui la ricerca scientifica ha effettuato, negli ultimi decenni, numerosi studi sperimentali sulle cause e sulle possibili terapie da poter mettere in atto. Sono stati raggiunti risultati promettenti riguardo la prevenzione e la cura, riducendo di molto i tassi di mortalità. Il tumore al pancreas rappresenta però una emergenza sanitaria in quanto, secondo il Recalcitrant Cancer Research Act, rientra nella categoria dei tumori più mortali avendo un tasso di sopravvivenza di cinque anni pari al 6% seguito da cancro al polmone (16,6%), fegato (18%), esofago (19%), stomaco (29%), cervello (35%), ovaia (44%) e da mieloma multiplo (45%) [1]. Una prognosi estremamente sfavorevole, infatti, è associata al cancro al pancreas, di solito viene diagnosticato in stadi troppo avanzati e ciò è spesso dovuto ad assenza di sintomi, mancanza di marcatori tumorali sensibili e specifici e alla difficoltà nell'imaging dei tumori in stadio iniziale. A partire dagli anni '80, in Europa, il cancro al pancreas ha mostrato un aumento del tasso di mortalità del 3,9% nelle donne e una diminuzione del solo 0,5% negli uomini, contrariamente ad altri tumori (stomaco, polmoni e seno) in cui invece il tasso di mortalità è sceso di molto [2]. Ogni anno le morti per cancro al pancreas in tutto il mondo sono 200000 e si prevede che sarà la seconda causa di morte per

cancro negli Stati Uniti entro il 2030 [1]. In particolare, gli afroamericani hanno un'incidenza superiore del 30-50% rispetto ad altri gruppi etnici negli Stati Uniti [3]. Il tumore al pancreas, come altri tumori, deriva da un accumulo di mutazioni e alterazioni del genoma in un processo evolutivo di “malignità”, a partire da una cellula staminale adulta (CSA), fino a generare linee cellulari, in primo luogo capaci di autonomia proliferativa a livello locale, poi in grado di attuare infiltrazione locale e alla fine di invadere generando le metastasi [4]. Le mutazioni e le alterazioni coinvolgono specifici geni: gli oncogeni (promotori diretti della proliferazione cellulare e inibitori della apoptosi), i geni oncosoppressori (inibitori della proliferazione) e i geni stabilizzatori (riparatori dei danni genetici) [4]. La capacità di infiltrazione, propria delle neoplasie maligne, la distingue dalle benigne, che invece hanno solo capacità di crescita espansiva. Nelle neoplasie maligne la diffusione è dapprima locale, aggravata dall'infiltrazione, fino a raggiungere i vasi ematici, dove viaggia in forma di microemboli, i vasi linfatici o le cavità sierose con successiva diffusione a distanza (metastasi) [4]. Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e l'interleuchina 8 (IL-8), sono le principali molecole angiogeniche che consentono la vascolarizzazione dello stroma del tumore pancreatico [5]. L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) è la neoplasia più comune e aggressiva derivante dal pancreas, i meno frequenti sono i tumori

neuroendocrini, le neoplasie solide pseudopapillari, i pancreatoblastomi, i carcinomi acinosi e i carcinomi colloidali (Fig.1).

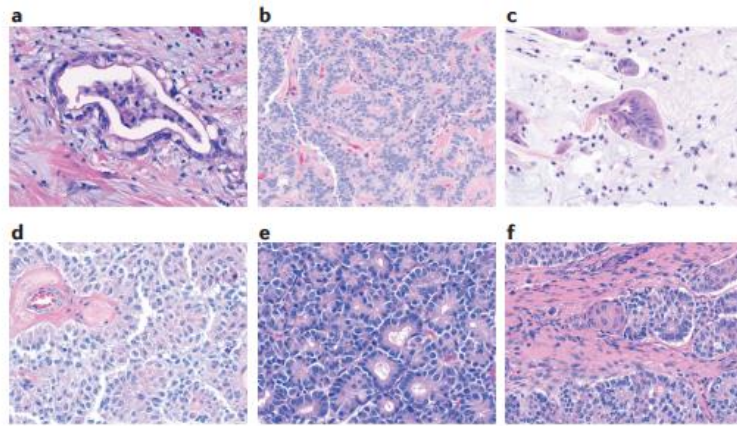


Fig.1: Rappresentazione istologica dei più comuni tipi di cancro al pancreas [3].

L'adenocarcinoma pancreatico (Fig.1-a) che si verifica nel 90% dei casi, si trova nella testa del pancreas nel 60-70% dei pazienti, nel 10-20% nel corpo e nel 5-10% nella coda. Questi tumori sono solidi, derivati da cellule neoplastiche che si sono infiltrate nei tessuti formando ghiandole e si diffondono lontano dal tumore primario. I tumori neuroendocrini pancreatici (Fig.1-b) sono la seconda neoplasia più comune, rappresentano l'1-5% di tutti i tumori pancreatici, con un tasso di mortalità del 60% e potrebbero insorgere come parte di sindromi ereditarie. Possono essere funzionanti o non funzionanti a seconda che diano sintomi precoci per l'eccessiva produzione di ormoni, o ritardati, quando il tumore è molto esteso. I carcinomi colloidali (Fig.1-c) insorgono quasi sempre in associazione con la neoplasia mucinosa papillare intra-duttale (IPMN), ed

hanno una prognosi migliore. E' composta da cellule neoplastiche che galleggiano in "pozze" di mucina. Le neoplasie solide pseudopapillari (Fig.1-d) rappresentano l'1-2% dei tumori pancreatici primari. Questo tipo si presenta come un tumore maligno eterogeneo di basso grado con componenti solide, cisti ed è frequente nelle giovani donne. Il carcinoma a cellule acinose (Fig.1-e) del pancreas rappresenta l'1% delle neoplasie pancreatiche mentre il pancreatoblastoma (Fig.1-f) rappresenta lo 0,2% e si verifica soprattutto nei bambini [3]. Il carcinoma acinoso e il pancreatoblastoma sono tumori solitamente solidi, ed entrambi sono composti da cellule neoplastiche con differenziazione simile alla quelle che producono enzimi esocrini [6].

1.1.1 Microambiente dell'adenocarcinoma duttale

L'adenocarcinoma duttale del pancreas (PDAC) è diverso da altri tumori solidi a causa della reazione desmoplastica, uno stroma di collagene abbondante e denso, che avvolge le cellule maligne. Questo stroma contiene una componente proteica e una cellulare [3]. La componente cellulare è costituita dalle cellule immunitarie e dalle pancreatic stem cells (Pasc) nello stato attivato di miofibroblasti (Fig.2). Le cellule immunitarie consistono principalmente di mastociti, macrofagi, alcuni linfociti e plasmacellule che si accumulano ai bordi periferici del tumore e hanno la funzione di regolare l'angiogenesi e di sorveglianza immunitaria. Ci sono poi le cellule T-antigene specifiche nel

sangue periferico e nel midollo osseo che però non riescono ad agire sulla massa tumorale a causa della reazione desmoplastica. Le cellule stellate pancreatiche sono normalmente presenti nel pancreas a livello peri-acinare e peri-duttale in stato quiescente, con basso tasso di crescita e di produzione delle proteine ECM, fattori di crescita, citochine e chemochine. Durante il processo neoplastico vengono attivate attraverso l'esposizione a citochine e fattori di crescita probabilmente prodotti dalle cellule acinose, dalle cellule infiammatorie, dalle piastrine, dalle cellule endoteliali, dalle cellule cancerose e dalle stesse PaSC. Nello stato attivato producono le proteine della ECM e quindi inducono la crescita del tumore ma anche la proliferazione, la migrazione e l'invasione delle cellule cancerose [7].

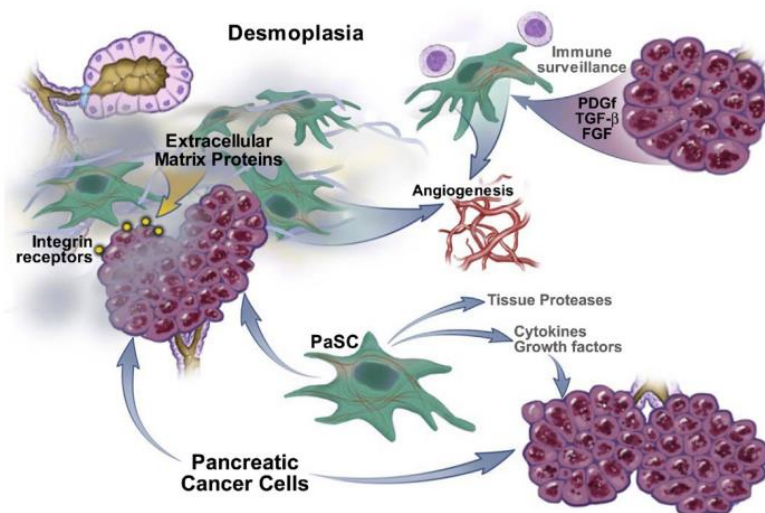


Fig.2: Componenti della desmoplasia in PDAC [7].

1.1.2 Fattori di rischio

Ad oggi le conoscenze riguardo le cause del cancro al pancreas non sono ancora sufficientemente note nonostante alcuni fattori di rischio siano stati identificati. Per tale ragione il tasso d'incidenza potrebbe attenuarsi mettendo in atto delle pratiche di prevenzione. Uno dei fattori prevenibili è il fumo di sigaretta che causa un aumento del rischio di cancro al pancreas del 75% rispetto ai non fumatori e il rischio persiste per almeno 10 anni dopo la cessazione del fumo. Lo studio europeo (EPIC) ha mostrato nel 2012 che il rischio aumentava ogni cinque sigarette fumate al giorno. Inoltre, lo stesso studio EPIC ha notato che il fumo passivo può aumentare il rischio di cancro al pancreas del 50% [8]. È interessante notare che il sequenziamento del genoma del cancro del pancreas ha rivelato che i pazienti fumatori hanno più mutazioni somatiche rispetto ai pazienti non fumatori [6]. Il rischio di sviluppare il cancro al pancreas aumenta con l'età, oltre l'80% dei tumori pancreatici si sviluppa tra i 60 e gli 80 anni [8]. Ritornando alle abitudini da modificare, in un ampio studio di coorte del Regno Unito nel 2016, i mangiatori di poca carne (circa il 30% -45% di mortalità inferiore), così come i vegetariani e i vegani (circa il 50% di mortalità inferiore) avevano una mortalità più bassa per il cancro al pancreas rispetto ai mangiatori di carne abituali [8], ed è stato inoltre dimostrato che l'elevato consumo di grassi saturi, di carne rossa e lavorata e il basso apporto di frutta e verdura sono

una fonte di rischio [6]. E' stato osservato che il consumo eccessivo di alcol è correlato all'incidenza del tumore, mentre l'assunzione moderata di alcol non induce un aumento del rischio [6]. A conferma di ciò è stato visto che il profilo d'espressione genica e la quantità e il tipo di collagene nella desmoplasia PDAC sono simili a quelli trovati nella pancreatite cronica alcolica [7]. L'obesità è associata all'incidenza del cancro pancreatico e l'alto indice di massa corporea e la distribuzione centralizzata del grasso possono aumentarne il rischio [9]. Il diabete mellito può essere un fattore di rischio oltre che una conseguenza della malattia, infatti i pazienti diabetici hanno una possibilità del 30% di sviluppare un tumore per più di 20 anni dopo la diagnosi [10]. Infine il rischio di cancro al pancreas è correlato ad una componente ereditaria, diversi studi hanno dimostrato che il 10% dei pazienti ha una storia familiare di adenocarcinoma duttale del pancreas. Alcune sindromi genetiche germinali sono state associate ad un aumentato rischio di sviluppare questa neoplasia. Fra queste, le mutazioni nel gene BRCA2 caratterizzano il cancro familiare del pancreas, il ruolo del mutante BRCA1 rimane incerto, mentre le mutazioni ereditarie nei geni oncosoppressori BRCA2 e BRCA1 sono associate a un elevato rischio di cancro della mammella e dell'ovaio. Mutazioni in PRSS1 e SPINK1 sono la causa della rara forma di pancreatite, la pancreatite ereditaria. I pazienti con queste alterazioni hanno una probabilità del 30-40% di sviluppare

il cancro. Gli individui con Sindrome di Lynch, una malattia causata da mutazioni germinali nei geni che codificano per proteine di riparazione del mismatch del DNA, sono caratterizzati da un tumore del colon a esordio precoce e presentano un rischio elevato di vari tipi di cancro, tra cui il cancro del pancreas [6,11].

1.1.3 Trattamento e strategie sperimentali

Le cure di elezione per il cancro al pancreas sono: chemioterapia, radioterapia, resezione chirurgica e cure per alleviare il dolore. In base alla sua estensione al momento della diagnosi, può essere classificato come localizzato o metastatico. I tumori pancreatici localizzati possono essere classificati in resecabili, potenzialmente resecabili, borderline e localmente avanzati a seconda del grado di estensione locale che potrebbe coinvolgere la vena mesenterica o portale e l'arteria gastroduodenale ed epatica. Secondo le situazioni che si presentano gli interventi possono essere diversi, ricordiamo però che la resezione chirurgica è l'opzione che prolunga la vita rispetto agli altri trattamenti con tassi di sopravvivenza a 5 anni del 20%. Tuttavia, solo il 10-20% dei pazienti presenta malattie resecabili e l'80% di questi casi è sottoposto a una recidiva nonostante la resezione del tumore e la terapia adiuvante. La resezione del tumore spesso non risolve il problema poiché si possono presentare delle recidive con

sopravvivenza simile ai pazienti inoperabili a causa della presenza di metastasi primitive nascoste o non completa resezione del tumore.

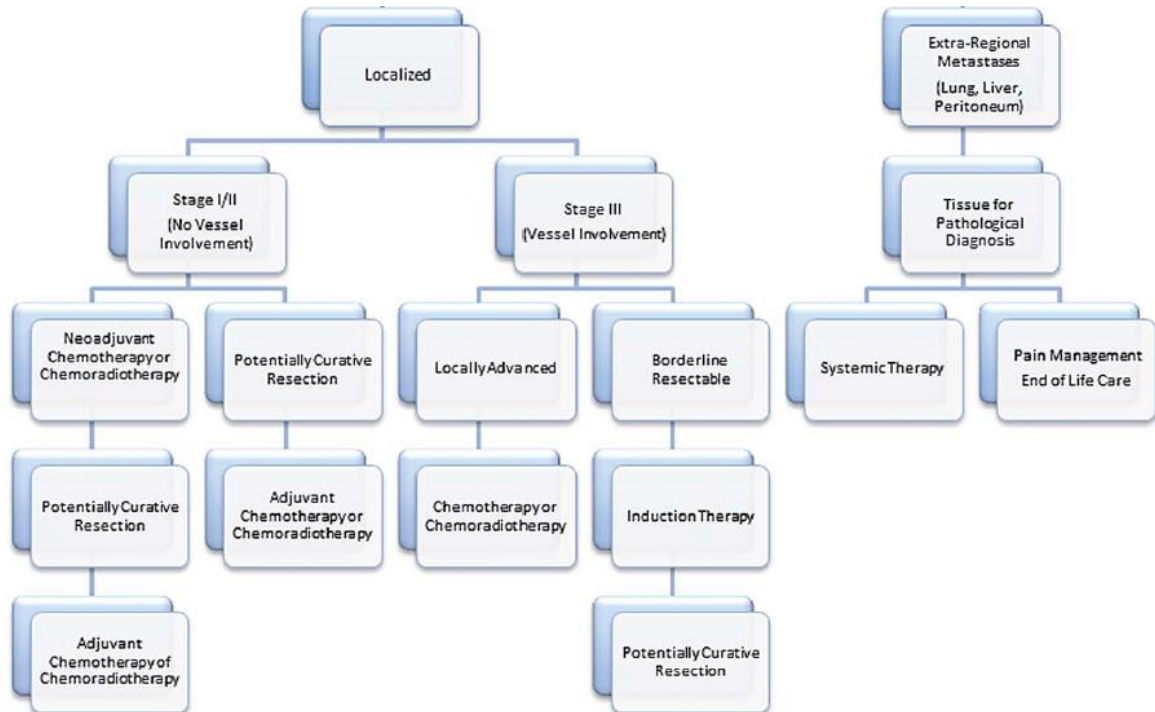


Fig.3: Approccio generale al cancro pancreatico [6].

Per l'intervento chirurgico i pazienti vengono selezionati e i criteri principali sono: l'età, non superiore ai 75 anni, l'assenza di patologie concomitanti e livelli sierici bassi dei biomarker CA19-9 e SMAD4 [3, 6, 11]. La sola chirurgia è associata a una scarsa sopravvivenza quindi molto importante è la terapia adiuvante con gemcitabina o 5-fluorouracile, farmaci di elezione per il cancro al pancreas, che viene iniziata 1-2 mesi dopo la resezione allungando la sopravvivenza dei pazienti. Per i pazienti con carcinoma metastatico la durata media di vita è di 5-9 mesi di conseguenza le cure servono per aumentare la

sopravvivenza e diminuire il dolore. Quello che si fa è utilizzare solitamente una terapia di combinazione, che allunga la sopravvivenza, sia per la chemioterapia di prima linea che di seconda linea, ma essendo terapie più tossiche per gli anziani viene usata la sola gemcitabina [12]. Guardando i dati statistici di pazienti affetti da cancro al pancreas è facile intuire che bisogna trovare nuove strategie per combattere questa patologia. Sono stati prodotti farmaci che andavano ad intaccare i pathway specifici delle cellule staminali in quanto coinvolte nella iniziazione di nuovi focolai tumorali e recidive così come nella resistenza alla chemioterapia in quanto capaci di auto-rinnovarsi, ma sono risultati fallimentari [13]. Nel corso degli ultimi decenni diversi studi sperimentali sono stati effettuati per migliorare la specificità dei chemioterapici e l'assorbimento da parte delle cellule neoplastiche. In uno studio del 2016 hanno scoperto che il trattamento di cellule cancerose pancreatiche con liposomi PEG-ilati che trasportavano curcumina comportava una maggior morte cellulare attraverso l'attivazione della caspasi 3/7 e l'aumento di ROS intracellulari con conseguente apoptosi. La curcumina si ottiene dal rizoma essiccato e macinato della pianta di *Curcuma longa* e nel corso degli anni è stato dimostrato possedere potenti proprietà antinfiammatorie, antiossidanti e antitumorali con bassa citotossicità [14]. Un lavoro più recente, del 2018, mostra che la curcumina in associazione con un campo elettrico pulsato non

invasivo determina un aumento di assorbimento tramite elettro-endocitosi, inibisce la proliferazione e induce apoptosi in cellule cancerose PANC-1. E' molto interessante perché è un metodo non invasivo che aumenta l'efficacia terapeutica minimizzando gli effetti collaterali [15]. Quest'ultimo approccio fa parte di un campo di ricerca che si sta sviluppando negli ultimi anni e che sta ottenendo risultati promettenti. Un ulteriore studio pubblicato nel 2019 cerca di superare il problema della resistenza e degli effetti collaterali della gemcitabina (gem) utilizzando nanoparticelle magnetiche di ossido di ferro (MF66) coniugate con la gemcitabina e/o NucAnt (N6L) in associazione all'ipertermia magnetica (43 ° C per 60 min) per trattare cellule bxPC3 e PANC-1 e modelli in vivo. N6L determina la specificità di assorbimento riconoscendo la nucleolina over-espressa sulla superficie delle cellule tumorali e riesce così ad entrare nel nucleo. I risultati dimostrano che in queste condizioni c'è una diminuzione della proliferazione cellulare e un aumento di morte cellulare in vitro. In modelli murini con xenotrapianto di cellule tumorali il trattamento con le nanoparticelle MF66-Gem, MF66-N6L e MF66-N6L-Gem con ipertermia comporta una riduzione in 28 giorni della massa tumorale [16]. Per ovviare al problema della radio e chemio-resistenza si utilizza la terapia fotodinamica ma quest'ultima genera ipossia che attiva il fattore di trascrizione HIF-1 α che over-esprime VEGF, di conseguenza questa terapia può comportare una recidiva

post trattamento. In un recente studio hanno utilizzato liposomi coniugati con una sostanza fotosensibilizzante e anticorpi monoclonali verso VEGF con efficiente trasporto dell'anticorpo al bersaglio e aumentata citotossicità in vitro in cellule tumorali pancreatiche e diminuzione della massa tumorale in modelli murini con adenocarcinoma duttale subcutaneo [17]. Un altro studio utilizza invece un copolimero cationico per adsorbire sulla superficie si-Rna per HIF-1a e incapsulare nel nucleo idrofilo il farmaco gemcitabina ricoperto con doppio strato fosfolipidico. HIF-1a è coinvolto nella chemio-resistenza e nella crescita tumorale. E' stata dimostrata una ridotta crescita cellulare in vitro in cellule PANC-1 così come una riduzione della massa tumorale in modelli murini con trapianto sottocutaneo e ortotopico di cellule PANC-1, con riduzione della metastasi in quest'ultimo caso [18].

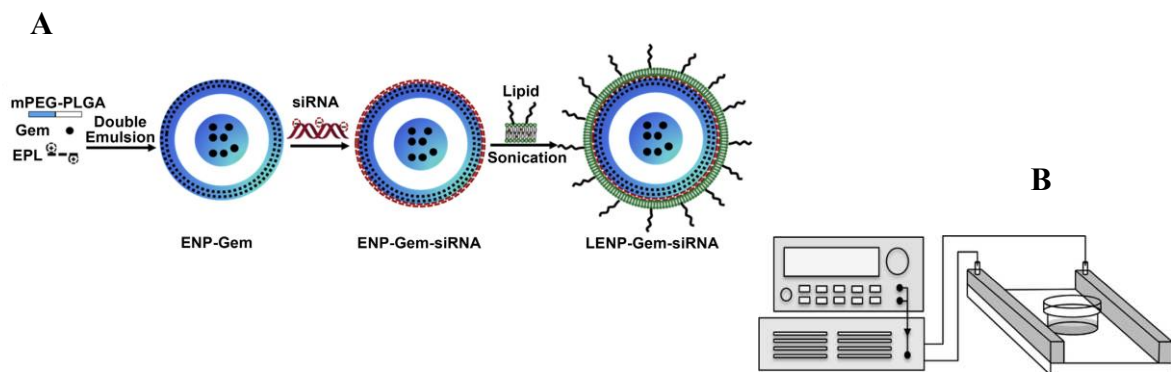


Fig.4: A) Struttura per la co-somministrazione di si-HIF1a e gem [18], B) schema per l'esperimento con curcumina e campo elettrico pulsato [15].

1.2 Doxorubicina

La doxorubicina è un farmaco antineoplastico, della famiglia delle antracicline abitualmente utilizzato nel trattamento di diversi tipi di cancro tra cui quello al seno, al polmone, gastrico, ovarico, alla tiroide, per il linfoma di non Hodgkin e di Hodgkin, per il mieloma multiplo, per il sarcoma e i tumori pediatrici [19].

Le prime Antracicline isolate sono la doxorubicina (DOX) e la daunorubicina (DNR). Appartengono a questa famiglia anche l'epirubicina e l'idarubicina, sintetizzate successivamente a partire dalle prime due, e sono tra i farmaci antitumorali più efficaci nella terapia di molti tumori umani. Tutte hanno in comune il sistema policiclico a 4 anelli 7,8,9,10-tetraidrotetracene-5,12-chinone, ma differiscono per i residui R1, R2, e R3. In particolare DOX e DNR, dal punto di vista strutturale, hanno in comune una porzione agliconica e una porzione glucidica. L'aglicone è una struttura di 4 anelli condensati chiamata tetracena, presenta un chinone sull'anello C adiacente a un idrochinone sull'anello B. Contiene inoltre un gruppo metossile sul C-4, nell'anello D, e una piccola catena al C-9 contenente un gruppo carbonilico. Lo zucchero, chiamato daunosammina, è attaccato tramite legame glicosidico al C-7, all'anello A, ed è costituito da una porzione 3-ammino-2,3,6-trideossi-L-fucosilica. L'unica differenza tra DOX e DNR è che la catena laterale nel C-9 termina, per la prima, con un gruppo ossidrilico alcolico primario -CH₂OH mentre l'altra termina con

un semplice metile (Fig.5) [20]. Questa differenza cambia lo spettro di azione, infatti per la DNR è più ristretto e agisce nelle leucemie acuto-linfoblastiche o mieloblastiche [21].

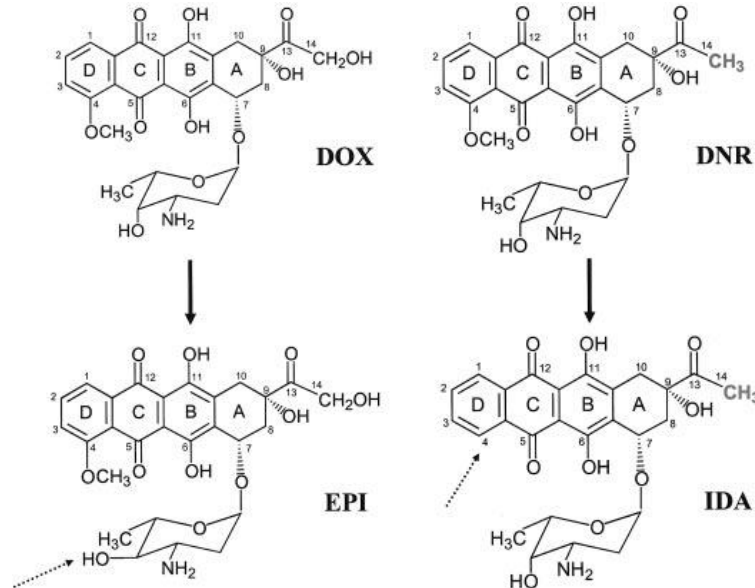


Fig.5: Struttura di doxorubicina (DOX), daunorubicina (DNR) e le modificazioni strutturali per la formazione di epirubicina (EPI) e idarubicina (IDA) [20].

L'epirubicina è un derivato semisintetico della doxorubicina, ottenuto tramite epimerizzazione da assiale ad equatoriale del gruppo idrossilico al C4' della daunosamina (Fig.5). L'Idarubicina invece deriva dalla daunorubicina per eliminazione del gruppo metossilico al C4 (Fig.5) [20].

1.2.1 Biosintesi

La biosintesi delle due principali molecole di questa famiglia avviene ad opera di un genere di Attinomiceti, batteri gram-positivi aerobi che formano un micelio vegetativo molto ramificato e spesso pigmentato. La doxorubicina è

stata isolata per la prima volta nel 1967 da *Streptomyces peucetius* variante *caesius* [22] e introdotta negli Stati Uniti nel 1974 sotto il nome di Adriamicina [23]. La biosintesi, schematizzata in figura 6, parte dal propionil coenzima A (propionil-CoA) che funge da primo substrato per una serie di 9 condensazioni del malonil-CoA. A questo punto una 9-chetoriduttasi innesca la chiusura dei successivi cicli fino all'antrachinone acido alklanonico. L'acido carbossilico viene esterificato e i quattro anelli vengono processati da una semplice reazione aldolica. L'ammino-zucchero L-daunosaimina viene dal TDP glucosio (timidina difosfoglucosio) e viene introdotto alla fine della sintesi. L'idrossilazione per passare dalla daunorubicina alla doxorubicina è proprio l'ultimo stadio [24].

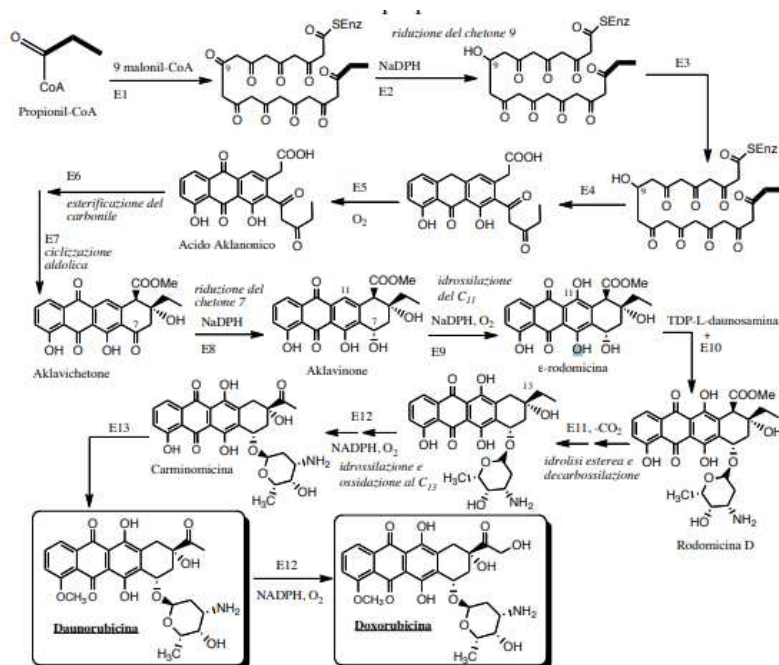


Fig.6: Schematizzazione della biosintesi della doxorubicina e della daunorubicina negli *Streptomyces* [24].

1.2.2 Meccanismo di azione e metabolismo

Nonostante il largo impiego della doxorubicina, i meccanismi di azione nelle cellule tumorali non sono ancora del tutto chiariti. Sono stati ipotizzati, mediante diversi studi, i seguenti meccanismi di azione: 1) legame al DNA con conseguente inibizione della sintesi di macromolecole, 2) generazione di radicali liberi che danneggiano il DNA o causano perossidazione dei lipidi di membrana, 3) inibizione della Topoisomerasi II eucariotica e conseguente induzione dell'apoptosi 4) interazione con i proteasomi citoplasmatici per il trasporto nucleare.

In breve, la doxorubicina viene ossidata a semichinone, un metabolita instabile, che viene riconvertito in doxorubicina in un processo che rilascia specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le specie reattive dell'ossigeno possono portare alla perossidazione lipidica e al danneggiamento della membrana, al danno al DNA, allo stress ossidativo e scatenare le vie apoptotiche della morte cellulare. I geni candidati che possono modulare questa via coinvolgono quelli capaci della reazione di ossidazione (NADH deidrogenasi, ossido nitrico sintasi, xantina ossidasi) e quelli capaci di disattivare i radicali liberi come glutazione perossidasi, catalasi e superossido dismutasi [19]. Il semichinone può formarsi anche tramite riduzione mediante l'aggiunta di un elettrone alla porzione chinonica dell'anello C (Fig.7), catalizzata da una serie di NADPH

ossidoreduttasi. Una parte però di questo prodotto può essere ossidata a livello del legame tra l'anello A e la daunosamina con conseguente deglicosilazione riduttiva e formazione di 7-deossiaglicone. A causa della loro aumentata solubilità lipidica, gli agliconi si intercalano nella membrana biologica e formano ROS nelle immediate vicinanze dei bersagli sensibili [20]. Il processo metabolico di elezione è la riduzione a due elettroni della doxorubicina a doxorubicinolo, un alcool secondario, tramite enzimi specifici dei vari tessuti [20].

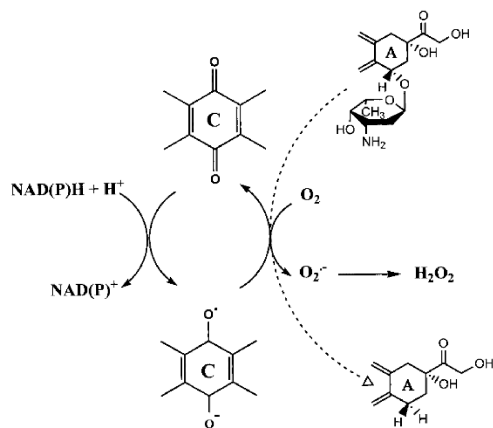


Fig.7: Riduzione ad un elettrone [20].

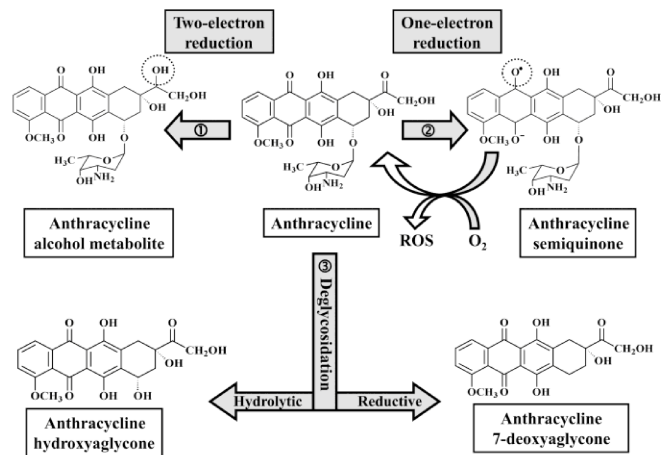


Fig.8: Metabolismo della doxorubicina [21].

In alternativa, la doxorubicina può entrare nel nucleo e “avvelenare” la topoisomerasi-II, provocando anche danni al DNA e morte cellulare [19]. Gli inibitori delle DNA topoisomerasi definiti come “veleni” portano alla morte cellulare mediante l'intrappolamento del “cleavage complex” costituito dal

legame enzima / DNA. La sensibilità delle cellule ai veleni aumenta con un sovra-espressione delle DNA topoisomerasi, mentre la riduzione della loro espressione è la principale causa di resistenza, come infatti accade nelle cellule tumorali [20]. Attualmente si sa che le antracicline, dopo essersi intercalate, tramite gli anelli planari, nella doppia elica, vanno a localizzarsi all'interfaccia tra il sito attivo della topoisomerasi II e il sito di cleavage del DNA stabilizzando questo complesso ternario in cui il DNA tagliato è legato covalentemente alle tirosine catalitiche dell'enzima. L'azione del farmaco pertanto porta a tagli irreversibili nel DNA che aprono la strada al programma di morte cellulare nelle cellule tumorali [20]. Inoltre c'è la possibilità che il farmaco induca l'interazione della proteina p53, molto espressa nei tumori, con la topoisomerasi II e inibisca la sua funzione ligasica [20]. La topoisomerasi II infatti rilassa sia i superavvolgimenti positivi che negativi durante la replicazione del DNA mediante rottura a doppio filamento in uno dei duplex e passaggio attraverso di essa di un'altra regione duplex, la rottura è poi risaldata. Un altro meccanismo ancora oggetto di studio coinvolge i proteasomi, complessi multiproteici presenti nelle cellule che attuano degradazione non lisosomica di polipeptidi all'interno della cellula. I proteasomi sono presenti nel nucleo e nel citoplasma ma le cellule trasformate ne hanno un forte accumulo nel nucleo. Secondo un recente studio i proteasomi trasporterebbero la doxorubicina nel

nucleo attraverso i pori nucleari, essa poi si dissocia dal proteasoma e interagisce col DNA a causa della sua maggiore affinità. Inoltre si è visto che il farmaco lega un sito allosterico del proteasoma che ha attività proteasica e quindi ne inibisce l'attività determinando un accumulo di proteine non differenziate che inducono apoptosi [20].

1.2.3 Effetti collaterali: la cardiotoxicità della doxorubicina

Una limitazione importante per l'uso di doxorubicina è la cardiotoxicità e la dose totale cumulativa è l'unico criterio attualmente utilizzato per prevedere la tossicità. La cardiotoxicità indotta dalla doxorubicina sembra essere un effetto di un processo multifattoriale, in particolare i meccanismi principali sono: lo stress ossidativo nei cardiomiociti e gli effetti deleteri del farmaco sulla bioenergetica mitocondriale. La produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) avviene in alcuni passaggi fondamentali richiesti per il metabolismo della doxorubicina. La riduzione della doxorubicina tramite l'aggiunta di un elettrone alla porzione chinonica dell'anello C genera un semichinone che rapidamente tende a tornare chinone rilasciando ROS, in special modo l'anione superossido (O_2^-), e perossido d'idrogeno (H_2O_2). L'anione superossido inoltre è talmente piccolo che riesce a penetrare nei canali transproteici della ferritina fino a raggiungere il nucleo di ossidrossido di ferro e avendo poi un potenziale di riduzione minore del nucleo di ferro (Fe) riduce il Fe (III) a Fe (II)

promuovendone il rilascio. Il ferro viene rilasciato in grandi quantità dunque la sua omeostasi alterata, inoltre reagendo con le specie reattive all'ossigeno ne amplifica le reazioni e le trasforma in radicali idrossido più potenti [20]. Studi recenti hanno anche ipotizzato un effetto contrario, trattando infatti cardiomiociti isolati con ferro legato alla transferrina, essa tramite specifici recettori viene internalizzata, il ferro rilasciato e depositato nella ferritina. Il ferro però viene rilasciato, in questo caso mediante l'azione di riduttori fisiologici (cisteine, flavina ridotta etc...), per sopperire alle esigenze metaboliche della cellula. Se le cellule sono trattate con la doxorubicina, la ferritina è modificata a livello post-traduzionale da O_2^- e non riesce più a far penetrare possibili riduttori, determinando un accumulo di Fe. Questo scenario opposto potrebbe indurre tossicità in quanto il ferro è essenziale nei processi di sintesi del DNA e del citocromo [20].

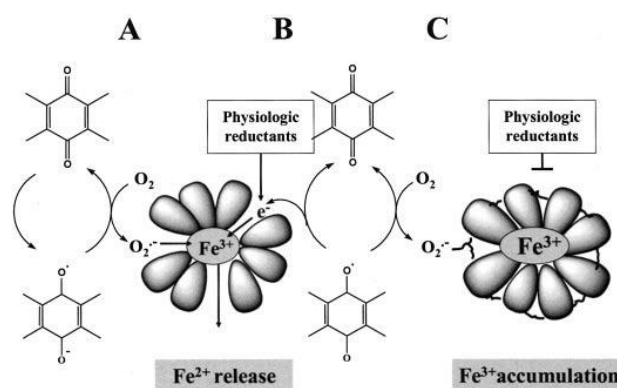


Fig.9: Doxorubicina e rilascio del ferro (A) vs accumulo del ferro (C). In (B) rilascio mediato da riduttori fisiologici [20].

Dalla doxorubicina inoltre si può formare idrossiaglicone (deglicosidazione idrolitica) o deossiaglicone (deglicosidazione riduttiva) che avendo più solubilità lipidica si inseriscono nella membrana mitocondriale, a livello della catena di trasporto degli elettroni, e determinano la formazione degli anioni superossido in prossimità di bersagli sensibili, causando disfunzione mitocondriale. Infine la doxorubicina può essere ridotta, mediante l'aggiunta di due elettroni all'anello C, a doxorubicinolo (DOXolo), un alcool secondario, che si accumula nel cuore e interferisce con i processi di omeostasi del ferro regolati dalla proteina I regolatrice del ferro aconitasi (ACO1) citoplasmatica contenente un cluster ferro-zolfo (4Fe-4S) inducendo il rilascio dei 4 atomi di ferro. Il rilascio del ferro comporta la perdita dell'attività propria dell'enzima che ne acquisisce un'altra, si lega ai domini IRE (Iron Responsive Element) degli RNA messaggeri del recettore per la transferrina e della proteina ferritina inducendo la stabilità del primo e una riduzione di traduzione del secondo. In questo modo viene aumentato il pool di ferro libero anche quando effettivamente non ce n'è bisogno e anche qui l'omeostasi del ferro viene alterata. Il doxorubicinolo inoltre inibisce l'ATPasi $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ del reticolo sarcoplasmatico, la pompa protonica fo-f1 dei mitocondri, l'ATPasi Na^+ / K^+ e lo scambiatore $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ del sarcolemma. DOXol diminuisce anche l'espressione genica dell'ATPasi di trasporto di Ca^{2+} (SERCA2) e del canale per

il rilascio del calcio cardiaco (RyR2) del reticolo sarcoplasmatico. In questo modo il DOXolo può influenzare il metabolismo energetico del miocardio, i gradienti ionici e i movimenti di Ca^{2+} , compromettendo in ultima analisi la contrattilità cardiaca [21]. Il trattamento con DOX, inoltre, può anche aumentare la produzione di ossido nitrico (NO) mediante l'up-regolazione dell'espressione dell'isoforma inducibile di NO sintasi (iNOS). La sovra produzione concomitante di O_2^- e NO produce specie reattive all'azoto (RNS) e, in particolare, perossinitrito (ONOO^-) un potente ossidante che può danneggiare direttamente ogni tipo di macromolecole cellulare, risultante nella perossidazione lipidica, nelle modificazioni covalenti delle proteine e nelle rotture del filamento del DNA [21]. I cardiomiociti sono più sensibili delle altre cellule ai danni ossidativi e nitrosanti per le deboli difese antiossidanti dovute al loro basso contenuto di catalasi, superossido dismutasi e glutazione perossidasi. Inoltre, l'amministrazione di DOX diminuisce effettivamente l'attività della superossido dismutasi e della glutazione perossidasi [21].

1.2.4 Assorbimento nelle cellule

Le vie di ingresso dei farmaci antineoplastici, in particolare delle antracicline, sono ancora in fase di studio. La doxorubicina è instabile a pH acido, non è assorbita a livello gastrointestinale, irrita i tessuti con la quale viene in contatto perciò è somministrata per via endovenosa. La via principale di ingresso in una

cellula cancerosa è la diffusione passiva attraverso la membrana plasmatica della forma non carica del farmaco, che è moderatamente lipofila ed è una base debole con un pKa di 8,3 [25]. La doxorubicina può anche entrare tramite SLC22A16, membro della famiglia di trasportatori di cationi organici che oltre al trasporto di L-carnitina media anche l'ingresso di doxorubicina nelle cellule [26, 27]. Per l'efflusso dalla cellula invece ci sono diverse pompe ATP dipendenti, una over-espressa in molti tumori è la glicoproteina P (Pgp, ABCB1 / MDR1), codificata dal gene umano MDR1, che appartiene alla famiglia di trasportatori (ABC) che legano l'adenosina trifosfato (ATP). La Pgp, una glicoproteina di membrana integrale (170 kDa), ha la capacità di conferire un fenotipo a resistenza multipla (MDR) nelle cellule. Questa pompa di efflusso ATP-dipendente è coinvolta nella resistenza crociata ad una varietà di agenti citotossici strutturalmente non correlati. I substrati trasportati dalla Pgp includono farmaci antitumorali doxorubicina, Vinblastina, Etoposide e Taxolo [28].

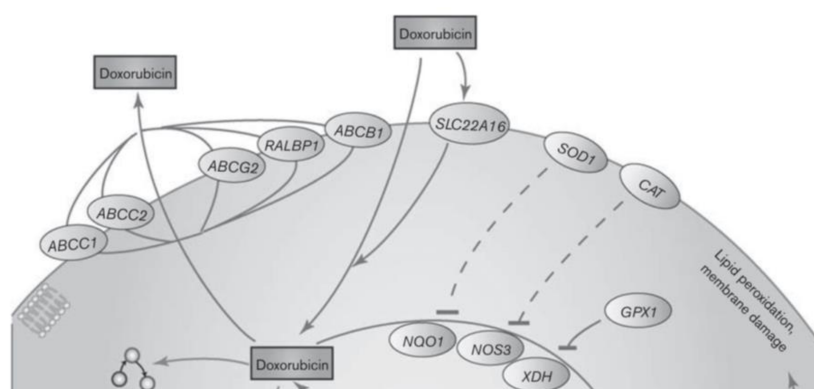


Fig.10: Rappresentazione dell'assorbimento e del rilascio della doxorubicina [19].

La doxorubicina inoltre possiede una naturale fluorescenza che permette di monitorarne l'accumulo intracellulare. La doxorubicina è una molecola anfifilica con un gruppo idrofobico policiclico, dove appunto troviamo il cromoforo antrachinone responsabile della fluorescenza, e con un gruppo idrofilo amminoglicosilico.

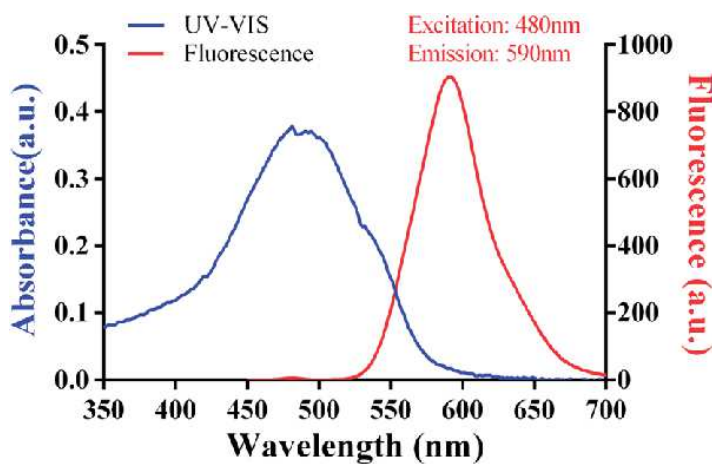
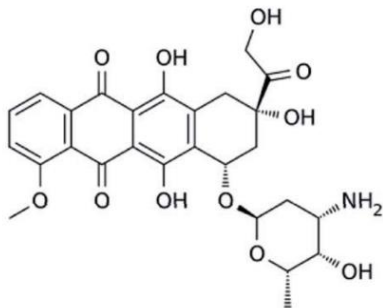


Fig.11: Struttura doxorubicina [29].

Fig.12: Caratteristiche della fluorescenza e

spettro UV-VIS della doxorubicina [29].

Le caratteristiche di fluorescenza e lo spettro UV-VIS della doxorubicina sono mostrati in Fig. 12 e la sua struttura molecolare è mostrata in Fig. 11. Il massimo assorbimento di DOX è a 495 nm e le lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione sono 495 e 595 nm, rispettivamente [29].

1.3 Il campo elettromagnetico

Il campo elettromagnetico nasce dalla combinazione del campo elettrico e del campo magnetico ed è generato localmente da qualsiasi distribuzione di carica elettrica variabile nel tempo. Nella storia, a partire dal concetto di campo elettrico e magnetico, si è arrivati all'elettromagnetismo e alle equazioni di Maxwell che Einstein definì l'avvenimento più importante verificatosi nel campo della fisica dall'epoca di Newton.

Il campo elettrico è un campo di forze generato nello spazio dalla presenza di una o più cariche elettriche o di un campo magnetico variabile nel tempo. Per quanto riguarda il primo punto: data una carica di prova q posta in un campo elettrico E generato da una carica Q , si definisce campo elettrico il rapporto tra la forza elettrica che si instaura tra la carica di prova q e la carica sorgente Q e la carica di prova stessa

$$\vec{E} = \frac{\vec{F}}{q}$$

Da una serie di relazioni matematiche si evince che il vettore campo Elettrico è indipendente dalla carica di prova q ma dipende unicamente dalla carica generatrice Q che crea il campo e dalla distanza r del punto P , in cui si trova q , dalla carica Q .

Il campo elettrico viene rappresentato mediante linee di campo, tangenti al vettore che rappresenta il campo, orientate nel verso del vettore campo elettrico e la loro densità è direttamente proporzionale all'intensità del campo elettrico.

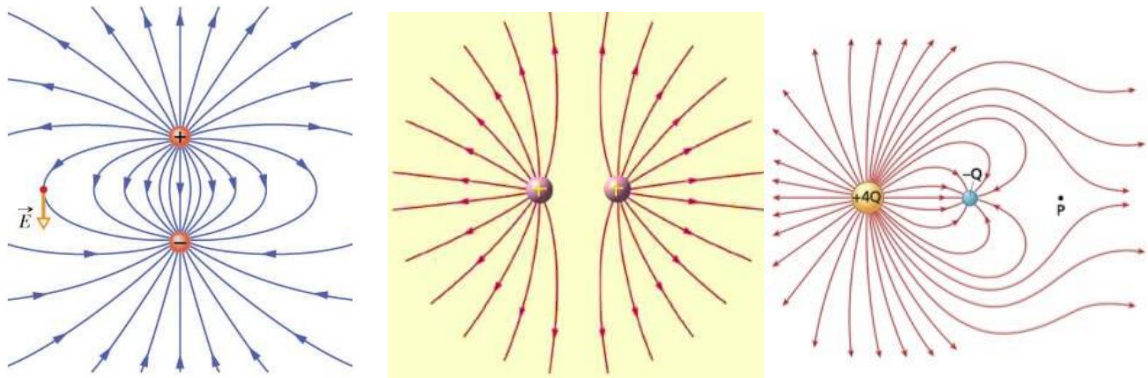


Fig.13: Tre diversi casi di linee di campo generato da due cariche.

Il campo magnetico invece è un campo vettoriale generato nello spazio dal moto di una carica elettrica o da un campo elettrico variabile nel tempo. La direzione e il verso di un campo magnetico in ogni punto dello spazio sono quelli indicati dal polo nord di un ago magnetico posto in quel punto. Questo concetto nasce già nell’XI secolo quando i cinesi scoprirono che un sottile ago di magnetite, sospeso al centro in modo che possa ruotare, tende a disporsi in modo da puntare verso il nord geografico e costruirono le prime bussole da utilizzare nella navigazione.

Abbiamo visto che le cariche elettriche in quiete esercitano forze su altre cariche in quiete ma è esperienza comune che, se si avvicinano due magneti (calamite), essi esercitano delle forze reciproche, attraendosi o respingendosi. In analogia con quanto detto per il campo elettrico, possiamo allora affermare che un magnete genera nello spazio un campo magnetico.

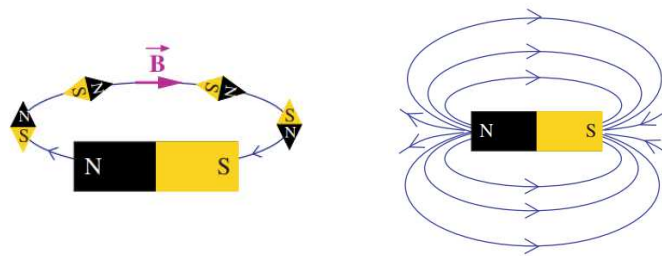


Fig.14: Campo magnetico vettoriale B tangenziale alle linee di campo del magnete [30].

Un esperimento che diede inizio al concetto di elettromagnetismo fu quello del 1820, quando il chimico e fisico danese Hans Christian Oersted scoprì che se all'ago di una bussola, inizialmente allineato con il campo magnetico terrestre, si avvicina un circuito in cui passa una corrente elettrica, esso si sposta. Questo semplice esperimento dimostrò che esiste una relazione tra i fenomeni elettrici e quelli magnetici. Come dicevo questa scoperta è alla base della teoria dell'elettromagnetismo che fu sviluppata nel corso degli anni con il contributo di molti grandissimi scienziati, quali A.M. Ampère, C.F. Gauss, J.B. Biot, F. Savart, M. Faraday, i cui studi e risultati furono riepilogati da James Clerk Maxwell, fisico scozzese, nelle famose equazioni che portano il suo nome [30].

Le equazioni di Maxwell sono 4: la prima descrive il campo elettrico generato da cariche ferme, secondo la legge di Coulomb; la seconda stabilisce che non esistono cariche magnetiche isolate, diversamente da quanto accade per le cariche elettriche, ma che il polo nord di un magnete è sempre legato a un polo sud, infatti ogni volta che si spezza un magnete, si formano due nuovi magneti, ciascuno con un polo nord e un polo sud. La terza equazione di Maxwell esprime la legge dell'induzione elettromagnetica di Faraday-Neumann, secondo cui un campo magnetico variabile nel tempo produce un campo elettrico. La quarta equazione di Maxwell afferma che una qualsiasi corrente genera un campo magnetico, sia una corrente continua sia un campo elettrico variabile nel tempo. Maxwell nei suoi ragionamenti intuì che un campo elettrico variabile genera un campo magnetico variabile, l'oscillazione di uno genera l'oscillazione dell'altro e così via, il tutto a una velocità che Maxwell calcolò pari alla velocità della luce ($c = 299\,792\,458\text{ m/s}$). Tale oscillazione si propaga nello spazio come un'onda trasversale sinusoidale, l'onda elettromagnetica, in cui il campo elettrico E e il campo magnetico B sono perpendicolari tra di loro e perpendicolari alla direzione di propagazione dell'onda (Fig.15). Il Campo magnetico nella S.I si misura in Ampere al metro (A/m) però in genere viene usata un'altra grandezza a questa collegata, la

densità di flusso magnetico o induzione magnetica, misurata in micro Tesla o suoi sottomultipli come il milli Tesla (mT) o micro Tesla (μT).

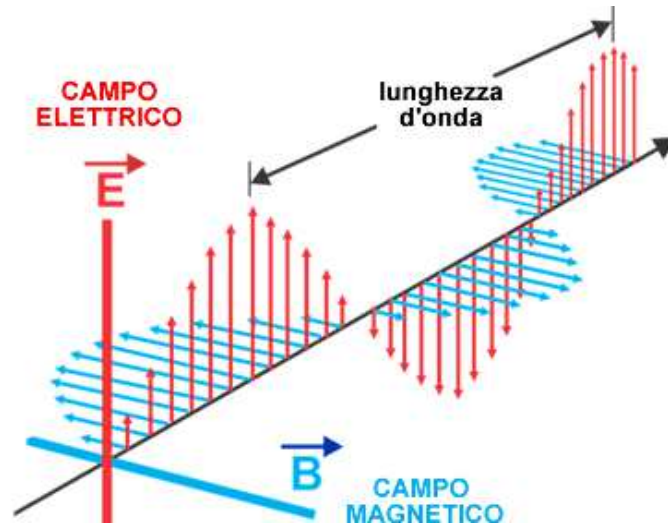


Fig.15: Rappresentazione dell'onda elettromagnetica.

I campi elettromagnetici come tutti i fenomeni oscillatori possono essere descritti dalle comuni grandezze fisiche che caratterizzano la propagazione di un'onda. Le grandezze caratteristiche di un'onda elettromagnetica sono due: la frequenza e la lunghezza d'onda. La frequenza (ν) misurata in Hz (s^{-1}), rappresenta il numero di periodi che l'onda compie nell'unità di tempo. Il periodo (T), misurato in secondo (s), rappresenta il tempo che l'onda impiega per compiere un'oscillazione completa e tornare alla condizione iniziale. La lunghezza d'onda (λ), misurata in metri (m), invece rappresenta la distanza tra punti equivalenti di una forma d'onda e cioè la distanza tra due massimi o due minimi (anche dette creste o valli) dell'oscillazione. La relazione che lega frequenza e lunghezza d'onda è la seguente: $\lambda=c/\nu$, dove c è la velocità della

luce nel vuoto. Questa relazione stabilisce una proporzionalità inversa tra frequenza e lunghezza d'onda di una radiazione elettromagnetica per cui al crescere della frequenza diminuisce la rispettiva lunghezza d'onda. Dato che la frequenza è inoltre legata all'energia E per mezzo della nota equazione di Planck ($E=hf$) si capisce come l'energia di una radiazione elettromagnetica aumenta all'aumentare della frequenza e al diminuire della sua lunghezza d'onda. Le onde elettromagnetiche si propagano anche nello spazio vuoto e in base alla frequenza e alla lunghezza d'onda, vengono classificate e suddivise nelle varie categorie di onde che formano lo spettro elettromagnetico (tabella 1).

DENOMINAZIONE		SIGLA	FREQUENZA	LUNGHEZZA D'ONDA
FREQUENZE ESTREMAMENTE BASSE		ELF (extremely low frequency)	0 - 3 kHz	> 100 Km
FREQUENZE BASSISSIME		VLF (very low frequency)	3 - 30 kHz	100 - 10 Km
RADIOFREQUENZE	FREQUENZE BASSE (ONDE LUNGHE)	LF (low frequency)	30 - 300 kHz	10 - 1 Km
	MEDIE FREQUENZE (ONDE MEDIE)	MF (medium frequency)	300 kHz - 3 MHz	1Km - 100 m
	ALTE FREQUENZE	HF (high frequency)	3 - 30 MHz	100 - 10 m
	FREQUENZE ALTISSIME (ONDE METRICHE)	VHF (very high frequency)	30 - 300 MHz	10 - 1 m
MICROONDE	ONDE DECIMETRICHE	UHF (ultra high frequency)	300 MHz - 3 GHz	1m - 10 cm
	ONDE CENTIMETRICHE	SHF (super high frequency)	3 - 30 GHz	10 - 1 cm
	ONDE MILLIMETRICHE	EHF (extremely high frequency)	30 - 300 GHz	1 cm - 1 mm
INFRAROSSO		IR (infra red)	0.3 - 385 THz	1000 - 0.78 nm
LUCE VISIBILE			385 - 750 THz	780 - 400 nm
ULTRAVIOLETTA		UV (ultra violet)	750 - 3000 THz	400 - 100 nm
RADIAZIONI IONIZZANTI		X, gamma	> 3000 THz	< 100 nm

Tabella 1: Classificazione delle frequenze elettromagnetiche.

All'interno dello spettro elettromagnetico esiste una distinzione importante:

- Radiazioni ionizzanti (IR)
- Radiazioni non ionizzanti (NIR)

Le IR (raggi x, γ e cosmici) sono radiazioni elettromagnetiche dotate di Energia (superiore a 12 eV) tale da generare il fenomeno della ionizzazione, cioè interagendo con un atomo, sono in grado di spezzare il legame tra un elettrone e il nucleo dell'atomo e creare una coppia di ioni, uno negativo, l'elettrone libero, e uno positivo, cioè l'atomo privo di elettrone. Le radiazioni ionizzanti possono innescare, in maniera irreversibile, danni alle complesse molecole biologiche che sono alla base del funzionamento degli organismi, quindi DNA, proteine, etc... e si potrebbero dunque generare mutazioni fino allo sviluppo di patologie gravi come ad esempio il tumore. Le radiazioni non ionizzanti sono quelle che non trasportano un quantitativo di energia sufficiente a produrre ionizzazione. Possono agire sui livelli vibrazionali e rotazionali delle molecole e quindi apportano, interagendo con la materia, modifiche termiche, meccaniche, bioelettriche. In questa categoria rientrano i campi statici (0 Hz), Low-frequency waves prodotte dall'energia elettrica (50-60 Hz), Extremely Low Frequency (ELF, 0-3 kHz) e Very Low Frequency (VLF, 3-30 kHz), i campi a radiofrequenza (RF, fino a 300 MHz), le microonde (MW, fino a 300 GHz) l'infrarosso, il visibile e il vicino ultravioletto (sopra 300 GHz) [31].

Per quanto riguarda gli effetti biologici le sorgenti non ionizzanti vengono divise in due gruppi:

- 1) sorgenti a bassa frequenza (da 0 Hz a 100 kHz) rappresentate da linee e apparecchiature elettriche.
- 2) sorgenti ad alta frequenza (da 100 kHz a 300 GHz) spesso indicate come Radio Frequenze, rappresentate principalmente dalle antenne.

1.4 Sorgenti naturali dei campi elettromagnetici

Per quanto concerne le onde elettromagnetiche nella banda “Non Ionizing Radiation” (NIR), che comprende frequenze fino a 300 GHz, il rumore elettromagnetico di fondo può avere sia un’origine naturale che artificiale.

L’insieme di tutti i campi elettromagnetici di origine naturale costituisce un fondo elettromagnetico naturale, continuo e di bassa intensità, al quale si sommano di tanto in tanto brevi picchi. I campi elettromagnetici esistono da sempre in natura, basti pensare ai materiali che generano campi magnetici statici come le calamite. Esistono diversi campi elettromagnetici di origine naturale. Innanzitutto il campo magnetico terrestre, che può essere paragonato a quello generato da una barra magnetica passante per il centro della Terra e inclinata di $11^{\circ} 30'$ rispetto all’asse di rotazione terrestre. Le linee di forza di un magnete escono dal polo Nord ed entrano nel polo Sud, in questo caso però

i poli del magnete non corrispondono con quelli geografici, tuttavia è tradizione chiamare polo magnetico Nord (N) quello che si trova nell'emisfero Nord e polo magnetico Sud (S) quello che si trova nell'emisfero Sud, in accordo con i corrispondenti poli geografici (Fig.16) [30]. Questo campo magnetico ha una componente statica la cui densità media è di $50 \mu\text{T}$, con intensità maggiore in corrispondenza dei poli ed è questa la componente del campo magnetico terrestre che consente all'ago della bussola di orientarsi lungo le sue linee di flusso. Si pensa sia dovuta a correnti elettriche presenti nel nucleo fluido e conduttore della Terra.

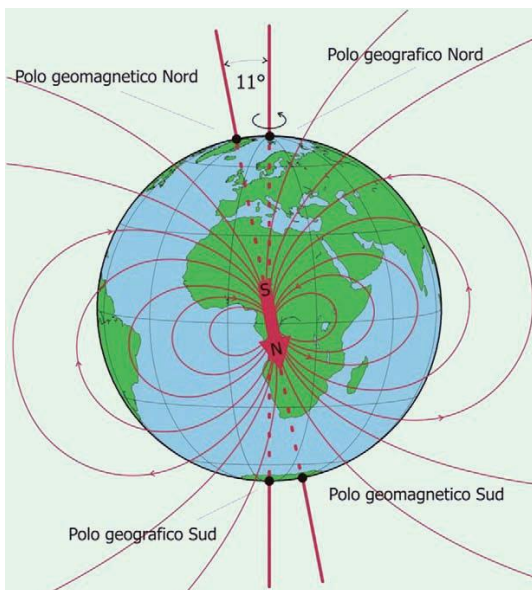


Fig.16: linee di forza del campo magnetico terrestre [30].

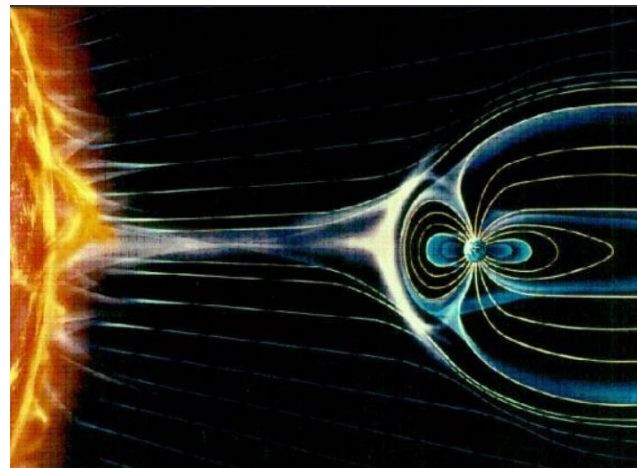


Fig.17: il campo magnetico terrestre in relazione alle particelle cariche del sole.

Il campo magnetico terrestre fa da scudo alla superficie della Terra dalle particelle cariche del vento solare. È compresso dal lato del giorno (ovvero del Sole) a causa della forza delle particelle in avvicinamento, mentre è esteso dal lato della notte formando una sorta di coda (Fig.17). È presente anche una componente variabile, dovuta all'attività del sole, della luna e ai temporali, la cui intensità è di circa 0,03 mT con frequenza variabile da pochi Hz a qualche MHz. La più importante sorgente naturale di radiazioni che interessa la superficie terrestre è appunto il sole in quanto fornisce calore, luce e radiazioni elettromagnetiche in un ampio spettro di frequenze. A frequenze superiori di 30 MHz i campi elettromagnetici naturali provengono soprattutto dalla radiazione a banda larga tipica di un corpo nero, proveniente dalla terra calda e dai processi extraterrestri, in quest'ultimo caso proveniente principalmente dal sole e dalla radiazione di fondo cosmica. La radiazione solare infatti al di sotto dei 30 MHz viene riflessa verso lo spazio dalla ionosfera (uno strato esterno dell'atmosfera terrestre), quella compresa tra 30 MHz e 30 GHz riesce a penetrare l'atmosfera e subisce un percorso di riflessione e diffusione a seconda delle bande di frequenza, mentre quella oltre i 30 GHz viene quasi completamente attenuata [32]. Per quanto riguarda le condizioni meteorologiche temporalesche, a frequenze inferiori a 30 MHz, la radiazione elettromagnetica di fondo è principalmente dovuta a scariche elettriche durante

i temporali, soprattutto tra nuvole ma sono comuni anche quelle più pericolose tra nuvola e suolo [32].

1.5 Sorgenti artificiali dei campi elettromagnetici

Come abbiamo già detto i campi elettromagnetici esistono in natura da sempre, ma l'opera dell'uomo ha contribuito e contribuisce sempre di più all'innalzamento dei livelli del campo magnetico rispetto al cosiddetto fondo naturale. Rispetto alla radiazione elettromagnetica a cui è esposta la popolazione a seguito di emissioni prodotte dalle sorgenti artificiali quella del fondo naturale è inferiore di alcuni ordini di grandezza, ad eccezione dei fulmini per cui la densità di potenza può raggiungere valori molto elevati. Le radiazioni elettromagnetiche di sorgenti artificiali sono suddivise in emittenti intenzionali, se l'emissione dei campi è effetto diretto rispetto allo scopo per il quale sono realizzati, ed emittenti non intenzionali, se l'emissione dei campi è effetto secondario. Possiamo differenziare i campi elettromagnetici in base alla frequenza andando così a considerare poi le sorgenti artificiali che li hanno generati:

- 1) Sorgenti di campi a bassa frequenza (fino a 300 Hz), comunemente definiti come campi ELF (Extremely Low Frequency), dovute essenzialmente al sistema di produzione, distribuzione e utilizzo dell'energia elettrica (linee elettriche, cabine di trasformazione,

elettrodomestici, ecc.) che in Italia presenta una frequenza industriale costante pari a 50 Hz.

- 2) Sorgenti di campi a Radio-frequenza, comunemente definiti come campi RF (Radio Frequency, fra i 100 kHz e i 300 MHz) dovute generalmente agli impianti di ricetrasmisione radio e tv.
- 3) Sorgenti di campi a Micro Onde o MO (fra i 300 MHz e i 300 GHz) dovute agli impianti per cellulari o ai ponti radio che prevedono frequenze molto più alte, comprese tra 100 kHz e 300 GHz.

Gli ultimi due punti possiamo accumunarli sotto il nome di sorgenti di onde elettromagnetiche ad altra frequenza e, poiché questa parte dello spettro viene utilizzata per la radiodiffusione e la telecomunicazione, viene definita radiofrequenza (RF). Gli apparati per la telecomunicazione sono sistemi che per svolgere la loro funzione devono emettere nell'ambiente esterno, con la massima efficienza, l'energia elettromagnetica generata e amplificata da una antenna trasmittente verso antenne riceventi. La trasmissione può essere di tipo direttivo, cioè da punto a punto, oppure di tipo broadcasting, cioè da un punto emittente a molti punti riceventi. Per quanto riguarda la radiodiffusione sonora i segnali sono trasmessi nei canali compresi tra due bande di frequenze, da 148 kHz a 283 kHz e da 526 kHz a 1606 kHz per i segnali modulati in ampiezza (AM), da 88 MHz a 108 MHz per i segnali modulati in frequenza (FM). Le

stazioni televisive trasmettono su diversi canali la maggior parte compresi tra 470 e 854 MHz.

Le antenne consistono tipicamente di tre o quattro antenne a dipolo verticale installate su tre o quattro lati della torre di trasmissione. Tipicamente l'area più pericolosa è limitata ad una distanza di circa 15 m dai dipoli [32].

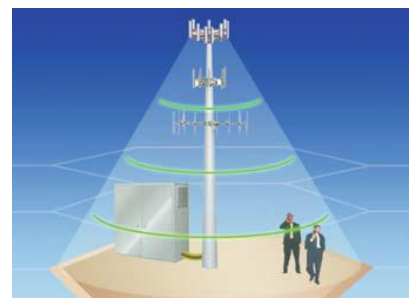
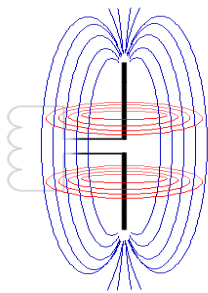


Fig.18: Antenna a dipolo verticale, campo magnetico (rosso) ed elettrico (blu).

Fig.19: esposizione dell'uomo a siti di radiodiffusione [31].

Altre sorgenti di energia ad alta frequenza sono le stazioni radio-base e i telefoni mobili o cellulari. La telefonia mobile opera a frequenze di 800 e 1800 MHz, fino ad arrivare a 2100 MHz per quella di ultima generazione [33]. Le stazioni radio base, sono strutture di ricetrasmissione con antenne montate su edifici o tralicci ad un'altezza dal suolo da 15 a 50 m, che ricevono e tramettono il segnale ad alta frequenza del cellulare [32]. Negli ultimi anni si sono sviluppate tecnologie di comunicazione senza fili (wireless) con la creazione di

reti locali WLAN (Wireless Local Area Network) che viaggia intorno a frequenza di qualche GHz, di dispositivi bluetooth che permettono, a posto dei cavi, la connessione di due dispositivi ed opera tramite trasmissione di segnali a 2,45 GHz. [32]. I forni a microonde funzionano con onde elettromagnetiche ad alte frequenze (2,4 GHz) con livelli elevati di potenza. Le perdite al di fuori dello sportello sono trascurabili e si riducono all'aumentare della distanza dallo strumento stesso. Problemi possono insorgere con danni allo sportello o alle guarnizioni [31].

Per quanto riguarda le sorgenti a bassa frequenza è bene sapere che tutte le apparecchiature elettriche che sono utilizzate in campo industriale (utensili elettrici, motori elettrici) e domestico (elettrodomestici e apparecchi per l'illuminazione) e nella produzione e distribuzione di energia elettrica (centrali elettriche, elettrodotti) funzionano alla frequenza di 50 Hz e producono campi elettrici e magnetici. A bassa frequenza i campi elettrici e magnetici si comportano come agenti fisici indipendenti, l'energia associata rimane localizzata alla sorgente, tanto che allontanandoci da essa l'intensità del campo diminuisce, in modo inversamente proporzionale quando parliamo di sistemi costituiti da un solo conduttore (antenna trasmittente), inversamente proporzionale al quadrato della distanza per quelli con due conduttori (elettrodotti), e al cubo della distanza per sistemi costituiti da motori elettrici e

trasformatori che alimentano i piccoli elettrodomestici. I motori elettrici e i trasformatori elettrici funzionano in modo diverso:

- 1) In un motore elettrico (Fig.20) l'energia elettrica viene fornita da una spira percorsa da corrente e viene trasformata in energia meccanica. L'energia meccanica così prodotta può poi venire utilizzata per muovere per esempio le pale di un ventilatore o il cestello di una lavatrice. Un motore elettrico è costituito generalmente da una parte fissa (statore) e da una mobile (rotore). Una spira rettangolare di filo conduttore rigido, montata su un asse sul quale è libera di ruotare, è immersa in un campo magnetico uniforme perpendicolare all'asse di rotazione, generato per esempio dai poli di un magnete. Il rotore per induzione elettromagnetica inizia a girare, in quanto il suo campo magnetico tende ad allinearsi a quello dello statore analogamente a quanto avviene per l'ago della bussola, esiste però un dispositivo che non permette il completo allineamento in modo che continui a girare.
- 2) Il trasformatore è una macchina elettrica che funziona solo in corrente alternata, esso viene usato per trasferire potenza elettrica costante da un livello di tensione ad un altro più basso e ciò conviene maggiormente sul piano economico e tecnico. La maggior parte degli elettrodomestici preleva la tensione di rete a 230 V alla frequenza di 50 Hz, attraverso la

spina elettrica dalla rete elettrica, ma di fatto funziona a bassissima tensione grazie al trasformatore. L'avvolgimento primario di N_1 spire, collegato ad una tensione alternata V_1 , viene percorso da corrente e genera nel nucleo un flusso magnetico Φ che nell'avvolgimento secondario, costituito da N_2 spire, provoca a sua volta una tensione indotta V_2 . Se di bassa qualità può perdere energia sotto forma di campo elettromagnetico e generare inquinamento elettromagnetico (Fig.21).

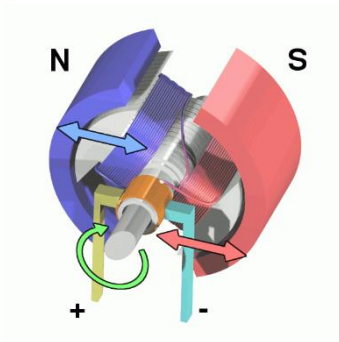


Fig.20: Motore elettrico.

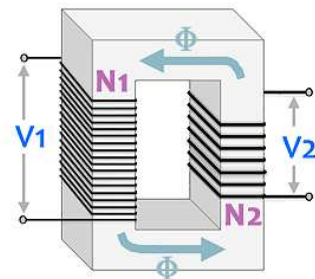


Fig.21: Trasformatore di tensione.

Mentre i campi elettrici sono prodotti da ogni dispositivo collegato ad una presa elettrica, anche se non acceso, e possono essere schermati facilmente dai comuni materiali (legno, muratura e metalli), i campi magnetici sono prodotti solo da apparecchi elettrici in funzione e sono difficilmente schermabili, si dovrebbe usare materiale ferromagnetico ad elevata permeabilità (es. ferro), oppure materiale conduttore ad elevata conducibilità (es. rame, alluminio, acciaio ad elevate caratteristiche magnetiche) che genera un campo magnetico

opposto, peraltro con elevato spessore e vicino alla sorgente. Gli elettrodotti quindi risultano un rischio per le abitazioni che vi si trovano vicino anche se ci sono dei limiti di distanza e di correlata intensità di campo all'interno delle case, stabiliti per prevenire effetti sanitari a breve e a lungo termine.

ELETTRODOMESTICI (50 Hz)	CAMPO MAGNETICO (μ T) ALLA DISTANZA DI		
	3 CM	30 CM	100 CM
ASCIUGABIANCHERIA	0,3-8	0,08-0,3	0,02-0,06
LAVATRICE	0,8-50	0,15-3	0,01-0,15
LAVASTOVIGLIE	3,5-20	0,6-3	0,07-0,3
TRAPANO	400-800	2-3,5	0,08-0,2
LAMPADA DA TAVOLO	40-400	0,5-2	0,05-0,25
ASCIUGACAPELLI	6-2000	<0,01-1	<0,01-0,3
FERRO DA STIRO	8-30	0,12-0,3	0,01-0,025
FORNO A MICROONDE	75-200	4,8	0,25-0,6
FORNO ELETTRICO	1-50	0,15-0,5	0,04-0,091
FRIGORIFERO	0,5-1,7	0,01-0,25	<0,01
RASOIO ELETTRICO	15-1500	0,08-7	<0,01-0,3
TELEVISORE	25-50	0,04-2	<0,01-0,15
TOSTAPANE	7-18	0,06-0,7	<0,01
ASPIRAPOLVERE	200-800	2,20	0,13-2
COPERTA ELETTRICA	2-3	0,1-0,2	<0,05

Tabella 2: Livelli di campo magnetico per elettrodomestici alla distanza di 3, 30, 100 cm.

(NPBR, Vol. 3 n° 1, 1992)

1.6 Effetti biologici e sanitari dei campi elettromagnetici

E' di fondamentale importanza chiarire alcuni termini:

- 1) Un' interazione è la possibilità che un'onda elettromagnetica venga a contatto con le componenti atomiche e molecolari di un sistema biologico. L'equilibrio elettrico viene perturbato ma ciò non si traduce necessariamente in un effetto biologico.

- 2) Un effetto biologico si verifica quando l'esposizione provoca qualche variazione fisiologica notevole o rilevabile in un sistema biologico.
- 3) Un effetto di danno alla salute (sanitario) si verifica quando l'effetto biologico è al di fuori dell'intervallo in cui l'organismo può normalmente compensarlo, e ciò porta a qualche condizione di detrimento della salute.

L'esposizione dei sistemi biologici ai campi elettromagnetici è solitamente specificata in termini di: modulazione (onda continua o pulsata), intensità del campo elettrico e magnetico incidenti, la frequenza sorgente, il tipo e la zona di esposizione (campo vicino o lontano) e durata dell'esposizione [32]. I principali effetti biologici delle radiazioni elettromagnetiche sono il riscaldamento dei tessuti (effetti termici) tipico di alte frequenze ma anche effetti non termici, alte e basse frequenze, che comprendono effetti di stimolazione dei tessuti muscolari e nervosi elettricamente eccitabili da parte delle correnti elettriche indotte nel corpo umano da campi elettrici e magnetici esterni, formicolio della pelle, scariche elettriche e bruciature dovuto al contatto con oggetti immersi nei campi elettromagnetici.

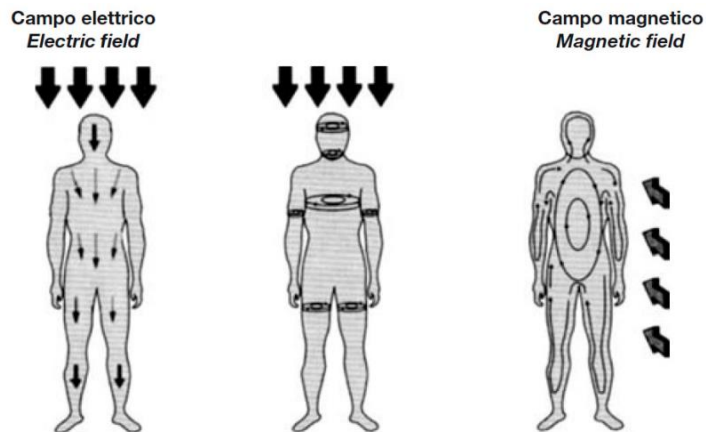


Fig.22: correnti indotte nel corpo umano dal campo elettrico (verticale) e magnetico (orizzontale).

Il campo elettrico variabile genera correnti alternate superficiali tramite la variazione di posizione in funzione del segno delle cariche per cercare un equilibrio. Il campo magnetico induce un campo elettrico interno che genera una corrente elettrica. Lo scambio di energia che avviene tra radiazione elettromagnetica e materia vivente, ovvero la quantità di energia elettromagnetica che viene assorbita nell'unità di tempo da un elemento di massa unitaria di un sistema biologico è espresso dalla grandezza densiometrica SAR (Specific Absorption Rate) [32].

Quelli citati sono effetti a breve termine, per quelli a lungo termine ci sono ancora numerosi studi in atto poiché non ci sono certezze scientifiche a riguardo; sono divisi in studi sugli effetti di categorie professionalmente

esposte e studi in laboratorio di esposizione a campi elettromagnetici di diversa intensità e frequenza su colture cellulari o cavie.

Tramite studi sperimentali è stato visto infatti che gli effetti sui sistemi biologici, come le cellule, tramite esposizioni a Radiofrequenze che non danno effetti termici, possono essere molteplici, a partire da alterazione dei canali ionici cellulari, alterazione dei pathway in cui sono coinvolte proteine di trasduzione del segnale, alterazioni dell'attività enzimatica della ornitina decarbossilasi (un enzima che, quando è attivo, è associato all'insorgenza di tumori), danni al DNA in vivo, diminuzione della permeabilità della barriera ematonecefalica, ma non sono state riscontrate evidenze certe come agenti di inizio del cancro in vivo, in vitro invece diversi studi riportano esiti contrastanti [34].

1.7 Effetti dei campi magnetici a bassa frequenza: studi su sistemi in vitro e in vivo

Come abbiamo detto i campi a frequenza estremamente bassa (ELF-MF) sono emessi da molte apparecchiature industriali, domestiche e di distribuzione dell'energia elettrica, quali gli elettrodotti, che quindi possono generare un inquinamento elettromagnetico nelle nostre case [35]. Il campo della ricerca si è concentrato sugli effetti che questi campi a bassa frequenza possono avere a livello biologico e sanitario, soprattutto alla frequenza di 50 Hz, frequenza

tipica delle apparecchiature sopra citate. Gli ambienti domestici interni sono caratterizzati da una densità di flusso ELF-MF di pochi microtesla, anche se alcuni ruoli occupazionali determinano lunghi tempi vicino a trasformatori e linee di distribuzione elettrica, che sono caratterizzati da intensità ELF-MF molto più elevate. La letteratura riporta numerose segnalazioni di effetti in vitro dei campi ELF-MF sulle proprietà delle membrane cellulari (trasporto ionico ed interazione dei mitogeni con i recettori alla superficie della cellula), sulle variazioni delle funzioni cellulari e proprietà di crescita (ad es. aumento della proliferazione cellulare, alterazioni del metabolismo, dell'espressione genica e dell'attività enzimatica, alterazione dell'attività enzimatica della ornitina decarbossilasi) [36,37,38,39,40,41].

Un aspetto interessante della ricerca si è concentrato sugli effetti di questi campi insieme all'utilizzo di farmaci chemioterapici riguardo la risposta delle cellule tumorali alla differenziazione, ai trattamenti citotossici e citostatici, ai danni al DNA, alla detossificazione e antiossidazione. Per ogni punto i risultati risultano contrastanti, molto probabilmente per le diverse condizioni sperimentali utilizzate nei vari laboratori, per questo è necessario trovare una standardizzazione in questa metodologia di ricerca [35]. Riporto alcuni esempi di questi studi, nonostante ne siano stati fatti innumerevoli molto simili: sappiamo che le cellule tumorali maligne sono caratterizzate da una perdita di

differenziazione, per tale motivo in uno studio del 2000 hanno trovato che l'esposizione con ELF-MF , 60 Hz, 4 μ T, ha inibito la differenziazione di cellule di eritroleucemia trattate con dimetilsolfossido ed esameten-bis-acetammide (promotori della differenziazione) e questo era associato alla conservazione dell'attività della telomerasi, la cui espressione sostiene uno stato indifferenziato delle cellule. I neuroblastomi ad alto rischio sono spesso trattati con acido retinoico (RA) o composti derivati da RA per indurre arresto della crescita e differenziazione cellulare. Marcantonio et al., nel 2003 hanno rilevato che un'esposizione a medio termine con ELF-MF a 50 Hz, 1 mT, potenziava significativamente gli effetti antiproliferativi del trattamento ATRA (acido trans-retinoico) sulla linea di cellule di neuroblastoma umano BE(2)C. Al contrario in un altro studio del 2003 è stato visto un effetto opposto su linee cellulari di neuroblastoma umano LAN5 [35].

Le cellule tumorali di fronte agli effetti citotossici e citostatici dei chemioterapici sviluppano resistenza all'apoptosi, per tale motivo in uno studio del 2002 è stato dimostrato che un'esposizione di 1-h a un campo ELF pulsato da 1,25 Hz e 1,5 mT ha potenziato l'effetto citotossico della mitomicina C, vincristina e cisplatino, tre sostanze chimiche antitumorali frequentemente utilizzate nella chemioterapia del cancro, in cellule di adenocarcinoma del colon umano multiresistenti. Pirozzoli et al. (2003) hanno dimostrato che le

cellule di neuroblastoma LAN-5 sono protette dall'apoptosi indotta da camptotecina se il composto citotossico viene utilizzato in combinazione con un trattamento di 24 ore con campo ELF a 50 Hz, 1 mT [35].

Non inaspettatamente la sovra-espressione della capacità di riparazione del DNA è stata collegata allo sviluppo della chemioresistenza del cancro, infatti in un lavoro del 2017 stabilirono che l'esposizione per 24 h a ELF-MF (50 Hz, 100 μ T) riparava in qualche misura il grado di danno al DNA dopo (e non prima) l'incubazione con menadione (induttore del danno al DNA), infatti diminuiva il rapporto G1/S, il cui alto valore è un segnale di apoptosi [35].

In generale, le cellule tumorali mostrano un'eccessiva protezione contro i ROS attraverso l'alta espressione di enzimi antiossidanti fondamentali, e questo sembra promuovere la progressione del tumore e la multiresistenza (MDR). L'alta attività della glutatione perossidasi (GPX) che della catalasi, insieme ad un aumento del livello di glutatione ridotto (GSH), sono collegati al fenotipo MDR in alcune cellule tumorali. In cellule di neuroblastoma SH-SY5Y umane, un'esposizione con ELF-MF per 24h a 50 Hz, 1 mT ha limitato significativamente l'aumento indotto dall' H_2O_2 della catalasi, la cui catalisi assicura una rapida rimozione del perossido di idrogeno dalla cellula. Al contrario, nel 2006 hanno descritto come i linfoblasti da linfoma istiocitico umano hanno subito una forte diminuzione dei livelli GSH grazie un

trattamento di 2h con ELF-MF a 50 Hz, in parallelo con un marcato aumento della concentrazione di ROS [35].

Infine si sospetta che gli ELF-MF svolgano un ruolo significativo nella co-carcinogenesi, nonché nella progressione della tumorigenesi, durante la quale si ritiene che le cellule maligne acquisiscano capacità di sopravvivenza o vantaggio proliferativo cruciale. Riguardo questo una scoperta molto interessante è stata fatta con cellule di glioblastoma umano tramite due studi degli ultimi decenni: il campo magnetico (60 Hz, 5 mT) da solo non induce danni al DNA, non fa aumentare siti apurinici e apirimidinici ma solo in associazione con metil mentan sulfonato (MMS) o H_2O_2 , che generano danni al DNA. Tali risultati sembrano suggerire che l'ELF-MF può potenziare gli effetti degli agenti attivi redox che danneggiano il DNA senza compromettere la vitalità o la crescita delle cellule, infatti l'esposizione contemporanea a agenti redox e campo elettromagnetico non ha fatto aumentare la morte cellulare rispetto al trattamento con H_2O_2 o MMS [35].

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della mia tesi è stato quello di analizzare l'effetto del campo elettromagnetico a bassa frequenza (50 Hz) sull'assorbimento e il rilascio del farmaco doxorubicina in due modelli cellulari del dotto pancreatico. L'ipotesi che muove il mio lavoro è quella di pensare al campo elettromagnetico a bassa frequenza come un approccio innovativo terapeutico, poco invasivo, per aumentare l'efficacia della chemioterapia o per diminuirne gli effetti collaterali.

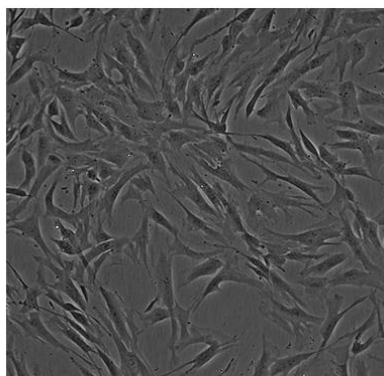
Per sottoporre le cellule al campo magnetico è stata utilizzata, come generatore di campi magnetici a bassa frequenza, la bobina di Helmholtz, che produce un campo elettromagnetico uniforme per l'ampio volume di spazio all'interno della bobina.

Le misure della concentrazione intracellulare del farmaco sono state eseguite con la tecnica della citometria a flusso e con il microscopio a fluorescenza.

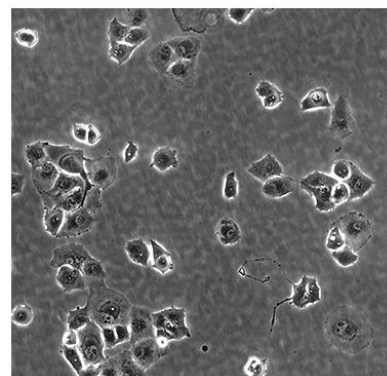
3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari

I modelli biologici scelti per questo studio sono: la linea cellulare PANC-1 e la linea cellulare hTERT-HPNE E6/E7/K-RasG12D. PANC-1 sono cellule epiteliali derivanti da carcinoma che origina da cellule duttali pancreatiche, precisamente derivano dal tessuto di un uomo di 56 anni caucasico. hTERT-HPNE E6/E7/K-RasG12D sono cellule epiteliali del dotto pancreatico umano con fenotipo non tumorale immortalizzate tramite trasduzione con un vettore di espressione retrovirale (pBABEpuro) contenente il gene hTERT e in un secondo momento infettate con vettore retrovirale (pLXSN) che porta la forma mutata (G12D) dell'isoforma b della proteina umana K-Ras.



hTERT-HPNE E6/E7



PANC-1

Fig.23: Immagini al microscopio ottico invertito, cellule hTERT-HPNE E6/E7 e PANC-1.

Per il loro mantenimento è stato usato un terreno di crescita DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con il 10 % di FBS (Fetal Bovine

Serum), l'1% di streptomicina-penicillina e l'1% di L-glutammina. Le cellule sono state mantenute in incubatore (THERMO electron corporation) a condizioni ambientali costanti di 37°C, 5 % di CO₂ e 95 % di umidità, in fiasche da 25 e 75 cm².

Il mantenimento delle linee cellulari e l'allestimento delle prove sperimentali prevedono una serie di accorgimenti e operazioni svolte in maniera estremamente rigorosa, sia sotto cappa biologica a flusso laminare che nel tragitto tra cappa e incubatore, per escludere ogni possibile contaminazione da parte di batteri, funghi e micoplasmi. La cappa utilizzata è del tipo Gelaire BSB4 ed è classificata biologicamente di classe 2, il che significa che è un apparecchio a circolazione parziale di aria, sterilizzata da appositi filtri Hepa, adatto a lavorare con agenti di basso-medio potenziale rischio biologico. Il terreno di crescita è stato cambiato 2 o 3 volte a settimana e le cellule mantenute in crescita in incubatore fino a che non raggiungevano una confluenza del 70-80 %. Quando viene raggiunta la confluenza il medium viene rimosso e le cellule lavate con 2 ml di PBS 1X. Viene quindi aggiunta la Tripsina-EDTA 10X (EuroClone), un enzima proteolitico che degrada le proteine della matrice che mantengono le cellule aderenti rompendo i legami tra le singole cellule e quelli che si formano tra la cellula e la parete della fiasca. La durata stabilita del trattamento con tripsina deve essere rispettata altrimenti, andando oltre, si

potrebbero avere danni alle cellule. Successivamente viene aggiunto il terreno completo nella fiasca per inibire l'azione della tripsina e il tutto viene recuperato in provetta e centrifugato ad una velocità di 500 x g, per 5 minuti a temperatura ambiente. Il pellet di cellule viene risospeso in terreno e un'aliquota viene utilizzata per la conta vitale con trypan blue mediante la camera di Burker. Una volta effettuata la conta si calcola il volume di sospensione cellulare che bisogna utilizzare per ogni piastra Petri o pozzetto, a seconda del tipo di esperimento.

3.2 La bobina di Helmholtz e le procedure di esposizione ai campi elettromagnetici

Per esporre le cellule ai campi elettromagnetici a bassa frequenza abbiamo utilizzato un generatore di campi rappresentato dalla bobina di Helmholtz pilotata da un generatore di corrente alternata a 50 Hertz. Lo strumento è stato costruito dal gruppo di Biologia Applicata e può generare campi magnetici di intensità variabile fino al limite di 2 mT. Nel nostro caso abbiamo utilizzato la frequenza di 50 Hz e un'intensità di 1 mT. La bobina di Helmholtz presenta una configurazione che permette di generare un campo elettromagnetico, tramite due circuiti percorsi da corrente elettrica, di intensità uniforme per un ampio volume di spazio. La configurazione di Helmholtz dispone due bobine a una distanza R corrispondente al raggio delle bobine stesse. In questo modo si

supera il problema dell'eterogeneità di intensità di campo in quanto il campo elettromagnetico delle due bobine si somma generando un campo magnetico risultante che, a metà distanza fra le due bobine (punto C), è in buona approssimazione uniforme (Fig.24).

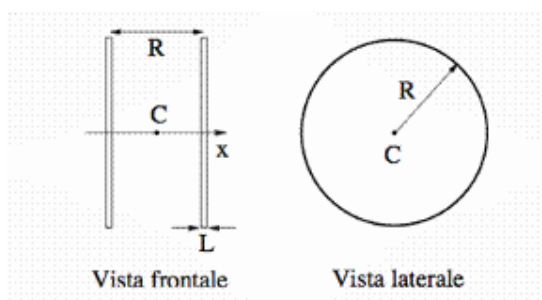


Fig.24: Schema rappresentativo della disposizione delle bobine.

Nel nostro caso la bobina è stata costruita con un filo di rame di grosso diametro (2mm) per minimizzare gli effetti termici dovuti al passaggio della corrente elettrica in un conduttore (effetto Joule) che altrimenti avrebbe potuto aumentare la temperatura all'interno dell'incubatore (Fig.25). Per effettuare le esposizioni delle cellule al campo magnetico la bobina di Helmholtz è stata posizionata all'interno dell'incubatore (Thermo scientific 3110 Series II CO2 Water Jacketed incubator). Le piastre con le cellule sono state collocate al centro della bobina di Helmholtz mentre le cellule che non dovevano essere esposte al campo magnetico sono state poste in un incubatore (Midi 40, Thermo Fisher Scientific) presente nel laboratorio.

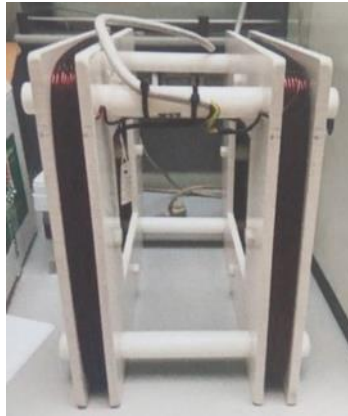


Fig.25: Bobina di Helmholtz utilizzata per i nostri esperimenti.

3.3 Citofluorimetria

La citometria a flusso è una metodica di laboratorio che permette l'analisi automatica di una sospensione cellulare monodispersa che viene convogliata da un sistema fluidico di trasporto fino al punto di misura. Qui incontra un fascio luminoso focalizzato, tramite l'ausilio di una lente, proveniente da una sorgente di eccitazione. Quando il raggio di luce intercetta il flusso cellulare (stream) vengono generati segnali dall'incontro di ogni singola cellula. Questi segnali sono legati alle caratteristiche fisiche della particella e alla presenza di molecole fluorescenti localizzate in diversi siti. Una volta emessi, i segnali sono raccolti da un sistema di lenti, specchi dicroici e filtri ottici, e inviati ai rispettivi sensori (fotodiodi e fotomoltiplicari) che ne misurano l'intensità. Questi segnali elettrici (analogici) provenienti da ogni sensore, opportunamente amplificati e digitalizzati, sono inviati a un analizzatore/elaboratore di dati che provvede alla presentazione su un monitor dei medesimi e alla loro definizione statistica. Gli

elementi principali di un citofluorimetro sono: il sistema fluidico che realizza il fenomeno della focalizzazione idrodinamica cioè fa in modo che singole cellule attraversino il punto di intersezione con un raggio di luce. Nello strumento si vengono a creare due flussi: quello interno contiene le cellule (core flow) e quello esterno mantiene queste ultime lungo l'asse del flusso (sheath fluid). La velocità di efflusso delle cellule (flow rate) può essere regolata agendo sul sistema che controlla la differenza di pressione tra core flow e sheath fluid e normalmente è valutata in numero di "eventi" al secondo, cioè numero di "particelle" che hanno incontrato il fascio luminoso del sistema di eccitazione. La cellula, colpita dal fascio luminoso focalizzato, emette per prima cosa segnali di luce diffusa relativi alle sue caratteristiche fisiche e morfologiche, attraverso fenomeni fisici di rifrazione, riflessione (side scatter SS) e diffrazione (forward scatter FC). La luce dispersa in avanti ad angoli superiori di 10° C rispetto l'asse del raggio (FC), legata essenzialmente alla grandezza cellulare, viene catturata da una lente che la convoglia a un fotodiodo detto *forward scatter channel* (FSC). La luce misurata a 90° C rispetto alla sorgente (SS) viene convogliata a un sensore detto *side scatter channel* (SSC). Il segnale correlato ai fenomeni di riflessione e rifrazione è da attribuire a parametri di morfologia cellulare come: granulosità citoplasmatica, rapporto nucleo/citoplasma, rugosità di superficie e diametro. Oltre alle SS, le celle

emettono luce fluorescente (FL) a tutti gli angoli rispetto all'asse del raggio laser. Tramite lenti e filtri la luce SS e FL sono raccolte solo dall'area di rilevamento del flusso cellulare e vengono collimate. Tale luce è sottoposta ad una analisi spettrale (separazione delle varie componenti a diversa lunghezza d'onda con l'ausilio di specchi diecrici e filtri ottici), quindi raccolta da fotomoltiplicatori, in quanto trattasi di emissioni molto meno intense rispetto al segnale di forward scatter. Dalla combinazione dei due tipi di segnali si ottiene un particolare diagramma bidimensionale detto "citogramma" in cui le informazioni fornite da FSC e SSC sono spesso specifiche per certe famiglie di cellule e permettono di distinguere in un campione eterogeneo le diverse popolazioni. Nella figura 26 troviamo riassunto tutto il percorso appena descritto che avviene in linea generale in un citometro a flusso.

Il sistema di emissione è costituito da una sorgente laser di 488 nm. La specificità della rilevazione è permessa dall'utilizzo di filtri ottici che convogliano emissioni di diversa lunghezza d'onda a diversi rivelatori.

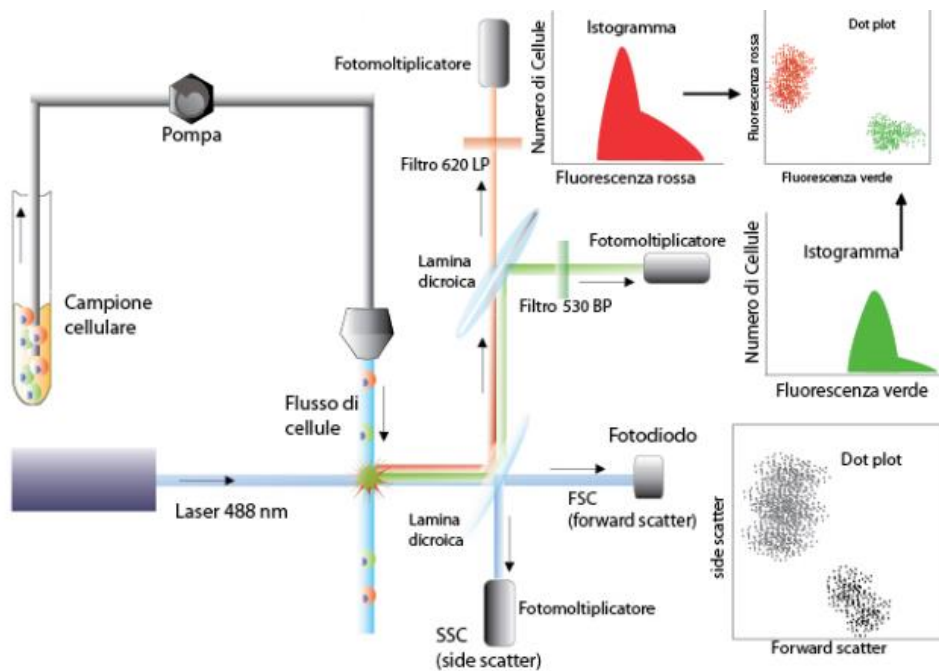


Fig.26: Schema di un citometro a flusso.

Nel nostro caso lo strumento Coulter Epic XL Flow Cytometer, che ho utilizzato per i miei esperimenti, possiede:

- 1) Un filtro dicroico “long pass” (488 DL) che riflette la SS sul sensore SS ma trasmette la luce fluorescente con lunghezze d'onda più lunghe. La luce SS è infatti la prima ad essere separata.

Poi abbiamo 2 tipi di filtro dicroico per separare la luce fluorescente ed inviarla ai corrispettivi sensori chiamati FL.

- 2) Il filtro 550 DL che invia a un filtro “band pass” (525 BP) una lunghezza d’onda inferiore a 550 nm che a sua volta che trasmette luce tra 505 nm e 545 nm al sensore FL1.
- 3) Il filtro 600 DL che invia a un filtro 575 BP, di fronte al sensore FL2, una luce di lunghezza d’onda compresa tra 555 e 600 nm. Il 575 BP trasmette al sensore FL2. Inoltre, il filtro 600 DL invia al filtro 620 BP, di fronte FL3, una luce con lunghezza d’onda compresa tra 605 e 725 nm e trasmetta la luce al sensore FL3.

Il segnale luminoso, generato dall’interazione della luce con le particelle, dopo i filtraggi ottici viene catturato dai rilevatori (sistema elettronico) rappresentati da tre fotomoltiplicatori:

- 1) FL1 che rivela la luce a una lunghezza d’onda tra 505 e 545 nm;
- 2) FL2 che rivela lunghezze d’onda tra 560 e 590 nm;
- 3) FL3 che rivela la luce a un intervallo di lunghezza d’onda tra 605 e 635 nm.

Come sopra accennato i sensori trasmettono un segnale elettrico proporzionale all’intensità del fascio luminoso acquisito ad un elaboratore che colloca i singoli eventi in uno o più grafici (istogrammi, dot plot e density plot). I segnali sono riferiti ai parametri di fluorescenza, FSC o SSC.

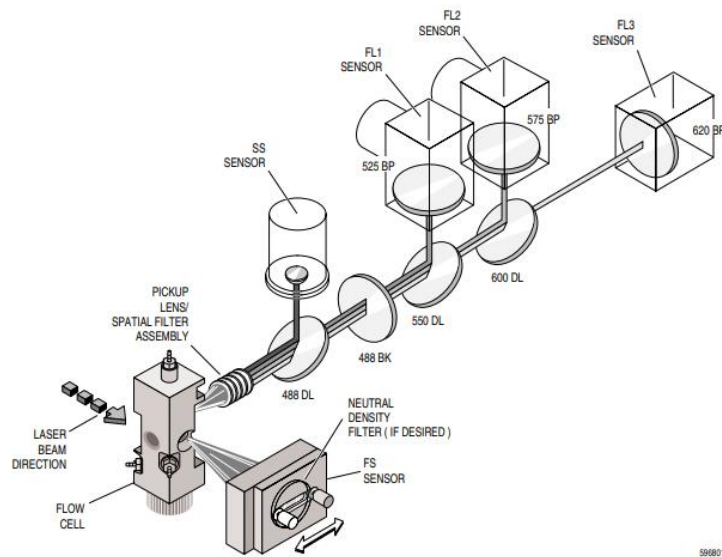


Fig.27: Rappresentazione schematica del sistema ottico presente nel citofluorimetro Coulter Epic XL.

3.3.1 Protocollo sperimentale per gli studi di assorbimento della doxorubicina

Per gli studi di uptake della doxorubicina (eccitazione a 480 nm ed emissione a 590 nm) le cellule PANC-1 e hTERT-HPNE sono state piastrate in numero di 100.000 cell/2 ml in piastre Petri da 35 mm². Dopo incubazione overnight il terreno DMEM completo è stato sostituito con il corrispondente senza FBS, in modo da evitare possibili interferenze con la fluorescenza, a cui è stata aggiunta doxorubicina alla concentrazione finale di 10 µM. Le cellule trattate con il farmaco sono state esposte al campo magnetico per 1h e 2h, o non esposte per 1h o 2h a seconda del trattamento. Le cellule, alla fine di ogni trattamento, sono state lavate con PBS 1X, staccate con tripsina-EDTA, raccolte in provetta e

centrifugate a 500 x g per 7 minuti. Tolto il surnatante, le cellule sono state risospese con 1 ml di PBS 1X e centrifugate per eliminare il farmaco in eccesso (lavaggio). Tolto il surnatante, le cellule sono state risospese con 1 ml di PBS 1X e l'intensità di fluorescenza della doxorubicina, accumulata all'interno delle cellule, è stata analizzata con citometria a flusso. Il valore di fluorescenza delle cellule trattate solamente con la doxorubicina e non esposte al campo magnetico (controllo) è stato preso come riferimento per valutare tutte le altre condizioni sperimentali:

- 1) Trattamento simultaneo di doxorubicina e campo magnetico per 1h.
- 2) Trattamento simultaneo di doxorubicina e campo magnetico per 2h.
- 3) Trattamento con doxorubicina per 1h e poi esposizione al campo magnetico per 1h.
- 4) Trattamento con doxorubicina per 2h e poi esposizione al campo magnetico per 2h.
- 5) Esposizione al campo magnetico per 1h e poi trattamento con doxorubicina per 1h.
- 6) Esposizione al campo magnetico per 2h e poi trattamento con doxorubicina per 2h.

L'analisi dei dati e l'acquisizione degli istogrammi relativi alle misure citofluorimetriche, sono stati eseguiti con il software FCS Express (De Novo Software, Los Angeles, CA)

3.4 Microscopia a fluorescenza

Il microscopio utilizzato nei miei esperimenti è l'Inverted Research Microscope eclipse Ti2, un microscopio invertito che può funzionare con diverse modalità tra cui:

- 1) Microscopia diascopica in campo chiaro.
- 2) Microscopia diascopica a contrasto di fase.
- 3) Microscopia episcopica fluorescente.
- 4) Microscopia diascopica in campo scuro.

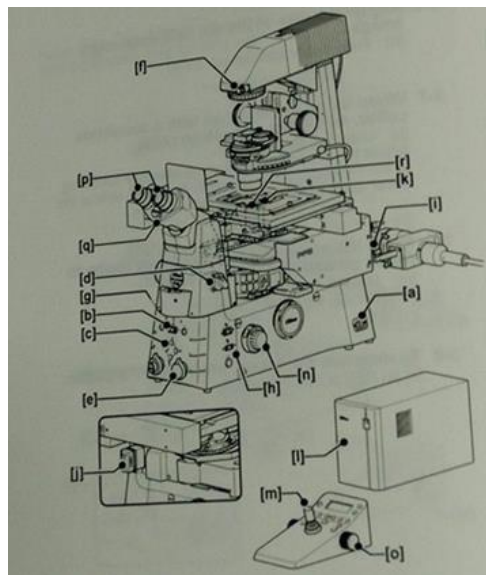


Fig.28: Microscopio Inverted Research Microscope eclipse Ti.

Il microscopio offre la possibilità di visualizzare direttamente sul monitor l'immagine osservata al microscopio, spostarsi con comando analogico, effettuare foto ed effettuare calcoli automatici efficienti, inoltre presenta un incubatore per mantenere le cellule in condizioni vitali.

Il microscopio a fluorescenza è un microscopio ottico composto in cui una fonte di luce ad alta intensità (nel nostro caso una lampada led) emette luce in un ampio spettro dal visibile a tutto l'ultravioletto. Il preparato viene colpito da una luce ad una determinata lunghezza d'onda e i suoi componenti vengono esaminati in base alla fluorescenza emessa. Gran parte dei microscopi a fluorescenza utilizzati sono microscopi ad epifluorescenza, nei quali l'eccitazione e l'osservazione della fluorescenza avvengono da sopra (*epi-*) il campione, e comunque fuori asse rispetto all'osservatore. In questo modo la lente dell'obiettivo viene utilizzata sia come condensatore dell'illuminazione sia come collettore di luce fluorescente. La lunghezza d'onda d'illuminazione (eccitazione: Ex) viene scelta posizionando un filtro (filtro di eccitazione) dopo la sorgente di luce che limita la trasmissione della luce a un intervallo ristretto di lunghezze d'onda. La luce quindi colpisce uno specchio dicroico e viene riflessa attraverso la lente dell'obiettivo e sul campione. Si possono avere due tipi di fluorescenza: naturale (fluorescenza primaria) prodotta da sostanze presenti nel campione (es. proteine, neurotrasmettitori) e quella indotta da una

colorazione con coloranti fluorescenti detti fluorocromi (fluorescenza secondaria). La fluorescenza è il fenomeno per cui determinate sostanze colpite da una determinata lunghezza d'onda emettono luce di lunghezza d'onda maggiore cioè nello spettro del visibile. La lente dell'obiettivo raccoglie questa luce fluorescente emessa (emissione: E_m), che passa quindi attraverso lo specchio dicroico. Qualsiasi luce di eccitazione riflessa viene bloccata da un terzo filtro (filtro a barriera). Pertanto, solo la luce emessa da molecole fluorescenti all'interno del campione viene osservata. La disposizione dei due filtri e dello specchio dicroico si chiama *cubo ottico*. I filtri e gli specchi dicroici sono scelti in base alle caratteristiche di eccitazione ed emissione del fluoroforo utilizzati.

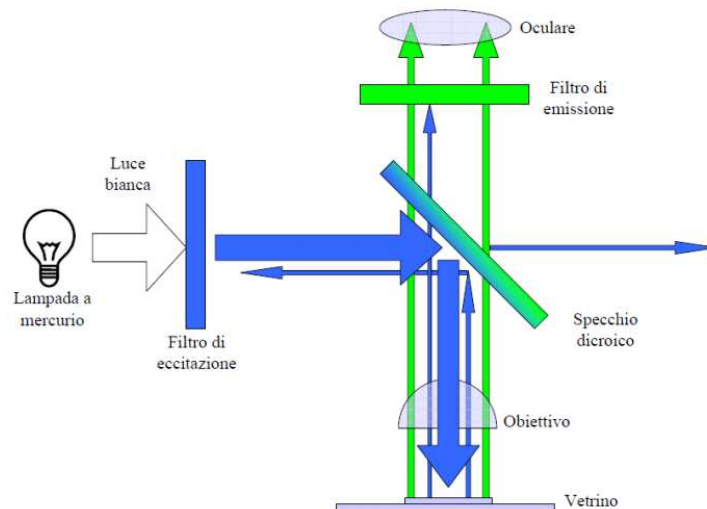


Fig.29: Immagine rappresentativa del cubo ottico e del tragitto della luce.

3.4.1 Protocollo sperimentale per gli studi di assorbimento della doxorubicina

Le cellule PANC-1 ed hTERT-HPNE sono state piastrate nei pozzetti di piastre da 24 well in numero 20.000 cellule/ml e incubate overnight. Il giorno successivo, per ogni pozzetto, abbiamo cambiato il terreno DMEM completo con il corrispettivo senza FBS a cui è stata aggiunta doxorubicina alla concentrazione di 10 μ M. Le cellule sono state quindi esposte o meno al campo magnetico per 1h. Dopo i trattamenti le cellule sono state lavate con 1 ml di PBS 1X e sono stati aggiunti 500 μ l di PBS 1X per effettuare l'analisi al microscopio.

Utilizzando la funzione "microscopia a fluorescenza" abbiamo effettuato tre foto per ogni pozzetto in posizioni distanti l'una dall'altra. Ciascuna delle tre immagini conteneva un numero simile di cellule, in modo da rendere le misure confrontabili. Il filtro (cubo ottico) utilizzato è stato *FITC-LP01-Clinical Filter Cube (EX 475/28, DM 500, BA 515LP) - EX B-2A* con spettro di eccitazione a 475 nm e 28 nm di larghezza minima garantita della banda e con la lunghezza d'onda di inizio dello spettro di emissione a 500 nm. Come si può notare dall'immagine lo spettro di emissione è ampio e comprende diverse lunghezze d'onda a partire da 500 nm (Fig.30). In questo spettro di eccitazione ed emissione rientra la doxorubicina. L'analisi delle immagini è stata eseguita con

il software NIS-elements Advanced Research (Nikon). Il software permette di selezionare in modo automatico tutte le cellule presenti nell'immagine e misurarne quindi la fluorescenza media.

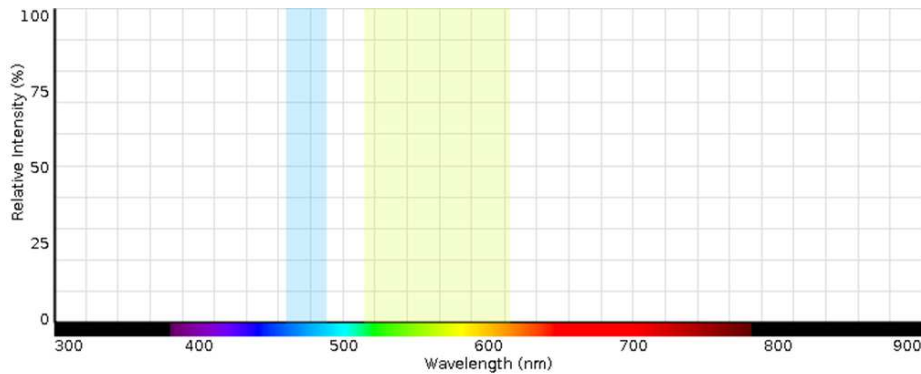


Fig.30: Rappresentazione delle caratteristiche ottiche del cubo ottico FITC-LP01.

3.5 Saggio della vitalità con trypan blue

Le cellule PANC-1 ed hTERT-HPNE sono state piastrate nei pozzetti di piastre da 24 well in numero 20.000 cellule/ml e incubate overnight. Il giorno successivo, per ogni pozzetto, abbiamo cambiato il terreno DMEM completo con il corrispettivo senza FBS a cui è stata aggiunta doxorubicina alla concentrazione di 10 μ M. Le cellule sono state quindi esposte o meno al campo magnetico per 1h. Dopo i trattamenti le cellule sono state lavate con 1 ml di PBS 1X. E' stata preparata una soluzione di trypan blue in un rapporto di 1:1 con il PBS 1X ed è stata aggiunta una aliquota in modo da ricoprire il pozzetto. Dopo un tempo 10 minuti il trypan blue è stato aspirato e sono state effettuate al microscopio tre grandi foto per ogni pozzetto con la microscopia in campo

chiaro a colori. Le cellule sono state contate con un apposito software (NIH Image J). Le cellule vitali, avendo la membrana intatta, non permettono la penetrazione del trypan blue nel citoplasma, al contrario, nelle cellule morte questo penetra facilmente rendendole distinguibili (blu intenso) dalle vive. Le cellule non trattate e trattate solo con il campo magnetico sono state prese come controllo.

3.6 Analisi statistica

Ogni esperimento è stato eseguito in triplicati indipendenti. I dati riportati si riferiscono alla media di ciascun replicato \pm l'errore standard della media (SEM). Le differenze tra i gruppi di trattamento sono state analizzate usando lo Student's t-test e considerate significative quando $p < 0,05$.

Tutti i test statistici di significatività assumono inizialmente la cosiddetta ipotesi zero, anche chiamata ipotesi nulla. Quando si effettua il confronto fra due o più gruppi di dati (campioni), l'ipotesi zero prevede sempre che non esista alcuna differenza tra i gruppi riguardo al parametro considerato. Quindi se l'ipotesi nulla è valida, i campioni vengono dalla stessa popolazione e le eventuali differenze osservate nei campioni (il parametro considerato) vanno attribuite al solo caso. Una decisione di respingere l'ipotesi nulla (presa sulla base del test statistico) è probabilmente giusta, ma potrebbe anche essere errata. La probabilità di commettere questo errore si chiama livello di significatività

del test. Il livello di significatività di un test può essere scelto a piacere dallo sperimentatore. Questa probabilità, chiamata anche valore P, di solito viene fissata ai valori tipici di 0.05 (5%). Se il parametro che andiamo a considerare dei due campioni è la media e vogliamo sapere se la eventuale differenza fra medie è significativa useremo il test di Student.

4. RISULTATI

4.1 Verifica della proporzionalità tra concentrazioni di doxorubicina e l'intensità di fluorescenza emessa a tempo costante

Nel mio studio ho voluto analizzare l'effetto dei campi elettromagnetici a bassa frequenza (ELF), 50 Hz, sull'assorbimento e rilascio di doxorubicina in due linee cellulari pancreatiche: PANC-1 e hTERT-HPNE E6/E7/K-RasG12D con fenotipo canceroso e non, rispettivamente. Inizialmente sono state svolte misure preliminari al citofluorimetro per verificare se la concentrazione di doxorubicina utilizzata nel trattamento fosse proporzionale all'intensità di fluorescenza cellulare. È stata misurata l'intensità di fluorescenza delle cellule hTERT-HPNE che sono state trattate con tre diverse concentrazioni di doxorubicina (1 μM , 10 μM e 20 μM) per 60 minuti. Il grafico (Fig.31) riporta l'intensità di fluorescenza emessa in funzione della concentrazione di doxorubicina ed è possibile notare che c'è proporzionalità tra i due parametri in corrispondenza di tutte e tre le concentrazioni. Il canale utilizzato al citofluorimetro per misurare la fluorescenza è FL2, che presenta un filtro che convoglia emissioni di lunghezza d'onda compresa tra 560 nm and 590 nm al sensore, a una tensione di 800 V.

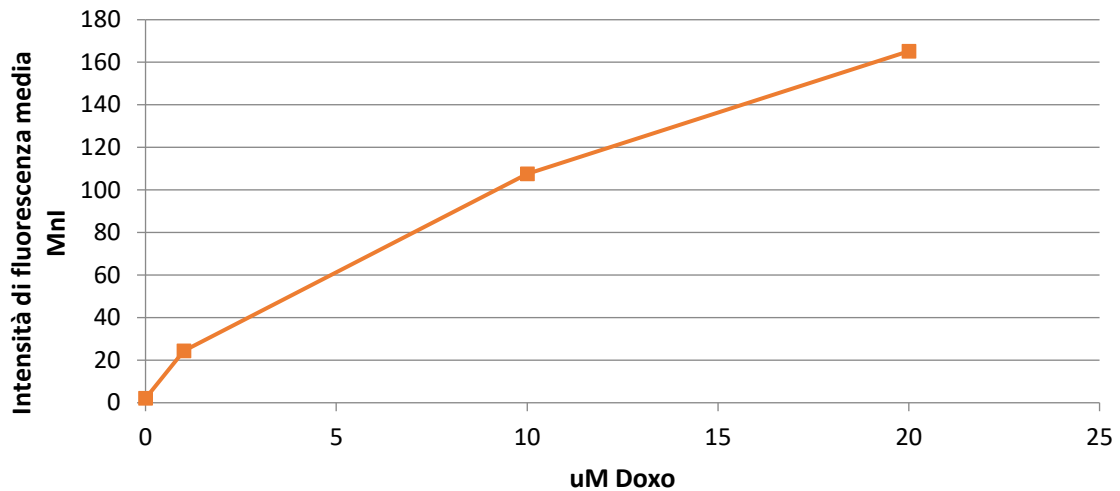


Fig.31: Cellule hTERT-HPNE trattate per 1h con diverse concentrazioni di doxorubicina. Il grafico mostra la proporzionalità tra le diverse concentrazioni (1 μM , 10 μM e 20 μM) di doxorubicina ed emissione di fluorescenza.

Grazie ai risultati ottenuti è stato possibile stabilire che la concentrazione di doxorubicina da utilizzare nelle prove sperimentali è di 10 μM così da poter escludere eventuale saturazione o variazione della curva dalla linearità.

4.2 Verifica della proporzionalità tra il tempo di esposizione e l'intensità di fluorescenza emessa alla concentrazione di 10 μM di doxorubicina

Una volta stabilita la concentrazione di doxorubicina da usare, di rilevante importanza era stabilire il tempo per cui ci fosse ancora proporzionalità tra concentrazione di doxorubicina ed emissione di fluorescenza prima di raggiungere la saturazione. E' stata misurata l'intensità di fluorescenza delle cellule hTERT-HPNE che sono state trattate con la doxorubicina alla

concentrazione di 10 μM da zero fino a 16 ore. In particolare, le misure sono state effettuate a 0h, 1h, 2h, 4h e 16h.

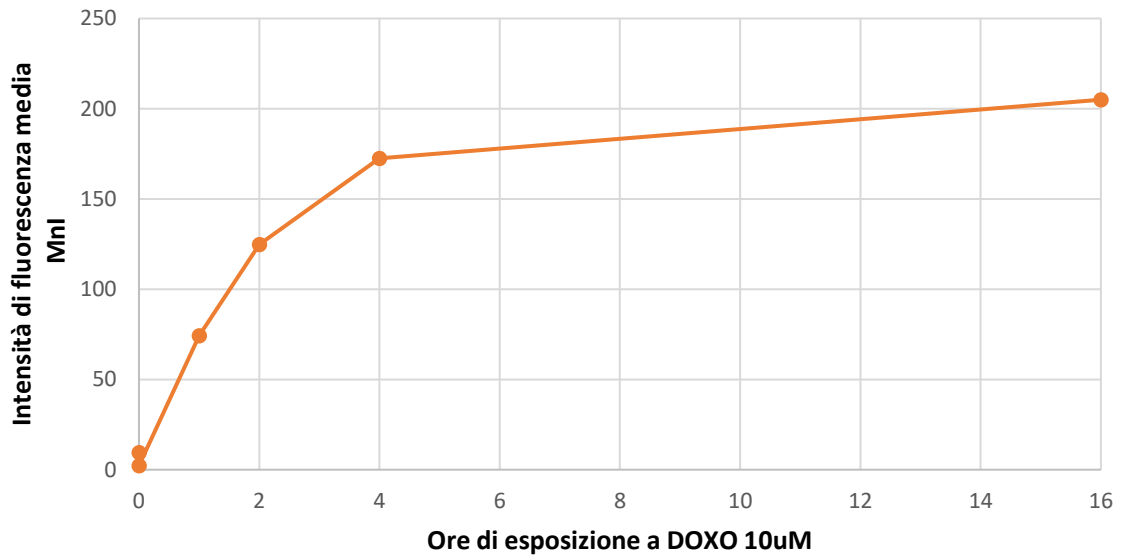


Fig.32: Cellule hTERT-HPNE trattate con doxorubicina 10 μM per diversi tempi. Il grafico mostra l'intensità di fluorescenza emessa dalla doxorubicina alla concentrazione di 10 μM in funzione del tempo in ore.

E' stato osservato che dopo 4h di trattamento con doxorubicina 10 μM , la concentrazione di farmaco nella cellula tendeva a crescere con minore velocità (zona di non linearità) per cui i trattamenti successivi sono stati effettuati per tempi non superiori alle 2h.

4.3 Gli effetti del campo elettromagnetico 50 Hz, 1 mT nel modulare l'assorbimento e il rilascio della doxorubicina in cellule cancerose e non del dotto pancreatico, a 1 ora di trattamento

Per verificare se i campi elettromagnetici a bassa frequenza, 50 Hz , di intensità 1 mT, modulassero l'assorbimento e il rilascio di doxorubicina, sono state eseguite delle misure di intensità di fluorescenza emessa tramite citofluorimetro su due linee cellulari, PANC-1 e hTERT-HPNE E6/E7/K-RasG12D, cancerose e non rispettivamente, sottoposte a diversi trattamenti a intervalli temporali di un'ora.

I grafici (Fig.33 e Fig.36) mostrano la media e la deviazione standard, di tre replicati sperimentali indipendenti, dell'intensità di fluorescenza media (MnI) per ogni trattamento delle due linee cellulari.

Dai grafici della figura 33 (a. PANC-1, b. hTERT-HPNE) si evince che l'esposizione per 1h al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) contemporaneamente al trattamento con doxorubicina (10 μ M) causa una riduzione significativa della fluorescenza emessa in entrambe le linee cellulari facendoci supporre una minor entrata del farmaco nelle cellule stesse. L'intensità di fluorescenza media (MnI), in presenza di sola doxorubicina per 1h, per le PANC-1 e le hTERT-HPNE è di 891,8 e 1107,7 rispettivamente, mentre nel trattamento insieme al campo elettromagnetico è diminuita di circa il 52 % e il 36% rispettivamente.

Inoltre per verificare se effettivamente il campo elettromagnetico prima del trattamento con doxorubicina influenzasse l'assorbimento della stessa sono state eseguite misure di fluorescenza emessa nelle due linee cellulari, dapprima esposte per 1h al campo magnetico senza doxorubicina e poi trattate per un'altra ora con doxorubicina senza campo magnetico. Dal grafico delle PANC-1 (Fig.33-a) si nota un aumento della fluorescenza media emessa circa del 30%, ma non è significativo rispetto al valore di riferimento (cellule trattate solo con doxorubicina per 1h e non esposte al campo), mentre per le hTERT-HPNE non c'è proprio aumento di fluorescenza, la MnI infatti risulta essere 1096,9.

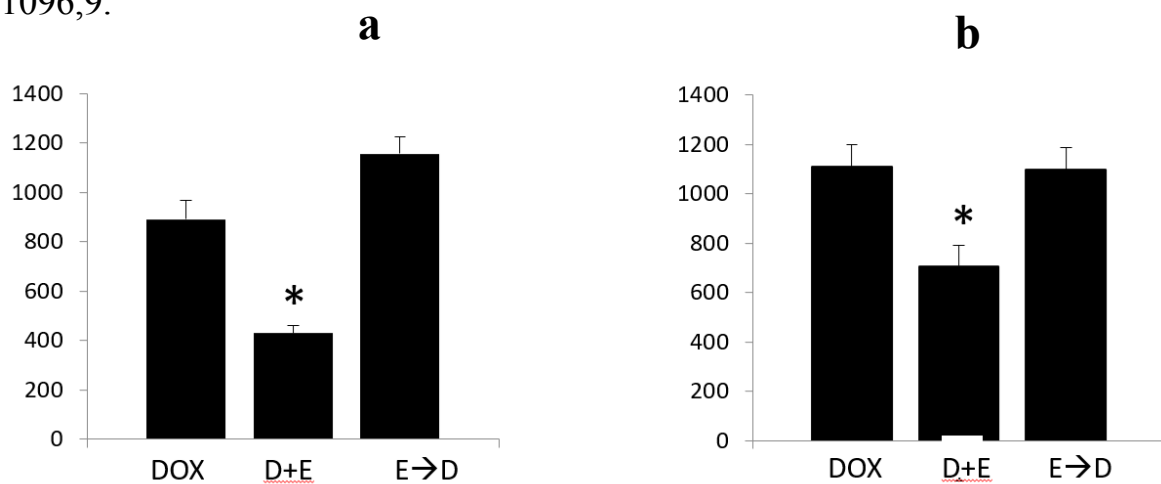


Fig.33: Istogramma che riporta l'intensità di fluorescenza media (MnI) nelle seguenti condizioni ; trattamento solo doxorubicina (10 μ M) per 1h (DOX), trattamento con doxorubicina (10 μ M) contemporaneamente all'esposizione al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) per 1h (D+E), esposizione di 1h al campo magnetico senza doxorubicina (50 Hz, 1 mT) seguita da trattamento di 1h solo con doxorubicina (10 μ M) (E→D) nelle cellule PANC-1 (a), hTERT-HPNE (b).

Di seguito riporto i corrispondenti grafici “ a istogramma” del citofluorimetro dove in ascissa viene riportata l’intensità di fluorescenza emessa e in ordinata il numero di cellule che hanno emesso fluorescenza per la presenza di doxorubicina intracellulare. In ogni grafico sono presenti i trattamenti (in rosso) e la prova sperimentale di riferimento (in nero) per evidenziare il discostamento tra i due.

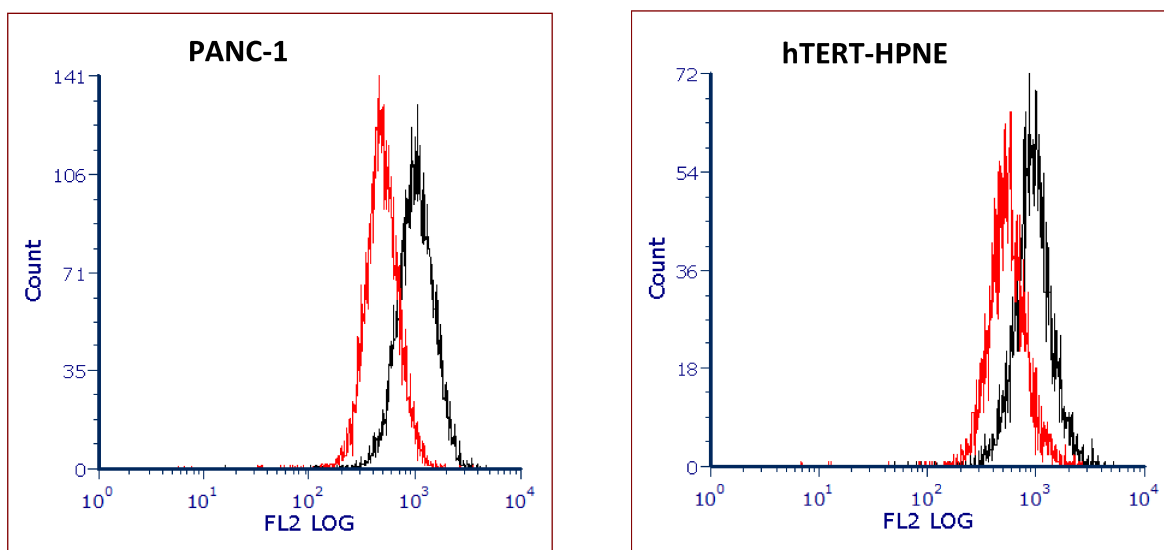


Fig.34: Grafici “ a istogramma” del citofluorimetro per le PANC-1 e le hTERT-HPNE di un replicato rappresentativo di ogni esperimento: in nero trattamento di 1h delle cellule con doxorubicina ($10 \mu\text{M}$) senza esposizione al campo magnetico, in rosso trattamento contemporaneo di doxorubicina ($10 \mu\text{M}$) e campo magnetico (50 Hz, 1 mT) per 1h.

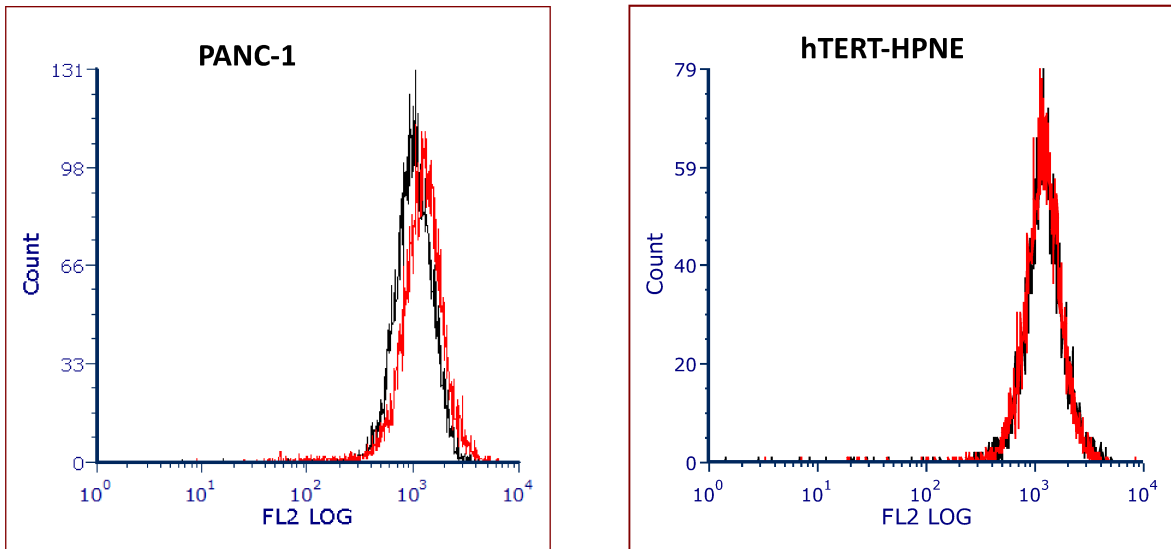


Fig.35: Grafici “a istogramma” del citofluorimetro per le PANC-1 e le hTERT-HPNE di un replicato rappresentativo di ogni esperimento: in nero trattamento di 1h delle cellule con doxorubicina (10 μ M) senza esposizione al campo magnetico, in rosso esposizione al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) senza doxorubicina per 1h con successivo trattamento con doxorubicina (10 μ M) senza campo magnetico per un'altra ora.

Dai grafici a barre in figura 36 (a. PANC-1, b. hTERT-HPNE) è possibile notare che il trattamento delle cellule con doxorubicina per 1h e poi lasciate per un'altra ora in terreno DMEM senza FBS in assenza di doxorubicina e campo magnetico causa una riduzione significativa della fluorescenza media emessa in entrambe le linee cellulari rispetto al valore di riferimento (cellule trattate solo con doxorubicina per 1h e non esposte al campo). Per le PANC-1 la diminuzione è circa del 35%, per le hTERT-HPNE è circa del 36%. Inoltre per

verificare se effettivamente il campo elettromagnetico dopo trattamento con doxorubicina ne influenzasse il rilascio dalle cellule, queste ultime sono state trattate con doxorubicina (10 μ M) per 1h e solo successivamente esposte al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) senza doxorubicina per un'altra ora. Dal grafico si evince che la fluorescenza media emessa diminuisce in entrambe le linee cellulari ma in modo significativo solo per le hTERT-HPNE con una diminuzione di circa il 38%. Risultato interessante riguarda invece le PANC-1 che presentano una diminuzione di fluorescenza minore, circa il 20%, rispetto al riferimento tanto che non risulta significativa.

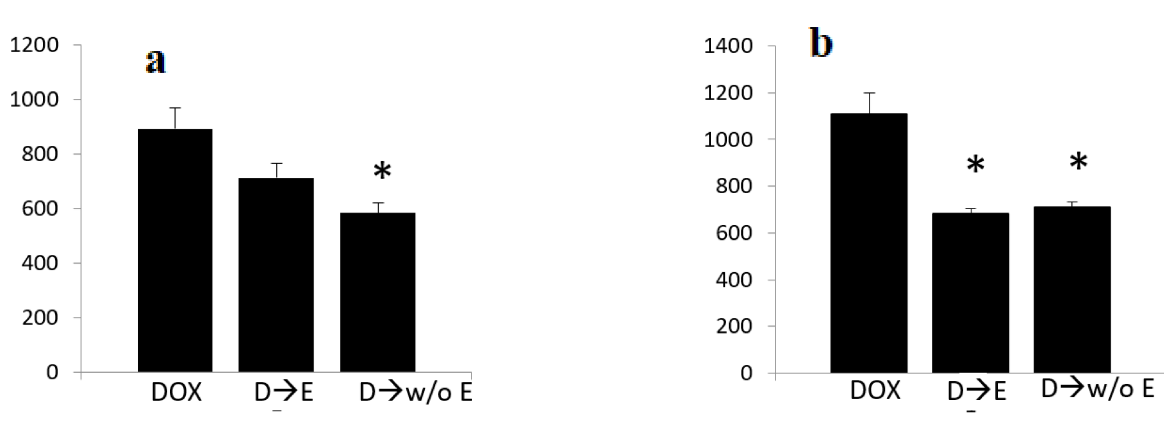


Fig.36: Istogramma che riporta l'intensità di fluorescenza media (MFI) nelle seguenti condizioni; trattamento solo doxorubicina (10 μ M) per 1h (DOX), trattamento di 1h con doxorubicina (10 μ M) e successiva esposizione di 1h al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) senza doxorubicina (D→E), trattamento di 1h con doxorubicina (10 μ M) e successivo trattamento di 1h senza doxorubicina né campo magnetico (D→ w/o E) nelle cellule PANC-1 (a), hTERT-HPNE (b).

Sembrerebbe, quindi, che l'esposizione delle PANC-1 all'ELF per 1h rallenti l'uscita del farmaco attraverso la membrana plasmatica ma è importante sottolineare che la differenza in percentuale tra l'intensità media di fluorescenza emessa del trattamento con la doxorubicina per 1h poi nessun trattamento per un'altra ora e il trattamento con la doxorubicina per 1h e poi esposizione al campo magnetico per un'altra ora è circa del 18% e non è significativa. Di seguito, per confermare quello già detto, riporto i corrispondenti grafici "a istogramma" del citofluorimetro. Anche qui in ogni grafico sono presenti i trattamenti (in rosso) e la prova sperimentale di riferimento (in nero) per evidenziare il discostamento tra i due.

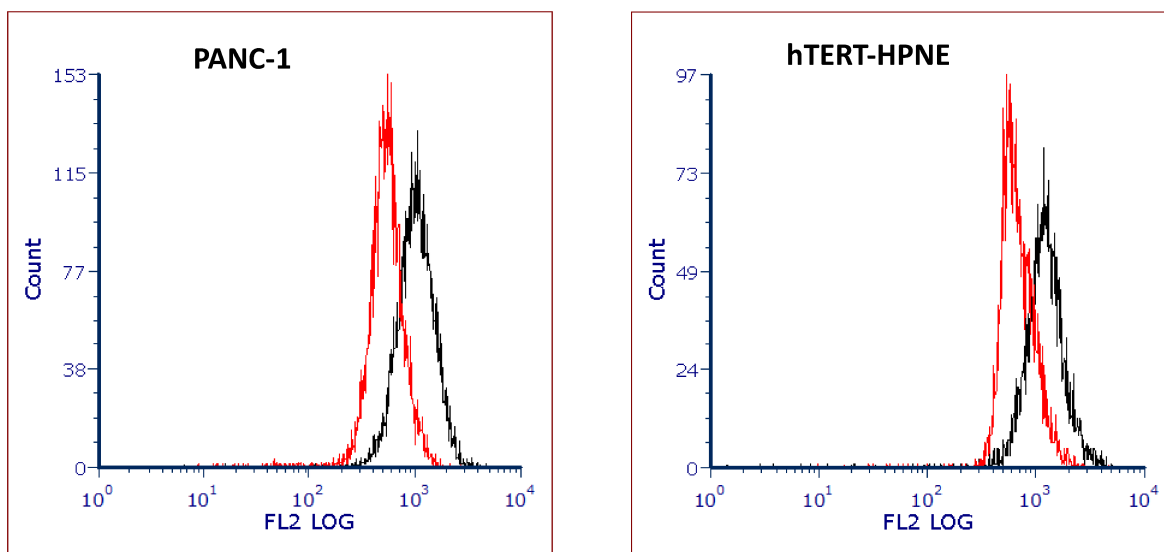


Fig.37: Grafici "a istogramma" del citofluorimetro per le PANC-1 e le hTERT-HPNE di un replicato rappresentativo di ogni esperimento: in nero trattamento di 1h delle cellule con doxorubicina (10 μ M) senza esposizione al campo magnetico , in rosso trattamento di 1h con doxorubicina (10 μ M) e successivo trattamento senza doxorubicina né campo magnetico per 1h.

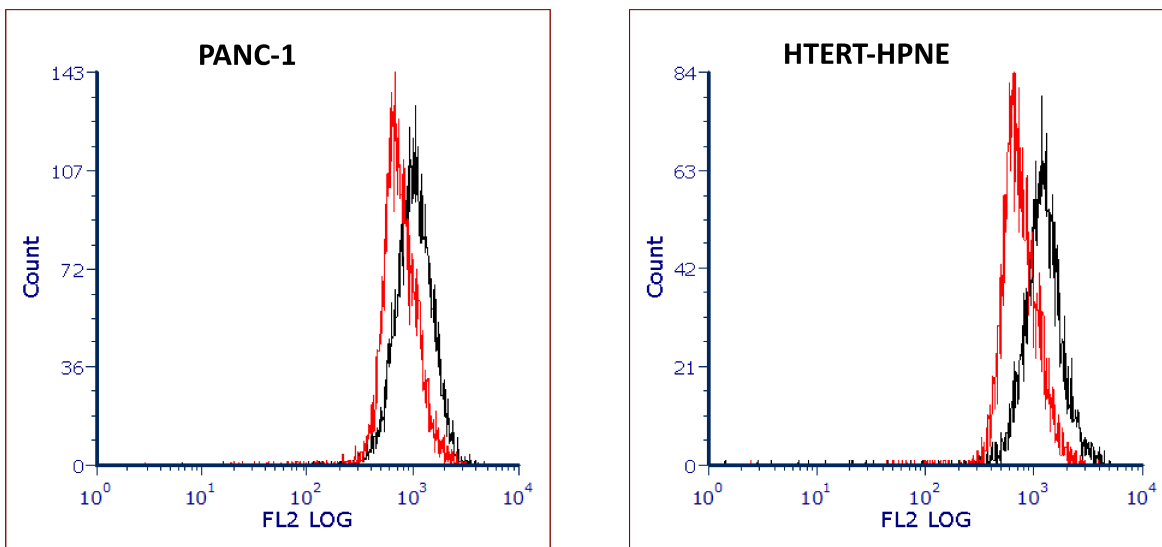


Fig.38: Grafici “a istogramma” del citofluorimetro per le PANC-1 e le hTERT-HPNE di un replicato rappresentativo di ogni esperimento: in nero trattamento di 1h delle cellule con doxorubicina (10 μ M) senza esposizione al campo magnetico, in rosso trattamento di 1h con doxorubicina (10 μ M) con successiva esposizione di 1h al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) senza doxorubicina.

4.4 Gli effetti del campo elettromagnetico a 50 Hz, 1 mT nel modulare l'assorbimento e il rilascio della doxorubicina in cellule cancerose e non del dotto pancreatico, a 2 ore di trattamento

Sempre con lo scopo di verificare che i campi elettromagnetici a bassa frequenza, 50 Hz, di intensità 1 mT, modulassero l'assorbimento e il rilascio di doxorubicina, sono state eseguite con il citofluorimetro delle misure di intensità di fluorescenza emessa sulle due linee cellulari, PANC-1 e hTERT-HPNE E6/E7/K-RasG12D, cancerose e non rispettivamente, sottoposte ai medesimi trattamenti visti nel paragrafo precedente ma a intervalli di 2 ore.

I grafici a barre (Fig.39 e Fig.42) mostrano la media e la deviazione standard, di tre replicati sperimentali indipendenti, dell'intensità di fluorescenza media (MnI) per ogni trattamento delle due linee cellulari rispetto al valore di riferimento che è sempre il trattamento delle cellule con la doxorubicina per 2h senza campo magnetico.

Dai grafici della figura 39 (a. PANC-1, b. hTERT-HPNE) si evince che l'esposizione per 2h al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) contemporaneamente al trattamento con doxorubicina (10 μ M) causa una riduzione della fluorescenza emessa in entrambe le linee cellulari ma significativa solo per le hTERT-HPNE facendoci supporre, anche in questo caso, una minor entrata del farmaco nelle cellule stesse. L'intensità di fluorescenza media (MnI), in

presenza di sola doxorubicina per 2h, per le PANC-1 e le hTERT-HPNE è di 1562,2 e 1553,7 rispettivamente, mentre nel trattamento insieme al campo elettromagnetico è diminuita di circa il 27% e il 30% rispettivamente. Per quanto riguarda il trattamento delle cellule, prima esposte per 2h al campo magnetico senza doxorubicina e poi trattate per altre 2h con doxorubicina senza campo magnetico, non si osserva un aumento della fluorescenza per entrambe le linee cellulari.

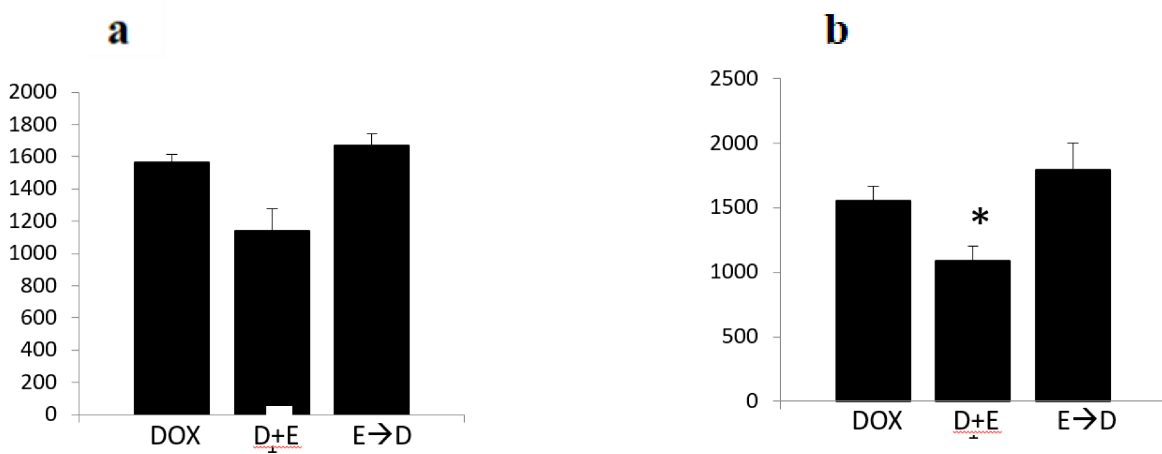


Fig.39: Istogramma che riporta l'intensità di fluorescenza media (MFI) nelle seguenti condizioni; trattamento solo doxorubicina (10 μ M) per 2h (DOX), trattamento con doxorubicina (10 μ M) contemporaneamente all'esposizione al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) per 2h (D+E), esposizione di 2h al campo magnetico senza doxorubicina (50 Hz, 1 mT) seguita da trattamento di 2h solo con doxorubicina (10 μ M) (E→D) nelle cellule PANC-1 (a), hTERT-HPNE (b).

Di seguito riporto i corrispondenti grafici “a istogramma” del citofluorimetro dove in ascissa viene riportata l’intensità di fluorescenza emessa e in ordinata il numero di cellule che hanno emesso fluorescenza grazie alla doxorubicina intracellulare. In ogni grafico sono presenti i trattamenti (in rosso) e la prova sperimentale (in nero) di riferimento per evidenziare il discostamento tra i due.

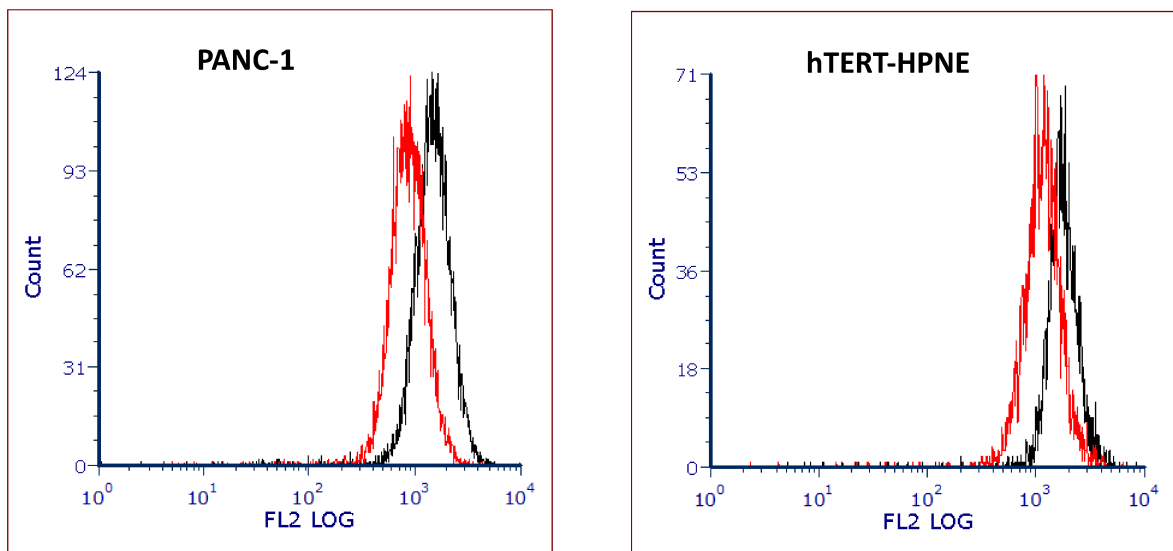


Fig.40: Grafici “a istogramma” del citofluorimetro per le PANC-1 e le hTERT-HPNE di un replicato rappresentativo di ogni esperimento: in nero trattamento di 2h delle cellule con doxorubicina (10 μ M) senza esposizione al campo magnetico, in rosso trattamento contemporaneo di doxorubicina (10 μ M) e campo magnetico (50 Hz, 1 mT) per 2h.

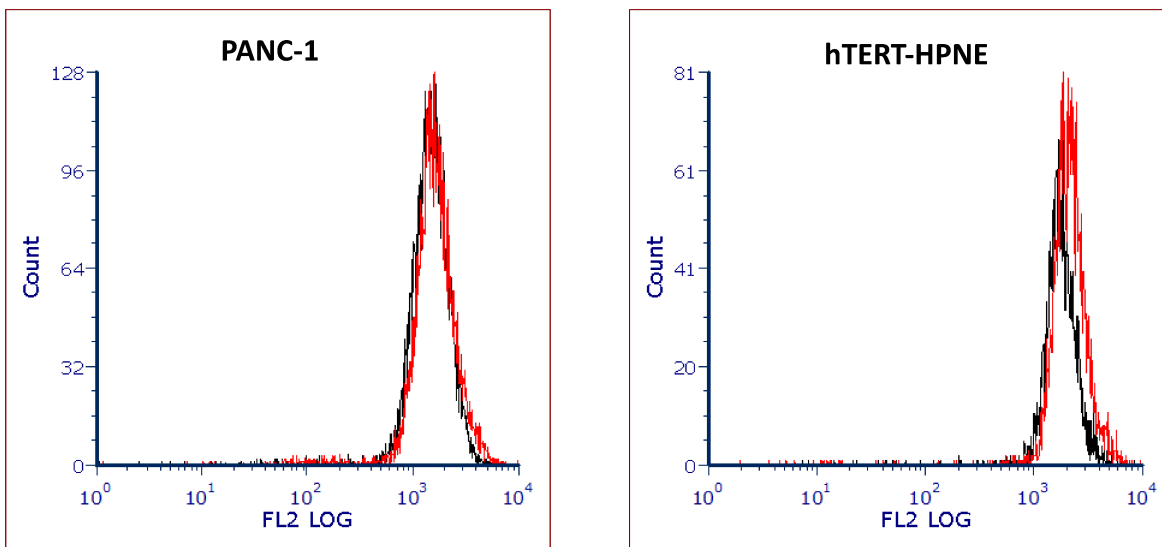


Fig.41: Grafici “a istogramma” del citofluorimetro per le PANC-1 e le hTERT-HPNE di un replicato rappresentativo di ogni esperimento: in nero trattamento di 2h delle cellule con doxorubicina (10 μ M) senza esposizione al campo magnetico, in rosso esposizione di 2h al campo magnetico senza doxorubicina e successivo trattamento con doxorubicina senza campo magnetico per altre 2h.

I grafici a barre in figura 42 (a. PANC-1, b. hTERT-HPNE) mostrano che il trattamento delle cellule con doxorubicina per 2h e poi lasciate per altre 2h in terreno DMEM senza FBS in assenza di doxorubicina e campo magnetico causa una riduzione significativa della fluorescenza media emessa in entrambe le linee cellulari rispetto al valore di riferimento, circa del 60% per le PANC-1 e circa del 50% per le hTERT-HPNE.

Inoltre per verificare se effettivamente il campo elettromagnetico dopo trattamento con doxorubicina influenzasse il rilascio di doxorubicina dalle

cellule, queste ultime sono state trattate con doxorubicina (10 μ M) per 2h con successiva esposizione al campo magnetico (50 Hz 1 mT) senza doxorubicina per altre 2h. Dal grafico (Fig.42) notiamo che la fluorescenza media emessa diminuisce in modo significativo, di circa il 57% per le PANC-1 e di circa il 47% per le hTERT-HPNE, come se il campo magnetico non ci fosse.

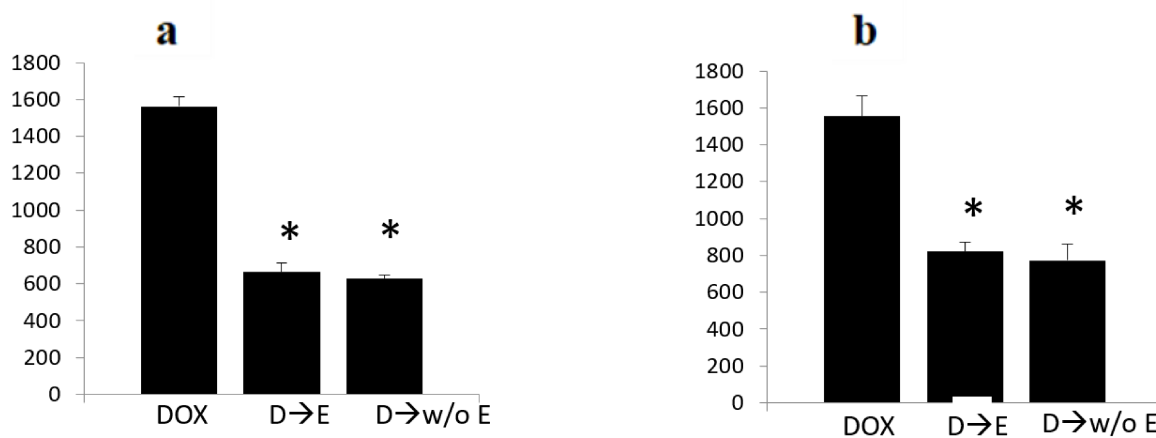


Fig.42: Istogramma che riporta l'intensità di fluorescenza media (MnI) nelle seguenti condizioni; trattamento solo doxorubicina (10 μ M) per 2h (DOX), trattamento di 2h con doxorubicina (10 μ M) con successiva esposizione di 2h al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) senza doxorubicina (D→E), trattamento di 2h con doxorubicina (10 μ M) e successivo trattamento di 2h senza doxorubicina né campo magnetico (D →w/o E) nelle cellule PANC-1 (a), hTERT-HPNE (b).

Di seguito riporto i corrispondenti grafici “a istogramma” del citofluorimetro. Anche qui in ogni grafico sono presenti i trattamenti (in rosso) e la prova sperimentale di riferimento (in nero) per evidenziare il discostamento tra i due.

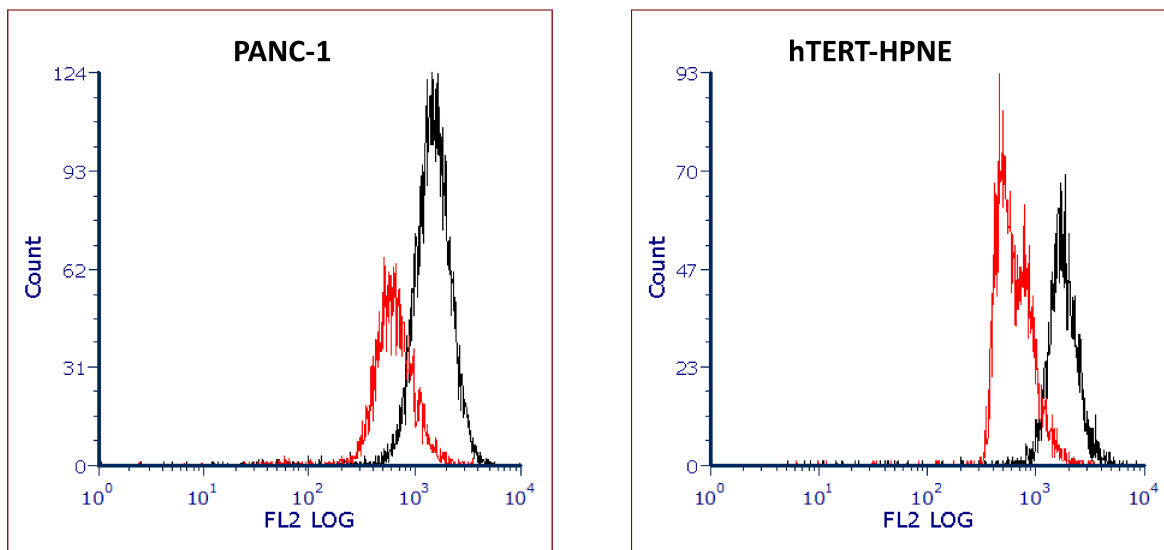


Fig.43: Grafici “a istogramma” del citofluorimetro per le PANC-1 e le hTERT-HPNE di un replicato rappresentativo di ogni esperimento: in nero trattamento di 2h delle cellule con doxorubicina (10 μ M) senza esposizione al campo magnetico, in rosso trattamento con doxorubicina (10 μ M) e successivo trattamento senza doxorubicina né campo magnetico per 2h.

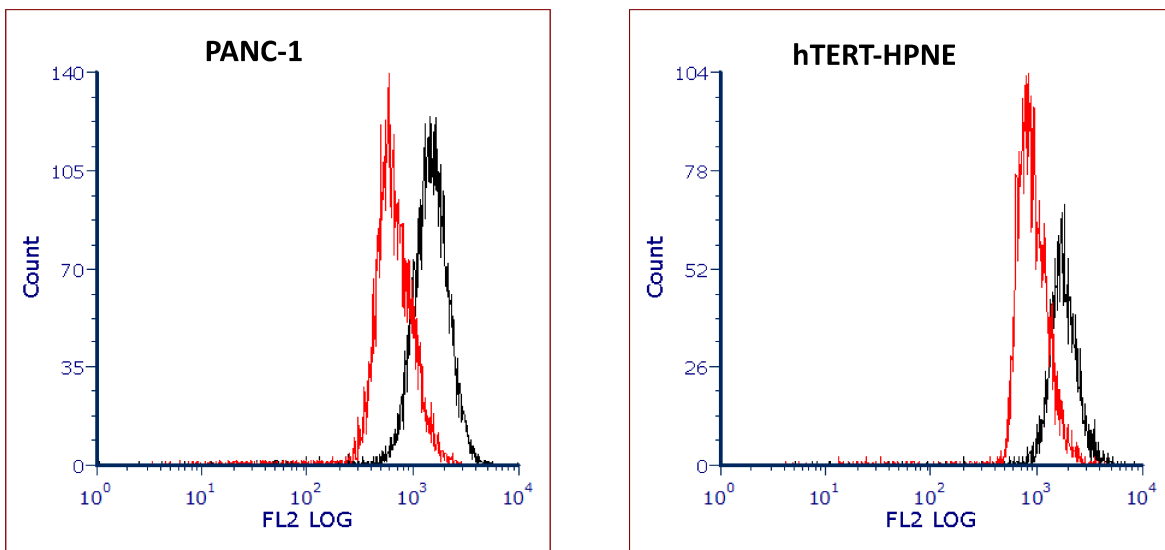


Fig.44: grafici “a istogramma” del citofluorimetro per le PANC-1 e le hTERT-HPNE di un replicato rappresentativo di ogni esperimento: in nero trattamento di 2h delle cellule con doxorubicina alla concentrazione di 10 μ M senza esposizione al campo magnetico, in rosso trattamento delle cellule solo con la doxorubicina (10 μ M) poi trattamento con campo magnetico (50 Hz, 1 mT) senza doxorubicina per 2 h.

4.5 Il campo elettromagnetico a 50 Hz, 1 mT riduce l'ingresso della doxorubicina nelle due linee cellulari pancreatiche

Dai risultati ottenuti precedentemente è emerso che il trattamento contemporaneo delle due linee cellulari, PANC-1 e hTERT-HPNE E6/E7/K-RasG12D, con la doxorubicina e campo elettromagnetico per 1h comporta una riduzione significativa della fluorescenza emessa rispetto alle cellule trattate per 1h solamente con la doxorubicina. Abbiamo quindi voluto confermare i risultati ottenuti con il citofluorimetro anche tramite microscopio a fluorescenza. Le cellule PANC-1 e hTERT-HPNE sono state esposte, durante 1h di trattamento con doxorubicina (10 μ M), a campi magnetici della frequenza di 50 Hertz. La diminuzione, rispetto al controllo, di fluorescenza emessa delle cellule trattate con doxorubicina ed esposte all'ELF, può essere visivamente apprezzata dalle immagini acquisite con microscopio a fluorescenza (Fig.46). Il software NIS-Element Advanced Research, ha permesso di misurare l'intensità di fluorescenza media delle cellule visualizzate. Il grafico a barre nella figura 45 riporta l'intensità di fluorescenza media (MnI) misurata per ogni trattamento effettuato. Risulta evidente una diminuzione significativa dell'intensità di fluorescenza media per entrambe le linee cellulari rispetto al controllo (cellule trattate solamente con la doxorubicina per 1h non esposte al campo) confermando i dati ottenuti al citofluorimetro. La diminuzione

dell'intensità di fluorescenza media emessa è di circa il 45 % per le PANC-1 e di circa il 41% per le hTERT-HPNE.

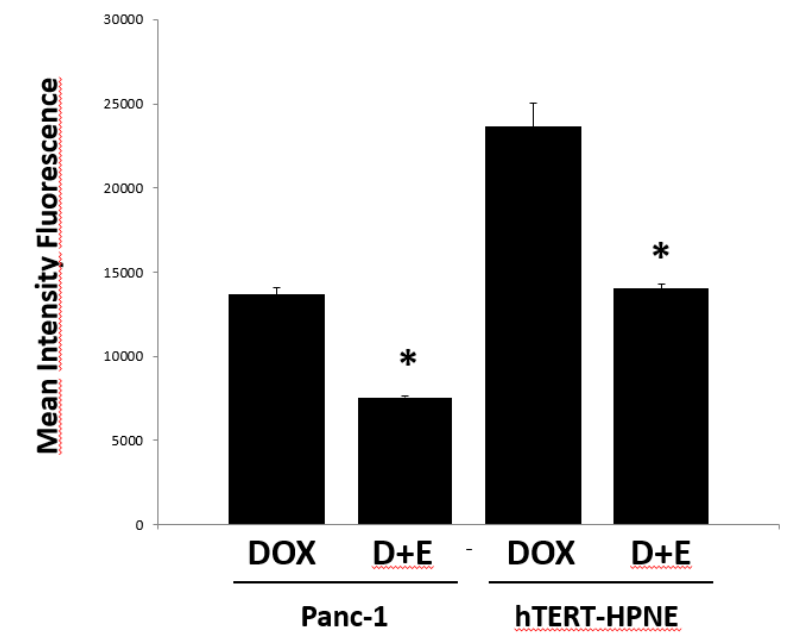
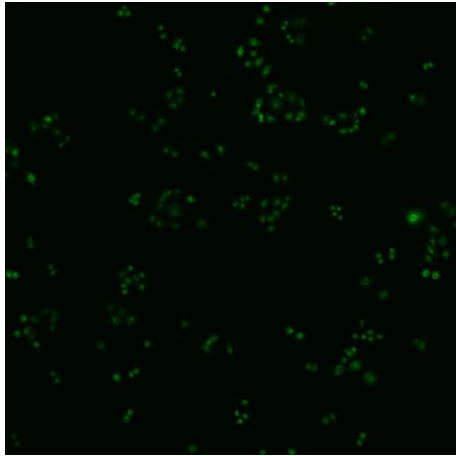
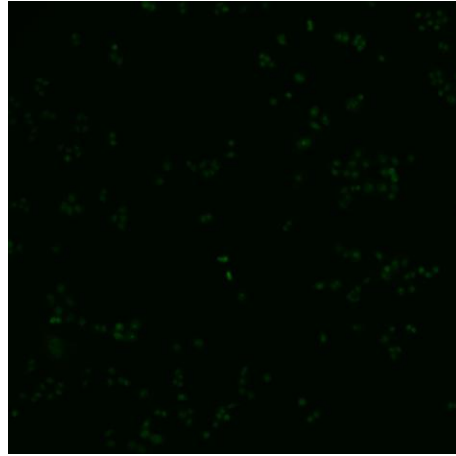


Fig.45: Istogramma che riporta l'intensità di fluorescenza media (MnI) nelle seguenti condizioni; trattamento solo doxorubicina (10 μ M) per 1h (DOX), trattamento di 1h con doxorubicina (10 μ M) contemporaneamente all'esposizione al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) (D+E) per le cellule PANC-1 e hTERT-HPNE.

b. PANC-1 Doxo

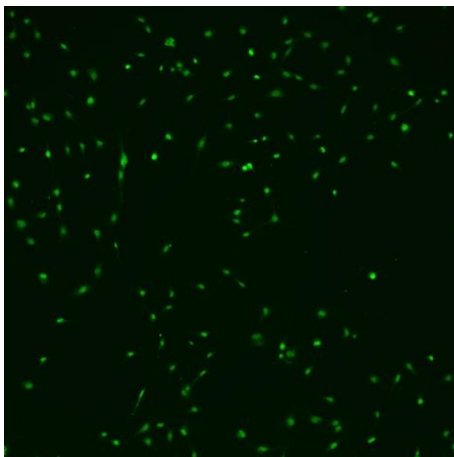


a. PANC-1 Doxo + campo



c. hTERT-HPNE

Doxo



d. hTERT-HPNE

Doxo + campo

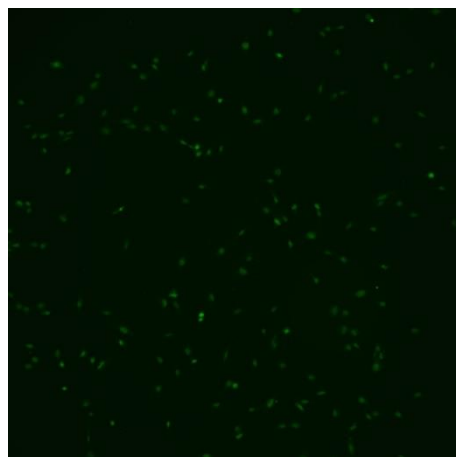


Fig.46: Immagini effettuate con il microscopio a fluorescenza di a) cellule PANC-1 trattate con solo doxorubicina per 1h (Doxo), b) PANC-1 trattate 1h con doxorubicina e campo magnetico (Doxo + campo), c) hTERT-HPNE trattate 1h con solo doxorubicina (Doxo), d) hTERT-HPNE trattate 1h con doxorubicina e campo magnetico (Doxo + campo).

4.6 Un minore assorbimento di doxorubicina nella cellula corrisponde effettivamente ad una minore mortalità cellulare

Dal momento che il campo elettromagnetico (50 Hz, 1 mT) ostacola l'assorbimento di doxorubicina da parte delle cellule, si è voluto verificare se ad un minor ingresso di farmaco corrispondesse una minore citotossicità, tramite il saggio della vitalità con trypan blue. Il saggio è stato eseguito dopo che le due linee cellulari sono state esposte, durante 1h di trattamento con doxorubicina (10 μ M), a campi elettromagnetici della frequenza di 50 Hertz, di intensità 1 mT. La vitalità è stata confrontata con le cellule trattate solo con la doxorubicina (10 μ M) e non esposte al campo. Come controllo sono state utilizzate cellule non trattate e non esposte e cellule esposte solamente al campo elettromagnetico (50 Hz 1 mT). Dalla conta cellulare effettuata si evince che la percentuale di cellule morte diminuisce quando sono esposte al campo elettromagnetico, rispetto al controllo con solo la doxorubicina, infatti la mortalità per le PANC-1 è circa del 38% nel trattamento con solo la doxorubicina rispetto al 13% circa per le cellule trattate contemporaneamente con campo elettromagnetico. La mortalità per le hTERT-HPNE è circa del 29% nel trattamento con solo la doxorubicina per 1h mentre è circa del 15% quando sono contemporaneamente esposte al campo. Il controllo effettuato tramite la sola esposizione di 1h al campo elettromagnetico presenta una mortalità di circa

l'11% per le PANC-1 e di circa il 12% per le hTERT-HPNE. Il controllo effettuato con cellule non esposte e non trattate presenta una mortalità di circa il 13% per le PANC-1 e del 12% per le hTERT-HPNE.

Da questo risultato è possibile dimostrare che ad una minor fluorescenza emessa dalle cellule trattate con doxorubicina (10 μ M) e campo elettromagnetico (50 Hz, 1 mT) corrisponde minor tossicità del farmaco nelle cellule.

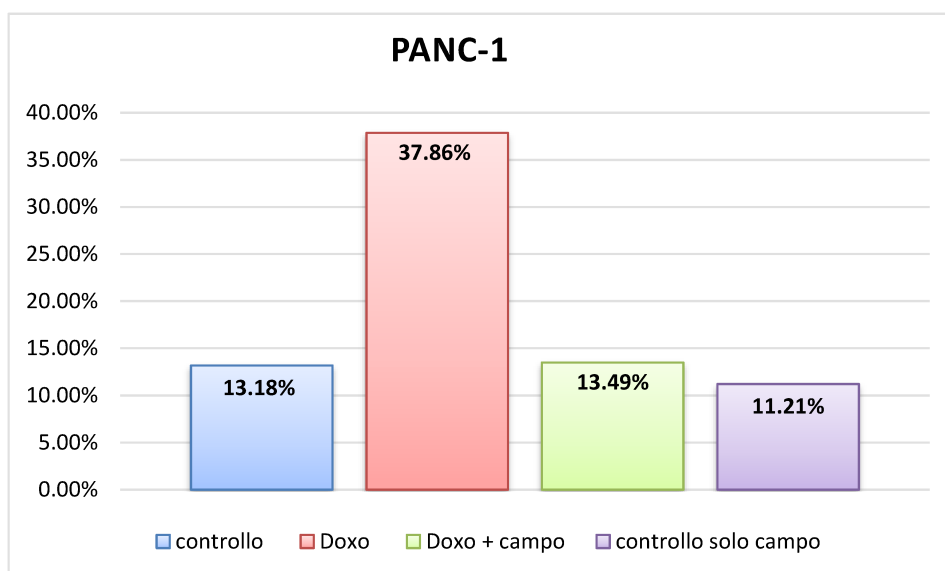


Fig.47: Istogramma che riporta la percentuale di cellule morte nelle seguenti condizioni per le PANC-1; cellule non esposte e non trattate (controllo), trattamento solo doxorubicina (10 μ M) per 1h (Doxo), trattamento di 1h con doxorubicina (10 μ M) contemporaneamente all'esposizione al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) (Doxo + campo), sola esposizione di 1h al campo elettromagnetico (50 Hz, 1 mT) (controllo solo campo).

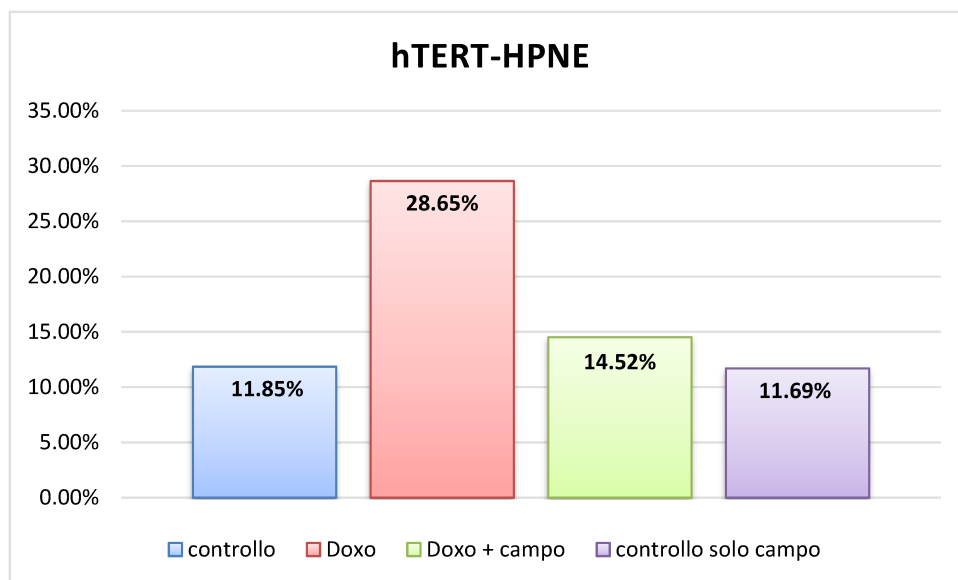
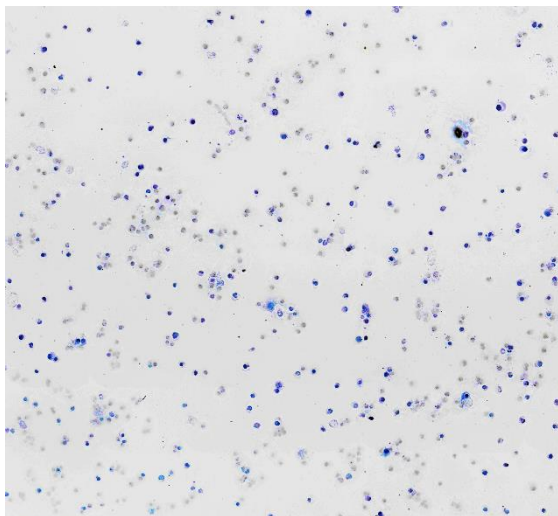
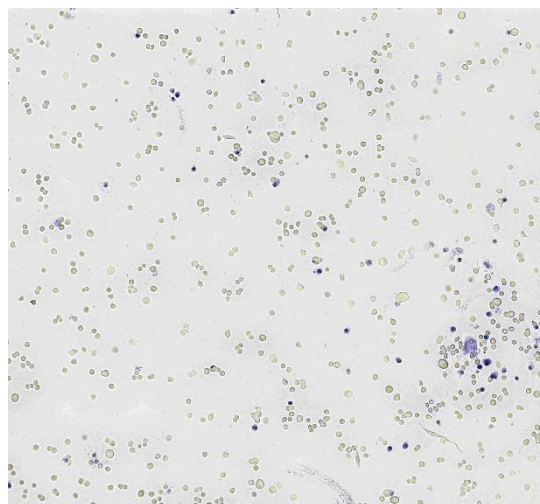


Fig.48: Istogramma che riporta la percentuale di cellule morte nelle seguenti condizioni per le hTERT-HPNE; cellule non esposte e non trattate (controllo), trattamento solo doxorubicina (10 μ M) per 1h (Doxo), trattamento di 1h con doxorubicina (10 μ M) contemporaneamente all'esposizione al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) (Doxo + campo), sola esposizione di 1h al campo elettromagnetico (50 Hz, 1 mT) (controllo solo campo).

a. PANC-1 Doxo

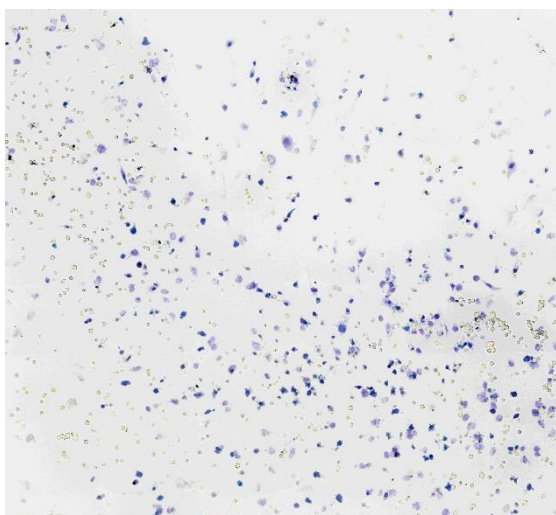


b. PANC-1 Doxo + campo



c. hTERT-HPNE

Doxo



d. hTERT-HPNE

Doxo + Campo

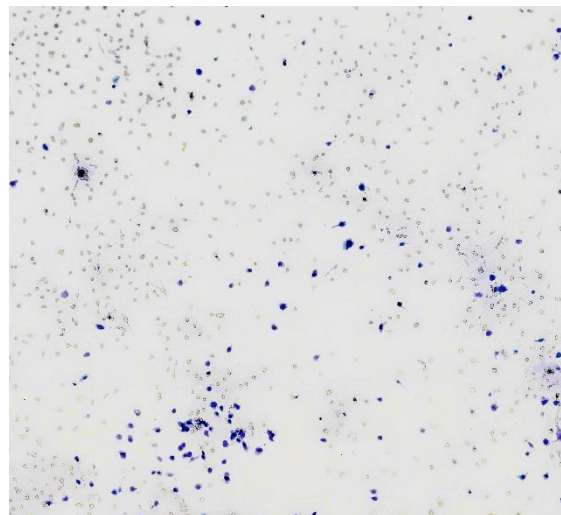


Fig.49: Immagini effettuate con il microscopio in campo chiaro a colori a) cellule PANC-1 trattate con solo doxorubicina per 1h (Doxo), b) PANC-1 trattate 1h con doxorubicina e campo magnetico (Doxo + campo), c) hTERT-HPNE trattate 1h con solo doxorubicina (Doxo), d) hTERT-HPNE trattate 1h con doxorubicina e campo magnetico (Doxo + campo).

5. DISCUSSIONI

Nel presente studio è stata valutata la possibilità che il campo elettromagnetico a frequenze estremamente basse (ELF-MF), precisamente a 50 Hz, moduli l'assorbimento e il rilascio del farmaco doxorubicina in cellule cancerose e non del dotto pancreatico. Il campo avrebbe potuto aumentare l'assorbimento nelle cellule cancerose o diminuirlo nelle cellule con fenotipo non canceroso, aumentando, nel primo caso, l'accessibilità del chemioterapico e proteggendo, nel secondo, le cellule dalla citotossicità. La doxorubicina, della famiglia delle antracicline, in questo studio, è stata utilizzata come agente chemioterapico modello grazie alla sua fluorescenza naturale che ne consente facilmente la quantificazione all'interno delle cellule.

In accordo con quanto detto è stato dimostrato che l'esposizione al campo elettromagnetico (50 Hz, 1 mT) di cellule del dotto pancreatico cancerose (PANC-1) e non cancerose (hTERT-HPNE E6/E7/K-RasG12D) in contemporanea al trattamento con la doxorubicina (10 μ M) per 1h ha comportato una diminuzione significativa (fino al 50 %) di intensità di fluorescenza emessa (MnI) rispetto al controllo, effettuato trattando le cellule solo con la doxorubicina. Dopo 2h di trattamento è risultata comunque una diminuzione di fluorescenza emessa, ma minore, circa del 30 %.

Quanto detto dimostra che ELF-MF rallenta ed ostacola l'entrata del farmaco nelle cellule con probabile protezione dagli effetti citotossici della doxorubicina, ma non ne aumenta l'assorbimento che avrebbe invece fatto ipotizzare ad un miglioramento dell'efficacia della chemioterapia.

Inoltre il saggio di vitalità del trypan blue ha evidenziato una minor mortalità cellulare per entrambe le linee cellulari trattate contemporaneamente con la doxorubicina e il campo elettromagnetico per 1h rispetto a quelle trattate solo con la doxorubicina, dimostrando in effetti che una diminuzione della concentrazione intracellulare di doxorubicina corrisponde anche ad una diminuzione della mortalità, per cui le cellule sono protette dalla tossicità del farmaco.

Grazie a queste evidenze, si potrebbe pensare di costruire un dispositivo che generi ELF-MF, da applicare esternamente al paziente vicino al cuore per proteggerlo dagli effetti collaterali dei farmaci antitumorali in quanto ridurrebbe, nel caso specifico, la diffusione del farmaco doxorubicina nelle cellule cardiache.

In questa condizione, non sarebbe necessario ridurre la dose o interrompere il trattamento nei pazienti oncologici con cardiopatia. Come è stato detto, il trattamento a due ore non ha amplificato gli effetti di ELF-MF, il dispositivo quindi potrebbe essere indossato per un breve periodo, non più di un'ora,

evitando gli eventuali effetti negativi, ancora non confermati, che potrebbero derivare dal campo elettromagnetico.



Fig.50: Rappresentazione schematica del dispositivo che genera ELF-EM da applicare esternamente al paziente vicino al cuore.

In uno studio infatti è stato dimostrato che l'esposizione a 40 Hz, 7 mT con ELF-MF per 60 min / giorno per due settimane ha causato la produzione di ROS nel tessuto cardiaco del ratto [42]. Per l'uomo invece sono state fatte delle prove con gruppi di volontari dove l'esposizione a campi elettrici e magnetici combinati a 60 Hz (9 kV / m, 0,02 mT) per 3 e 6 ore ha portato ad una diminuzione della frequenza cardiaca durante e subito dopo l'esposizione. E' stato inoltre visto che sebbene l'esposizione continua a campi elettrici e

magnetici combinati a 9 kV / m, 0,02 mT rallenti la frequenza del cuore, l'esposizione intermittente può determinare un rallentamento e un aumento della frequenza cardiaca [43]. Per tale motivo gli effetti collaterali a livello del cuore causati dal campo elettromagnetico a frequenze estremamente basse dovrebbero essere ulteriormente valutati in vitro e in vivo, dapprima sui cardiomiociti animali e umani, poi su modelli di mammifero, come i topi, e successivamente sull'uomo, come già riportato in studi non recenti.

Nel mio studio sono stati effettuati altri trattamenti esponendo le cellule al campo magnetico (50 Hz, 1 mT) prima e dopo il trattamento con doxorubicina ad intervalli di 1h e 2h, dai cui risultati sembrerebbe che, nelle specifiche condizioni, il campo elettromagnetico non moduli l'assorbimento e il rilascio di doxorubicina.

Un risultato interessante però riguarda le PANC-1 che, quando esposte, dopo trattamento con la doxorubicina per 1h, al campo elettromagnetico per un'altra ora in assenza del farmaco, presentano una diminuzione di fluorescenza emessa non significativa rispetto al controllo (cellule trattate solamente con doxorubicina per 1h). Le cellule trattate invece per 1h con la doxorubicina e poi lasciate per un'altra ora a riposo nel terreno, in assenza di farmaco, hanno mostrato una diminuzione di fluorescenza emessa significativa rispetto al controllo, dovuta al fatto che il farmaco, trovandosi in una normale condizione

fisiologica, esce dalla cellula. Questo risultato ci fa ipotizzare che le cellule PANC-1, in presenza di campo elettromagnetico, successivamente al trattamento con la doxorubicina, sembrerebbero comportarsi diversamente da quelle lasciate a riposo, non rimanendo quindi indifferenti al campo elettromagnetico. Questo risultato richiede però ulteriori approfondimenti in futuro dal momento che la differenza di fluorescenza emessa tra le cellule esposte al campo elettromagnetico e quelle lasciate a riposo, dopo trattamento con la doxorubicina, non risulta significativa.

Studi futuri potranno approfondire questo risultato in quanto, se il campo elettromagnetico determina, dopo trattamento con la doxorubicina, un minor rilascio della stessa, allora il dispositivo con la bobina potrebbe essere applicato, dopo aver effettuato la chemioterapia, a livello della sede tumorale rallentando così l'uscita del farmaco dalle cellule.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM “*Projecting cancer incidence and deaths to 2030: The unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the united states*” *Cancer Res* 2014;74:2913-2921.
2. Malvezzi M, Carioli G, Bertuccio P, Rosso T, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E “*European cancer mortality predictions for the year 2016 with focus on leukaemias*” *Ann Oncol* 2016;27:725-731.
3. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH, Neoptolemos JP “*Pancreatic cancer*” *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16022.
4. *Anatomia Patologica e correlazioni anatomo – cliniche* di Mariuzzi, 2006 volume 1.
5. Gauri R.Varadhachary, MD, Eric P.Tamm, MD, James L.Abbuzzese, MD, Henry Q.Xiong, MD, Christopher H.Crane, MD, Huamin Wang, MD, Jeffrey E.Lee, MD, Peter W.T.Pisters, MD, Douglas B.Evans, MD, and Robert A.Wolff, MD1 “*Borderline Resectable Pancreatic Cancer: Definitions, Management, and Role of Preoperative Therapy*” *Annals of Surgical Oncology* 13(8): 1035_1046.

6. Christopher L. Wolfgang, MD, PhD; Joseph M. Herman, MD, MSc; Daniel A. Laheru, MD; Alison P. Klein, PhD, MHS; Michael A. Erdek, MD; Elliot K. Fishman, MD, FACR; Ralph H. Hruban, MD “*Recent Progress in Pancreatic Cancer*” CA CANCER J CLIN 2013;63:318–348.
7. Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A “*Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma*” Clin Gastroenterol Hepatol 2009;7:S44-47.
8. Milena Ilic, Irena Ilic, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia “*Epidemiology of pancreatic cancer*” World J Gastroenterol 2016 November 28; 22(44): 9694-9705.
9. Arslan AA, Helzlsouer KJ, Kooperberg C, Shu XO, Steplowski E, Bueno-de-Mesquita HB, Fuchs CS, Gross MD, Jacobs EJ, Lacroix AZ, Petersen GM, Stolzenberg-Solomon RZ, Zheng W, Albanes D, Amundadottir L, Bamlet WR, Barricarte A, Bingham SA, Boeing H, Boutron-Ruault MC, Buring JE, Chanock SJ, Clipp S, Gaziano JM, Giovannucci EL, Hankinson SE, Hartge P, Hoover RN, Hunter DJ, Hutchinson A, Jacobs KB, Kraft P, Lynch SM, Manjer J, Manson JE, McTiernan A, McWilliams RR, Mendelsohn JB, Michaud DS, Palli D, Rohan TE, Slimani N, Thomas G, Tjonneland A, Tobias GS, Trichopoulos D, Virtamo J, Wolpin BM, Yu K, Zeleniuch-Jacquotte A, Patel AV; Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan) “*Anthropometric*

measures, body mass index, and pancreatic cancer: A pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (panscan)” Arch Intern Med 2010; 170:791-802.

10. Bosetti C, Rosato V, Li D, Silverman D, Petersen GM, Bracci PM, Neale RE, Muscat J, Anderson K, Gallinger S, Olson SH, Miller AB, Bas Bueno-de-Mesquita H, Scelo G, Janout V, Holcatova I, Lagiou P, Serraino D, Lucenteforte E, Fabianova E, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski W, Foretova L, Fontham E, Bamlet WR, Holly EA, Negri E, Hassan M, Prizment A, Cotterchio M, Cleary S, Kurtz RC, Maisonneuve P, Trichopoulos D, Polesel J, Duell EJ, Boffetta P, La Vecchia C “*Diabetes, antidiabetic medications, and pancreatic cancer risk: An analysis from the international pancreatic cancer case-control consortium*” Ann Oncol 2014; 25:2065-2072.

11. Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K “*Pancreatic cancer*” Lancet 2016;388:73-85.

12. Hidalgo M, Cascinu S, Kleeff J, Labianca R, Lohr JM, Neoptolemos J, Real FX, Van Laethem JL, Heinemann V “*Addressing the challenges of pancreatic cancer: Future directions for improving outcomes*” Pancreatology 2015;15:8-18.

13. Chiaravalli M, Reni M, O'Reilly EM “*Pancreatic ductal adenocarcinoma: State-of-the-art 2017 and new therapeutic strategies*” *Cancer Treat Rev* 2017;60:32-43.
14. Mohamed Mahmud, Adriana Piwoni, Nina Filiczak, Martyna Janicka, Jerzy Gubernator “*Long-Circulating Curcumin-Loaded Liposome Formulations with High Incorporation Efficiency, Stability and Anticancer Activity towards Pancreatic Adenocarcinoma Cell Lines In Vitro*” *PLoS One*. 2016 Dec 9;11(12):e0167787.
15. Chueh-Hsuan Lu, Shu-Hui Lin, Chih-Hsiung Hsieh, Wei-Ting Chen, Chih-Yu Chao “*Enhanced anticancer effects of low-dose curcumin with non-invasive pulsed electric field on PANC-1 cells*” *Onco Targets Ther*. 2018 Aug 10;11:4723-4732.
16. Mourad Sanhaji, PhD, Julia Göring, Pierre Couleaud, PhD, Antonio Aires, PhD, Aitziber L. Cortajarena, PhD, José Courty, PhD, Adriele Prina-Mello, PhD, Marcus Stapf, PhD, Robert Ludwig, PhD, Yuri Volkov, PhD, Alfonso Latorre, PhD, Álvaro Somoza, PhD, Rodolfo Miranda, PhD, Ingrid Hilger, PhD “*The phenotype of target pancreatic cancer cells influences cell death by magnetic hyperthermia with nanoparticles carrying gemcitabine and the*

pseudo-peptide NucAnt” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 20 (2019) 101983.

17. Shifalika Tangutoori, Bryan Q. Spring, Zhiming Mai, Akilan Palanisami, Lawrence Mensah, and Tayyaba Hasan “*Simultaneous delivery of cytotoxic and biologic therapeutics using nanophotoactivatable liposomes enhances treatment efficacy in a mouse model of pancreatic cancer*” *Nanomedicine*. 2016 January ; 12(1): 223–234.

18. Xiao Zhao, Feng Li, Yiye Li, Hai Wang, He Ren, Jing Chen, Guangjun Nie, Jihui Hao “*Co-delivery of HIF1 α siRNA and gemcitabine via biocompatible lipidpolymerhybrid nanoparticles for effective treatment of pancreatic cancer*” *Biomaterials* 46 (2015) 13e25.

19. Caroline F. Thorna, Connie Oshiroa, Sharon Marshe, Tina Hernandez-Boussardb, Howard McLeodd, Teri E. Kleina, and Russ B. Altmana “*Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects*” Published in final edited form as: *Pharmacogenet Genomics*. 2011 July; 21(7).

20. Giorgio Minotti, Pierantonio Menna, Emanuela Salvatorelli, Gaetano Cairo, And Luca Gianni “*Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activityand Cardiotoxicity*” *Pharm. Rev* 56:185–229, 2004.

21. A. Mordente, E. Meucci, A. Silvestrini, G.E. Martorana and B. Giardina
“*New Developments in Anthracycline-Induced Cardiotoxicity*” *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16, 1656-1672.
22. F. Arcamone, G. Cassinelli, G. Faktini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, and C. Spalla, Istituto Ricerche di Base della SOC. Farmaceutici Italia, Milano, Italia.
“*Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a New Antitumor Antibiotic from S. peuceetius var. caesius*” *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING VOL. XI, PAGES 1101-1110 (1969)*.
23. Herna´n Corte´s-Funes, Cyntia Coronado “*Role of anthracyclines in the era of targeted therapy*” *Cardiovasc Toxicol (2007) 7:56–60*.
24. P.M.Dewick “*Medicinal Natural Product, A Biosynthetic Approach*” 3rd ed.; John Wiley & Sons (2009).
25. Mario Suwalsky, Pedro H ernández, Fernando Villenab, Felipe Aguilar and Carlos P. Sotomayor “*The Anticancer Drug Adriamycin Interacts with the Human Erythrocyte Membrane*” *Z. Naturforsch. 54c, 271-277 (1999)*; received October 26/November 30, 1998.
26. Abolfazl Faraji¹, Hamid Reza Dehghan Manshadi², Maryam Mobaraki¹, Mahkameh Zare², Massoud Houshmand “*Association of ABCB1 and SLC22A16 Gene Polymorphisms with Incidence of Doxorubicin-Induced*

Febrile Neutropenia: A Survey of Iranian Breast Cancer Patients” PLoS One. 2016 Dec 30;11(12):e0168519.

27. Wenhua Zhao, Yongbin Wang & Xin Yue “*SLC22A16 upregulation is an independent unfavorable prognostic indicator in gastric cancer*” Future Oncol. 2018 Sep;14(21):2139-2148.

28. Siying Ye, Daniel P. MacEachran, Joshua W. Hamilton, George A. O’Toole, and Bruce A. Stanton “*Chemotoxicity of doxorubicin and surface expression of P-glycoprotein (MDR1) is regulated by the Pseudomonas aeruginosa toxin Cif*” Am J Physiol Cell Physiol 295: C807–C818, 2008. First published July 23.

29. Junyu Liang, Zhigao Zhang, Hui Zhao, Shanhe Wan, Xiangming Zhai, Jianwei Zhou, Rongliang Liang, Qiaoting Deng, Yingsong Wu and Guanfeng Lin. “*Simple and rapid monitoring of doxorubicin using streptavidin-modified microparticle-based timeresolved fluorescence immunoassay†*” RSC Adv., 2018, 8, 15621.

30. Ferrati, Luci, Mariani, Pelissetto, “*FISICA Volume Secondo ELETTRROMAGNETISMO E OTTICA*” IDELSON-GNOCCHI.

31. Ali Zamanian and Cy Hardiman Fluor Corporation, Industrial and Infrastructure Group “*Electromagnetic Radiation and Human Health: A Review of Sources and Effects*” From July 2005 High Frequency Electronics.
32. ICNIRP Standing Committee III and Task Group – Physics and Engineering, Allen S, Bassen H, D’Inzeo G, Hirata A, Jokela K, Lin J, Mann S, Matthes R, Roy C, Taki M, Wang J, and Watanabe S “*Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz-300 GHz)*”, “*I. Dosimetry of high frequency electromagnetic fields (100 kHz to 300 GHz)*” ICNIRP 16/2009.
33. Cridland, N.A. “*Electromagnetic fields and cancer: a review of relevant cellular studies*” National Radiological Protection Board (1993); Report NRPB-R256.
34. Michael H. Repacholi “*Low-Level Exposure to Radiofrequency Electromagnetic Fields: Health Effects and Research Needs*” World Health Organization, Geneva, Switzerland, Bioelectromagnetics 19:1–19 (1998).
35. Stefano Falone¹, Silvano Jr. Santini¹, Valeria Cordone¹, Giovanna Di Emidio, Carla Tatone¹, Marisa Cacchio and Fernanda Amicarelli “*Extremely Low-Frequency Magnetic Fields and Redox-Responsive Pathways Linked to*

Cancer Drug Resistance: Insights from Co-Exposure-Based In Vitro Studies”

Front Public Health. 2018 Feb 23;6:33.

36. Carl H. Durney, Ph.D. Habib Massoudi, Ph.D. Magdy F. Iskander, Ph.D. “*radiofrequency dosimetry handbook*” october 1986, USAF School of Aerospace Medicine, Aerospace Medical Division (AFSC), Brooks Air Force Base, TX 78235-5301.

37. R D Saunders, Z J Sienkiewicz and C I Kowalczyk “*Biological effects of electromagnetic fields and radiation*” National Radiological Protection Board, Chilton, Didcot. Oxon OX11 0RQ, UK.

38. Tenforde T.S, Kaune WT. “*Interaction of extremely low frequency electric and magnetic fields with humans*” Bioelectrochem Bioenerg. (1991); 25:1-17.

39. Tenforde T.S, “*Biological interactions and potential health effects of extremely-low-frequency magnetic fields from power lines and other common sources*” Annu Rev Public Health. 1992;13:173-96.

40. Tenforde. T.S, “*cellular and molecular pathways of extremely-low-frequency electromagnetic field interactions with living systems*” Blank, M., ed. Electricity and magnetism in biology and medicine. (1993); 1-8.

41. Tenforde T.S, “*Interaction of ELF Magnetic Fields with Living System*”
Polk C.; Postow, E, eds. Biological Effects of Electromagnetic Fields. Boca
Raton, FL, CRC Press (1996); 185-230.

42. A. Goraca, E. CIEJKA, A. Piechota “*Effects of extremely low frequency
magnetic field on the parameters of oxidative stress in heart*” J Physiol
Pharmacol. 2010 Jun;61(3):333-8.

43. Repacholi MH¹, Greenebaum B “*Interaction of Static and Extremely Low
Frequency Electric and Magnetic Fields With Living Systems: Health Effects
and Research Needs*” Bioelectromagnetics. 1999;20(3):133-60.

SITOGRAFIA:

<http://www.satishielding.it/schermatura-elettromagnetica/effetti-a-lungo-termini-dei-campi-elettromagnetici/>

<http://www.raffaeleilardo.it/trasf.htm>

<https://elettronicasemplice.weebly.com/funzionamento-motore-elettrico.html#>

http://www.elektro.it/AAA_campi_magnetici/campi_magnetici_03.html

RINGRAZIAMENTI

Giunta alla conclusione di questo percorso vorrei ringraziare il Professore Francesco Piva che mi ha dato l'opportunità di svolgere il mio lavoro di tesi insegnandomi la dedizione che bisogna avere nella ricerca, il metodo scientifico da applicare e di come la ricerca sia uno strumento di conoscenza che arricchisce e spinge al miglioramento.

Ringrazio poi il team del laboratorio di biologia applicata per avermi accolto e accompagnato nel lavoro fatto, sempre pronti a supportarmi e disponibili nello spiegarmi ogni procedimento. Un ringraziamento speciale va però alla dottoressa Giulia Occhipinti, la mia correlatrice, che mi ha seguito in ogni passo, dalle prime procedure alle ultime effettuate, con pazienza e gentilezza. La ringrazio di cuore per avermi trasmesso la passione per la ricerca, qualità che la contrassegna, e cosa significa non arrendersi di fronte a errori o risultati non aspettati, mi ha insegnato a provare sempre nuove alternative, con occhio scrupoloso ai particolari, ad avere pensiero critico, e la ringrazio per avermi corretto perché mi ha migliorato e mi ha stimolato a superare i miei limiti.

Ringrazio anche Daniela, altra tesista del team, che ho conosciuto negli ultimi mesi, per avermi trasmesso quella tranquillità che le appartiene, per avermi incoraggiato e sostenuto, grazie per aver condiviso le tue conoscenze

scientifiche con me che ci ha permesso di crescere e di migliorarci, proprio come dovrebbe essere tra colleghe.

Ringrazio il mio fidanzato Matteo che mi ha sostenuto in questi anni di studio, che ha avuto sempre fiducia in me e mi ha stimolato e incoraggiato a raggiungere i miei obiettivi. In questa sessione di laurea in cui anche tu hai raggiunto il tuo obiettivo, nel mio stesso giorno, grazie di cuore per il tuo amore e la tua pazienza.

Ringrazio poi i miei amici, primo fra tutti Luca, che mi ha stimolato ad andare avanti di fronte ad ogni mia paura e tutti gli altri, in particolare Martina, Martina, Laura, Emma, Rossana e Valentina, mie colleghe, che hanno sempre creduto nelle mie capacità, con cui ho condiviso le mie conoscenze e mi hanno aiutato a crescere emotivamente e scientificamente.

Non posso non ringraziare la mia famiglia;

I miei amati fratelli, Marco, Francesca e Chiara che mi hanno sostenuto e hanno creduto nella mia passione per la biologia, incoraggiandomi, sostenendomi in ogni mio passo. Mia zia Laura per avermi incoraggiato e consigliato, pensando con amore al mio futuro.

I miei genitori che mi hanno permesso di studiare, soprattutto mia madre, che mi ha insegnato la dedizione allo studio, quanto sia importante seguire le proprie passioni e soprattutto che ogni obiettivo richiede sacrificio e lavoro.

Le mie amatissime nonne, nonna Liana perché nonostante non abbia studiato ha ritenuto importante aiutarmi nello studio con consigli saggi e premurosi e nonna Anna, purtroppo deceduta due anni fa, che credeva molto nella ricerca e mi chiese di impegnarmi nel campo della ricerca oncologica, e proprio la sua scomparsa improvvisa mi ha stimolato a compiere questo lavoro.