



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA
IN IGIENE INDUSTRIALE E AMBIENTALE
XXIV CICLO**

***L'USO DEGLI ULTRASUONI
ALLE FREQUENZE TERAPEUTICHE:
STUDIO DEGLI EFFETTI INDOTTI IN LINEE CELLULARI
UTILIZZANDO SPETTROSCOPIA FTIR E MICROSCOPIA***

**Tutore scientifico:
Prof.ssa Agostina Congiu Castellano**

**Candidato:
Claudia Giliberti**

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

INDICE

INTRODUZIONE	5
<u>PARTE I</u>	8
CAPITOLO 1: Gli ultrasuoni, l'interazione con la materia vivente e le applicazioni terapeutiche	9
1.1 La fisica degli ultrasuoni	9
1.2 Effetti biologici degli ultrasuoni	15
1.2.1. <i>Studi in vitro degli effetti indotti da ultrasuoni utilizzando tecniche spettroscopiche</i>	23
1.3 Applicazioni mediche degli ultrasuoni	25
1.4 Applicazioni estetiche degli ultrasuoni	29
1.5 La "dosimetria" degli ultrasuoni	30
CAPITOLO 2: Problematiche connesse con l'uso degli ultrasuoni in fisioterapia e in estetica	33
2.1 Normativa per le apparecchiature ad ultrasuoni in fisioterapia ed estetica	35
2.1.1 <i>Normativa sui dispositivi medici</i>	35
2.1.1.1 <i>La Direttiva Europea 93/42 sui dispositivi medici</i>	35
2.1.1.2 <i>La norma CEI EN 60601-1 sugli apparecchi elettromedicali</i>	39
2.1.2 <i>Norme tecniche specifiche per gli ultrasuoni in fisioterapia</i>	41
2.1.2.1. <i>La norma CEI EN 60601-2-5</i>	41
2.1.2.2. <i>La norma CEI EN 61689</i>	43
2.1.2.3. <i>Altre norme: la norma CEI EN 61161</i>	50
2.1.3 <i>Normativa sugli ultrasuoni in estetica</i>	51
2.1.3.1. <i>Normativa per l'estetica non-medica</i>	52
2.1.3.1.1 <i>La norma tecnica CEI 62-39</i>	52
2.1.3.1.2 <i>La legge 1/90 e il decreto n. 110 del 2011</i>	54
2.1.3.2. <i>Normativa per l'estetica medica</i>	56
2.2 Problematiche connesse con l'uso degli ultrasuoni in fisioterapia	56
2.2.1 <i>Evidenze di efficacia e cautele d'uso</i>	56

2.2.2 Valutazione delle performances degli apparecchi ad ultrasuoni usati in fisioterapia	61
2.2.3 Criticità connesse agli aspetti di sicurezza	65
2.3 Problematiche connesse con l'uso degli ultrasuoni in estetica	67
2.3.1 Gli ultrasuoni in estetica medica	67
2.3.1.1 Il "caso francese"	69
2.3.2 Gli ultrasuoni in estetica non medica	70
2.3.2.1 La cavitazione estetica	70
2.3.2.2 Applicazioni nei centri estetici: aspetti normativi e criticità	70
2.3.2.3 Applicazioni domestiche	71
2.3.3 Proposte per il superamento delle problematiche connesse con l'uso degli ultrasuoni in estetica	72
<u>PARTE II</u>	73
CAPITOLO 3: Caratterizzazione di dispositivi ad ultrasuoni per fisioterapia ed estetica	74
3.1 Descrizione delle sorgenti di ultrasuoni	74
3.2 Caratterizzazione presso INRIM Torino	75
3.3 Caratterizzazione presso CNR-IDASC Roma	77
3.3.1 Procedure sperimentali e set up di misura	78
3.3.2 Risultati del diffusore a 1 MHz	81
3.3.3. Risultati del diffusore a 3 MHz	89
3.4 Valutazione delle performances di due dispositivi ad ultrasuoni per fisioterapia ed estetica: conclusioni	96
CAPITOLO 4: Materiali e metodi per lo studio degli effetti degli ultrasuoni su linee cellulari	98
4.1 Linea cellulare NIH-3T3 e condizioni di coltura	98
4.2 Esposizione agli ultrasuoni: descrizione del set up di esposizione e misura	100
4.3 Caratterizzazione del campo acustico prodotto dalle sorgenti di ultrasuoni	101
4.4 Tecniche d'indagine sui campioni cellulari	105
4.4.1 Spettroscopia infrarossa	105
4.4.1.1 Spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FT-IR)	107
4.4.1.2 Spettroscopia FTIR: preparazione dei campioni	109

4.4.2 Il test dei micronuclei	111
4.4.2.1 Il test dei micronuclei: preparazione dei campioni	113
4.4.3 Il test di vitalità Trypan blue	114
4.4.3.1 Il test di vitalità Trypan blue: preparazione dei campioni	115
4.4.4 Microscopia ottica a fluorescenza	115
4.4.4.1 La Calceina	117
4.4.4.2 Microscopia ottica a fluorescenza: preparazione dei campioni	119
4.4.5 Citofluorimetria a flusso	120
4.4.5.1 Citofluorimetria a flusso: preparazione dei campioni	124
4.4.6 Microscopia confocale	124
4.4.6.1 Microscopia confocale: preparazione dei campioni	127
CAPITOLO 5 : Risultati sperimentali e discussione	128
5.1 Misure di spettroscopia FTIR: parametri spettrali	128
5.2 Analisi statistica dei dati FTIR: la PCA	133
5.3 Spettroscopia FTIR: risultati sperimentali	134
5.3.1 Effetti degli ultrasuoni sulle strutture lipidiche	134
5.3.2 Effetti degli ultrasuoni sulle strutture dell'Amide I e Amide II	144
5.3.3 Effetti degli ultrasuoni nella regione degli acidi nucleici	148
5.3.4 Risultati complessivi delle misure di spettroscopia FTIR	151
5.4 Il test di vitalità del Trypan Blue: risultati sperimentali	153
5.5 Il test dei micronuclei: risultati sperimentali	155
5.6 Microscopia a fluorescenza: risultati sperimentali	157
5.6.1 Risultati per esposizione ad ultrasuoni a 1 MHz, 75% High	158
5.6.1.1 Il campione di controllo	158
5.6.1.2 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=5 cm, t=30'	158
5.6.1.3 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=5 cm, t=45'	161
5.6.1.4 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=5 cm, t=60'	161
5.6.1.5 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75%High, SSD=10 cm, t=30'	162
5.6.1.6 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=10 cm, t=45'	164
5.6.1.7 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=10 cm, t=60'	164
5.6.1.8 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=15 cm, t=30'	165
5.6.1.9 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=15 cm, t=45'	166
5.6.1.10 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=15 cm, t=60'	167

5.6.1.11 <i>Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti per esposizione ad ultrasuoni a 1 MHz 75% High</i>	168
5.6.2 <i>Risultati per esposizione ad ultrasuoni a 3 MHz, 100% High</i>	169
5.6.2.1 <i>Risultati per esposizioni a 3 MHz 100% High, SSD=5 cm, t=30', t=45' e t=60'</i>	169
5.6.2.2 <i>Risultati per esposizioni a 3 MHz 100% High, SSD=10 cm, t=30'</i>	171
5.6.2.3 <i>Risultati per esposizioni a 3 MHz 100% High, SSD=10 cm, t=45'</i>	172
5.6.2.4 <i>Risultati per esposizioni a 3 MHz 100% High, SSD=10 cm, t=60'</i>	173
5.6.2.5 <i>Risultati per esposizioni a 3 MHz 100% High, SSD=15 cm, t=30', t=45' e t=60'</i>	173
5.6.2.6 <i>Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti per esposizione ad ultrasuoni a 3 MHz 100% High</i>	175
5.7 <i>Citofluorimetria a flusso: risultati sperimentali</i>	176
5.7.1 <i>Risultati sperimentali per esposizione ad ultrasuoni a 1 MHz 75% High</i>	177
5.7.2 <i>Risultati sperimentali per esposizione ad ultrasuoni a 3 MHz 100% High</i>	180
5.8 <i>Microscopia confocale: risultati sperimentali</i>	181
CONCLUSIONI	186
BIBLIOGRAFIA	190

INTRODUZIONE

Gli ultrasuoni (US) sono radiazioni meccaniche non ionizzanti, di frequenze superiori ai 20 kHz, quindi non percepibili dall'orecchio umano. L'apparente innocuità insieme all'ampia versatilità anche in campo industriale, ne ha incrementato notevolmente l'utilizzo, specialmente in campo medico, nella diagnostica e nella terapia; il livello di intensità ultrasonora emessa dagli apparecchi consente di passare da onde acustiche utilizzate a fini diagnostici (es. ecografia: intensità generalmente inferiori al centinaio di mW/cm^2), ad applicazioni di tipo terapeutico (es. onde d'urto fisiatriche, intensità dell'ordine dei W/cm^2), utilizzate ad esempio nella riparazione delle fratture ossee, dei tendini, nel trattamento dei tessuti cicatriziali, fino alle tecniche non invasive di ablazione chirurgica HIFU che impiegano US ad intensità dell'ordine dei kW/cm^2 , utilizzate per il trattamento di tumori.

Da alcuni anni, si ricorre all'applicazione degli US anche in campo estetico, sia medico che non medico; nel primo caso, i trattamenti afferiscono alla cosiddetta "medicina estetica", branca della medicina le cui terapie, eseguite negli ambulatori, sono dirette alla prevenzione ed alla correzione degli inestetismi costituzionali o acquisiti, quali esiti di malattia. Nell'ambito della medicina estetica, gli US vengono tipicamente impiegati in regime di *cavitazione*, fenomeno associato alla variazione ciclica della pressione che si registra al passaggio del fascio ultrasonico, che determina l'implosione di bolle di vapore e la conseguente lisi degli adipociti, con rilascio dei lipidi, per il trattamento della cellulite.

Nel caso, invece, della cosiddetta "estetica non medica", ci troviamo di fronte ad applicazioni il cui aspetto terapeutico ricade nella sola sfera psicologica dell'utente, poiché le prestazioni ed i trattamenti eseguiti dall'estetista riguardano esclusivamente la superficie del corpo umano e il loro scopo è quello di mantenerlo in perfette condizioni, di migliorarne e proteggerne l'aspetto estetico, modificandolo attraverso l'eliminazione o l'attenuazione degli eventuali inestetismi presenti. In questo caso, l'attività può essere svolta con l'ausilio di apparecchi che, nel caso di utilizzo degli US, sono opportunamente progettati per lavorare a frequenze tali da non consentire la propagazione in profondità delle onde ultrasonore; si tratta infatti di applicazioni legate generalmente al trattamento delle rughe e delle masse adipose.

Negli ultimi anni, i dispositivi ad US per fisioterapia ed estetica sono risultati disponibili sul mercato tradizionale (farmacie, centri specializzati, ecc.) e su quello più moderno virtuale (siti Internet) a costi relativamente ridotti; gli utenti, anche privi di specifica competenza tecnica nel settore, possono pertanto procedere all'acquisto, sottoponendosi in regime "fai da te" ad un agente

fisico potenzialmente pericoloso per la salute, nel caso in cui l'applicazione non fosse guidata da personale competente.

Visto quanto sopra, in questo lavoro si intende approfondire l'analisi delle problematiche sanitarie connesse alle esposizioni deliberate delle persone agli US per finalità che vanno da quelle fisioterapiche a quelle di natura estetica. L'analisi di queste questioni non può prescindere dall'esame della letteratura scientifica, della legislazione e delle norme tecniche, al fine di fotografare lo stato dell'arte, evidenziare problematiche e criticità, e formulare proposte rivolte sia all'autorità sanitaria, sia al settore produttivo.

Stante la recente diffusione nell'utilizzo di dispositivi ad US, in questo lavoro è stato effettuato uno studio delle proprietà emissive di apparecchiature disponibili sul mercato e utilizzate per la fisioterapia e l'estetica non medica, alla luce delle normative vigenti, al fine di fornire un contributo per il miglioramento della qualità e della sicurezza dei trattamenti.

Lo sviluppo tecnologico e la sempre più ampia applicazione degli US nella terapia, hanno posto l'attenzione anche sulla necessità di una approfondita comprensione dell'interazione tra onde ultrasoniche e materia biologica. Tale studio è essenziale poiché è in grado di favorire la produzione in sicurezza di apparecchi a livello industriale, segnalando eventuali problematiche sanitarie.

Alla luce di quanto sopra esposto, in questo lavoro sono stati studiati gli effetti indotti in campioni di cellule *in vitro*, provenienti dalla linea cellulare NIH-3T3 (fibroblasti murini), dall'esposizione ad US alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz, utilizzate tipicamente per trattamenti di tipo fisioterapico ed estetico, variando l'intensità del campo acustico e il tempo di esposizione.

I metodi di indagine utilizzati sono di tipo microscopico e spettroscopico: la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), il test dei micronuclei, il test del Trypan blue, la microscopia a fluorescenza, la citofluorimetria a flusso, la microscopia confocale.

La spettroscopia FTIR permette di rilevare cambiamenti strutturali nelle principali molecole biologiche, operati da un dato agente fisico/chimico. E' una tecnica di analisi non distruttiva, che consente di ottenere simultaneamente informazioni su tutte le macromolecole presenti all'interno di una popolazione di cellule ed è in grado di rilevare cambiamenti conformazionali nei gruppi funzionali dei campioni biologici analizzati.

Il test dei micronuclei è considerato come uno dei metodi migliori per valutare i danni nella cellula a livello cromosomico, operati da un agente fisico/chimico; infatti consente la misura di cromosomi persi e danneggiati. Tale test consiste nell'osservazione microscopica dei nuclei cellulari, con l'utilizzo di un opportuno marcatore che permette la visualizzazione in fluorescenza dei nuclei stessi.

Il test del Trypan blue consente una misura della vitalità cellulare del campione esposto ad un dato agente.

La microscopia a fluorescenza rappresenta un eccellente mezzo per studiare materiali che sono in grado di fluorescere sia in maniera naturale, sia nel caso in cui vengano trattati con prodotti chimici (fluorofori) capaci di emettere in fluorescenza. Questa forma di microscopia ottica ha come maggiore punto di forza la sua scarsa invasività, che consente di avere immagini di campioni biologici con una buona risoluzione spaziale.

La citofluorimetria a flusso è una tecnica che permette il conteggio e la caratterizzazione di cellule in sospensione, marcate con fluorofori, tramite l'uso di laser e di rilevatori ottici.

La microscopia confocale è una tecnica ottica principalmente utilizzata per lo studio tridimensionale di strutture biologiche isolate o in situ; la metodica consente il sezionamento ottico di un sistema biologico consistente nella raccolta di una serie di immagini di piani paralleli, spostando il fuoco dell'obiettivo lungo un asse che generalmente coincide con l'asse di propagazione della luce.

La tesi è organizzata nel modo seguente: nella prima parte viene trattata la fisica degli US, l'interazione degli US con la materia biologica ed i relativi effetti indotti, una trattazione della legislazione e delle norme tecniche riguardanti l'uso degli US nella fisioterapia, nell'estetica medica e nell'estetica non medica, le problematiche connesse con l'utilizzo degli US in fisioterapia e in estetica e le criticità evidenziate.

Nella seconda parte vengono riportati i risultati della caratterizzazione di trasduttori ad US utilizzati in fisioterapia ed in estetica ai sensi delle norme tecniche internazionali, i protocolli per la preparazione dei campioni per le indagini spettroscopiche e microscopiche, la descrizione del set up utilizzato per l'esposizione al campo ultrasonoro, la caratterizzazione del campo ultrasonoro prodotto dalle sorgenti utilizzate, i risultati delle misure effettuate con le tecniche sopra descritte.

PARTE I

CAPITOLO 1:

GLI ULTRASUONI, L'INTERAZIONE CON LA MATERIA VIVENTE E LE APPLICAZIONI TERAPEUTICHE

1.1 La fisica degli ultrasuoni

Gli ultrasuoni (US) sono radiazioni non ionizzanti di natura meccanica; a differenza delle radiofrequenze e microonde, con cui si identificano specifiche regioni dello spettro elettromagnetico, sono una forma di energia meccanica e perciò, per potersi propagare, necessitano di un mezzo elastico quale plasma o liquidi, (Humphrey, 2007). Si estendono a partire da frequenze superiori ai 20 kHz, limite superiore di udibilità per l'orecchio umano, fino alle frequenze di qualche centinaio di MHz e, intorno a 1 GHz, lasciano il posto al regime cosiddetto *ipersonico*.

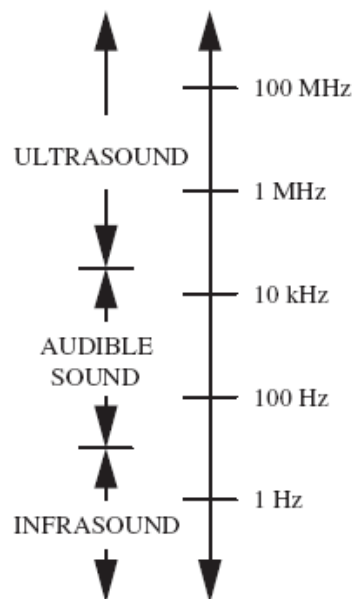


Figura 1.1: range delle frequenze per gli ultrasuoni

Gli US, essendo onde meccaniche, si propagano in un mezzo con trasferimento di energia e non di particelle; queste ultime, infatti, oscillano semplicemente attorno alla loro posizione di equilibrio, con trasferimento di energia da una particella ad un'altra. L'oscillazione molecolare può propagarsi nel mezzo in varie direzioni, pertanto si possono distinguere *onde longitudinali* e *onde trasversali*; nelle *onde longitudinali*, il movimento oscillatorio delle particelle del mezzo di trasmissione è

parallelo alla direzione di propagazione, mentre nelle *onde trasversali* è perpendicolare. Le *onde longitudinali* (di compressione) possono propagarsi in qualsiasi mezzo, mentre le *onde trasversali* solo in quelli solidi, a causa dei deboli legami che si instaurano tra atomi e molecole nei tessuti liquidi. L'onda ultrasonora è pertanto *longitudinale*, caratterizzata dall'alternanza di compressioni e rarefazioni del mezzo in cui si propaga, che comportano variazioni di pressione all'interno dello stesso (figura 1.2).

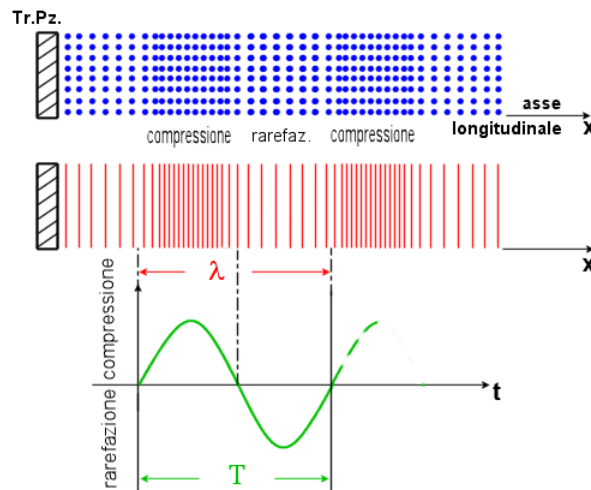


Figura 1.2: onde acustiche longitudinali

La generazione e la rilevazione degli ultrasuoni avviene artificialmente mediante i cosiddetti *trasduttori* che sfruttano il fenomeno della *piezoelettricità*, scoperto dai fratelli Pierre e Jacques Curie nel 1880. I due scienziati, comprimendo con una pressa, secondo varie direzioni, un cristallo di quarzo, osservarono il particolare *fenomeno piezoelettrico*: le due facce schiacciate del cristallo si erano polarizzate elettricamente in maniera molto simile alle batterie chimiche dell'epoca.

Il *fenomeno della piezoelettricità* consiste nella sovrapposizione di due manifestazioni, una di natura meccanica, l'altra di origine elettrica e nel passaggio spontaneo dall'una all'altra; in particolare, se alle due superfici opposte di un blocco di *materiale piezoelettrico* (lamine di quarzo, dischi di materiale ceramico) viene applicata una tensione elettrica, il materiale si espande (o si contrae); di conseguenza, sottoponendo tali elementi ad un campo elettrico alternato, si ottiene un alternarsi di compressioni e di espansioni. Tale proprietà consente di convertire l'energia elettrica applicata, in energia meccanica cioè in un'onda acustica di pressione.

Allo stesso modo, per la medesima proprietà, se si sottopone il *trasduttore* ad uno sforzo capace di deformarlo, tra le superfici opposte si realizza una tensione elettrica: tale caratteristica consente pertanto la rilevazione di un'onda acustica di pressione.

L'assenza di un centro simmetria è condizione necessaria affinché si manifesti la piezoelettricità. Dal materiale naturale si è passati a materiali ceramici come il titanato zirconato di piombo (PZT, 1950) e poi al materiale plastico come il fluoruro di polivinilidene (pVF2, 1970).

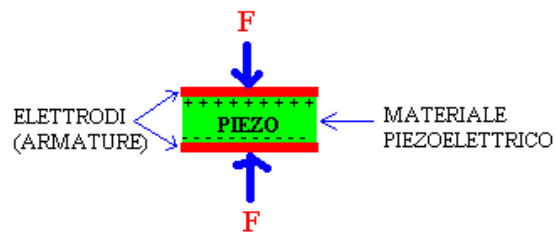


Figura 1.3: effetto piezoelettrico

Per quanto riguarda **la propagazione degli ultrasuoni**, quando un'onda ultrasonora passa da un mezzo ad un altro, si assiste generalmente al verificarsi di fenomeni che contribuiscono in maniera diversa alla ridistribuzione dell'energia trasportata dall'onda stessa: una parte viene riflessa e una parte viene trasmessa, secondo le leggi della meccanica classica. Ciascun mezzo attraversato è caratterizzato intrinsecamente da una grandezza complessa, **l'impedenza Z** , che sintetizza le caratteristiche acustiche del mezzo attraversato e quantifica la resistenza che il mezzo stesso oppone al passaggio delle onde sonore. L'impedenza acustica è definita come il prodotto della densità ρ del mezzo (kg/m^3) per la velocità di propagazione c (m/s)

$$Z = \rho c \quad (1.1)$$

La sua unità di misura è $\text{Pa}\cdot\text{s/m}$, equivalente a $\text{kg/m}^2\cdot\text{s}$. Viene tuttavia più frequentemente indicata come “rayl” ($1 \text{ rayl} = 1 \text{ Pa}\cdot\text{s/m}$), dal nome del famoso scienziato inglese Lord Rayleigh (1842-1919), matematico e teorico dei sistemi vibrazionali e ottici.

In tabella 1.1 vengono riportati i valori di impedenza per alcuni mezzi biologici; in generale, i valori più elevati si riscontrano nei solidi (es. alluminio $Z = 13,8 \times 10^6 \text{ rayl}$). In aria a 20°C tipicamente Z risulta pari a 415 rayl ($\rho = 1,204 \text{ kg/m}^3$; $c = 343,4 \text{ m/s}$), mentre in acqua, alla stessa temperatura, poiché $\rho = 998 \text{ kg/m}^3$ e $c = 1484 \text{ m/s}$, si ha $Z = 1,5 \times 10^6 \text{ rayl}$.

L'impedenza acustica costituisce una grandezza chiave in diverse applicazioni biomediche, da cui discende l'interesse pratico a conoscerne il valore nei diversi mezzi biologici. Mentre in alcuni casi i valori sono noti con discreta affidabilità come il sangue ($1,6 \times 10^6 \text{ rayl}$), i tessuti grassi ($1,36 \times 10^6 \text{ rayl}$) o i vasi sanguigni ($1,65 \times 10^6 \text{ rayl}$), in altri sono soggetti a notevole variabilità, conseguenti all'indeterminatezza con cui è nota la velocità di propagazione delle onde: esempi evidenti sono le ossa e la pelle.

Materiali	Densità (g/cm ³)	Velocità (m/s)	Impedenza acustica (x10 ⁶ rayl)
Aria (20 °C)	0,0013	331	0,0004
Acqua (20 °C)	0,9987	1480	1,5
Grasso	0,92	1478	1,36
Pelle	1,09	1519	1,58
Ossa	1,8	~3500	6,3-7,8
Sangue	1,04	1566	1,63
Vaso sanguigno	1,08	1530	1,65

Tabella 1.1: impedenza caratteristica di alcuni mezzi

Quando un fascio ultrasonoro incontra l'interfaccia acustica di due mezzi con impedenze acustiche differenti Z_1 e Z_2 , una parte della sua energia viene riflessa e la parte rimanente prosegue il suo cammino nel mezzo come fascio trasmesso. La massima trasmissione di un'onda ultrasonica da un mezzo ad un altro si verifica quando le impedenze acustiche dei due mezzi in questione sono uguali.

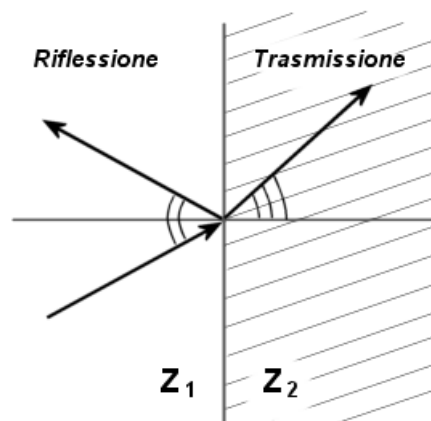


Figura 1.4: riflessione e trasmissione di un'onda acustica di pressione all'interfaccia tra due mezzi

Nel corso della propagazione in un mezzo, l'onda acustica è soggetta ad una progressiva perdita dell'energia ad essa associata e, più propriamente, si determina una diminuzione dell'intensità in funzione della distanza dalla sorgente. Le cause sono essenzialmente due: l'*assorbimento*, processo in base al quale l'energia meccanica dell'onda è in parte convertita in calore, e lo *scattering*, cioè l'interazione tra l'onda ed eventuali strutture e disomogeneità presenti nel mezzo, determinate principalmente da variazioni locali di densità o di proprietà elastiche, che determina una parziale diffusione dell'energia lungo direzioni diverse da quella di propagazione dell'onda diretta.

L'effetto complessivo, in un mezzo omogeneo, è tale che un campo d'onda di intensità iniziale I_0 dopo una certa distanza z , ha una intensità che decresce esponenzialmente secondo la relazione:

$$I = I_0 \exp(-2\alpha_a z) \quad (1.2)$$

in cui I_0 rappresenta l'intensità iniziale e α_a il coefficiente di assorbimento del mezzo (cm^{-1}).

Se il mezzo non è omogeneo l'ampiezza si riduce a causa di fenomeni di scattering, allora la (1.2) diventa

$$I = I_0 \exp(-2\alpha z) \quad (1.3)$$

dove $\alpha = \alpha_a + \alpha_s$ (α_s rappresenta il coefficiente di attenuazione di scattering).

L'interazione degli ultrasuoni con i tessuti biologici produce assorbimento dell'energia del fascio che dipende dal tipo di tessuto attraversato e dalla frequenza delle onde. In tabella 1.2 sono riportati alcuni coefficienti di assorbimento per tipologie di tessuti attraversati da US alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz.

Coefficienti di assorbimento (cm^{-1}) per tipologia di tessuti attraversati da US alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz		
	1 MHz	3 MHz
Sangue	0,028	0,084
vasi sanguigni	0,4	1,2
Tessuto osseo	3,22	-
Pelle	0,62	1,86
Cartilagine	1,16	3,48
Aria (20° C)	2,76	8,28
Tendini	1,12	3,36
Tessuto muscolare	0,76	2,28
Tessuto adiposo	0,14	0,42
Acqua (20° C)	0,0006	0,0018
Tessuto nervoso	0,2	0,6

Tabella 1.2: coefficienti di assorbimento di tessuti attraversati da US alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz.

Basso assorbimento e quindi alta penetrazione dell'onda ultrasonora è osservabile in acqua e nel grasso in quanto tessuto ricco di acqua ($\alpha=0,14$ e $0,42$ rispettivamente a 1 e 3 MHz); pertanto non viene prodotto riscaldamento significativo quando l'onda ultrasonora passa attraverso tali mezzi. Al contrario, l'assorbimento è più elevato nel tessuto osseo e nei tendini (Dyson, 1987). In generale, i tessuti molli assorbono circa il 10-20% della potenza per centimetro, mentre l'osso adulto assorbe completamente il fascio ultrasonoro in una brevissima distanza; particolare è il comportamento dell'osso del feto, che produce una attenuazione al crescere dell'età gestazionale.

In generale, gli US con frequenza maggiore (3 MHz) vengono assorbiti prima di quelli a frequenza minore (1 MHz), i quali raggiungono profondità maggiori a seconda del tipo di tessuto attraversato. Gli US alla frequenza di 1 MHz sono assorbiti principalmente dai tessuti alla profondità di 3-5 cm (Gann, 1991) e, proprio per questa proprietà, per quanto concerne ad esempio le loro applicazioni fisioterapiche, sono raccomandati per lesioni più profonde e in pazienti con più grasso sottocutaneo. Gli US alla frequenza di 3 MHz sono raccomandati invece per lesioni più superficiali, alla profondità di 1-2 cm (Gann, 1991; Ziskin, 1990); per questa ragione, oltre ad essere usati in fisioterapia, sono utilizzati anche nell'estetica (medica e non medica).

Gli ultrasuoni possono essere definiti mediante i seguenti parametri fisici che caratterizzano un'onda ultrasonora:

- *l'ampiezza* dell'onda: valore della massima pressione, positiva o negativa, raggiunta dal mezzo in fase di compressione: è indicativa della forza che l'onda esercita sulle particelle del mezzo e quindi dell'entità dello spostamento delle particelle dalla posizione di equilibrio;
- *la frequenza* f (Hz): numero di cicli di compressione e rarefazione nell'unità di tempo;
- *la lunghezza d'onda* λ (m): distanza tra due punti in fase tra loro di due cicli successivi;
- *il periodo* T (s): inverso della frequenza e rappresenta il tempo impiegato per percorrere una distanza pari alla lunghezza d'onda;
- *la velocità di propagazione* c (m/s): caratteristica del mezzo nel quale si diffondono le onde meccaniche ed è data da $c = \lambda \cdot f$. Poiché la frequenza è una proprietà intrinseca dell'onda acustica, la lunghezza d'onda varia al passaggio tra due mezzi con velocità di propagazione differenti;
- *la potenza* di un fascio ultrasonoro (W): energia trasportata nell'unità di tempo;
- *la pressione acustica* di un fascio ultrasonoro: descrive il grado di compressione e rarefazione e quindi la forza per unità di superficie a cui è sottoposto il materiale. Le compressioni e rarefazioni hanno luogo alla frequenza del suono (kHz o MHz nel caso degli US). L'unità di misura della pressione è il Pascal ($\text{Pa} = \text{N/m}^2$ = forza esercitata su una superficie) e suoi multipli (ad esempio MPa).

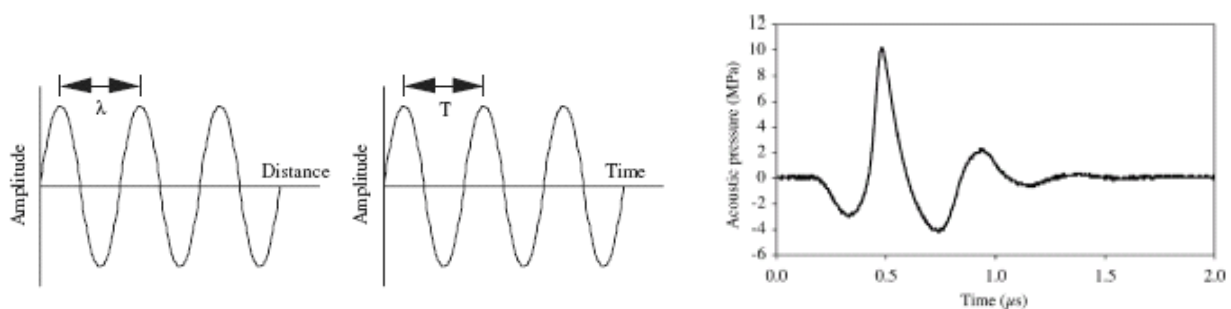


Figura 1.5: rappresentazione schematica di un'onda acustica in termini di ampiezza vs distanza e vs tempo e pressione ultrasonora

Particolarmente importante è la determinazione della pressione acustica negativa di cresta, intesa come massimo del modulo della pressione acustica istantanea negativa in un campo acustico o in una superficie, durante un periodo di ripetizione dell'impulso ultrasonoro.

-l'*intensità* dell'onda (W/cm^2): quantità di energia che fluisce nell'unità di tempo attraverso una superficie di area unitaria, perpendicolare alla direzione di propagazione dell'onda. L'intensità può variare nel tempo se si impiega onda continua o onda impulsata: in particolare, la presenza di un campo pulsato introduce una variazione temporale, definendo un *duty cycle*, come rapporto tra la durata dell'impulso ultrasonoro (in unità di tempo) e la lunghezza del periodo, calcolato come una percentuale.

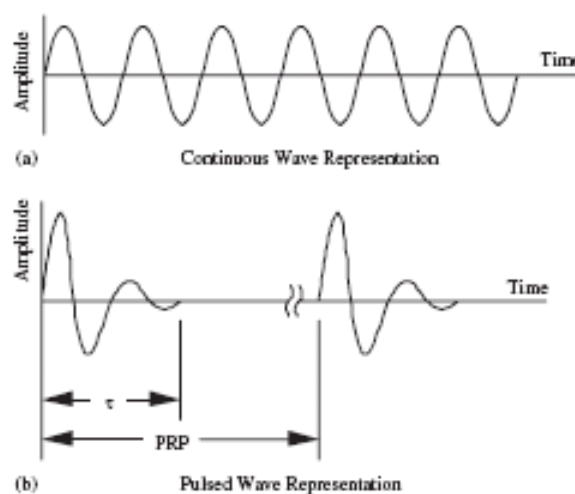


Figura 1.6: rappresentazione schematica di onde continue e onde impulsate con PRF= frequenza di ripetizione dell'impulso e τ = durata dell'impulso ultrasonoro

E' possibile pertanto calcolare un'intensità basata sulla pressione massima misurata nel campo ultrasonoro (*spatial-maximum intensity*) o basata sulla pressione mediata su un'area specifica (*spatial-average intensity*). Quando si descrive l'energia rilasciata dall'esposizione ultrasonora è anche importante distinguere se l'intensità è mediata solo quando l'impulso è "on" (*pulse average*) o se è stata mediata su un tempo che include l'intera durata del trattamento, considerando cioè l'impulso ultrasonoro "on" e "off" (*temporal average*).

1.2 Effetti biologici degli ultrasuoni

Gli US, attraversando i tessuti, determinano effetti tradizionalmente separati in *termici* e *non termici* (Miller, 1996); i *non termici* riguardano principalmente la cavitazione. Gli effetti termici si verificano tipicamente per esposizioni in onda continua, mentre gli effetti non termici per esposizioni in onda pulsata (Milowska, 2007). I due effetti non sono effettivamente separabili, cioè

non si può assumere la presenza di soltanto una tipologia di effetti, eccetto nel caso di litotrixxia, in cui l'effetto indotto è quello meccanico. Per tutte le altre situazioni, è bene assumere che gli effetti *non termici* siano sempre accompagnati da sviluppo di calore (Baker, 2001).

Effetti termici: quando gli US si propagano in un mezzo, l'ampiezza dell'onda acustica si riduce progressivamente cioè gli US perdono la loro energia e il fascio si attenua a causa dell'assorbimento e della dissipazione di energia ultrasonica. Gli US producono calore attraverso le vibrazioni, l'urto e la frizione delle strutture cellulari ed intercellulari che compongono i tessuti attraversati. L'aumento di temperatura del mezzo può provocare eventuali variazioni chimiche o strutturali dei biopolimeri. Questo fenomeno è influenzato sia dalle caratteristiche del fascio ultrasonoro cioè intensità e frequenza, dalla durata dell'esposizione e dalle caratteristiche dei tessuti attraversati; in particolare, come già visto, gli US possono essere più o meno attenuati in funzione della differenza tra le impedenze acustiche dei tessuti attraversati dalle onde sonore. Il riscaldamento prodotto si instaura rapidamente, tuttavia si stabilisce presto un equilibrio termico a causa della veloce dispersione del calore, dovuta al flusso sanguigno. L'effetto termico è più evidente a livello dell'interfaccia dei tessuti ed in particolare a livello del periostio e della zona di passaggio tra grasso e muscolo; il periostio, per la sua struttura anatomica e per la continuità con l'osso, assorbe una grande quantità di energia ed è, pertanto, sede di elevato riscaldamento. L'elevazione termica genera, come effetti secondari, aumento del metabolismo cellulare e vasodilatazione; in particolare, quest'ultima proprietà risulta importante nell'utilizzo terapeutico degli US in fisioterapia.

Effetti non termici: Cavitazione: fenomeno che consiste nella formazione, crescita e implosione di bolle di gas all'interno del fluido sottoposto ad un campo ultrasonoro. In generale, la cavitazione può essere vista come la "rottura" di un liquido e la conseguente formazione all'interno dello stesso, di "cavità" (propriamente di bolle) contenenti gas disciolto o vapore del liquido stesso; si manifesta in molte situazioni, per esempio nell'acqua in ebollizione o in vicinanza dell'elica in rotazione di una nave, e comunque in tutte le regioni di un liquido soggette ad alte e brusche variazioni di pressione. In particolare, all'interno di un liquido sottoposto all'azione di un campo ultrasonoro particolarmente intenso si parla di "cavitazione acustica" che in genere viene distinta in due categorie: inerziale (o transiente) e non-inerziale (o stabile) (Leighton, 1997). Le condizioni che si stabiliscono dipendono dalla frequenza e dall'ampiezza della pressione acustica applicata, dal raggio delle bolle e dalle proprietà del liquido in cui esse sono intrappolate. Questo fenomeno si manifesta nei liquidi che contengono aria o gas, fatto questo che ovviamente facilita la cavitazione, ma il fenomeno può manifestarsi anche in un liquido privo di gas, se la pressione acustica applicata è più grande della pressione idrostatica nel liquido stesso.

Quando una bolla è esposta ad US, la pressione acustica agisce come una forza esterna che ne fa variare il raggio, aumentando le sue dimensioni; la bolla si comporta come un sistema oscillante, con una elasticità che è data dal gas contenuto al suo interno, e una inerzia, che è quella del liquido che circonda la bolla e che oscilla con la parete della bolla stessa. Il risultato è che essa ha una frequenza propria, il cui valore è inversamente proporzionale al suo raggio, in condizioni di equilibrio; quando la frequenza del campo acustico applicato si avvicina alla frequenza propria della bolla, questa tende ad avere un comportamento risonante e l'ampiezza delle sue oscillazioni dipende da quanto sono vicini i due valori di frequenza e dal valore della pressione applicata. In prossimità della risonanza, le oscillazioni assumono un carattere di forte non-linearità, con generazione di armoniche di ordine superiore e con effetti che si manifestano sia nel campo acustico, sia nel mezzo stesso, talvolta producendo sensibili modificazioni chimiche e fisiche.

I comportamenti delle bolle in oscillazione sotto l'azione del campo acustico possono essere diversi; una possibilità consiste nella cosiddetta “*diffusione rettificata*”, in conseguenza della quale il raggio di equilibrio della bolla tende a crescere nel tempo. Tale effetto si presenta alle intensità acustiche più basse, con sviluppo della cavità in un processo lento. La ragione è che durante le fasi di compressione e di espansione, del gas può diffondere attraverso la superficie della bolla, rispettivamente verso il liquido esterno o verso l'interno della bolla stessa, e poiché l'area della superficie è più grande durante l'espansione che nel corso della compressione, il risultato è che entra più gas di quello che esce; tale processo corrisponde alla *cavitazione non inerziale o stabile*. Tale fenomeno avviene solo con l'irradiazione di fasci ultrasonori continui e ad esempio occorrono circa 1000 cicli affinché una bolla arrivi in condizioni di risonanza ad 1 MHz. Va sottolineato che questo tipo di cavitazione è importante nell'utilizzo terapeutico degli US oppure in ecografia Doppler (Guiot, 2010).

La *cavitazione inerziale o transiente* è invece caratterizzata da una fase di relativamente lenta espansione della bolla all'interno del campo ultrasonoro; quest'ultimo è caratterizzato da onde di compressione e depressione. Durante la fase di pressione negativa (depressione) si ha l'ingrandimento della bolla fino ad un volume molto più grande di quello in condizioni di equilibrio. Durante la fase di pressione positiva (compressione), l'enorme pressione esercitata sulla bolla, la comprime in modo rapido e violento, fino a farla collassare su se stessa con conseguente implosione e rilascio di energia.

Con l'implosione delle bolle di gas, si verifica un'emissione di grande quantità di energia localizzata, con il raggiungimento di altissime pressioni e temperature, che possono produrre effetti anche dannosi per il sistema biologico attraversato, e la formazione di quelli che si definiscono *hot spot* cioè punti caldi (Plaja, 2003); vengono valutati valori di temperatura anche superiori a 5000 K,

una pressione di circa 1000 atmosfere, un tempo di vita inferiore al μs ed una velocità di riscaldamento e raffreddamento che supera i 10 miliardi di gradi Celsius/sec .

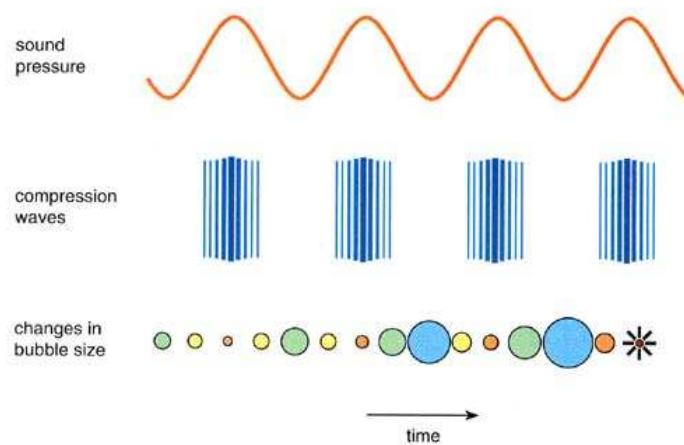


Figura 1.7: dinamica delle bolle sottoposte all'onda acustica

Le variazioni quasi istantanee di densità, pressione, temperatura all'interno del fluido in cui si propaga l'onda ultrasonica possono produrre anche eventuali onde cosiddette di *shock*, ossia onde di pressione che possono anche essere estremamente intense.

La *cavitazione inerziale* è un processo caratterizzato da una soglia, in termini di ampiezza del campo acustico (più precisamente del massimo negativo della pressione acustica), di frequenza (più è bassa, più lungo è il tempo a disposizione per l'espansione delle bolle) e di dimensioni delle bolle presenti; a tal proposito, bolle molto piccole sono caratterizzate da un'alta tensione superficiale che tende a limitarne l'espansione, mentre bolle con un raggio di equilibrio già molto grande possono espandersi ma il collasso non è sufficientemente violento. Per esempio, (figura 1.8) alla frequenza di 10 MHz, la minima pressione negativa che induce cavitazione inerziale è di circa 0,84 MPa ed a questa pressione solo bolle di raggio iniziale di circa $0,2 \mu\text{m}$ iniziano a cavitare (Guiot, 2010).

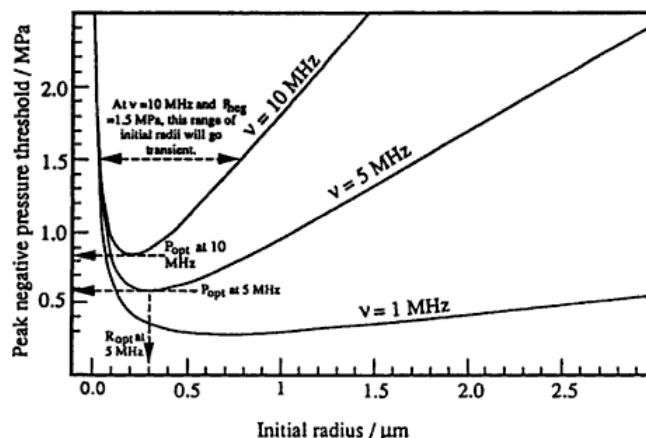


Figura 1.8: soglia della cavitazione inerziale a 3 frequenze in funzione del raggio iniziale delle bolle (Apfel, 1991)

Questo andamento violento del fenomeno della cavitazione può portare alla formazione dei **radicali liberi**, molecole o atomi estremamente reattivi, che possono agire direttamente sulle catene polimeriche e sulle strutture presenti nel mezzo (Langton, 1962). I radicali liberi più noti sono quelli derivanti: dalla sonolisi dell'acqua, ed a contenuto di ossigeno detti ROS (*Reacting Oxygen Species*).

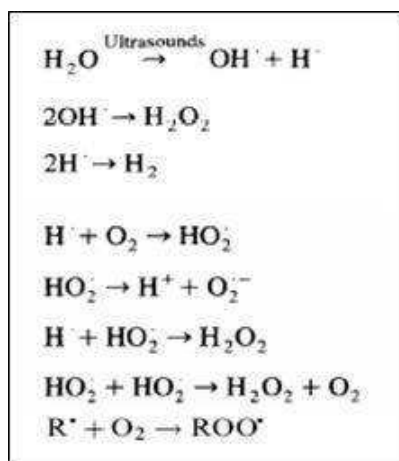


Figura 1.9: i radicali liberi prodotti dagli ultrasuoni

L'irradiazione ultrasonora dell'acqua porta alla formazione del radicale ossidrilico e radicale idrogeno, che danno come prodotti finali principali H_2O_2 (perossido d'idrogeno) e H_2 .

L'esposizione ultrasonora in presenza di ossigeno porta alla formazione di atomi di ossigeno; questi ultimi reagiscono con l'ossigeno per formare i radicali $\text{HO}_2^\cdot$. Le specie reattive a contenuto di ossigeno sono principalmente: radicale superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radicale idrossido ($\text{OH}^\cdot$), radicale perossido ($\text{ROO}^\cdot$) e perossido di idrogeno (H_2O_2) (Riesz, 1992; Barnett, 1998).

A livello cellulare, la produzione di radicali indotti da esposizione ad US può produrre anche effetti biologici sul DNA; studi sperimentali e modelli teorici hanno messo in evidenza come gli effetti degli US sui biopolimeri riguardano soprattutto la degradazione delle strutture per via meccanica (Langton, 1962). Alcuni tipi di legami chimici nelle macromolecole vengono spezzati per le forze di impatto e di *shear* che si generano a causa delle variazioni di pressione, o in seguito ai fenomeni cavitatori che portano alla formazione dei radicali.

I danni al DNA possono essere attribuiti all'azione meccanica e sonochimica della cavitazione. L'azione meccanica degli US si ha quando cellule e microbolle interagiscono direttamente (Fuciarelli, 1995). Le forze di *shear*, dovute alla presenza dell'onda acustica, possono portare alla formazione di rotture nella catena di DNA. I legami che vengono degradati dai radicali sono in genere legami C-C, C-O e C-H presenti nella struttura del biopolimero. Lo stress ossidativo derivato

dalla produzione di radicali liberi può portare in alcuni casi alla modificazione delle basi azotate (Miller, 1997).

I radicali liberi prodotti dalla cavitazione interagiscono anche con la membrana cellulare, in particolare con i lipidi presenti sulle membrane cellulari. L'azione dei radicali liberi si esercita mediante la destrutturizzazione delle membrane, fenomeno attraverso il quale il doppio strato lipidico modifica il suo ordine fisiologico.

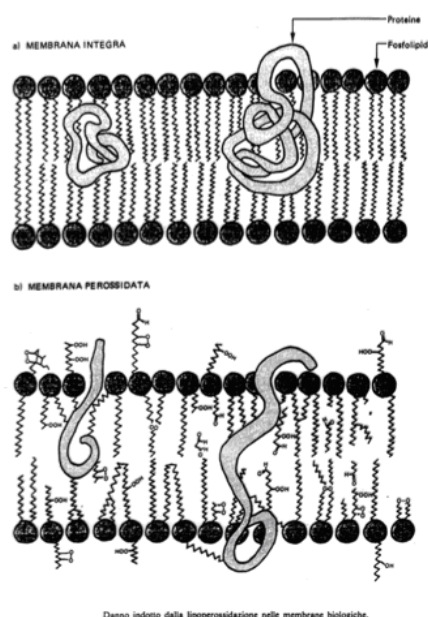


Figura 1.10: destrutturizzazione di membrana ad opera degli ultrasuoni

L'azione degli US sulle strutture lipidiche può avvenire anche per mezzo di rotture meccaniche di zone della membrana ad opera di microflussi o microbolle cavitanti che si trovano in prossimità della superficie. In particolare, in Pozzi (2011), è stata investigata la correlazione tra possibili danni alla membrana cellulare e produzione di radicali liberi, indotta da US terapeutici ad 1 MHz su una popolazione di fibroblasti murini, utilizzando misure di EPR (*Electron Parametric Resonance*) e di FTIR (spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier). I risultati mostrano che l'esposizione delle cellule ad intensità di circa $0,04 \text{ W/cm}^2$, al di sotto della soglia della cavitazione, fissata in letteratura in 100 mW/cm^2 (Krasovitski, 2011), per 30 minuti alla distanza campione- trasduttore di 3 cm, porta ad un aumento statisticamente significativo di radicali liberi, che può alterare l'equilibrio cellulare, inducendo stress perossidativo sulle componenti cellulari (ad esempio la componente fosfolipidica della membrana plasmatica), modificando la permeabilità della membrana stessa, senza indurre morte cellulare.

I radicali liberi, inoltre, possono modificare le interazioni lipide-proteina, con conseguenze sulla funzionalità di trasporto della membrana.

L'effetto del campo acustico viene esercitato anche sulle proteine presenti all'interno delle cellule. Alcuni studi su proteine in soluzione hanno evidenziato come l'azione degli US può portare alla formazione di strutture amiloidi e aggregati (Ohhashi, 2005, Marchioni, 2009). Il campo acustico può indurre l'esposizione del sito attivo della proteine attraverso un processo di *unfolding* o portare a variazioni funzionali dovute al distacco di un complesso molecolare. In particolare, cambiamenti nella struttura secondaria di proteine di membrana possono provocare cambiamenti anche nella microviscosità di membrana (Huang, 1995), collegato al fenomeno della sonoporazione.

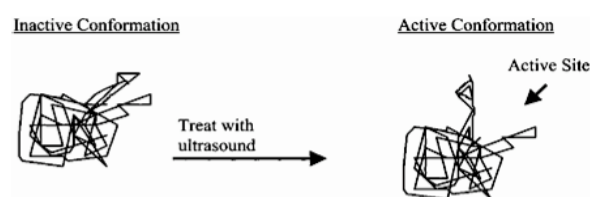


Figura 1.11: esposizione del sito attivo di una proteina in seguito a trattamento con US

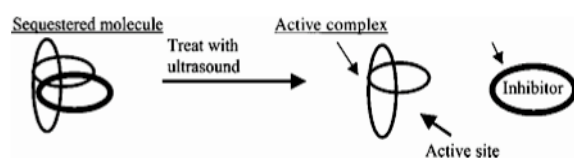


Figura 1.12: distacco dalla proteina di un inibitore

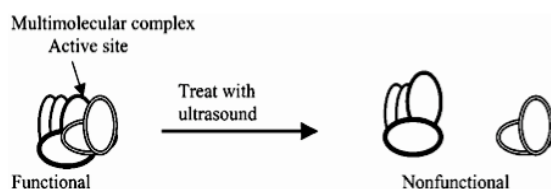


Figura 1.13: transizione della proteina da uno stato funzionale ad uno stato non funzionale

Come abbiamo visto, un'ipotesi centrale che riguarda gli effetti non termici dell'interazione tra US e tessuti biologici è che essi siano primariamente mediati dalla cavitazione; in realtà modificazioni della membrana cellulare, con evidenza di bioeffetti in cellule e tessuti, possono essere indotte anche in assenza di cavitazione stabile o inerziale (Daleki, 2004; Kimmel, 2006; O'Brien, 2007; Krasovitski, 2011), con livelli di intensità ultrasonora al di sotto della soglia della cavitazione (100 mW/cm^2). Secondo Krasovitski (2011), è possibile spiegare sia gli effetti biologici indotti dalla cavitazione che quelli indotti in condizioni di non-cavitazione, mediante un modello che fa riferimento all'interazione diretta tra la pressione acustica oscillante e il doppio strato della membrana cellulare. L'autore ipotizza infatti che la membrana cellulare sia in grado di assorbire l'energia meccanica dal campo ultrasonoro, trasformando l'energia acustica in stress meccanici,

attraverso espansioni e contrazioni dello spazio intermembrana; in particolare, è ipotizzabile che lo spazio idrofobico tra i due monostrati lipidici si gonfi e si sgonfi con una certa periodicità quando è esposto agli US. La pressione acustica, che costituisce la forza, oscilla tra pressione “negativa” (“rarefazionale”) in cui i due foglietti del doppio strato si allontanano tra di loro, superando le forze di attrazione molecolare, le forze inerziali dell’acqua circostante e le forze viscosi; il contrario accade durante la fase di pressione “positiva” (compressione). Tali espansioni e contrazioni potrebbero stimolare cicli di stiramento e rilascio nella membrana cellulare e nel citoscheletro, che potrebbero attivare proteine mecano-sensibili, aumentando la permeabilità cellulare. Sulla base di studi sperimentali e teorici, l’autore sottolinea che pressioni acustiche modeste, inferiori a 0,1 MPa possano già superare le forze di attrazione tra i due strati lipidici; in particolare, secondo l’autore, la massima deformazione è proporzionale all’ampiezza della pressione acustica e inversamente proporzionale alla radice quadrata della frequenza. Risultati di simulazioni mostrano che la membrana sottoposta agli US ad 1 MHz diviene un oscillatore meccanico e una sorgente essa stessa di attività cavitatoria intracellulare, in modo molto simile ad una bolla di gas in un campo acustico. Secondo l’autore, differenti stadi nell’interazione tra la membrana cellulare e il campo ultrasonoro possono indurre diversi bioeffetti sulla membrana cellulare e il citoscheletro (figura 1.14); man mano che la tensione sulla membrana aumenta rispetto allo stadio iniziale (S0), possono prodursi effetti reversibili, per effetto delle espansioni e contrazioni indotte dagli US del doppio strato lipidico, con, ad esempio, attivazione delle proteine di membrana mecano-sensibili (S1); la tensione crescente può portare a danni sulle proteine di membrana e /o al citoscheletro (S2), e può indurre la formazione di pori (S3a, S3b) e anche rotture ad elevati livelli di stretching della stessa, facilitando l’uptake di farmaci o geni e aumentando la permeabilità cellulare.

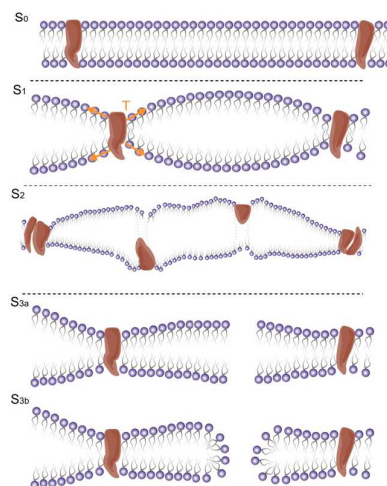


Figura 1.14: differenti stadi dell’interazione tra doppio strato lipidico e US

1.2.1 Studi in vitro degli effetti indotti da ultrasuoni utilizzando tecniche spettroscopiche

Nel corso degli ultimi anni, la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR) è stata utilizzata in modo innovativo per investigare gli effetti indotti su proteine e campioni cellulari esposti ad US terapeutici (frequenza 1 MHz), in termini di cambiamenti strutturali, ricavando informazioni sulle macromolecole presenti in una popolazione cellulare. In particolare, Marchioni (2009), ha studiato gli effetti indotti da esposizione ad US a 1 MHz su sei proteine in soluzione acquosa con differente peso molecolare e differente struttura secondaria, utilizzando spettroscopia FTIR, spettroscopia UV-VIS, dicroismo circolare e light scattering. In particolare, sono stati indagati due set di proteine, uno con struttura secondaria alfa dominante, uno con beta dominante. Il set con struttura secondaria alfa dominante è costituito da: *citocromo c*, proteina coinvolta nel trasporto di elettroni, la cui struttura secondaria è composta al 41% da α -elica e al 21,9% da β -turns; *lisozima*, enzima che catalizza la rottura idrolitica dei polisaccaridi della parete cellulare protettiva di alcune famiglie di batteri, la cui struttura secondaria è composta al 41,9% da α -elica e al 6,2% da β -strands e 30,6% da β -turns; *mioglobina*, proteina globulare con la funzione di conservare e facilitare la diffusione dell'ossigeno nelle cellule muscolari, la cui struttura secondaria è composta al 75,8% da α -elica e 12,4% da β -turns; *albumina sierica bovina*, enzima che regola la corretta distribuzione dei liquidi corporei nei compartimenti intervascolari e nei tessuti, la cui struttura secondaria è composta al 67% da α -elica.

E' stato inoltre studiato un set di proteine caratterizzate da struttura beta dominante, costituito da: *trypsinogeno*, la cui struttura secondaria è composta al 10,1% da α -elica, 32,3% da β -sheets e 25,3% da β -turns; *α -chimotrypsinogeno A*, enzima che catalizza il taglio del legame peptidico, la cui struttura secondaria è composta al 32% da β -strand e al 21% da β -turns.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando una sorgente di US alla frequenza di 1 MHz e posizionando la soluzione campione in un tubo di polipropilene (6 x 2,4 cm²) nel fondo di una vasca (19,5 cm x 11,5 cm x 7,5 cm) riempita con acqua degassata alla temperatura controllata di 25 °C. I campioni sono stati posizionati alla distanza fissa di 3 cm dalla sorgente di US e sonicati per 10, 20, 30, 40, 50, 60 min. I risultati mostrano un effetto prodotto dalla sonicazione dipendente dal tipo di struttura secondaria dominante nelle diverse proteine e dal grado della loro struttura ordinata; in particolare, le proteine più suscettibili agli US sono risultate quelle con PM più basso e l'effetto è risultato decrescere linearmente dal citocromo c (12.384 Da) all' α -chimotrypsinogeno A (25.600 Da). In particolare, per quanto riguarda le proteine α -dominanti, i risultati hanno mostrato che la variazione della struttura principale è inferiore nelle proteine con più alta percentuale di struttura dominante; la struttura ordinata sembrerebbe pertanto costituire uno schermo per le onde

ultrasuono. Al contrario, le proteine β -dominanti non sembrano modificare la loro struttura principale per effetto dell'esposizione all'agente fisico. Gli autori associano l'effetto riscontrato alla produzione di radicali liberi, prodotti dalla sonolisi dell'acqua, i quali modificano la struttura ordinata delle proteine, molto più facilmente quando la proteina è piccola e quindi con basso peso molecolare e caratterizzata da bassa struttura ordinata.

In un ulteriore lavoro, (Conti 2010), la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (ATR-FTIR) è stata utilizzata per la prima volta per rilevare effetti indotti dall'esposizione ad US terapeutici alla frequenza di 1 MHz sulla linea cellulare tumorale linfociti T Jurkat. In questo caso, sono stati utilizzati due diversi set-up sperimentali per variare i parametri del campo acustico, modificando la posizione del campione in piastra Petri rispetto al trasduttore (0,8, 5, 15 e 20 cm) posizionato sul fondo di una vasca, e il tempo di sonicazione. I danni genotossici nelle cellule esposte sono stati ricercati mediante il Protocollo Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN). I risultati hanno mostrato cambiamenti dei gruppi funzionali tipici delle proteine, degli acidi nucleici e dei lipidi a dosi corrispondenti ad esposizioni alla distanza trasduttore-campione di 15 cm, in corrispondenza della quale il test dei micronuclei non ha mostrato però tossicità indotta nei campioni. Dosi più elevate, relative alla distanza campione-trasduttore pari a 5 cm, hanno invece prodotto sia effetti tossici che cambiamenti strutturali. L'aumento nell'assorbimento di tutti i gruppi funzionali, rilevato dalla spettroscopia FTIR in corrispondenza della dose erogata a 15 cm, è risultato un fenomeno probabilmente dovuto all'interazione dei radicali liberi generati dagli US all'esterno e all'interno della cellula, con le strutture lipidiche e nucleotidiche all'interno della cellula.

In questi ultimi anni, è stato investigato l'utilizzo degli US per aumentare il trasporto di membrana, a causa della non invasività e dell'efficienza del metodo; gli US potrebbero infatti aprire in modo reversibile la membrana protettiva delle cellule viventi, consentendo di far entrare medicinali o molecole terapeutiche (sonoporazione). Futuri progressi in questo campo richiedono però una conoscenza approfondita di come gli US e la cavitazione agiscono sui sistemi biologici. In questo ambito, particolare importanza rivestono i risultati del lavoro di Di Giambattista (2011), in cui i fibroblasti murini NIH-3T3, sono stati studiati come sistema modello per la *terapia genica* e la *drug delivery*, e utilizzati come target dell'esposizione ad US terapeutici. Il setup sperimentale prevedeva l'irradiazione dei campioni per 15, 30, 45 e 60 minuti alle distanze campione trasduttore di 10 e 15 cm; i cambiamenti indotti nei gruppi funzionali sono stati investigati con la spettroscopia FTIR. Dall'analisi degli spettri IR è stato rilevato che l'esposizione ad US di cellule non tumorali induce un cambiamento di intensità per la banda relativa allo stretching asimmetrico del gruppo CH_2 (2924 cm^{-1}) nella regione lipidica ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$), dipendente dal tempo di esposizione e quindi

dall'energia fornita. Tale risultato può risultare utile nello studio della trasfezione genica *in vitro* mediata da US, poiché il movimento del doppio strato lipidico può essere associato con il cambiamento di permeabilità della membrana plasmatica, con formazione di pori temporanei.

In un ulteriore lavoro del 2011, (Grimaldi 2011), sono stati posti a confronto gli effetti dell'esposizione ad US terapeutici sui fibroblasti murini con quelli ottenuti sulla linea cellulare tumorale, linfociti T Jurkat, utilizzando la spettroscopia FTIR e il test dei micronuclei per rilevare danni genotossici e citotossici, al variare delle condizioni di esposizione. Il confronto tra i risultati della spettroscopia FTIR per tutte le componenti cellulari (lipidi, proteine, acidi nucleici) delle due linee, ha mostrato che le cellule Jurkat sono molto sensibili agli US nella regione dei lipidi, mentre i fibroblasti nella regione degli acidi nucleici. Un importante effetto genotossico è risultato presente per entrambe le linee cellulari solo per tempi di sonicazione lunghi (60 minuti per NIH-3T3; 45 e 60 minuti per Jurkat alla distanza di 15 cm campione trasduttore) mentre per le cellule Jurkat è stato riscontrato anche un significativo effetto citotossico per lunghi tempi di esposizione. Il lavoro mostra una radicale differenza di comportamento a seguito di esposizione ad US delle due linee cellulari, a dimostrazione del fatto che l'identificazione della tipologia di cellula target dell'agente fisico è fondamentale al fine dell'efficienza ed efficacia di una eventuale terapia genica.

1.3 Applicazioni mediche degli ultrasuoni

In medicina, le applicazioni degli US possono essere suddivise in due grandi categorie: **formazione di immagini a scopo diagnostico e terapia**.

Per quanto riguarda la **diagnosi**, gli US vengono tipicamente utilizzati nella formazione delle immagini per ecografie (addominali, ginecologiche, ecc), utilizzando le riflessioni subite dal fascio ultrasonoro nell'attraversare i tessuti biologici. Nella diagnostica, il range di frequenza utilizzato è generalmente tra i 2,5 e i 7,5 MHz e l'intensità mediata nel tempo è dell'ordine delle decine di mW/cm². L'applicazione degli US a parti superficiali del corpo come la tiroide o gli occhi, necessita invece di frequenze più alte, nel range 7,5-15 MHz, caratterizzate da una scarsa capacità di penetrazione nei tessuti.

Le terapie che impiegano US possono essere suddivise in due gruppi: ad “**alta potenza**” ed a “**bassa potenza**” (ter Haar, 2007). Le applicazioni ad alta potenza comprendono *HIFU* (*High Intensity Focused Ultrasounds*) e litotrixxia, mentre le applicazioni a bassa potenza includono fisioterapia, sonoforesi, sonoporazione, terapia genica. La tabella 1.3 mostra la frequenza, l'intensità di picco spaziale mediata nel tempo e la pressione nel punto focale o massima spaziale

per gli US non focalizzati, utilizzati per le principali applicazioni terapeutiche degli US (Shaw, 2008).

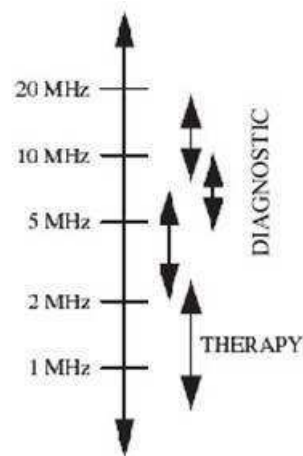


Figura 1.15: range di utilizzo degli ultrasuoni nella diagnosi e nella terapia medica

La maggior parte delle applicazioni terapeutiche degli US utilizzano il riscaldamento per ottenere l'effetto desiderato. **Nel caso di terapie ad US a “bassa potenza”**, aumentando la temperatura di pochi gradi al di sopra dei livelli normotermici, è possibile indurre vasodilatazione temporanea e aumentare l'afflusso di sangue nella zona interessata. Questo meccanismo è stato proposto per spiegare gli effetti benefici che si ottengono nelle **applicazioni fisioterapiche**, con sollievo nei dolori articolari e muscolari, accelerazione nella cicatrizzazione delle ferite, maggiore estensibilità dei tessuti molli, riduzione del gonfiore, riparazione delle lesioni dei tendini, ecc. In questo caso, gli US vengono utilizzati in regime continuo e impulsato, con frequenze da 500 kHz a 5 MHz, ed intensità comprese tra $0,5 \text{ W/cm}^2$ e $3,0 \text{ W/cm}^2$.

Trattamenti terapeutici con US	Frequenza MHz	Intensità W/cm^2	Pressione MPa
Fisioterapia	0,5-5	<3	$<0,5$
Litotrissia	0.5	$<10^{-4}$	10-15
HIFU	0,8-2	1000-10.000	10
Emostasi	1-10	100-5000	5
Stimolazione della crescita ossea	1,5	30 mW/cm^2	50 kPa
Drug delivery	Fino a 2	Varie	0,2-8

Tabella 1.3: frequenza, pressione, intensità degli US usati per differenti applicazioni terapeutiche.

Trasfezione genica, drug delivery: tali applicazioni degli US sfruttano la *sonoporazione*, fenomeno transiente e reversibile, che permette a molecole di dimensioni tali da non poter attraversare la membrana cellulare in condizioni normali, di passare attraverso i pori, a seguito dell'aumento della

permeabilità di membrana indotto da esposizione ad US (Okada, 2005; Zarnitsyn, 2008; Zhou, 2008).

La *trasfezione genica* è un processo che consiste nell'introdurre DNA in cellule eucariote; il DNA introdotto viene successivamente integrato nei cromosomi cellulari. Le correnti di trasfezione sono divise in due categorie: virali e non virali (Pepe, 2004). Le trasfezioni virali si basano sull'utilizzo di particolari virus che hanno un'ottima tendenza ad infettare le cellule e trasferirvi il proprio DNA. Rispetto alle trasfezioni non virali hanno dunque un'efficienza maggiore. Le non virali comprendono l'immissione nella cellula di DNA nudo, all'interno di liposomi o il bombardamento tramite particelle (*gene gun*).

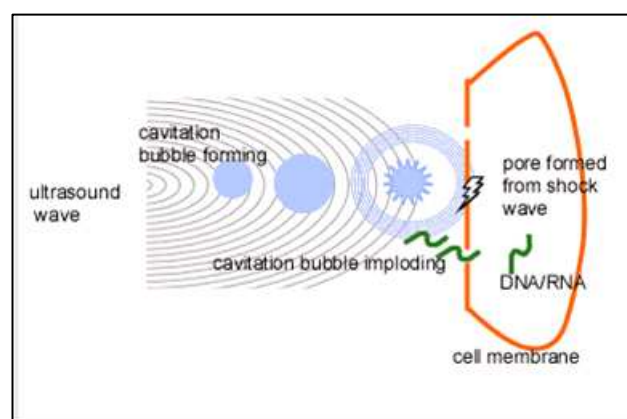


Figura 1.16: rappresentazione schematica del processo di sonoporazione in prossimità della membrane cellulare

La *drug delivery* consiste nel processo di *uptake* nella cellula di molecole o farmaci (analgesici o anti-infiammatori) di peso molecolare elevato, rendendo specifico il sito del rilascio degli stessi a seguito di irradiazione con US. Dalecki (2004) riferisce che US di 20-100 kHz aumentano significativamente la veicolazione transdermica di anestetici topici, insulina e altre proteine ad elevato peso molecolare. L'efficienza di sonoporazione è influenzata dal set up sperimentale e dal tipo di cellula esposta al campo ultrasonoro.

Diversi studi hanno mostrato che l'efficienza risulta considerevolmente accresciuta con l'aggiunta di agenti di contrasto (Okada, 2005; Hallow, 2006), costituiti da microbolle gassose incapsulate, usate spesso anche nell'imaging, in quanto sono in grado di riflettere l'onda acustica. La proprietà principale di questi mezzi è enfatizzare gli effetti del campo ultrasonico sul campione per cui, aggiungendoli nel terreno di coltura cellulare, vengono ridotti i livelli di intensità ultrasonora richiesta per generare la cavitazione.

Nel caso delle terapie ad US ad “alta potenza”, che sfruttano il meccanismo termico, la temperatura dei tessuti viene innalzata molto rapidamente (tipicamente in meno di 3 secondi) al di sopra di 56 °C, provocando la morte istantanea delle cellule; tale effetto viene utilizzato per

l'**HIFU**, **High Intensity Focused Ultrasounds**, tecnica che prevede l'applicazione di US focalizzati di elevata intensità (1 kW/cm^2) per l'ablazione selettiva e non invasiva di tessuti, tra cui alcune forme tumorali.

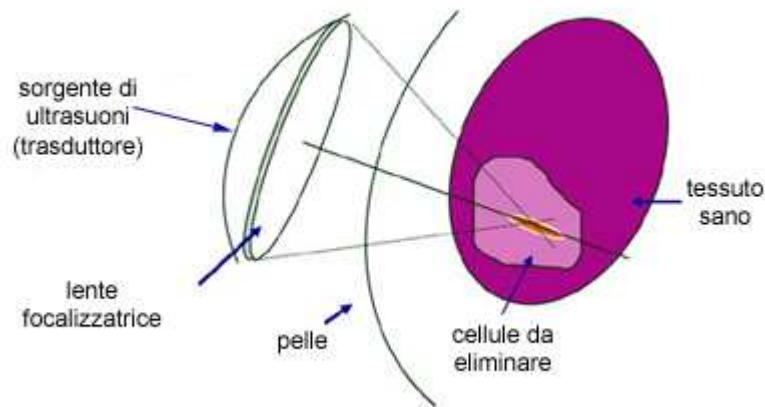


Figura 1.17: schema di principio della tecnica di focalizzazione di ultrasuoni di elevata intensità (HIFU) per applicazioni di terapia chirurgica (fonte www.inrim.it)

Il fascio ultrasonoro viene applicato per un tempo molto breve, tipicamente tra 1 e 16 s, ad una frequenza, che, nei sistemi dedicati per la prostata, è compresa tra 3 e 4 MHz. La frequenza del fascio deve essere tale da consentire un'adeguata concentrazione di energia nel fuoco, a distanza dal trasduttore, senza determinare un assorbimento significativo nella regione tra il trasduttore ed il fuoco stesso; l'assorbimento degli US è in grado di produrre una necrosi irreversibile nella regione bersaglio, salvaguardando in larga misura i tessuti sani circostanti;

Litotrissia: nell'ambito delle terapie ad US ad alta potenza, tale tecnica consente la rottura dei calcoli biliari, renali, uretrali per mezzo di US ad ampiezza elevata.

Tra le applicazioni mediche più recenti degli US occorre annoverare anche la **medicina estetica**: in questo ambito, l'utilizzo degli US è rivolto essenzialmente al trattamento delle masse adipose in eccesso. Nel passato, l'unico modo per la riduzione delle adiposità localizzate era la liposuzione o altre procedure chirurgiche. Nel corso degli anni 80, è stata introdotta la **liposuzione assistita da US (UAL)**; la tecnica consiste nell'utilizzo degli US contemporaneamente ad un'aspirazione di tipo tradizionale. La UAL prevede un'incisione chirurgica con l'applicazione sottocutanea, direttamente nel pannicolo adiposo da trattare, di un manipolo emettitore di US alla frequenza di circa 20 kHz, che, per dimensioni, è paragonabile ad una normale cannula da aspirazione. Questo approccio chirurgico, seppur efficace, presenta numerosi inconvenienti per i pazienti legati al ricovero, all'anestesia generale, al dolore post-operatorio, alla presenza di ecchimosi e gonfiore nell'area trattata, al recupero post-operatorio, oltre ad altri rischi inerenti le procedure chirurgiche. A questo

si aggiungono anche la tendenza a produrre complicazioni quali ustioni e irregolarità della pelle e la probabilità di danneggiare vasi sanguigni, nervi e muscoli (Asher, 2010).

Tecniche più recenti prevedono l'applicazione degli US, senza intervento chirurgico, utilizzando la cosiddetta **cavitazione estetica**, che consiste nell'applicazione di onde ultrasoniche che determinano l'implosione di bolle di vapore e la conseguente lisi delle cellule del tessuto adiposo. L'energia ultrasonora attraverso questa procedura non invasiva, può essere fornita al tessuto in due forme: **non focalizzata e focalizzata**.

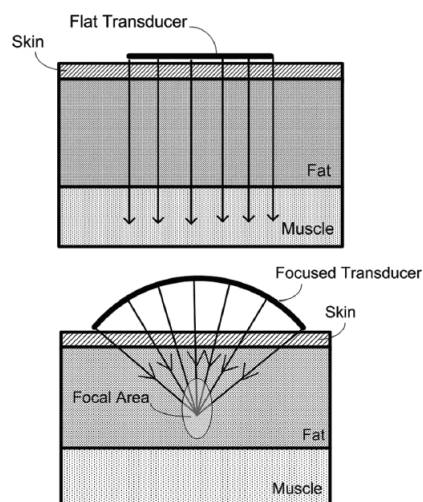


Figura 1.18: estensione del fascio ultrasonoro quando l'energia è emessa da un trasduttore piano o focalizzato.

Nel primo caso, poiché l'energia ultrasonora decresce con la distanza, a causa dell'attenuazione, la pelle risulta esposta ad una intensità superiore rispetto al grasso sottocutaneo che costituisce invece il vero bersaglio del trattamento. Nel caso di US focalizzati, invece, l'energia ultrasonora viene concentrata in una precisa area sottocutanea, ove produrre la lisi delle cellule adipose, limitando invece i danni ai nervi, al tessuto connettivo, ai muscoli, ai vasi sanguigni (Brown, 2009).

Dopo la rottura delle cellule adipose, il loro contenuto, composto principalmente da trigliceridi, viene disperso nei fluidi intracellulari, trasportato nel fegato attraverso il sistema vascolare e linfatico ed eliminato attraverso le vie tradizionali di espulsione dall'organismo.

1.4 Applicazioni estetiche degli ultrasuoni

Da alcuni anni si ricorre all'applicazione di US anche in campo estetico non-medico, attraverso macchinari opportunamente progettati per lavorare a frequenze tali da non consentire la propagazione in profondità delle onde ultrasonore (tipicamente intorno a 3 MHz); si tratta infatti di applicazioni legate generalmente al trattamento delle rughe e alla cura delle adiposità localizzate.

Secondo i costruttori delle apparecchiature ad US per applicazioni estetiche non mediche, risulta l'applicazione degli stessi per i seguenti trattamenti :

-applicazione di agenti cosmetici: l'ultrasuono faciliterebbe l'assorbimento di sostanze attive sul viso e sul corpo quali oli, vitamine solubili grasse, prodotti ai liposomi, emulsioni e agenti idrosolubili: l'effetto sarebbe di aumentare la permeabilità delle cellule, diminuire la barriera funzionale della pelle e aumentare l'attività dei canali degli ingredienti attivi (sonoforesi);

-trattamento per stendere e/o levigare le rughe superficiali: l'ultrasuono, grazie ai suoi effetti termici, riscalda i tessuti e favorisce processi biochimici e metabolici;

-trattamenti anti cellulite per eliminare o ridurre le adiposità localizzate: l'ultrasuono effettua un'azione di mobilizzazione del grasso della zona trattata, favorendo il metabolismo del grasso e la sua rimozione. Tale trattamento non è però permesso in Italia dal 2011, nei centri estetici.

1.5 La “dosimetria” degli ultrasuoni

L'uso degli US in ambito clinico viene comunemente considerato, o almeno così è stato fino a non molto tempo fa, una metodica completamente sicura e priva di rischi. Gli US emessi dai cristalli piezoelettrici attraversano i tessuti biologici dando origine ai fenomeni di riflessione, rifrazione, assorbimento e diffusione che ne configurano un assorbimento da parte dei tessuti. La valutazione di tale assorbimento e lo studio dei suoi effetti biologici sono normalmente legati allo sviluppo di una “dosimetria” che caratterizza l'agente fisico e la sua potenziale o effettiva interazione con il materiale biologico e che richiede la presenza di tre fattori (Guiot, 2010):

- a) quantificazione di una o più grandezze univocamente misurabili che definiscono l'“uscita” dalla sorgente;
- b) determinazione dell'effetto sul materiale biologico dell'energia propagata nelle varie modalità (per riflessione, rifrazione, ecc);
- c) determinazione della relazione causa-effetto tra le quantità precedenti.

La storia degli altri tipi di radiazione mostra che è sempre difficile definire il **concetto di dose** o concetti simili; nel campo delle radiazioni ionizzanti, per esempio, la principale grandezza dosimetrica è la dose assorbita (energia impartita per unità di massa nel sito di interesse) ma accanto a questa, la spiegazione di molti effetti biologici richiede l'introduzione dei concetti di *dose cumulativa*, *dose equivalente*, *dose di soglia* ecc. Analogamente, in fotobiologia ci si riferisce alla radiazione ultravioletta come energia per unità di superficie e nel campo della radiazione elettromagnetica si utilizzano il SAR (*Specific Absorption Rate*) e la densità di potenza assorbita.

La dosimetria nel campo ultrasonico viceversa è molto meno sviluppata e rappresenta ancora oggi un “problema aperto”; i parametri dosimetrici per gli US terapeutici sono stati determinati attraverso osservazioni sperimentali dei bioeffetti dovuti all’esposizione: in questo ambito, le quantità più utilizzate sono la pressione acustica (MPa) e l’**intensità** (W/cm^2).

Va tuttavia sottolineato che la determinazione dell’intensità come grandezza dosimetrica ha lo stesso problema della variabile “*esposizione*” nel campo delle radiazioni ionizzanti, ossia in realtà non rappresenta una misura di dose, in quanto stabilisce soltanto l’energia a cui il tessuto è sottoposto, ma non l’assorbimento che ne deriva.

Va tuttavia sottolineata l’importanza di arrivare ad una **definizione del concetto di “dose” per le applicazioni terapeutiche degli US**, che possa mettere in relazione l’esposizione con l’eventuale effetto biologico/danno osservato. Tale risultato potrebbe essere ottenuto mediante *tecniche teoriche*, di simulazione numerica della propagazione del fascio ultrasonoro in tessuti e campioni biologici, e *tecniche sperimentali*, cioè progettando e realizzando opportuni *fantocci*, costituiti, ad esempio, da sandwich di elementi tessuto-equivalenti, accoppiati a termocoppie o termocamere per la misura della temperatura locale, disponendo anche di un *database* consolidato per valutare i modelli dosimetrici attraverso studi *in vivo* e *in vitro*; su questo argomento sono attualmente in corso progetti europei con lo scopo di arrivare finalmente ad una definizione del concetto di “dose” ultrasonora, per il momento assente. Tale obiettivo richiede una conoscenza approfondita delle caratteristiche del fascio ultrasonoro, fondamentale sia nello studio degli effetti biologici degli US, sia nella valutazione dell’efficacia e dei possibili rischi per la salute connessi a determinati trattamenti terapeutici. Sono stati identificati diversi meccanismi biofisici alla base di effetti biologici degli US di varia natura (effetto meccanico, effetto termico, ecc), i quali a loro volta possono costituire l’effetto desiderato del trattamento oppure un effetto indesiderato, potenziale causa di rischio. Per ognuno di questi meccanismi può essere maggiormente rilevante una particolare caratteristica del fascio ultrasonoro; per questo motivo **non è possibile identificare un unico concetto di “dose” che possa mettere in relazione le esposizioni ad US con gli effetti biologici**.

Sicuramente l’intensità è una grandezza significativa nel caso degli effetti di natura termica; per gli effetti di natura non termica, invece, possono essere maggiormente significative altre grandezze fisiche, come per esempio la pressione di picco negativa (di rarefazione) nel caso degli effetti di natura meccanica connessi alla cavitazione.

Sono state proposte in passato alcune grandezze ultrasoniche dosimetriche, ma si è trattato di casi molto specifici e non facilmente generalizzabili. La norma internazionale della International Electro-technical Commission IEC 60601, 2001, part 2-37 (IEC 2001b), nata per i **sistemi ad US**

per la diagnosi e il monitoraggio, introduce un importante parametro per la sicurezza legata all'esposizione agli US, **l'indice meccanico**, utilizzato per indicare la possibilità di un danno meccanico ai tessuti per effetto di bolle o gas, legato al fenomeno della cavitazione; tale parametro è stato definito come indice di esposizione o di sicurezza, poiché prende in considerazione le proprietà dei tessuti attraversati dall'onda ultrasonora, i processi biofisici e le proprietà acustiche dei sistemi in esame.

Inoltre, come già illustrato, quando gli US attraversano un tessuto, vi è anche trasformazione di parte dell'energia associata in calore. Tale produzione di calore può essere responsabile di un danno, appunto di natura termica, delle cellule di quel tessuto; esso dipende non soltanto dalla temperatura della fonte di calore, ma anche dal tempo di esposizione nonché dai meccanismi di propagazione del calore presenti nel tessuto stesso ed è quantificato dal cosiddetto **indice termico**. Gli *indici meccanico e termico* sono ampiamente utilizzati nelle applicazioni diagnostiche ad alta frequenza come indicatori della sicurezza dell'esposizione agli US; recentemente è stata studiata l'applicazione degli stessi indici come parametri di sicurezza per applicazione degli US a bassa frequenza (*Low Frequencies* (LF): 20-100 kHz), utilizzati per diverse applicazioni terapeutiche mediche, in particolare sonoforesi, rimodellamento del corpo, ecc. Il lavoro di Ahmadi (2012) indica che l'applicazione diretta di questi indici alle basse frequenze ha bisogno di un'accurata investigazione, per cui, mentre l'indice termico può essere usato direttamente nella gamma delle LF, l'indice meccanico sembra diventare meno affidabile alle frequenze più basse.

Va sottolineata l'importanza, soprattutto per quanto riguarda le applicazioni mediche "emergenti" degli US, ossia HIFU e medicina estetica, di determinare sia metodi accurati per predire la dose, o comunque le grandezze fisiche più significative, sia di sviluppare procedure *ad hoc* per caratterizzare i trasduttori e monitorare le prestazioni degli apparati; per quanto riguarda l'HIFU, la capacità di generare temperature elevate all'interno dei tessuti rende oltremodo necessaria la garanzia che il trattamento venga fornito in modo adeguato e nel sito corretto: per questa applicazione, in particolare, permangono problemi aperti connessi alla misura delle grandezze fisiche rilevanti che riguardano, ad esempio, i metodi più appropriati per la misura della potenza in un campo ultrasonoro fortemente focalizzato (Shaw, 2008). Anche per la medicina estetica, una caratterizzazione fisica del fascio ultrasonoro e della sua propagazione nei tessuti biologici è necessaria, a garanzia dell'efficacia e della sicurezza dei trattamenti.

CAPITOLO 2:

PROBLEMATICHE CONNESSE CON L'USO DEGLI ULTRASUONI IN FISIOTERAPIA E IN ESTETICA

Le apparecchiature emittenti US, in relazione alle aree a cui fa riferimento il presente lavoro, possono essere distinte, sulla base del loro utilizzo, in:

- a) apparecchi utilizzati in *fisioterapia*;
- b) apparecchi utilizzati nell'*estetica medica*;
- c) apparecchi utilizzati nell'*estetica non medica*.

Fanno parte della *fisioterapia*, le apparecchiature ad US usate nella Medicina riabilitativa, ad esempio nella riparazione delle fratture ossee e delle lesioni dei tendini, nel trattamento dei tessuti cicatriziali; rientrano invece nell'area dell'*estetica medica*, le apparecchiature usate per il trattamento della cellulite con applicazione degli US in regime di *cavitazione*, per la lisi degli adipociti e il trattamento delle masse adipose in eccesso. Per quanto riguarda l'*estetica non medica*, si fa riferimento alle apparecchiature tipicamente impiegate nei centri estetici per il trattamento di rughe a livello superficiale.

Le apparecchiature ad US utilizzate in *fisioterapia* e nell'ambito della *medicina estetica*, si configurano come *dispositivi medici* e sono soggetti ad una specifica normativa che disciplina le prestazioni delle attrezzature, la sicurezza, le norme di buona pratica per la costruzione, la progettazione o il funzionamento in sicurezza dei dispositivi. Per quanto riguarda i macchinari ad US utilizzati nell'*estetica non medica*, non trattandosi di dispositivi medici, le norme a cui fanno riferimento sono completamente differenti.

Per quanto riguarda le normative tecniche a cui sono soggetti i dispositivi di cui sopra, in generale, l'implementazione di norme che regolamentano l'esposizione ad agenti fisici, è a beneficio della salute delle persone esposte e fornisce un quadro di riferimento per l'igiene industriale. Tali norme possono essere utili poiché (Repacholi, 1979):

- (A) la loro elaborazione serve come un segnale per l'industria e la popolazione in generale che vi è preoccupazione per l'esposizione ad un dato agente fisico e che i pazienti dovrebbero essere al corrente dei potenziali rischi;
- (B) forniscono obiettivi da raggiungere nella costruzione degli apparecchi;
- (C) i dispositivi che producono livelli dell'agente fisico in esame in eccesso rispetto a quelli prestabiliti dalle norme, dovrebbero essere identificati e opportune misure correttive dovrebbero

essere adottate;

(D) la presenza di norme costituisce la base per la sicurezza del lavoro per garantire che i lavoratori ed i pazienti non siano esposti a eccessivi livelli.

Inoltre, le norme che si riferiscono alla valutazione delle *performances* dei dispositivi forniscono ai produttori ed agli utilizzatori procedure standardizzate per confrontare le prestazioni di diverse marche e modelli di apparecchiature, destinate ad essere utilizzate per lo stesso scopo generale (EHC, 1982).

In generale, la protezione dalle esposizioni ad agenti fisici utilizzati per applicazioni mediche è mediata da enti governativi (Duck, 2007); le decisioni prese da tali organismi sono spesso basate su norme internazionali, la maggior delle quali sono pubblicate dalla *International Electro-technical Commission* (IEC). Norme europee sono a carico di *Comité Européen de Normalisation Electrotechnique* (CENELEC) e CEN (*Comité Européen de Normalisation*).

Negli Stati Uniti, i regolamenti del *Medical Device Amendments* controllano la vendita di apparecchiature ad uso medico. Di solito, negli Stati Uniti i produttori che intendono commercializzare un'apparecchiatura passano attraverso la *Food and Drug Administration*, utilizzando un processo noto come 510 (k) (FDA, 1997). Nel mondo, i singoli governi hanno istituito analoghi processi legislativi, che utilizzano criteri di sicurezza per consentire l'approvazione alla vendita sul mercato delle apparecchiature.

Il Canada nel 2010 ha pubblicato "*Radiation Emitting Devices Regulations*" (Canada, 2010) ossia i Regolamenti concernenti i dispositivi che emettono radiazioni, tra cui i forni a microonde, le apparecchiature dentali e gli apparati diagnostici a raggi X, i dispositivi per la terapia ad US, i microscopi elettronici a bassa energia. Per quanto riguarda gli apparati ad US (part XIII), particolare attenzione viene dedicata: alle definizioni dei parametri in uso per quanto concerne la terapia ad US; alle norme di progettazione e costruzione; agli standards di funzionamento; ai *warning signs*. Inoltre, sempre il Canada, nel sito riguardante la *Environmental and Workplace Health*, Salute ambientale e sul posto di lavoro (Canada, 1989) pubblica le *Guidelines for the Safe Use of Ultrasound: Part I - Medical and Paramedical Applications* in cui particolare attenzione viene dedicata alla cura dei dispositivi ad US in termini di calibrazione e mantenimento degli stessi; alle precauzioni da attuare per garantire la sicurezza dell'operatore e del paziente; alle controindicazioni all'uso degli US; al training per gli operatori.

2.1 Normativa per le apparecchiature ad ultrasuoni in fisioterapia ed estetica

2.1.1 Normativa sui dispositivi medici

2.1.1.1 La Direttiva Europea 93/42 sui dispositivi medici

Le apparecchiature ad US utilizzate in fisioterapia si configurano come *dispositivi medici* sulla base della Direttiva 93/42/CEE, modificata dalla Direttiva 2007/47/CE, recepita in Italia dal D.Lgs. 46/97 e da ultimo modificata dal D.Lgs. 37/2010.

La Direttiva sui dispositivi medici (Direttiva 93/42 CEE del Consiglio, del 14 Giugno 1993) è un documento che riporta i criteri generali da utilizzare nella progettazione e realizzazione degli stessi. In generale, la norma fornisce una definizione di **dispositivo medico**, ossia qualsiasi strumento, apparecchio, impianto, sostanza usato da solo o in combinazione, compreso l'eventuale software informatico impiegato, destinato dal fabbricante ad essere utilizzato sull'uomo allo scopo di diagnosi, prevenzione, controllo, terapia di una malattia (o di una ferita); diagnosi, controllo, terapia, attenuazione, compensazione di un handicap; studio, sostituzione o modifica dell'anatomia o di un processo fisiologico.

La norma stabilisce che detti dispositivi possano essere immessi in commercio e messi in servizio unicamente se non compromettono la sicurezza e la salute dei pazienti, degli utilizzatori ed eventualmente di terzi, qualora siano correttamente installati, formino oggetto di un'adeguata manutenzione e siano utilizzati alle condizioni e per i fini previsti, fermo restando che gli eventuali rischi debbono essere di livello accettabile, tenuto conto del beneficio apportato al paziente, e compatibili con un elevato livello di protezione della salute e della sicurezza.

Nella direttiva, i dispositivi medici vengono suddivisi in 4 classi: *I, IIa, IIb e III*: le regole di classificazione tengono conto dei rischi potenziali legati alla fabbricazione e all'utilizzo di tali dispositivi e, per ogni classe, sono indicate specifiche prescrizioni:

classe I: vengono allocati in questa classe i dispositivi generalmente riconosciuti di **scarsa pericolosità** (rischio basso): questa classe include la maggior parte di prodotti non invasivi e gli strumenti chirurgici riutilizzabili;

classe IIa: vengono allocati in questa classe i dispositivi generalmente riconosciuti di **pericolosità medio-bassa**: questa classe include prodotti sia invasivi che non invasivi, generalmente utilizzati per tempi limitati, come la maggior parte dei prodotti per medicazione, alcuni utilizzati per conservare a breve e trasportare il sangue, altri prodotti invasivi utilizzati in chirurgia, la maggior parte dei dispositivi attivi (elettromedicali) utilizzati per scopi terapeutici, altri dispositivi attivi che

inviano o scambiano energia col corpo del paziente ed i dispositivi attivi utilizzati in diagnostica che inviano energia nel corpo del paziente come ad esempio **gli ecografi ad US; le apparecchiature ad US per fisioterapia;**

classe IIb: vengono allocati in questa classe i dispositivi generalmente riconosciuti di **pericolosità medio-alta** e vi sono compresi i dispositivi attivi che forniscono al paziente energia o sostanze sotto forma potenzialmente pericolosa. Si trovano in questa classe le sacche di sangue, alcuni prodotti invasivi posti nel corpo con una operazione chirurgica, apparecchiature a raggi X, dispositivi medici ad US come litotrittori, device ad US chirurgici;

classe III: i dispositivi di questa classe sono generalmente considerati di **alta pericolosità** e includono prodotti che entrano in contatto diretto col sistema circolatorio o col sistema nervoso centrale come le protesi vascolari.

La direttiva stabilisce che i dispositivi devono recare al momento dell'immissione in commercio una marcatura di conformità CE apposta in modo visibile, leggibile ed indelebile. Il simbolo CE significa "*Conformité Européenne*", ed indica che il prodotto è conforme ai requisiti essenziali previsti da Direttive in materia di sicurezza, sanità pubblica, tutela del consumatore, ecc. pertanto non rappresenta un marchio di qualità del prodotto.

L'articolo 11 della Direttiva europea descrive le procedure per la valutazione della conformità: a seconda della classe di appartenenza del dispositivo, i controlli sono più o meno severi, per cui si va da una semplice autocertificazione da parte del fabbricante, per i dispositivi di classe I, ai rigorosi controlli per le fasi di progettazione e fabbricazione, per i dispositivi di *classe III*.

L'applicazione puntuale della Direttiva 93/42/CE garantisce agli utenti (pazienti) e agli utilizzatori che un dispositivo medico è stato progettato e fabbricato per rispondere ai requisiti essenziali di sicurezza ed efficacia, quindi al fine di erogare prestazioni "valide" (in base allo stato dell'arte), e che il suo impiego può essere considerato "sicuro", nelle normali condizioni di utilizzo, per il paziente, l'utilizzatore ed eventualmente di terzi, in relazione all'uso previsto. I requisiti relativi alla progettazione e alla costruzione di tali apparecchiature prevedono anche le informazioni che devono essere fornite dal fabbricante con le apparecchiature stesse. Quest'ultime sono costituite dalle indicazioni riportate sull'etichetta e dalle indicazioni contenute nelle istruzioni per l'uso (Ministero della Salute, 2011).

In considerazione della sua destinazione d'uso e delle sue caratteristiche tecniche, il dispositivo deve soddisfare requisiti essenziali di efficacia e sicurezza specifici, che devono essere garantiti non solo al momento dell'immissione in commercio, ma anche mantenuti nel tempo, per tutto il suo ciclo di vita utile, grazie ad una corretta installazione e adeguata manutenzione. A tali fini il fabbricante può riferirsi alle **Norme armonizzate** di settore (norme riviste a livello europeo su cui

ogni Stato ha espresso parere favorevole); in sintesi una Norma è costituita da un elenco di requisiti specifici compilato da una commissione di esperti. Data la sua origine, una norma descrive lo “stato dell’arte” di un prodotto e di un servizio, ovvero il rapporto ottimale tra caratteristiche tecniche e fattibilità tecnologica. Le norme in sé non rappresentano alcun vincolo o obbligo, mentre rappresentano un patrimonio di conoscenze (Sicurezza e Igiene del Lavoro, 2000). L’adempimento delle richieste contenute nelle norme è presunzione di conformità di un prodotto ai requisiti essenziali della Direttiva. Nel caso in cui il produttore non utilizzi dette Norme armonizzate, dovrà farsi carico di dimostrare con metodologie appropriate la conformità ai requisiti essenziali delle Direttive (Ministero della Salute, 2011).

Le valutazioni di conformità e la certificazione CE (tranne che per dispositivi di *classe I*) sono affidate ad enti particolari chiamati **Organismi Notificati**. Questi enti devono soddisfare criteri ben precisi (specificati nell’allegato 11 della Direttiva), altrimenti perdono la competenza. Gli Organismi Notificati applicano le norme armonizzate. Se i controlli hanno esito positivo si procede alla marcatura CE: è obbligatorio applicarla su tutti i dispositivi (tranne sui dispositivi su misura, come gli occhiali da vista e le lenti a contatto, e poche altre eccezioni). In ogni caso il marchio va applicato sempre sulle istruzioni per l’uso.

L’attività di compilazione e aggiornamento delle norme viene svolta dai cosiddetti *Enti di normazione* che sono organismi privati, volontari e indipendenti senza obblighi di alcun genere. Pur definendo il cosiddetto “stato dell’arte”, talvolta le norme assumono rilevanza giuridica, poiché in alcune circostanze i fabbricanti possono mettere in commercio solo prodotti conformi allo stato dell’arte, come nel caso dei requisiti per la sicurezza. In conseguenza di ciò, ogni Stato ha dovuto definire per legge quale tra i numerosi Enti potesse o dovesse essere considerato come riferimento attendibile e giuridicamente valido per la definizione dello stato dell’arte. In Italia, gli enti normativi riconosciuti sono: il CEI (Comitato Elettrotecnico Italiano) per quanto riguarda le norme relative a requisiti elettrici, elettronici e informatici e quindi per i dispositivi medici attivi (elettromedicali); l’UNI (Ente Italiano di Unificazione) per la meccanica e tutto il resto, per i dispositivi medici non attivi.

Oltre agli enti nazionali esistono due organismi mondiali l’ISO (*International Organization for Standardization*) e l’IEC che sono le controparti internazionali di UNI e CEI. Pur lasciando piena libertà agli enti nazionali di emettere tutte le norme che ritengono opportune, l’ISO cerca di renderle il più possibile uniformi, proponendo dei modelli preconfezionati che, se adottati, facilitano molto gli scambi internazionali. L’UNI quindi può emettere una sua norma semplicemente adottando una norma ISO, e ciò si fa scrivendo UNI ISO xxxx, per rendere esplicita tale origine. L’ISO definisce poi “armonizzate” le norme adottate da più enti nazionali.

Con la costituzione dell'Unione Europea era indispensabile che gli Stati membri armonizzassero le loro norme, anche e soprattutto quelle che riguardavano requisiti di sicurezza e quindi erano di fatto obbligatorie. A tal fine si sono costituiti il CEN e il CENELEC, il primo con lo scopo di armonizzare le norme emesse dall'UNI e corrispettivi Europei e il secondo quelle del CEI e corrispettivi Europei.

Le norme emesse da CEN o dal CENELEC portano il nome EN xxx (Norma Europea numero xxx) e sono adottate da tutti gli Enti nazionali europei con l'aggiunta della propria sigla ad esempio UNI EN xxx. Il risultato è che ci possono essere molti tipi di norme quali:

UNI xxx= norma solo italiana, non armonizzata;

EN xxx= norma solo europea, armonizzata;

UNI EN xxx= norma europea armonizzata e adottata dall'UNI;

UNI EN ISO xxx= norma ISO adottata dal CEN (quindi armonizzata) e dall'UNI;

UNI ISO xxx= norma ISO adottata dall'UNI, non armonizzata.

Le norme si possono suddividere in almeno 4 categorie di importanza:

- a) norme armonizzate cioè approvate dalla Commissione Europea e pubblicate sulla Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea (GUCE). Queste norme sono riconosciute da tutti gli Stati membri, acquisite nel *corpus legis* e quindi con valore legale; l'osservanza di queste norme è presunzione di conformità ai requisiti essenziali e non può essere messa in discussione dagli Organismi Notificati;
- b) norme armonizzate nel senso che sono condivise da tutti gli enti di normazione europei ma non sono pubblicate sulla GUCE; sono degli importanti riferimenti, esprimono comunque lo stato dell'arte e sono quindi accettate da tutti gli Organismi Notificati, ma non hanno lo status di disposizioni legislative e restano norme volontarie;
- c) norme varie nazionali (UNI, CEI, ecc) ed extra europee (FDA, Giappone, ecc): non sono armonizzate quindi possono essere diverse nei vari paesi della UE o non esistere affatto in alcuni; in mancanza di meglio si possono utilizzare, ma la loro applicazione può anche non essere accettata dagli Organismi Notificati;
- d) regole di buona prassi produttiva di associazioni di categoria riconosciute: quando non esiste alcuna norma, quest'ultime possono anche andar bene, ma solo se non contrastano con le norme nazionali (compresa la Farmacopea) o con quelle armonizzate. Gli Organismi Notificati possono tenerne conto o rifiutarle (Sicurezza ed Igiene del Lavoro, 2000).

2.1.1.2 La norma CEI EN 60601-1 sugli apparecchi elettromedicali

Nell'ambito delle norme tecniche armonizzate che assicurano il rispetto dei requisiti della Direttiva Europea 93/42/CEE sui *dispositivi medici*, particolare importanza riveste la norma generale CEI EN 60601-1:2007 “*Apparecchi elettromedicali. Parte 1: Prescrizioni generali relative alla sicurezza fondamentale e alle prestazioni essenziali*”; tale norma, non specifica per i dispositivi che impiegano US, si riferisce alle prescrizioni generali relative alla sicurezza e alle prestazioni essenziali degli apparecchi elettromedicali, con particolare riferimento alla sicurezza elettrica: le prescrizioni della norma si devono applicare nell'uso normale e nell'uso improprio ragionevolmente prevedibile.

Secondo la norma, gli apparecchi elettromedicali devono essere progettati e costruiti in modo da rimanere sicuri nelle cosiddette *condizioni di primo guasto*, ossia nelle condizioni in cui è difettoso un solo mezzo per la riduzione del rischio, oppure si verifica una singola condizione anormale.

La norma ha lo scopo di spiegare le prescrizioni di sicurezza e di illustrare gli interventi periodici per garantire l'efficienza delle apparecchiature. Altro scopo della guida è la descrizione delle modalità di esecuzione delle prove di accettazione all'atto della fornitura di un'apparecchiatura.

Secondo la norma, l'apparecchio e i suoi componenti separabili devono essere marcati con i cosiddetti “**dati di targa**” contenenti il nome o il marchio commerciale del fabbricante, e con il riferimento di modello o di tipo, nel caso in cui la loro erronea identificazione comporti un rischio inaccettabile; dati di alimentazione elettrica (tensione, numero di fasi, frequenza, corrente o potenza assorbita); classificazione (classe e tipo); dati dei fusibili esterni; altri dati specifici, se del caso (effetti fisiologici, modalità di raffreddamento, campo di temperatura di funzionamento, mezzi di protezione, ecc.)

Un esempio di marcatura dei dispositivi elettromedicali è riportato in figura 2.1.

Matricola C / 11 / XXXX / YY		  0476
ALIMENTAZIONE 230 V - 50/60 Hz - 15 VA	USCITA MICROONDE P _{MAX} 40 mW - Freq. 2,45/10,5 GHz	

Figura 2.1: esempio di dati di targa di un elettromedicale

Inoltre, la norma stabilisce che l'apparecchio deve essere munito di **istruzioni d'uso** e **descrizione tecnica**; in particolare, le istruzioni d'uso devono documentare: l'impiego dell'apparecchio nel modo previsto dal fabbricante; le funzioni frequentemente utilizzate, ed eventuali altre controindicazioni note nell'uso dell'apparecchio; le avvertenze e le segnalazioni di sicurezza;

informazioni sufficientemente dettagliate sull'esame preventivo, la manutenzione e la taratura, inclusa la frequenza di tale manutenzione.

La descrizione tecnica deve riportare: i dati di targa dell'apparecchio, eventuali istruzioni specifiche per l'installazione e la predisposizione all'uso, il tipo e le modalità di sostituzione dei fusibili o di parti intercambiabili, schemi circuitali ed elenco dei componenti, condizioni ambientali di trasporto e d'immagazzinamento. con indicati gli schemi circuitali, i dati di targa.

Secondo la norma, i produttori di apparecchi medicali devono eseguire prove per garantire che la progettazione dei loro prodotti sia intrinsecamente sicura; vengono allora specificati i requisiti per le prove per la protezione dai potenziali pericoli elettrici fra cui il test della messa a terra di protezione (continuità della messa a terra) e **le correnti di dispersione**. Da ogni apparecchio, nonostante l'elevata impedenza interna d'isolamento, fluisce una piccola corrente che si disperde verso terra, sull'involucro e nel paziente, definita come *corrente di dispersione*, che non ha uno scopo funzionale. Le tipologie di correnti di dispersione sono riportate in figura 2.2: *corrente di dispersione verso terra*; *corrente di contatto*; *corrente di dispersione nel paziente*.

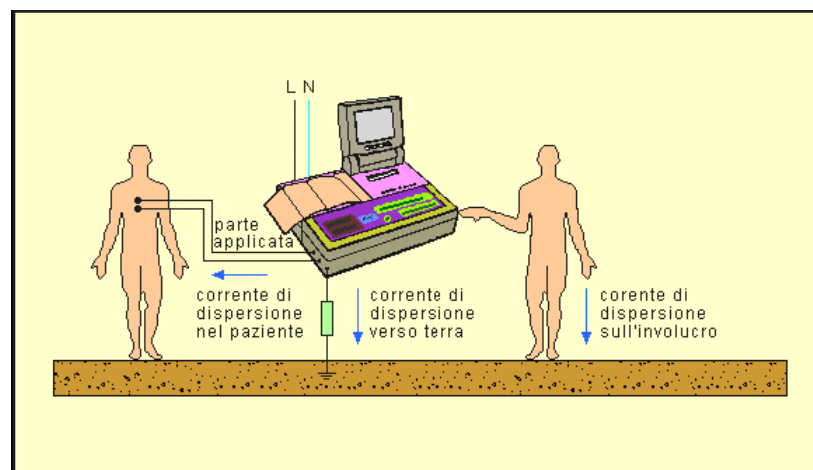


Figura 2.2: le correnti di dispersione di un elettromedicale

La *corrente di dispersione verso terra* è quella che dalla parte dell'apparecchio collegata alla rete elettrica, attraverso o lungo l'isolamento, percorre il conduttore di protezione verso l'impianto di terra. La *corrente di dispersione di contatto* è la corrente che percorre l'involucro di un apparecchio in uso normale (escluse le parti applicate) accessibile al paziente o all'operatore, che può attraversare il soggetto in collegamento tra l'involucro e la terra o con due punti dell'involucro. Quando l'apparecchio possiede parti applicate si deve parlare anche di *corrente di dispersione nel paziente*, intesa come la corrente che, dalla parte applicata, quando l'apparecchio è in funzione, può fluire nel soggetto verso terra.

Le *correnti di dispersione* presenti nelle normali condizioni d'uso possono aumentare in presenza di

anomalie nel circuito. Si parla in tal caso di *correnti di dispersione di primo guasto*. In funzione delle correnti di dispersione in condizioni normali e di primo guasto verso terra, sull'involucro e sul paziente, gli apparecchi elettromedicali vengono classificati in apparecchi di tipo B, BF, CF.

Gli apparecchi di tipo BF e CF, per limitare la corrente che può fluire nel paziente, hanno le parti a contatto isolate da terra (flottanti) mediante disaccoppiamento (ad esempio mediante disaccoppiamento ottico) ad elevata impedenza capacitiva.

L'isolamento è ulteriormente aumentato, nelle parti applicate di tipo CF (correnti di dispersione nel paziente non superiori a 10 microampere) che sono pertanto applicabili direttamente sul cuore.

2.1.2 Norme tecniche specifiche per gli ultrasuoni in fisioterapia

2.1.2.1 La norma CEI EN 60601-2-5

La Norma CEI EN 60601-2-5, seconda edizione, 2001 “*Apparecchi Elettromedicali; Parte 2: Norme particolari per la sicurezza delle apparecchiature per la terapia ad ultrasuoni*” (nel titolo in inglese si specifica “*ultrasonic physiotherapy*”) fornisce le prescrizioni e le specifiche relative alle prove rilevanti per la sicurezza delle apparecchiature per gli US usati in fisioterapia.

Tale standard fornisce una serie di **definizioni** importanti quali: “*apparecchiatura di fisioterapia ad US*”: apparecchio per la generazione e l'applicazione di US ad un paziente a scopo terapeutico; “*trasduttore ultrasonico*”: dispositivo in grado di convertire energia elettrica in energia meccanica all'interno dell'intervallo delle frequenze ultrasoniche; “*frequenza acustica di lavoro*”: frequenza di un segnale acustico basato sull'osservazione dell'uscita di un idrofono posto in un campo acustico; “*potenza nominale di uscita*”: massima potenza di uscita dell'apparecchio alla tensione nominale di rete; “*area effettiva radiante*”: area della sezione trasversale del fascio estrapolata alla superficie frontale della testa di trattamento e moltiplicata per un fattore dimensionale in conformità alla Norma IEC 61689; “*rapporto della non uniformità del fascio*”: rapporto tra il quadrato del valore efficace della pressione acustica massima e la media spaziale del quadrato del valore efficace della pressione acustica, dove la media spaziale è presa sull'area radiante effettiva, determinata in accordo alla Norma CEI EN 61689; “*intensità effettiva*”: rapporto tra la potenza d'uscita e l'area radiante effettiva; “*potenza di uscita*”: media nel tempo della potenza ad US irradiata dalla testa di trattamento di un apparecchio in un campo approssimativamente libero in condizioni specificate, in acqua; “*intensità temporale massima*”: nel caso di una forma d'onda modulata in ampiezza, è il rapporto tra la potenza d'uscita temporale massima e l'area radiante effettiva. Le procedure di prova

per il calcolo di questi parametri ed i limiti di accettabilità dei valori misurati sono contenuti nella Norma CEI EN 61689 del 2009.

La norma stabilisce che l'apparecchiatura ad US debba presentare **una serie di contrassegni** al suo esterno o su parti dello stesso che consentano di identificarlo con chiarezza; in particolare il generatore dell'apparecchio deve essere provvisto dei seguenti dati: frequenza acustica di lavoro in MHz; forme d'onda (continue, modulate in ampiezza o ad impulsi); se l'ampiezza è modulata (o ad impulsi), una descrizione delle forme d'onda d'uscita insieme ai valori di durata degli impulsi, del periodo di ripetizione degli impulsi e del fattore di rendimento per ciascuna modulazione impostabile. Il generatore deve riportare una targhetta permanentemente attaccata all'apparecchio sulla quale sia riportato il numero di serie, così da identificare univocamente l'apparecchio; la testa di trattamento deve essere contrassegnata con la sua potenza d'uscita nominale in Watt, con la sua area radiante effettiva in cm^2 , con il rapporto di non uniformità del fascio, con il tipo del fascio, con la designazione dello specifico generatore dell'apparecchio al quale la testa di trattamento va collegata e con un numero di serie unico.

Inoltre, in accordo con la norma, l'apparecchio deve includere **istruzioni d'uso** che devono contenere: 1) frequenza acustica di lavoro o frequenze in kHz o MHz e area di radiazione effettiva in cm^2 ; 2) una raccomandazione che richiami l'attenzione dell'operatore sulla necessità di una manutenzione periodica, ed in particolare: intervalli di tempo per l'esame periodico e la calibrazione ad opera dell'utilizzatore; esame della testa di trattamento per rilevare crepe che potrebbero consentire l'ingresso di liquido conduttore, esame dei cavi e dei connettori della testa di trattamento; 3) un'avvertenza sulle procedure necessarie per l'utilizzazione in condizioni sicure; 4) un'avvertenza per l'operatore di maneggiare con cura la testa di trattamento perchè una manipolazione non attenta può influenzare negativamente le sue caratteristiche; 5) un elenco di condizioni per cui è controindicato il trattamento con US; 6) una dichiarazione della destinazione d'uso.

La norma fornisce indicazioni per la compatibilità elettromagnetica e stabilisce che la temperatura della faccia anteriore del trasduttore non deve superare i $41\text{ }^{\circ}\text{C}$ quando opera sott'acqua. Un'importante indicazione contenuta nella norma consiste nel **fissare che l'intensità effettiva massima degli US non deve superare i 3 W/cm^2** , determinati tenendo conto di considerazioni della pratica clinica e di sicurezza. La norma stabilisce che la conformità deve essere verificata con misure di area radiante effettiva e misure di potenza d'uscita nominale in accordo al paragrafo 8 della Norma CEI EN 61689-2009.

Viene stabilito anche che, al fine di garantire precisione nei dati di funzionamento e protezione da errori di erogazione, il sistema deve essere provvisto di indicatori quantitativi sul pannello di

controllo che devono mostrare: a) la potenza di uscita e l'effettiva intensità nel caso di modo di funzionamento ad onda continua, e b) l'intensità di picco temporale massima e la potenza d'uscita temporale massima nel modo di funzionamento con forma d'onda modulata in ampiezza. La conformità deve essere verificata con misure in accordo al paragrafo 8 della Norma CEI EN 61689. Ogni indicazione di potenza non deve differire dal valore reale più del $\pm 20\%$ del valore reale.

Al fine di garantire l'omogeneità del campo radiante, **il rapporto della non uniformità del fascio BNR non deve superare il valore di 8,0 per ogni testa di trattamento** e per assicurare la stabilità dell'uscita nel tempo, la potenza di uscita deve rimanere costante entro il $\pm 20\%$ del suo valore iniziale durante un'ora di funzionamento continuo alla massima potenza d'uscita e alla tensione nominale di rete in acqua a $22\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

Infine la norma stabilisce che nei documenti di accompagnamento possano essere specificati: (i) l'area radiante, (ii) la potenza d'uscita nominale, (iii) la frequenza acustica di lavoro, (iv) il rapporto di non uniformità del fascio, (v) la durata degli impulsi, (vi) il periodo di ripetizione degli impulsi, (vii) l'indicazione quantitativa della potenza d'uscita, (viii) l'indicazione quantitativa dell'intensità effettiva.

2.1.2.2 La norma CEI EN 61689

La norma CEI EN 61689-2009- *Ultrasuoni- Sistemi per fisioterapia-specifiche di campo e metodo di misura nel campo delle frequenze comprese tra 0,5 MHz e 5 MHz*, definisce i parametri utili per la valutazione delle *performances* di un apparato per fisioterapia emittente US, indicando le modalità di effettuazione delle misurazioni a garanzia del rispetto dei requisiti di sicurezza previsti dalle norme precedentemente trattate.

Al fine della valutazione delle caratteristiche di *output* di un apparato emittente US, la norma evidenzia la necessità di conoscere un certo numero di quantità fisiche che caratterizzano la funzionalità dello stesso: la frequenza di trattamento; il *pulse timing*; l'area effettiva radiante (*ERA*); l'intensità effettiva; il *beam non uniformity ratio (BNR)*; la potenza acustica. Molte di queste quantità sono facilmente misurabili, ad esempio, la frequenza di trattamento può essere determinata utilizzando un oscilloscopio mentre l'*ERA* e il *BNR* necessitano di misure particolari, da effettuare con l'ausilio di un idrofono.

L'*area effettiva radiante (ERA)* è un parametro che definisce l'area prossima alla faccia del trasduttore sulla quale è distribuita la maggior parte della potenza ultrasonora emessa.

Nel 1981 la *World Health Organization*, a seguito di studi sugli effetti degli US su animali, ha stabilito che effetti benefici associati con la terapia ultrasonora possono essere raggiunti utilizzando

un'intensità (potenza radiante per unità di area) non superiore a 3 W/cm^2 . Al fine di proteggere il paziente dal pericolo di insorgenza di effetti avversi sulla salute, i 3 W/cm^2 sono stati pertanto adottati negli standard di sicurezza internazionali come limite massimo dell'intensità effettiva per gli apparati ad US ad uso terapeutico. Ora poiché è troppo complesso definire direttamente questo "parametro chiave" per la sicurezza con un certo grado di accuratezza, si è ritenuto di dover derivare l'intensità effettiva applicata al paziente dal quoziente tra la massima potenza ultrasonora (misurata in Watt) e un'area, nota appunto come area effettiva radiante (ERA, in cm^2), entro la quale è distribuita la maggior parte della potenza ultrasonora. La misura di quest'ultimo parametro, effettuata valutando direttamente, attraverso un idrofono, la pressione acustica nel campo ultrasonoro emesso da una testa emittente, consente quindi di determinare indirettamente l'intensità efficace in termini di intensità media spaziale emessa dal dispositivo, come energia che attraversa l'unità di area nell'unità di tempo (W/cm^2). A tal fine, ai sensi della norma CEI EN 61689-2009, deve essere eseguito uno scan per la misura della pressione ultrasonora emessa dalla testa emittente su una griglia in un piano perpendicolare all'asse del trasduttore alla distanza di 0,3 cm dalla faccia del trasduttore stesso, con la distribuzione di pressione determinata a partire dal campionamento del voltaggio rms (o picco-picco) ai capi dell'idrofono a passi di qualche mm, nota la sensibilità dell'idrofono alla frequenza in esame.

Va sottolineato che l'ERA di un diffusore ad US non è uguale all'area della faccia anteriore della testa emittente, né all'area del disco di materiale piezoelettrico che genera gli US stessi. Infatti, poiché l'elemento piezoelettrico non vibra uniformemente, l'ERA spesso è più piccolo dell'area geometrica della testa di trattamento. Un esempio che riporta la differenza tra area geometrica del trasduttore A e area effettiva radiante ERA è riportato in figura 2.3.

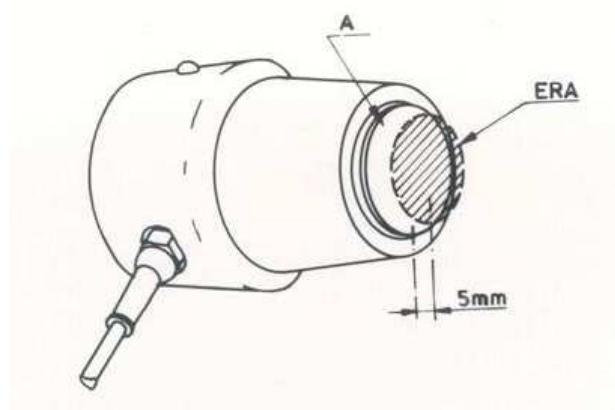


Figura 2.3: area geometrica A e area effettiva radiante ERA per una testa di trattamento ad US

Il parametro *Beam Non Uniformity Ratio (BNR)* definisce il rapporto tra la *spatial-maximum intensity* e la *spatial-average intensity*, cioè tra l'intensità di picco massimo nel campo acustico e l'intensità media spaziale. Tale rapporto può essere usato per determinare il punto di massima intensità nel fascio ultrasonoro, in corrispondenza di una data intensità media spaziale. Più alto è il valore di *BNR*, peggiore è il pattern di uscita che il dispositivo determina, con possibile creazione di *hot spot* e quindi disomogeneità.

Idealmente il fascio ultrasonoro dovrebbe avere una sezione trasversale uniforme: in realtà, basta osservare il pattern di uscita di generici trasduttori circolari (Fyfe (1986), figura 2.4, area 5 cm² operanti alle frequenze di 1,5 MHz e 3 MHz), ottenuto effettuando uno scan con un idrofono alla distanza di 1 cm dalla faccia del trasduttore, in un piano normale al fascio, per osservare che il campo ultrasonoro prodotto da tali dispositivi è molto disomogeneo e non uniforme.

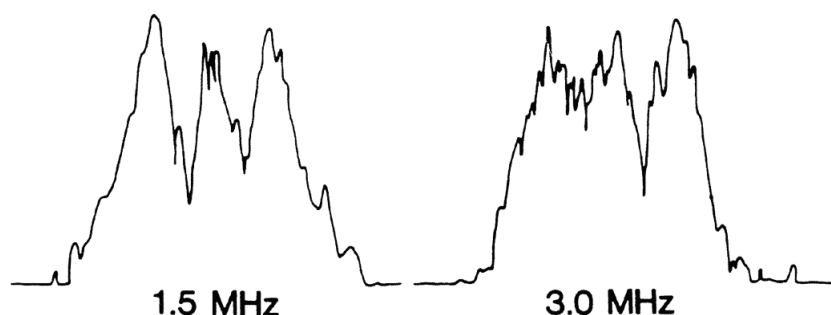


Figura 2.4: pattern di uscita di generici trasduttori circolari di area 5 cm² operanti alle frequenze di 1,5 MHz e 3 MHz ottenuto facendo uno scan con un idrofono alla distanza di 1 cm dalla faccia del trasduttore, in un piano parallelo alla faccia del trasduttore.

La figura 2.5 in particolare mostra le variazioni spaziali dei profili del fascio emesso da generici trasduttori ad US, costruite riportando gli scan della pressione ultrasonora effettuati in un piano normale al fascio in corrispondenza del punto di massimo assiale z_N (Ferrari, 2010).

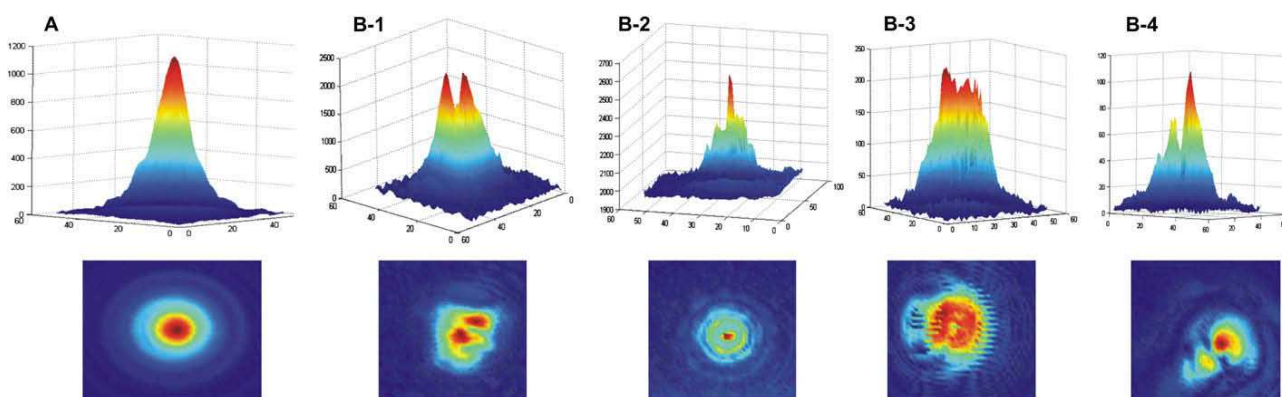


Figura 2.5: immagini del fascio acustico di generici apparecchi ad US, rilevate in corrispondenza del piano relativo all'ultimo di massimo della pressione z_N ; (a) evidenzia una forma geometrica regolare a cono; (b) evidenziano forme geometriche irregolari che indicano fasci non centrati.

La maggior parte delle figure evidenzia distribuzioni non uniformi del fascio che, in alcuni casi appare non centrato, con varie biforcazioni, che generano una distribuzione di energia disomogenea. Tali disomogeneità derivano sia dalle caratteristiche costruttive degli apparecchi, sia dalle condizioni operative di funzionamento dei sistemi, ma l'effetto finale può essere la produzione di un calore eccessivo in piccole regioni del tessuto trattato, con potenziali effetti dannosi per la salute dei pazienti sottoposti al trattamento.

Tale risultato evidenzia la necessità di valutare il campo di pressione ultrasonora dei diffusori normalmente usati per la terapia ad US, poiché l'eventuale presenza di queste disuniformità nella distribuzione di pressione può essere considerata come un indicatore della bassa qualità del trasduttore stesso.

La norma IEC 150 (1995) stabiliva che, per una testa emittente che opera in onda continua, in condizioni ideali, il minimo valore di *BNR* era 4. Ciò vuol dire che, alcune regioni del fascio avranno un'intensità quattro volte superiore rispetto alla media spaziale attraverso il fascio. Valori di *BNR* da 3 a 7 identificano diffusori operanti in condizioni accettabili. Valori di *BNR* superiori a 8 individuano diffusori non sicuri e di scarsa qualità. Per esempio, poiché il *BNR* è il rapporto tra l'intensità di picco massimo nel campo acustico e l'intensità media spaziale, un diffusore operante ad un'intensità media effettiva di 3 W/cm^2 e con un *BNR* pari a 8, può produrre picchi di intensità spaziale di $3 \times 8 = 24 \text{ W/cm}^2$, che aumenta notevolmente la possibilità di rischio per il paziente.

Dalla letteratura si evidenzia che, controlli effettuati su alcuni dispositivi hanno fornito valori del *BNR* fino a 14 (Hekkenberg, 1994). La norma CEI EN 61689 riporta l'istogramma dei valori di *BNR* (figura 2.6) per 37 teste di trattamento di vari diametri e frequenze, mostrando che normalmente *BNR* appare essere compreso nel range 3-7, mentre non viene considerato qualitativamente accettabile un *BNR* superiore a 8.

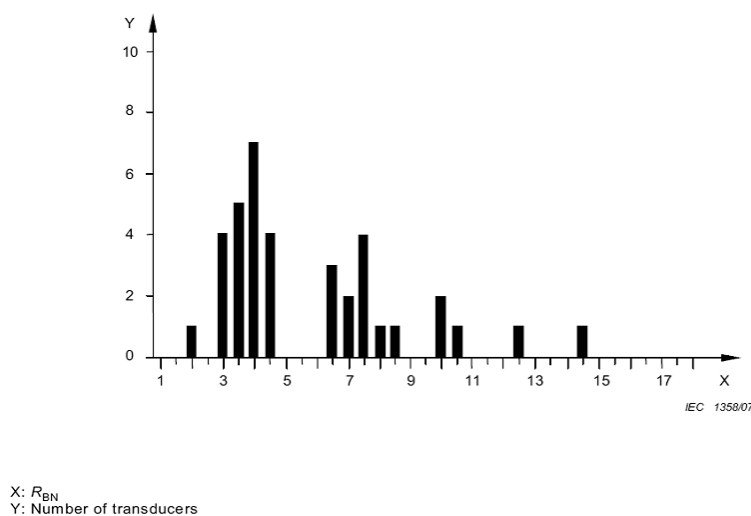


Figura 2.6: norma CEI EN 61689-2009, istogramma dei valori di *BNR*

Ai sensi della norma CEI EN 61689-2009, il parametro *BNR* si ottiene analizzando i dati della pressione ultrasonora su due piani ortogonali all'asse di propagazione del fascio, il piano a 0,3 cm dal trasduttore e il piano in corrispondenza dell'ultimo massimo assiale.

La figura 2.7 mostra l'andamento teorico spaziale del campo ultrasonoro generato da un generico trasduttore circolare in funzione della distanza dalla sua superficie emittente (Preston, 1991).

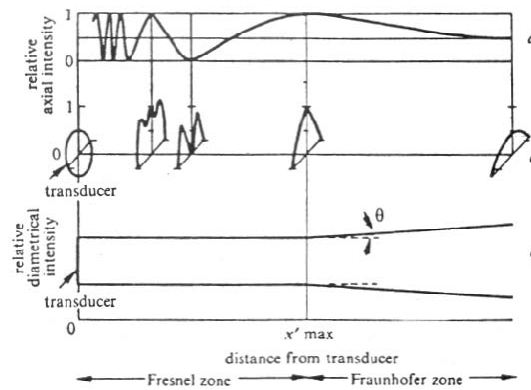


Figura 2.7: andamento spaziale del campo ultrasonoro generato da un generico trasduttore circolare

Per una sorgente a disco ed un'eccitazione sinusoidale, la distribuzione del campo emesso è piuttosto complessa e caratterizzata dalla presenza di due zone: la zona cosiddetta di *campo vicino* o *zona di Fresnel*, e la zona cosiddetta di *campo lontano* o *zona di Fraunhofer*.

Nella *zona di Fresnel*, in cui il punto di osservazione è prossimo alla superficie del trasduttore, il fascio è collimato cioè la dimensione globale del fascio rimane relativamente costante, anche se al suo interno la distribuzione dell'intensità assiale presenta variazioni molto complesse, con un certo numero di massimi, la cui distanza diminuisce avvicinandosi alla sorgente e che si trovano in corrispondenza di:

$$z_{max} = \frac{4a^2 - \lambda^2(2m+1)^2}{4\lambda(2m+1)} \quad (2.1)$$

con m numero intero che cresce verso la sorgente e a raggio del trasduttore.

Questa zona è seguita da una zona detta di *campo lontano*, dove il fascio diverge e si registra un andamento dell'intensità inversamente proporzionale alla distanza. La figura 2.7 illustra il passaggio dalla regione di campo vicino a quella di campo lontano.

La distribuzione di campo lungo l'asse di un trasduttore è tale che è possibile riscontrare un picco di intensità ad una distanza dalla superficie emittente data da:

$$Z_N = \frac{4a_1^2 - \lambda^2}{4\lambda} \quad (2.2)$$

L'esistenza e la determinazione sperimentale della posizione di quello che viene comunemente definito come *l'ultimo massimo assiale* z_N , è un fattore importante che caratterizza sia i campi ultrasonori che l'interpretazione di alcuni dati biologici riguardanti l'esposizione ad US. L'intensità ultrasonica in corrispondenza di questo picco lungo l'asse del campo è indicato come il *picco di intensità spaziale del campo*.

Inoltre la norma stabilisce: la misura della pressione prodotta dal trasduttore lungo il suo asse principale; la misura dettagliata attraverso un raster scan della pressione ultrasonora in tutti i punti dei piani ortogonali all'asse principale di propagazione del fascio, posti alle distanze di 0,3 cm e alla distanza a cui è collocato z_N ; il calcolo della pressione quadratica media totale $pmst$; il calcolo della *beam cross sectional area* A_{BCS} ; la determinazione dell'area effettiva radiante *ERA* ottenuta tenendo conto di A_{BCS} ; il calcolo del *beam non uniformity ratio (BNR)*.

In particolare, la norma 61689-2009 stabilisce che un parametro importante e intermedio nella definizione di *ERA*, è la *beam cross sectional area* ($A_{BCS} \text{ cm}^2$); tale parametro, definito come la minima area che contiene il 75% della somma di tutti i valori quadratici dei voltaggi determinati effettuando uno scan su un piano parallelo alla faccia del trasduttore alla distanza di 0,3 cm dalla faccia dello stesso, è determinabile attraverso un'analisi dei dati acquisiti.

Dalla determinazione di A_{BCS} è possibile ricavare il parametro *ERA* tramite la:

$$ERA = F_{ac} A_{BCS}(0,3) = 1,354 A_{BCS}(0,3) \quad (2.3)$$

in cui $A_{BCS}(0,3)$ si riferisce alla *beam cross sectional area* determinata a 0,3 cm dalla faccia del trasduttore, estrapolate indietro alla faccia del manipolo ($A_{BCS}(0)$) che contiene il 100% della pressione acustica totale, tramite il fattore adimensionale F_{ac} collegato alla divergenza del fascio; per un fascio collimato il fattore F_{ac} è pari a 1,354.

La misura della *beam cross sectional area* A_{BCS} viene operativamente eseguita effettuando uno scan di misura della pressione acustica con idrofono in un piano perpendicolare all'asse di propagazione del fascio e parallelo alla faccia della testa emittente, alla distanza di 0,3 cm dalla stessa, contenente una griglia di almeno 31x31 punti, e valutando la pressione quadratica media totale $pmst$:

$$pmst = \sum_{i=1}^N p_i^2 = 1/M_i^2 \sum_{i=1}^N U_i^2 \quad (2.4)$$

con N numero di punti dello scan della superficie; U voltaggio (di picco o r.m.s.) misurato ai capi dell'idrofono in ciascun punto del raster scan; p pressione in ciascun punto (i) dello scan del piano; M sensibilità dell'idrofono.

A_{BCS} è definito come la minima area in un piano perpendicolare all'asse di allineamento del fascio, che contiene il 75% del valore quadratico medio della potenza acustica totale $pmst$. I valori di U così determinati devono pertanto soddisfare la seguente relazione:

$$1/M_i^2 \sum_{i=1}^N U_i^2 \leq 0.75 pmst < 1/M_i^2 \sum_{i=1}^{N+1} U_i^2 \quad (2.5)$$

cioè devono contenere il 75% dell'integrale spaziale della pressione acustica quadratica media.

Il valore di A_{BCS} è dunque dato da:

$$A_{BCS} = n s^2 \quad (2.6)$$

dove s è la distanza tra punti successivi dello scan e n è derivato dalla (2.5), considerando tutti i punti che contengono il 75% del valore quadratico medio della potenza acustica totale $pmst$.

In finale, l'espressione per il parametro ERA può essere scritta secondo la relazione:

$$ERA = F_{ac} A_{BCS}(0,3) = F_{ac} n s^2 \quad (2.7)$$

Per quanto riguarda il parametro *Beam Non Uniformity Ratio BNR*, esso rappresenta il rapporto tra l'intensità di picco massimo nel campo acustico e l'intensità media spaziale nel fascio. BNR, in accordo con la norma CEI EN 61689-2009, è pari al rapporto tra il quadrato della massima pressione acustica rms (p_{max}) rilevato nell'intero campo acustico e la media spaziale del quadrato della pressione acustica rms , ove la media spaziale è presa sull'area ERA .

Ai sensi della suddetta norma, il parametro BNR è definito come:

$$BNR = \frac{p_{max}^2 ERA}{pmst s^2} \quad (2.8)$$

dove s è lo step con cui viene effettuato il raster scan e $pmst$ è la pressione acustica quadratica media totale. In particolare $pmst$ è riportato nella (2.4), mentre P_{max} è ricavato dai dati sperimentali e corrisponde al voltaggio massimo rilevato nel campo di misura.

Il prodotto $\overline{pmst s^2}$ è calcolato mediando sull'area del raster scan, i valori di pressione quadratici rilevati nel piano a 0,3 cm dalla faccia del trasduttore e nel piano che corrisponde all'ultimo massimo assiale z_N secondo l'equazione

$$\overline{pmst\ s^2} = \frac{1}{2} \left\{ [pmst_i(0,3)s^2(0,3)] + [pmst(z_N)s^2(z_N)] \right\} \quad (2.9)$$

In finale, il parametro *BNR* può essere scritto come:

$$BNR = 2 \frac{U_{max}^2\ ERA}{\left[\sum_1^N i U_i^2(0,3)s^2(0,3) \right] + \left[\sum_1^N i U_i^2(z_N)s^2(z_N) \right]} \quad (2.10)$$

2.1.2.3 Altre norme: la norma CEI EN 61161

Come abbiamo visto, i dispositivi emittenti US per scopi terapeutici (apparecchi elettromedicali) sono corredati di schede tecniche contenenti i valori nominali di riferimento dei parametri *BNR*, *ERA* e della *potenza acustica di uscita*; è possibile pertanto valutare le performances degli apparati ad US testando la stabilità dei parametri forniti dal costruttore nel tempo, disponendo della adeguata catena di misura.

Per quanto riguarda la *potenza acustica di uscita* della testa emittente, essa definisce l'energia vibrazionale al secondo trasmessa dalla faccia del dispositivo. E' definita come il rateo con cui l'energia è emessa dal trasduttore ed è misurata in Watt (Joule/sec). La potenza ultrasonora è una variabile molto importante poiché, assieme al tempo di esposizione, determina la quantità di energia trasferita al tessuto e quindi l'energia applicata al paziente.

La norma CEI EN 61161 (2007) *Ultrasuoni - Misure di potenza - Bilanci della forza di radiazione e requisiti di prestazione*, specifica un metodo per determinare la potenza acustica totale emessa da trasduttori ad US, basandosi sull'utilizzo della bilancia a forza di radiazione.

L'onda ultrasonora esercita una forza, nota come "forza di radiazione", su una qualsiasi superficie incidente e tale forza è direttamente proporzionale alla potenza totale nel fascio. I dispositivi per misurare tale forza sono le *bilance a forza di radiazione* che misurano la potenza media di un fascio ultrasonoro, misurando la forza esercitata dal fascio stesso su un bersaglio all'interno della bilancia (Perkins, 1989).

Quando un oggetto solido è inserito nel percorso di un'onda ultrasonora piana, viene trasferito un momento dal fascio all'oggetto, ed esso sperimenta una forza lungo la direzione di propagazione, la forza di radiazione. Se l'oggetto solido, o target, è più grande del fascio, la forza è proporzionale alla potenza acustica totale. Con la bilancia a forza di radiazione si dispone il trasduttore a piccole distanze da un bersaglio, tipicamente un disco di materiale fonoassorbente, collegato all'organo di carico di una bilancia, che intercetta la radiazione ultrasonora emessa da una sorgente, il tutto

immerso in una vasca di plexiglass. Si effettua una misura di forza di radiazione, ossia della variazione apparente della massa del bersaglio, che si determina tra il settaggio in cui il fascio ultrasonoro non è attivato e il setting che corrisponde invece all'attivazione della radiazione ultrasonora, da cui si ricava la potenza con la semplice relazione

$$P = c F = c g \Delta m \quad (2.11)$$

dove c è la velocità del suono nel fluido di propagazione (1482,36 m/s dipendente dalla temperatura), F la forza di radiazione sul target nella direzione di propagazione dell'onda incidente, g accelerazione di gravità, Δm è l'apparente variazione della massa bersaglio.

Pye (1996) suggerisce di effettuare una calibrazione annuale con il metodo della bilancia a forza di radiazione, riferibile al *National Physical Laboratory* (NPL). Le linee guida (IPSM, 1988) raccomandavano addirittura una calibrazione completa ogni 3 mesi.

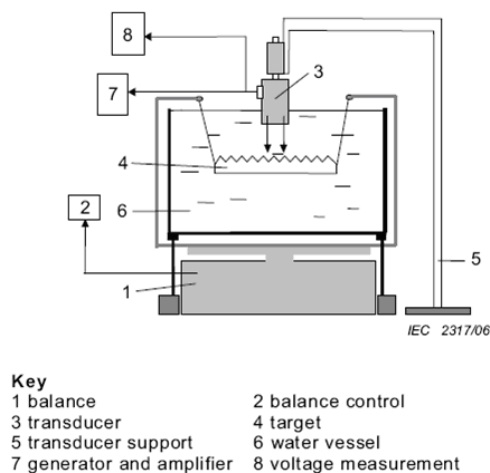


Figura 2.8: bilancia a forza di radiazione

2.1.3 Normativa sugli ultrasuoni in estetica

Come abbiamo visto precedentemente, gli US sono utilizzati sia in *estetica medica* che in *estetica non medica*. Per entrambi i settori va evidenziata l'assenza di norme tecniche specifiche, volte a dare indicazioni sulle definizioni delle quantità fisiche utili per determinare le caratteristiche di *output* dei sistemi, sui valori massimi di tali grandezze e sulle modalità di effettuazione delle misure, in analogia con le norme precedentemente trattate per la fisioterapia, ossia CEI EN 60601-2-5 e CEI EN 61689.

In teoria, per alcune tipologie di strumenti utilizzati in estetica, le quantità fisiche che descrivono l'energia emessa dai manipoli sono le stesse degli apparati per fisioterapia; di conseguenza, potrebbero essere considerati come parametri fisicamente utili per definirne le caratteristiche emissive, gli stessi ERA e BNR precedentemente definiti per gli apparati ad US per fisioterapia. In realtà però, tutte le norme riportate nei paragrafi precedenti, fanno specifico riferimento nel titolo stesso o nel corpo del testo, al termine “*physiotherapy*”, che riporta di fatto le suddette norme alle sole applicazioni fisioterapiche, escludendo la strumentazione per estetica.

Di seguito vengono quindi trattate per *l'estetica medica e non medica* e le normative generali a cui devono attenersi tali dispositivi.

2.1.3.1 Normativa per l'estetica non-medica

Ai fini della commercializzazione nell'Unione Europea, le norme a cui sono soggette le apparecchiature usate nell'*estetica non medica*, sono quelle relative alla conformità CE con riferimento a Direttive, differenti rispetto a quelle dei dispositivi medici, tra cui la Direttiva “bassa tensione” (2006/95/CE) detta BT, e la Direttiva Compatibilità elettromagnetica (2004/108/CE) detta EMC e relativa normativa nazionale.

L'obiettivo principale della legislazione sulla compatibilità elettromagnetica è quello di assicurare che le apparecchiature elettriche ed elettroniche non creino eccessivi disturbi elettromagnetici e che il loro funzionamento non sia influenzato da altre sorgenti di disturbo.

La normativa della EMC è complementare alla disciplina della direttiva Bassa Tensione, quest'ultima relativa alle garanzie di sicurezza che deve possedere il materiale elettrico destinato ad essere utilizzato entro dati limiti di tensione e secondo precise classi di infiammabilità.

La marchiatura CE sui dispositivi utilizzati nell'estetica non medica attesta pertanto la rispondenza del prodotto alle Direttive BT e ECM: le attrezzature che non soddisfano i requisiti previsti dalle suddette Direttive non possono essere commercializzate, importate e messe in servizio nella UE.

2.1.3.1.1 La norma tecnica CEI 62-39

La Norma CEI 62-39 *Apparecchi elettrici per uso estetico, Guida generale per la sicurezza*, non fa alcun riferimento agli US, ma specifica in generale le prescrizioni per la sicurezza degli apparecchi elettrici per uso estetico, ossia uso corretto dei macchinari, avvertenze, precauzioni da adottare, uso improprio, manutenzione, spiegazione dei simboli normativi.

Il normale utilizzo degli apparecchi per uso estetico, da parte di un operatore estetico, prevede una o più *parti applicate* al soggetto da trattare, che entrano in contatto fisico o elettrico con soggetto trattato e/o trasferiscono energia verso o dal soggetto trattato. La norma fornisce pertanto la definizione di *parte applicata*, ossia il complesso di tutte le parti dell'apparecchio, compresi i conduttori collegati al soggetto trattato, che vengono intenzionalmente messe in contatto con il soggetto trattato. Per alcuni tipi di apparecchi, *parti applicate* possono essere considerate le parti in contatto con l'operatore estetico. In particolare, *parte applicata isolata tipo F (flottante)* viene definita come parte applicata isolata da tutte le altre parti dell'apparecchio in modo tale che la corrente di dispersione nel soggetto trattato, ammissibile in condizione di primo guasto, non venga superata, quando tra la parte applicata e la terra si applica una tensione pari a 1,1 volte la più elevata tra le tensioni nominali di rete.

In particolare, la norma stabilisce l'elenco dei dati di targa (figura 2.9), che devono essere riportati nella targhetta identificativa posta all'esterno dell'apparecchio. Tra questi vi è *l'origine* dell'apparecchio, ovvero il produttore, *il modello* dell'apparecchio, la *frequenza* di rete espressa in hertz (simbolo Hz), la *potenza assorbita* e la *potenza d'uscita*, espressa in watt o volt-ampere (simboli rispettivamente W e VA), la *classe di isolamento elettrico*, di tipo I o di tipo II.

Tab. II Dati di targa ed altre indicazioni all'esterno dell'apparecchio

Prescrizioni specificate in	Oggetto	Apparecchi alimentati dalla rete (vedi 6.1 a)	Apparecchi con sorgente elettrica interna (vedi 6.1 b)	Apparecchi alimentati da alimentatore specificato (vedi 6.1 c)
6.1 e)	Origine	x	x	x
6.1 f)	Riferimento di modello o di tipo	x	x	x
6.1 g)	Connessione alla rete	x ⁽²⁾	—	—
6.1 h)	Frequenza di rete (in Hz)	x ⁽²⁾	—	—
6.1 j)	Potenza assorbita	x ⁽²⁾	—	—
6.1 k)	Potenza d'uscita	x ⁽¹⁾	—	—
6.1 l)	Classificazione	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
6.1 m)	Modalità d'impiego	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
6.1 n)	Fusibili	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
6.1 p)	Caratteristiche di uscita	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
6.1 q)	Effetti fisiologici	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
6.1 r)	A disposizione	—	—	—
6.1 s)	Dispositivi di collegamento di alta tensione	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
6.1 t)	Modalità di raffreddamento	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
6.1 u)	Stabilità meccanica	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
6.1 v)	Imballaggio di protezione	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
6.1 y)	Terminali di terra	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾
6.1 z)	Mezzi di protezione amovibili	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾	x ⁽¹⁾

x Dati di targa richiesti.
(1) Se del caso
(2) Non per gli apparecchi installati permanentemente se marcati all'interno. Vedi anche 6.2 a).

Figura 2.9: dati di targa di un apparecchio ad uso estetico (da norma CEI 62-39)

La norma stabilisce che l'apparecchio deve essere accompagnato da una documentazione, contenente almeno le istruzioni d'uso, una descrizione tecnica ed un indirizzo a cui l'operatore estetico possa fare riferimento. Deve contenere la descrizione delle modalità di uso corretto e le avvertenze sulla sicurezza dei dispositivi, le precauzioni da adottare, uso improprio, eventuale

manutenzione prevista. La documentazione annessa deve essere considerata come parte integrante dell'apparecchio.

Importante è anche nella Norma, la presenza dei cosiddetti *simboli normativi* ovvero immagini che descrivono in maniera visiva e immediata alcune proprietà dell'apparecchio; un esempio è riportato in figura 2.10.

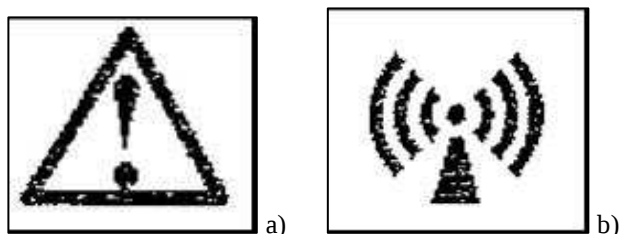


Figura 2.10: simboli normativi utilizzati per apparecchi ad US

Il simbolo della figura 2.10 a) rimanda ad una attenta lettura del manuale d'uso; il simbolo della figura 2.10 b) caratterizza tutti gli apparecchi che erogano forme di energia radianti non ionizzanti come US, radiofrequenze, campi magnetici, ecc

2.1.3.1.2 La legge 1/90 e il decreto n. 110 del 2011

Il quadro normativo di riferimento per l'*estetica non medica* è la Legge 4 gennaio 1990, n. 1 che disciplina l'attività di estetista. In particolare, l'articolo 10 della legge forniva un elenco di apparecchiature che potevano essere utilizzate nei centri estetici e demandava ad un successivo provvedimento normativo la determinazione delle *".....caratteristiche tecnico-dinamiche ed i meccanismi di regolazione, nonché le modalità di esercizio e di applicazione e le cautele d'uso degli apparecchi elettromeccanici di cui all'elenco allegato alla presente legge."* Per più di venti anni tale decreto non è stato emanato e, durante questo periodo, nei centri estetici si sono diffuse apparecchiature di vario tipo non comprese nell'elenco della legge 1/90, incluse alcune apparecchiature utilizzando US, in particolare quelle per il rimodellamento corporeo, dichiaratamente basate sul fenomeno della cavitazione e la conseguente lisi degli adipociti.

Nel corso del 2011 è stato infine pubblicato il Decreto 12 maggio 2011, n. 110: *"Regolamento di attuazione dell'articolo 10, comma 1, della legge 4 gennaio 1990, n. 1, relativo agli apparecchi elettromeccanici utilizzati per l'attività di estetista"*, dopo un lungo iter di pareri e richieste di osservazioni e modifiche fra i quali il Consiglio Superiore di Sanità.

In 5 articoli e 2 allegati, il decreto del 2011 disciplina l'impiego degli apparecchi elettromeccanici, alimentati alla corrente di rete e/o a batteria, che possono essere utilizzati per l'attività di estetista;

in particolare, ai sensi di quanto previsto dalla legge 1/90, l'elenco degli apparecchi elettromeccanici ad uso estetico è stato aggiornato, tenuto conto dell'evoluzione tecnologica del settore, includendo nuove apparecchiature che non esistevano negli anni '90. Ad ogni apparecchio viene dedicata una scheda tecnica nella quale vengono indicati i requisiti e le norme tecniche da applicare in materia di sicurezza.

Dal decreto si evince che, nella categoria *Stimolatori ad ultrasuoni (scheda tecnico-informativa 2A)*, soltanto due tipi di apparecchiature emittenti US possono essere utilizzate dalle estetiste:

- 1) *Vibrazione meccanica peeling*
- 2) *Ultrasuoni per trattamenti superficiali*

Il primo tipo di apparecchiatura utilizza vibrazioni meccaniche per l'esfoliazione (*peeling*) e la pulizia della pelle, rimuovendo le cellule morte superficiali. La potenza massima degli US emessi non deve superare i 10 W totali e la loro frequenza deve essere compresa fra 22 e 28 kHz; il trattamento non deve essere effettuato su soggetti con pelle sensibile, o che abbiano effettuato il *peeling* anche con altre modalità, da meno di 30 giorni, oppure portatori di impianti acustici attivi e/o con problemi all'apparato uditivo.

Il trattamento deve interessare soltanto la pelle integra, vanno evitate le parti arrossate, escoriazioni e ferite. Prima di ogni trattamento bisogna procedere a sterilizzare e/o disinfettare tutte le parti a contatto e verificare che la lamina dell'applicatore sia liscia e il suo margine perfettamente arrotondato.

Il secondo tipo di apparecchiatura ad US ad alta frequenza, è utilizzato per trattamenti volti a dare maggiore tonicità all'epidermide, diminuire la lassità cutanea di modesta entità e ridurre le rughe superficiali; in tabella 2.1 sono riportate le intensità ammesse nei due intervalli di frequenza 0,8 – 1,2 MHz e 1,2 – 3,5 MHz.

Frequenza	Intensità (W/cm ²)
$0,8 \text{ MHz} \leq f \leq 1,2 \text{ MHz}$	1,5
$1,2 \text{ MHz} < f \leq 3,5 \text{ MHz}$	3

Tabella 2.1: range di frequenza e relativa intensità per gli apparecchi ad US nei trattamenti estetici previsti dal decreto n. 110 del 2011, riveduta e corretta per via di imprecisioni nella tabella riportata nel Decreto 110/2011

E' necessario ottenere un contatto perfetto fra applicatore e cute che si ottiene applicando il "gel conduttivo" nella zona da trattare. A tale riguardo non si devono trattare soggetti con pelle sensibile e/o con intolleranza a detti gel.

Poiché la scheda raccomanda di effettuare un ciclo di trattamenti graduando progressivamente il valore della densità di potenza e la durata dell'applicazione, è evidente che l'apparecchiatura deve essere provvista di un opportuno comando per variare la potenza emessa e di un temporizzatore per limitare l'esposizione al tempo prestabilito. L'apparecchiatura non va utilizzata su soggetti portatori di impianti acustici attivi e/o con problemi all'apparato uditivo.

E' sconsigliato il trattamento nei soggetti: con protesi articolari metalliche, portatori di pace-maker, in gravidanza, con processi flogistici in atto, affetti da neoplasie, che presentino lesioni cutanee o varici. E' altresì sconsigliato il trattamento in prossimità di: cartilagini, ossa, apparato riproduttivo e regione cardiaca.

Il Decreto stabilisce infine che le norme tecniche da applicare per questa tipologia di apparecchi, siano: la Norma CEI 62-39 - Anno 1998 - *Apparecchi elettrici per uso estetico. Guida generale per la sicurezza* e relative varianti; la Norma CEI EN 60601-2-5 - Anno 2001 - *Apparecchi elettromedicali - Parte 2: Norme particolari per la sicurezza delle apparecchiature per la terapia a ultrasuoni* e relative varianti, con il solo riferimento alla stessa ai fini delle caratteristiche costruttive e dei meccanismi di regolazione, in quanto la destinazione d'uso delle apparecchiature non è medica. Si noti che il rispetto di dette norme diviene obbligatorio essendo citate in un provvedimento normativo.

2.1.3.2 Normativa per l'estetica medica

Per questa tipologia di apparecchiature, trattandosi di dispositivi medici, sicuramente vale la norma CEI EN 60601-1 - *Apparecchi elettromedicali. - Parte 1: Prescrizioni generali relative alla sicurezza fondamentale e alle prestazioni essenziali*, 2007.

Va inoltre rilevata, l'assenza di norme tecniche specifiche per gli US.

2.2 Problematiche connesse con l'uso degli ultrasuoni in fisioterapia

2.2.1 Evidenze di efficacia e cautele d'uso

In fisioterapia, gli US sono usati principalmente in applicazioni che riguardano il rilasciamento dei muscoli contratti (Lehmann, 1961; Wessling, 1987), il trattamento dei tessuti cicatriziali con azione fibrolitica (da Cunha, 2001), la riparazione dei danni tissutali e la risoluzione dei processi infiammatori (Frieder 1988), la guarigione delle fratture (Busse, 2004; Dalecki, 2004), la rigenerazione di nervi periferici (Paik, 2002; Lazar, 2001; Mourad, 2001; Crisci 2002).

Il dibattito sull'efficacia terapeutica degli US è tuttavia ancora aperto; a tal proposito, mentre è ben nota l'efficacia degli US pulsati a bassa intensità per la riparazione delle fratture ossee (Robertson, 2008; ter Haar, 2007), al contrario esiste grande incertezza circa l'efficacia degli US in altre tipologie di trattamento: ad esempio, alcune rassegne relative ai trial clinici sul trattamento delle lesioni dei tessuti molli non mostrano evidenze che suggeriscano l'efficacia dei trattamenti con US (Speed, 2001). Secondo l'autore, nel trattamento ad US ci sono molte variabili tecniche che possono agire come fonti di errore, tra queste l'inadeguatezza della calibrazione per i macchinari, la progettazione degli studi clinici in termini, ad esempio, di spettro troppo ampio di patologie all'interno del gruppo in studio, inadeguatezza nella durata del follow-up, nella dimensione del campione, il dosaggio degli US, inappropriato e variabile nei differenti studi e per differenti trattamenti, ecc. In effetti, dalla letteratura, si evidenzia variabilità nelle modalità con cui vengono eseguite le terapie ad US; come sottolineato da ter Haar (2007), inizialmente l'utilizzo degli US era pensato come un metodo di trattamento diatermico alternativo ad altri metodi, quale l'utilizzo di radiazione elettromagnetica, per l'induzione di un moderato riscaldamento. Nel corso del tempo, i regimi di trattamento sono stati modificati nel tentativo di utilizzare meccanismi benefici non termici, utilizzando intensità inferiori e fasci di US pulsati. Tuttavia, a causa della carenza di studi clinici scientificamente progettati, il regime di trattamento ultrasonico è spesso determinato in modo empirico e secondo la "ricetta" particolare di ogni singola struttura. Fino a quando non sarà disponibile un maggior numero di studi scientifici rigorosi, il meccanismo con cui il beneficio terapeutico, se esiste, è ottenuto, resterà oggetto di speculazione e non sarà possibile ottimizzare i trattamenti sulla base della comprensione dei meccanismi di interazione. In un'indagine su studi clinici randomizzati relativi agli US in fisioterapia, non è stata determinata una relazione tra la "dose" e il risultato terapeutico, tuttavia è stato osservato che la maggioranza dei trattamenti efficaci utilizzavano US pulsati con intensità (mediate spazialmente e temporalmente) comprese tra 0,16 e 0,5 W/cm² (ter Haar, 2007).

Ai fini di una valutazione di efficacia dei trattamenti fisioterapici che utilizzano diversi tipi di energia, compresi gli US, il Ministero della Salute ha effettuato, nel 2011, un'analisi della letteratura scientifica internazionale, con lo scopo di vagliare le diverse applicazioni cliniche in relazione a specifiche patologie (Ministero della Salute, 2011). Le evidenze relative alle tecniche terapeutiche vengono riportate all'interno di una cosiddetta "*Piramide delle Evidenze*", sulla base della quale i lavori scientifici vengono classificati secondo uno schema che vede alla base gli studi preliminari (su modelli animali o *in vitro*), a seguire quelli che esprimono opinioni di esperti o pareri di commissioni di esperti, le citazioni di casi clinici, le serie di casi, gli studi caso-controllo,

gli studi di coorte e, all'apice, gli studi clinici randomizzati e le metanalisi (Ministero della Salute, 2011).

Nel lavoro, i livelli di evidenza clinica sono suddivisi in:

- Ia – revisioni sistematiche di studi clinici randomizzati;
- Ib – almeno uno studio clinico controllato e randomizzato;
- IIa – almeno uno studio clinico controllato non randomizzato;
- IIb – altri tipi di studi controllati di buona qualità;
- III – studi non controllati di buona qualità (serie di casi, studi di correlazione, studi descrittivi);
- IV – opinione di esperti.

La forza delle raccomandazioni è divisa in:

- A (basate su informazioni scientifiche di livello Ia o Ib);
- B (basate su informazioni scientifiche di livello IIa, IIb e III), C (basate unicamente su opinioni di esperti – Livello IV).

Per comprendere quali gradi di evidenza siano disponibili, in relazione a specifiche tecniche terapeutiche, occorre procedere all'analisi della letteratura; per i casi ove il livello di evidenza risultasse il più basso fra i tre previsti, è necessario continuare a monitorare la letteratura nel tempo, al fine di identificare eventuali nuovi studi che possano variare il livello di evidenza assegnato alle varie tecniche terapeutiche. Ove le evidenze siano ancora modeste, occorre procedere all'effettuazione di nuovi studi, metodologicamente robusti e con un numero di casi appropriato, al fine di consentire un giudizio sull'efficacia clinica delle singole tecniche terapeutiche in sé o di loro specifiche applicazioni (Ministero della Salute, 2011).

I risultati del lavoro, per quanto riguarda i livelli di evidenza scientifica per gli effetti clinici che coinvolgono l'applicazione di US, sono riportati in figura 2.11.

Effetti clinici	Livelli di evidenza scientifica
Patologie degenerative (dolore e limitazione funzionale nell'osteoartrosi)	A
Patologie acute dei tessuti molli	B
Lombalgia	C
Rotture tendinee parziali	B
Algie di spalla (tendinopatie calcifiche di spalla)	B
Sindrome del tunnel carpale	B
Lesioni muscolari	B
Ulcere da pressione	C
Ulcere venose delle gambe	B
Herpes zoster (nevralgia postherpetica)	B
Consolidamento osseo	A
Pseudoartrosi	A
Osteoporosi	B

Figura 2.11: effetti clinici per applicazione degli US in terapia e relativi livelli di evidenza scientifica (Ministero della Salute, 2011).

Essi mostrano ampia variabilità nell'evidenza di efficacia dei trattamenti che coinvolgono US con riferimento ad alcune patologie specifiche (Ministero della Salute, 2011).

Una serie di cautele d'uso e controindicazioni all'applicazione degli US in fisioterapia sono elencate in numerose pubblicazioni (NCRP, 1983; WHO, 1982; Lehmann, 1982; Dyson, 1985; Reid, 1981; Oakley, 1978; Ministero della Salute, 2011); alcune di queste sono basate su una conoscenza generale dei principi e della pratica della terapia ad US, altre derivano da estrapolazione dei risultati di specifici esperimenti scientifici o sono basate sulla esperienza clinica personale dei fisioterapisti.

La letteratura evidenzia che nessun paziente in stato di gravidanza o potenzialmente in gravidanza deve ricevere una terapia ad US in qualsiasi zona del corpo che sia suscettibile di poter provocare esposizione per il feto, poiché l'applicazione degli US può determinarne surriscaldamento (Lele, 1979); infatti il sistema nervoso fetale in via di sviluppo è profondamente suscettibile al calore e ai danni fisici o chimici. L'ipertermia ha dimostrato essere un effetto teratogeno in molte specie animali, compresi gli esseri umani; in particolare, il feto non riesce ad eliminare il calore indotto, a causa dell'imaturità dei suoi meccanismi di termoregolazione. Inoltre studi su animali hanno mostrato anomalie fetali e peso ridotto dei feti in femmine di topo gravide esposte ad US ad intensità terapeutica (Edwards, 1997; Barnett, 1990).

Gli organi sensoriali cioè l'occhio, l'orecchio e il tessuto nervoso, sono particolarmente sensibili agli US, in quanto sono scarsamente vascolarizzati, quindi vulnerabili al trasferimento di calore per conduzione. In particolare, il neuroepitelio dell'orecchio interno può con facilità essere danneggiato in modo irreparabile da dosi terapeutiche di onda ultrasonora continua, quindi termica (Barnett, 1980). Per lo stesso motivo, ogni regione corporea caratterizzata da ridotta circolazione del sangue non dovrebbe essere sottoposta a irradiazione ultrasonora.

Gli US non devono essere applicati al cervello, al midollo spinale o in prossimità di grandi nervi periferici sottocutanei. Per evitare la possibilità di danni al midollo spinale, è consigliabile evitare l'utilizzo di US sulla colonna vertebrale, in particolare in prossimità di aree dove sono state eseguite laminectomie (NCRP, 1983).

La terapia a US non deve essere applicata a fegato, ovaio, testicolo, che possono risulterne gravemente danneggiati.

Occorre evitare di esporre ad US pazienti con particolari stati patologici, nei quali la ultrasuonoterapia può interferire con l'evoluzione della malattia o con la terapia in atto. In particolare va evitata l'esposizione in pazienti: con vasi sanguigni in cattive condizioni, per i quali gli impulsi ultrasonori possono danneggiare le deboli pareti dei piccoli capillari o creare scompensi

pressori localizzati alle zone trattate; affetti da osteoporosi grave, per il rischio di danneggiamenti delle ossa colpite da tale patologia.

Sono da rilevare controindicazioni all'uso degli US in pazienti con ridotta sensibilità nervosa o patologie neurologiche, ai quali la ridotta sensibilità cutanea può impedire di avvertire il dolore in caso di malfunzionamenti dell'apparecchio ad US. Per pazienti affetti da arteriopatie obliteranti o emofilia, la terapia ultrasonica può determinare un aumento della fluidità del sangue e locali scompensi pressori.

Inoltre deve essere prestata attenzione a non irradiare con US i tessuti neoplastici, in quanto vi è evidenza che inappropriati riscaldamenti possono stimolare la crescita del tumore o promuovere metastasi (Hynynen, 1981).

L'esposizione ad US non dovrebbe essere effettuata in prossimità di aree con infezioni acute di osso o tessuto, poiché il trattamento potrebbe portare forzatamente pus nel tessuto circostante, diffondendo così l'infezione.

Inoltre sono da evitare esposizioni dirette nella zona toracica di pazienti portatori di pacemakers o di altre apparecchiature elettromeccaniche impiantate, per i possibili danni permanenti che ne possono derivare.

I pazienti con tromboflebiti non devono essere trattati con US in quanto anche la parziale disintegrazione del coagulo potrebbe tradursi in un ostacolo per l'afflusso di sangue al cervello, al cuore o ai polmoni.

I pazienti affetti da malattie cardiache non dovrebbero ricevere il trattamento ad US sui gangli cervicali, il ganglio stellato, il torace nella regione del cuore o il nervo vago, poiché l'effetto potrebbe essere un vasospasmo coronarico attivato come riflesso. Se questi pazienti necessitano di essere trattati in altre regioni del corpo, vanno utilizzati US a bassa intensità e brevi tempi di trattamento, in quanto la stimolazione di un qualsiasi nervo (in particolare il nervo vago) nel corpo può causare un cambiamento nella frequenza cardiaca.

Si dovrebbe inoltre evitare l'impiego di US nei pazienti portatori di protesi dentarie, o di impianti metallici, o in presenza di protesi articolari, per il loro maggior assorbimento rispetto ai tessuti circostanti, che provoca un'azione termica eccessiva con danneggiamento dei tessuti stessi o in pazienti con presenza di frammenti metallici, che possono disseminarsi o spostarsi per l'effetto meccanico della terapia ultrasonora.

Occorrerebbe inoltre avere una visione completa della posizione di arterie e vene, ghiandole e organi interni, i quali potrebbero essere involontariamente raggiunti dagli US e danneggiati nel corso del trattamento. L'esposizione ad US vicino ad una superficie riflettente come le ossa può portare alla formazione di onde stazionarie, con la possibilità di produrre stasi del flusso sanguigno

e relativi effetti dannosi.

Gli US hanno le stesse controindicazioni dei mezzi fisici che agiscono con la produzione endogena di calore (osteoporosi, presenza di frammenti metallici, vene varicose, tromboflebiti, arteriopatie obliteranti, emorragie, mestruazioni, neoplasie, tubercolosi e gravidanza) e non vanno utilizzati in pazienti in età infantile-giovanile, con ossa in fase di accrescimento.

Inoltre durante il trattamento con US si può incorrere in ustioni che si verificano se la dose erogata è eccessiva e se, utilizzando un'emissione a fascio continuo, la testa emittente rimane ferma nella stessa zona di trattamento per lungo tempo.

Non sono consigliabili esposizioni ad US con la massima intensità ultrasonora effettiva superiore ai 3 W/cm^2 ; studi su animali riportati dalla *World Health Organization* hanno infatti stabilito che effetti benefici associati con la terapia ultrasonora possono essere raggiunti utilizzando livelli di esposizione inferiori a 3 W/cm^2 (Hill, WHO, 1981). Al di sopra di tale valore è stato riscontrato ritardo nella crescita delle ossa e insorgenza di fenomeni di cavitazione con possibilità di danni tissutali (Kolar, 1965; Wells, 1977; Lehmann, 1982). Barth e Wachsmann nel 1949 e Payton (1975) trovarono che il limite nell'intensità ultrasonora per danno alle ossa nei cani è proprio di 3 W/cm^2 e che la probabilità dell'insorgenza di effetti dannosi è più alta se si usano applicatori stazionari (Barth, 1949).

2.2.2 Valutazione delle performances degli apparecchi ad ultrasuoni usati in fisioterapia

L'analisi della letteratura sul tema evidenzia grande attenzione alla valutazione delle caratteristiche di *output* degli apparecchi emittenti US per fisioterapia, in termini di conformità alle norme di sicurezza: i risultati degli studi mostrano che gli strumenti presentano ampia variabilità rispetto ai limiti di tolleranza stabiliti dalle norme tecniche (Pye, 1994; Pye, 1996; Gledhill, 1996; Artho, 2002). L'utilizzo di apparecchiature non calibrate può avere serie implicazioni per quanto riguarda il trattamento fisioterapico sia in termini di sicurezza del paziente che di efficacia del trattamento stesso; infatti, macchine con potenze di uscita molto elevate, possono produrre esposizioni eccessive, con possibili ripercussioni sulla salute del paziente, sottoposto a rischi inutili; al contrario, macchine con potenze di uscita troppo basse, producono trattamenti inefficaci e privi del relativo beneficio clinico, con conseguente esposizione inutile del paziente ad un agente fisico potenzialmente pericoloso (Pye, 1996). Pye sottolinea l'importanza, per la categoria dei fisioterapisti, dell'informazione sulla necessità della calibrazione delle macchine usate, auspicando un controllo almeno annuale in termini di potenza emessa, effettuato con strumentazione dotata di riferibilità metrologica. Guirro (2002) indica nell'assenza di una “*cultura metrologica*” tra gli

utilizzatori uno dei motivi per cui le calibrazioni spesso non vengono effettuate periodicamente; l'autore sottolinea inoltre la carenza di linee guida e norme che definiscano chiaramente la necessità di effettuare calibrazioni periodiche degli apparati, evidenziando anche la mancanza di laboratori per la misura dei parametri cruciali per la valutazione delle *performances* degli apparati, disponibili solo in specifici centri di ricerca e in particolari industrie.

L'importanza della calibrazione degli apparati ad US è stata identificata per la prima volta nel 1956 quando gli Stati Uniti stabilirono standard (Rivest, 1987). Numerose organizzazioni a livello internazionale hanno sottolineato l'importanza della calibrazione degli strumenti, stimando anche la periodicità per l'effettuazione dei test e la tolleranza nella variabilità dei parametri misurati nel corso degli stessi. Nel *Radiation Emitting Devices Act* pubblicato dal Canadian Minister of Justice (Canada, 2010), vengono forniti una serie di tolleranze nella determinazione dei parametri utili a garantire il funzionamento delle apparecchiature ad US: prima di tutto la calibrazione deve essere effettuata almeno una volta al mese, per controllare che la potenza ultrasonora presenti una accuratezza del $\pm 20\%$; inoltre la stessa potenza in uscita deve rimanere costante entro $\pm 20\%$ del suo valore iniziale, durante un'ora di funzionamento continuo, alla massima potenza, alla tensione nominale della linea di alimentazione, in acqua ad una temperatura di $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Inoltre, la frequenza effettiva di un dispositivo terapeutico ad US non deve differire di oltre $\pm 5\%$ da quella dichiarata dal costruttore. L'area effettiva radiante (*ERA*), indicata tra le caratteristiche di fabbrica del prodotto, deve essere mantenuta entro il $\pm 20\%$ del valore nominale. Inoltre sono riportate una serie di precauzioni per l'operatore per minimizzare le esposizioni indesiderate ed una serie di precauzioni per la sicurezza dei pazienti, per evitare potenziali effetti avversi per la salute. Il documento sottolinea anche l'importanza di un adeguato training per gli operatori per la sicurezza e l'efficacia dei trattamenti.

Analogamente, le linee guida dell'American Food and Drug Administration (FDA, 2006) mostrano grande variabilità nella determinazione di *ERA* e *potenza totale* ($\pm 20\%$ per la potenza totale, $\pm 20\%$ - 25% per *ERA*).

La norma CEI EN 60601-2-5 stabilisce che il BNR non deve superare il valore di 8,0 per ogni testa di trattamento, la potenza di uscita deve rimanere costante entro il $\pm 20\%$ dal valore iniziale durante un'ora di funzionamento continuo, ed infine l'intensità effettiva massima non deve superare 3 W/cm^2 per ogni testa di trattamento; la norma però non fornisce indicazioni chiare sulla tempistica per l'effettuazione dei controlli sulla strumentazione. La norma CEI EN 61689 stabilisce che la funzionalità e la qualità dei dispositivi ad US sono definite principalmente da: *frequenza acustica di lavoro* (che influenza la profondità di penetrazione degli US nei tessuti); *area effettiva radiante (ERA)*: area della sezione trasversale del fascio estrapolata alla superficie frontale della testa di

trattamento e moltiplicata per un fattore adimensionale (parametro connesso alle dimensioni superficiali dell'area trattata); *rapporto della non uniformità del fascio (BNR)*: rapporto tra il quadrato del valore efficace della pressione acustica di picco spaziale e la media spaziale del quadrato del valore efficace della pressione acustica, dove la media spaziale è calcolata sull'ERA (tale valore è rilevante per la sicurezza in quanto determina la possibilità che all'interno del fascio US si creino *hot spot*, zone in cui la pressione acustica è particolarmente elevata con rischio di riscaldamento eccessivi dei tessuti esposti); *potenza di uscita*: media nel tempo della potenza irradiata dalla testa di trattamento di un apparecchio in un campo approssimativamente libero in condizioni specificate, preferibilmente in acqua; *intensità effettiva*: rapporto tra potenza di uscita e ERA (parametro connesso alla "dose" impartita al paziente nell'unità di tempo, le cui limitazioni concettuali sono state discusse in precedenza).

Tale norma stabilisce inoltre le tolleranze ammesse per i suddetti parametri: potenza massima: $\pm 20\%$; ERA: $\pm 20\%$; intensità effettiva alla potenza massima: $\pm 30\%$; frequenza acustica di lavoro: $\pm 10\%$; BNR: $\pm 30\%$.

L'azione degli US terapeutici sui tessuti biologici dipende dall'intensità acustica impiegata che può presentare errori nella calibrazione con conseguente eventuale inefficienza dei trattamenti o addirittura produzione di danni (Guirro, 2002). Ferrari (2010) ha valutato le performances di 31 apparati ad US usati per fisioterapia in termini di intensità emessa dai dispositivi, ai sensi della norma 61689-2009, rilevando che il 68% degli stessi risultava al di fuori dei limiti tollerati dalla norma. I risultati risultano in accordo con gli studi di Pye e Milford (1994) e Repacholi (1979) in cui rispettivamente il 69% e 72% degli apparati valutati risultavano al di fuori della stessa norma. Altri studi di Artho (2002) e Daniel (2003) ottenevano percentuali di apparecchiature fuori norma comprese tra il 39% e il 44%. Variazioni più elevate sono state invece riscontrate nei lavori di Guirro (1997) e Ishikawa (2002), in cui gli autori osservano errori addirittura superiori all'80%.

Guirro (2002), analizzando 48 apparecchiature mai utilizzate appartenenti a otto differenti modelli prodotti da diversi costruttori, ha riscontrato in cinque modelli errori di calibrazione superiori alle tolleranze previste dalle norme, a più livelli di intensità emessa impostati: questi risultati indicano la necessità di maggiori controlli di qualità sulla strumentazione prodotta da parte dei costruttori.

In termini di ERA, Ferrari (2010) mostra che il 68% dei trasduttori investigati presentava valori di tale parametro differenti da quanto dichiarato dal costruttore più di quanto tollerato secondo la norma. Le cause della variabilità riscontrata nei trasduttori di apparecchiature dello stesso modello possono essere dovute all'utilizzo, con conseguente dislocazione delle ceramiche o riduzione dell'effetto piezoelettrico, o essere dovute a fattori connessi al processo di produzione, quali la qualità dei materiali e il processo di assemblaggio dei trasduttori. Fyfe (1982) in un campione di 18

diffusori ad US, rileva che soltanto 5 rientravano nel range dei valori aspettati per ERA e 5 per potenza totale. Johns (2007) ha esaminato 66 trasduttori operanti alle frequenze di 1 e 3 MHz, riscontrando soltanto tre trasduttori al di fuori dei valori attesi per ERA. Ishikawa (2002) ha rilevato che il 42,3% degli apparati testati non rispettavano le tolleranze previste dalle norme in termini di ERA.

In termini di BNR, nel lavoro di Ferrari (2010) viene riportato che tutti i trasduttori rientravano nella tolleranza prevista dalla norma, tuttavia tre di questi presentavano valori superiori al massimo ammesso, pari a 8. Tali risultati sono in disaccordo con quelli di Ishikawa (2002), che non aveva trovato alcun apparecchio con BNR superiore a 8; al contrario, Hekkenberg (1998) trovò il 33% degli apparati analizzati con valori di BNR superiori a 8.

La frequenza del fascio ultrasonoro è correlata alla profondità a cui viene irradiato il tessuto; più alta è la frequenza, minore è la profondità raggiunta dal fascio. In termini di frequenza, Ferrari (2010) ha mostrato che in circa il 10% degli strumenti operanti alla frequenza nominale 1 MHz, e in nessuno di quelli operanti alla frequenza nominale 3 MHz, la differenza tra il valore misurato di frequenza e il valore nominale non rientrava nella tolleranza ammessa dalla norma. Tali risultati differiscono da quelli dello studio di Ishikawa (2002) in cui il 33% degli strumenti a 1 MHz e il 75% di quelli a 3 MHz non rientravano nei limiti di tolleranza.

In termini di potenza, Artho (2002) ha effettuato misurazioni su 83 unità usate in ambito clinico, mostrando che più di un terzo dei macchinari non rispettavano le tolleranze previste per la potenza di uscita. Allo stesso modo, Schabrun (2008) ha effettuato test su 64 macchine per fisioterapia: i risultati dello studio mostrano che la potenza di uscita misurata differisce dalla potenza dichiarata più di quanto ammesso dalla norma, per il 59% delle macchine testate, da cui si evince che circa un paziente su due riceve una dose differente da quella prescritta dal fisioterapista. L'inaccuratezza delle apparecchiature esaminate è risultata essere correlata alla loro età e alla frequenza con cui sono effettuate le calibrazioni.

Pye (1994) ha testato 85 macchinari ad US, trovando che il 69% aveva potenze di uscita che differivano di oltre il 30% dai valori impostati, riportati dal costruttore. Secondo Pye (1996), caratterizzare un macchinario per terapia ad US alla massima potenza di uscita può non essere sufficiente a caratterizzare completamente le prestazioni dell'apparato stesso, ed evidenzia la necessità di calibrare gli strumenti sull'intero intervallo delle impostazioni di potenza utilizzate nella terapia clinica, sia in onda continua che pulsata. In particolare, Pye (1994) ha analizzato 36 teste di trattamento, trovando 11 di esse con meno di 5 anni di anzianità di esercizio correttamente calibrate in onda continua ma con problemi in onda pulsata. Nel lavoro si evidenzia la necessità di un rigoroso programma di test e calibrazione di macchine per la terapia, quale strumento

importante per la sicurezza dei pazienti e per l'efficacia dei trattamenti. Pye auspica che ogni strumento sia venduto con un certificato di calibrazione, con tracciabilità agli standard nazionali; il certificato dovrebbe inoltre dettagliare le *performances* dell'apparato sull'intero range dei settaggi sia in onda continua che impulsata.

2.2.3 Criticità connesse agli aspetti di sicurezza

In accordo con le norme tecniche precedentemente illustrate, nei contrassegni posti sull'apparecchiatura o in alcune sue parti, quali i trasduttori, e nelle istruzioni d'uso, devono essere riportati i valori dei parametri rilevanti per il buon funzionamento dello strumento tra cui: la frequenza acustica di lavoro; la potenza d'uscita nominale; l'area radiante effettiva; il rapporto di non uniformità del fascio; inoltre, se l'ampiezza è modulata, o pulsata, la durata degli impulsi, il periodo di ripetizione degli impulsi e il *duty factor* per ciascuna modulazione impostabile. A tal proposito, nel lavoro pubblicato dal Ministero della Salute nel 2011, riguardante la *Sicurezza ed efficacia delle apparecchiature in riabilitazione*, sono state individuate significative criticità sul tema dell'utilizzo di strumenti nella Medicina fisica e riabilitativa, tra cui anche quelli che usano US per la fisioterapia, effettuando un'analisi sui manuali d'uso di alcune apparecchiature. Pur trattando l'intero panorama delle apparecchiature, comprendente apparati per Diatermia da contatto, Elettroterapia, Laserterapia, Energia vibratoria, Ultrasuoni, da questo lavoro emerge una significativa eterogeneità, per quanto riguarda l'indicazione delle caratteristiche tecniche e delle norme di sicurezza seguite nella costruzione degli strumenti. I risultati della campagna mostrano che i parametri dichiarati dalle ditte costruttrici non sono risultati, in molti casi, confrontabili tra loro; inoltre, sono emerse significative difformità, nei manuali di alcuni prodotti, riguardo alle istruzioni relative alla regolare manutenzione per il corretto funzionamento del dispositivo. Il lavoro si conclude auspicando, sia un sistema di verifiche più congruo e omogeneo, ma anche che le aziende del settore si rifacciano alle conoscenze tecniche in argomento per fornire indicazioni congrue e omogenee per ciascuna tipologia di apparecchio.

Inoltre, per quanto riguarda i controlli periodici di sicurezza effettivamente condotti sulle apparecchiature, nel lavoro si rileva che in molti casi essi si limitano sostanzialmente alla verifica del solo aspetto della sicurezza elettrica, mentre solo occasionalmente si procede all'ispezione dell'apparato grafico (etichette ecc.) dell'apparecchiatura. Appare cruciale, quindi, secondo il Ministero, verificare che quanto dichiarato dal fabbricante e verificato dall'Organismo Notificato (che ha certificato il prodotto ai fini della marcatura CE), riguardo alle specifiche funzionali (es. l'energia erogata) sia e si mantenga coerente nel tempo e che tutti i parametri previsti per il

funzionamento (frequenza, intensità, ampiezza ecc.) siano effettivamente mantenuti. Conseguentemente, sarebbe auspicabile che le autorità competenti, nei loro periodici controlli presso i presidi medici, richiedessero, oltre alla documentazione relativa ai test di sicurezza, la dimostrazione del corretto funzionamento dell'apparato in termini di erogazione della prestazione, a partire da quanto richiesto dall'impianto normativo disponibile per quel prodotto (Ministero della Salute, 2011).

Prendendo spunto dal suddetto lavoro e alla luce delle criticità rilevate, si evidenzia la necessità di procedere innanzitutto ad una analisi approfondita dei manuali d'uso della strumentazione ad US per fisioterapia, per valutare in primo luogo, come è garantita la qualità della manutenzione della strumentazione. Si fa presente, a tal proposito, che la norma tecnica CEI EN 60601-2-5 non dà indicazioni precise circa le modalità con cui effettuare le calibrazioni delle apparecchiature. Come sottolineato da Pye (1996) le apparecchiature ad US per fisioterapia dovrebbero essere calibrate almeno ogni due anni, o preferibilmente ogni anno, con una bilancia a forza di radiazione dotata di riferibilità metrologica. Sarebbe quindi auspicabile che la normativa tecnica desse indicazioni più precise circa la periodicità della verifica delle caratteristiche di *output* delle apparecchiature, nonché un riferimento alla necessità di utilizzare strumenti di misura con riferibilità metrologica.

A tal proposito, risulterebbe utile sviluppare dei protocolli per il *Controllo di Qualità*, da mettere a disposizione delle strutture sanitarie, analoghi a quelli per la diagnostica, che prevedano una valutazione dell'efficienza delle apparecchiature: ciò richiederebbe la realizzazione di appropriati laboratori di prova e caratterizzazione per l'area degli US in medicina, dotati di strumentazione di misura con riferibilità metrologica, a garanzia per gli operatori di un corretto funzionamento dei dispositivi e per i pazienti di essere sottoposti ad un trattamento efficace e sicuro.

Sarebbe inoltre utile prevedere l'effettuazione di una serie di misurazioni dei parametri di *output* della strumentazione ad US per fisioterapia, a campione su strumentazioni appena uscite dalla fabbrica e su apparecchi in uso da diverso tempo, per valutare la variazione percentuale degli stessi in funzione dell'utilizzo e in relazione ai dati forniti dal costruttore ed alle tolleranze stabilite dalle norme tecniche. Infatti, apparecchiature utilizzate per molte ore al giorno, molti giorni alla settimana avrebbero bisogno di una maggiore frequenza di calibrazione rispetto a quelle apparecchiature che presentano un tempo di utilizzo inferiore. I fattori che possono contribuire alla perdita di taratura delle apparecchiature sono infatti: la frequenza di utilizzo, la potenza emessa, il tempo dall'acquisto, fattori ambientali come temperatura e umidità, processi di produzione, qualità dei materiali utilizzati.

Al fine di ottimizzare i trattamenti fisioterapici con US, sulla cui reale efficacia esistono ancora ampi margini di incertezza, si evidenzia la necessità di implementare ulteriori studi, sia clinici che

di laboratorio, volti a determinare i meccanismi di azione ed i benefici dei trattamenti, nonché a valutare i rischi connessi alle esposizioni.

Infine, per quanto riguarda l'intensità effettiva massima, stabilita dalla norma CEI EN 60601-2-5 in 3 W/cm^2 , sarebbe auspicabile che nella norme tecniche venisse evidenziato che il limite prescritto non è una garanzia di assoluta innocuità del trattamento; a tal proposito si sottolinea l'importanza di programmare ricerche finalizzate a sottoporre a conferma il valore di 3 W/cm^2 , dal momento che, dalla letteratura scientifica sul tema, si evince la presenza di limitati riferimenti bibliografici, peraltro datati nel tempo. Il valore della massima intensità efficace è stato definito sulla base di studi su animali riportati dalla OMS (WHO, 1982) che indicano che gli effetti benefici degli US possono essere ottenuti utilizzando intensità inferiori a 3 W/cm^2 ; tuttavia, la stessa WHO segnala che è difficile effettuare una chiara valutazione rischio-beneficio delle esposizioni agli US terapeutici, perché sono stati condotti pochi studi clinici finalizzati a determinare i benefici dei trattamenti. Come sottolinea Duck (2007), l'esposizione prolungata dei tessuti ad un'intensità di 3 W/cm^2 causa aumenti di temperatura potenzialmente dannosi, in modo particolare alla superficie delle ossa. Questo limite "relativamente ad alta intensità" dovrebbe essere permesso, secondo Duck, per alcune applicazioni fisioterapiche che richiedono esposizioni brevi, e per le quali il trasduttore e il fascio sono mantenuti in moto continuo rispetto al tessuto trattato. Tuttavia, nella norma 60601-2-5 non sono riportati limiti inferiori per il caso di esposizioni prolungate, o nelle quali il trasduttore non è in movimento.

Le esposizioni agli US per finalità fisioterapiche devono soddisfare requisiti sia di sicurezza che di efficacia, che devono essere valutati accuratamente nell'ambito di valutazioni rischi-benefici, alla luce delle problematiche evidenziate. È necessario quindi che vengano condotti ulteriori studi clinici finalizzati a determinare i benefici dei trattamenti ed a valutare i rischi connessi ad esposizioni, anche qualora rispettino i limiti di intensità previsti dalle norme tecniche.

2.3 Problematiche connesse con l'uso degli ultrasuoni in estetica

2.3.1 *Gli ultrasuoni in estetica medica*

In estetica medica, nei trattamenti di lisi adipocitaria con US, la cavitazione instabile è deliberatamente ricercata all'interno dei tessuti adiposi, con lo scopo di distruggere gli adipociti grazie all'energia liberata dall'implosione delle bolle di vapore. Se da un lato il danno, consistente nella distruzione dell'adipocita, costituisce la finalità del trattamento estetico, non è comunque possibile escludere la possibilità che il fenomeno della cavitazione instabile possa verificarsi anche

in altri tessuti interessati al passaggio dell'onda ultrasonora che, dall'esterno del corpo ed a contatto della pelle, viene immessa nel corpo in direzione del tessuto sottocutaneo adiposo.

Al fine di garantire la sicurezza e l'efficacia dei trattamenti, la letteratura scientifica, attraverso studi *in vitro* e *in vivo* o una adeguata casistica clinica, dovrebbero documentare l'effettiva capacità degli US di determinare l'implosione selettiva delle cellule del tessuto adiposo risparmiando invece, nervi, muscoli, tessuto connettivo e vasi sanguigni. Brown (2009) ha riportato i risultati di esperimenti condotti con un dispositivo transcutaneo a US focalizzati alla frequenza di 20 kHz (UltraShape Contour I di fabbricazione israeliana) utilizzando come modello preclinico suini *in vivo*: i risultati del lavoro mostrano che campioni istologici della pelle e del grasso sottocutaneo escissi dopo il trattamento, rivelano lisi delle cellule di grasso anche ben al di sotto del derma, senza distruzione osservabile di vasi sanguigni, nervi e tessuto connettivo. Tuttavia, lo stesso autore rileva che queste osservazioni non sono direttamente estrapolabili all'uomo, per cui sono necessari studi clinici controllati, alcuni dei quali sono in corso negli Stati Uniti.

Inoltre, una volta prodotta la distruzione degli adipociti, appare determinante affrontare la problematica relativa allo smaltimento da parte dell'organismo dei trigliceridi liberati, e se ciò possa portare ad eventuali rischi per la salute, per esempio dovuti all'aumento dei trigliceridi circolanti nel sangue in soggetti sani o già affetti da dislipidemie, o dovuti al sovraccarico del fegato, in particolare nei soggetti con alterazioni della funzionalità epatica. Teitelbaum (2007) e Moreno Moraga (2007) hanno dimostrato l'assenza di cambiamenti clinici significativi nei parametri ematici rappresentativi del metabolismo dei grassi, in pazienti sottoposti a trattamenti con il sistema Contour I (Ultrashape). Anche in questo caso, una adeguata casistica clinica dovrebbe documentare l'assenza di controindicazioni o di modificazioni cliniche significative, anche a distanza di tempo dal trattamento, in pazienti sottoposti a trattamenti ad US.

Sono stati recentemente oggetto di sperimentazione clinica anche dispositivi per l'ablazione delle masse adipose mediante la tecnica HIFU: Gadsden et al. (2011) hanno descritto i risultati di una sperimentazione clinica per valutare la sicurezza di trattamenti con US focalizzati, alla frequenza di 2 MHz, la cui intensità raggiungeva 1000 W/cm^2 nel fuoco del trasduttore. Anche in questo caso non sono stati riportati danni ai tessuti adiacenti a quelli trattati, né sono state osservate alterazioni metaboliche.

Un'ulteriore problematica consiste nello studio delle conseguenze sulla salute di eventuali sostanze tossiche contenute nel tessuto adiposo e immesse in circolo a seguito della lisi adipocitaria prodotta da US.

Tuttavia, l'assenza in letteratura di riferimenti a danni conseguenti ai trattamenti può essere dovuta alla recente introduzione di questa tecnologia; la possibilità di tali danni è plausibile, per cui, pur

non essendo accertati, non è, almeno per il momento, possibile escluderli, come non è, per il momento, possibile valutare l'entità dei possibili rischi per la salute.

Inoltre, poiché le apparecchiature in questione sono di introduzione relativamente recente, ed essendo ancora aperti molti problemi relativi alla caratterizzazione fisica del fascio ultrasonoro e alla sua propagazione nei tessuti biologici, non è possibile avere dati certi sulla loro sicurezza per la salute. A tal proposito, sarebbe necessario definire una accurata dosimetria attraverso studi *in vivo* e *in vitro*, e studiare la propagazione degli US nei tessuti corporei per definire la “dose” utile per l'efficacia e la sicurezza dei trattamenti.

L'analisi approfondita e la valutazione esaustiva dei rischi associati all'uso degli US in campo estetico medico è dunque ancora in itinere e lungi dall'essere soddisfacente. Le esposizioni agli US per finalità terapeutiche, pur deliberate dalle persone, devono soddisfare requisiti sia di sicurezza che di efficacia, che devono essere valutati accuratamente nell'ambito di valutazioni rischi-benefici, alla luce delle problematiche evidenziate.

2.3.1.1 Il “caso francese”

Nell'ambito della medicina estetica, nel corso del 2011, la Francia, attraverso un decreto del Ministero del Lavoro e della Salute (n. 0.086/12 aprile), ha vietato i trattamenti di medicina estetica per il dimagrimento localizzato, che utilizzano “*mesoterapia, ultrasuoni, laser, infrarossi e radiofrequenza*” in quanto rappresentano “*un pericolo grave per la salute umana*” o quantomeno sono sospettati di esserlo; tra questi, la cavitazione che usa gli US a bassa frequenza. La decisione è stata presa in seguito a un avviso della Haute autorité de santé (Has) sulle troppe segnalazioni dei pazienti che, dopo il trattamento, si erano rivolti al Ministero della Salute francese. La Has ha infatti evidenziato “*complicazioni gravi*” su 23 pazienti che dopo essersi sottoposti a iniezioni di soluzioni ipo-osmolari avevano riportato necrosi cutanee, ematomi, lesioni sub-cutanee, ulcerazioni, trombosi. Addirittura, secondo le autorità sanitarie, per altri dieci pazienti si sono resi necessari interventi chirurgici per risolvere i problemi causati. Secondo il giudizio del Ministero “*le tecniche di lisi adipocitaria non invasive (e invasive) presentano rischi di danni gravi per la salute umana*”.

Il decreto ha creato polemiche e una domanda di sospensione e/o cancellazione è stata presentata al Consiglio di Stato da parte delle imprese francesi e medici che praticavano queste tecniche. Il giudice competente del Consiglio di Stato francese ha inizialmente sospeso l'esecuzione del decreto, in attesa di assumere decisioni definitive; successivamente, si è pronunciato consentendo le applicazioni con tecniche non invasive che utilizzano agenti fisici, a causa della mancanza di dati a sostegno della tesi relativa alla possibilità di rischi gravi per la salute.

Il dibattito resta comunque aperto, in Francia ma anche in Italia; il Ministero della Salute sottolineava infatti nel 2011 l'importanza di avviare “ *un’indagine con l’Istituto Superiore di Sanità per verificare la sicurezza delle pratiche di lipolisi, e se ci sia anche in Italia una casistica relativa alle complicanze collegate a tali trattamenti che possa portare a seguire la via decisa dalla Francia*”.

2.3.2 Gli ultrasuoni in estetica non medica

2.3.2.1 La cavitazione estetica

La pubblicazione nel 2011 del decreto n. 110 ha di fatto tolto alle estetiste la possibilità di eseguire trattamenti per la rimozione della adiposità localizzate in regime di cavitazione.

Negli ultimi anni, molti centri estetici hanno acquistato e utilizzato apparecchiature ad US in regime di cavitazione per il trattamento della cellulite; questo fatto è una conseguenza del vuoto normativo dovuta alla mancata emanazione del decreto relativo alle caratteristiche delle apparecchiature ammesse nei trattamenti estetici non-medici.

Va sottolineato che il trattamento ad US in regime di cavitazione, trattandosi di trattamento “profondo”, probabilmente non sarebbe potuto essere di pertinenza delle estetiste sin dal suo primo comparire sul mercato estetico; infatti, la legge che disciplina l'attività di estetista stabilisce che siano di competenza delle estetiste “*tutte le prestazioni ed i trattamenti eseguiti sulla superficie del corpo umano il cui scopo esclusivo o prevalente sia quello di mantenerlo in perfette condizioni, di migliorarne e proteggerne l'aspetto estetico..*”. Dette apparecchiature, però, in assenza del richiamato decreto, sono state effettivamente utilizzate.

Le richieste dei costruttori di apparecchiature e dei titolari dei centri estetici di autorizzare l'impiego degli US in regime di cavitazione, per trattamenti volti a ridurre la cellulite è molto forte; è possibile che in futuro il legislatore riconsideri il problema e che si cerchi una soluzione accettabile (se esiste) che consenta di espandere le attività economiche e allo stesso tempo di tutelare la salute dei cittadini che decideranno, eventualmente, di sottoporsi a simili trattamenti.

2.3.2.2 Applicazioni nei centri estetici: aspetti normativi e criticità

Per quanto riguarda le applicazioni previste dal decreto n. 110 del 2011, si evidenzia una specifica criticità relativa al razionale sottostante i limiti di intensità di emissione prescritti per le apparecchiature ad US che rimangono di pertinenza delle estetiste. Non è infatti chiaro su quale

base scientifica siano stati definiti i limiti di potenza emessa (tabella 2.1) per l'apparecchiatura "*Vibrazione meccanica peeling*", ed i limiti di intensità per l'apparecchiatura "*Ultrasuoni per trattamenti superficiali*": per quest'ultima apparecchiatura desta inoltre perplessità la scelta di imporre specifici limiti in relazione ad intervalli predeterminati di frequenza degli US. Probabilmente la spiegazione risiede nella differente profondità di penetrazione degli US alle varie frequenze, tuttavia sono possibili due differenti ragionamenti che portano a conclusioni opposte.

Il ragionamento che sembra alla base della scelta operata dal legislatore consiste nel limitare maggiormente l'intensità del fascio ultrasonoro a più bassa frequenza (circa 1 MHz), che penetra maggiormente all'interno del corpo, al fine di preservare organi interni potenzialmente critici. Considerando invece il fatto che gli US a più alta frequenza (circa 3 MHz) penetrano di meno perché depongono una maggiore energia in un percorso ridotto, volendo evitare eccessivi riscaldamento o altri fenomeni eventualmente dannosi e connessi ad un'elevata deposizione di energia, sarebbe stato al contrario opportuno limitare maggiormente l'intensità degli US alle frequenze più elevate.

Inoltre, il limite più elevato in intensità (3 W/cm^2) per gli US compresi nell'intervallo 1,2-3,5 MHz, sembra prendere a riferimento il limite di intensità effettiva massima per gli US per trattamenti fisioterapici e riferibile alla norma CEI 60601-2-5, pur non trattandosi di trattamenti medici.

Premesso che il decreto interministeriale contiene il nuovo elenco delle apparecchiature utilizzabili in estetica, a cui corrispondono limitazioni e divieti all'uso, va rilevato che esso non limita la possibilità di costruire tali apparecchiature in Italia, che possono essere esportate in altri Paesi.

2.3.2.3 Applicazioni domestiche

Il decreto n. 110 del 2011, pur non consentendo alle estetiste la possibilità di eseguire trattamenti ad US in regime di cavitazione, non limita la possibilità di comprare apparecchiature non ammesse nei centri estetici da parte di privati ad uso domestico. Inoltre, con una semplice ricerca su *Internet*, è possibile verificare che sono presenti numerosi siti in cui i dispositivi ad US per estetica in regime di cavitazione sono disponibili a costi accessibili; gli utenti, anche privi di specifica competenza, possono pertanto procedere all'acquisto, sottoponendosi in regime "fai da te" ad un agente fisico potenzialmente pericoloso per la salute.

Da qui anche la necessità di avviare ricerche e studi scientifici che possano finalmente verificare la presenza/assenza di pericoli o di rischio/danno per l'esposizione con finalità estetiche all'agente fisico US.

2.3.3 *Proposte per il superamento delle problematiche connesse con l'uso degli ultrasuoni in estetica*

Il sempre maggiore utilizzo degli US nella medicina estetica, pone nuove problematiche in relazione alla valutazione sia dei potenziali danni per la salute del paziente che dell'efficacia delle applicazioni. Per quanto riguarda le applicazioni degli US per la rimozione del tessuto adiposo, si evidenzia la necessità sia di ampliare la ricerca per valutare il rapporto rischio/beneficio, sia di documentare scientificamente o con una appropriata casistica clinica, l'effetto biologico indotto, le eventuali controindicazioni, i rischi, gli effetti collaterali.

A maggior ragione, dovrebbe sussistere l'obbligo di documentare con riferimenti scientifici gli effetti biologici prodotti dai dispositivi utilizzati nell'estetica non medica, e soprattutto che la sicurezza dei trattamenti estetici sia garantita per mezzo di limiti di esposizione scientificamente fondati.

Appare inoltre fondamentale colmare al più presto il vuoto normativo per i dispositivi usati nell'estetica medica e non medica, con l'emanazione a livello europeo di norme tecniche specifiche, analoghe a quelle definite per la fisioterapia, il tutto al fine di fornire all'operatore la garanzia di un corretto funzionamento dei dispositivi ed ai pazienti di essere sottoposti ad un trattamento efficace e sicuro.

Occorre infine che al più presto venga emanata una normativa per i prodotti ad uso domestico, per regolamentare il regime "fai da te" per quanto riguarda l'esposizione ad un agente fisico potenzialmente dannoso per la salute.

L'utilizzo degli US nella medicina estetica pone ulteriori problematiche legate alla valutazione delle caratteristiche di efficienza e affidabilità della strumentazione utilizzata, nonché alla caratterizzazione del fascio ultrasonoro durante la sua propagazione nei tessuti biologici. A tal proposito, una caratterizzazione fisica del fascio ultrasonoro e della sua propagazione nei tessuti biologici è necessaria a garanzia dell'efficacia e della sicurezza dei trattamenti. Ciò significa che dovrebbero essere stabiliti metodi accurati per predire la dose, o comunque le grandezze fisiche più significative, e procedure *ad hoc* per caratterizzare i trasduttori e monitorare le prestazioni degli apparati.

PARTE II

CAPITOLO 3:

CARATTERIZZAZIONE DI DISPOSITIVI AD ULTRASUONI PER FISIOTERAPIA ED ESTETICA

3.1 Descrizione delle sorgenti di ultrasuoni

Con la finalità di valutare le *performances* tecniche di apparecchi normalmente usati per applicazioni fisioterapiche ed estetiche, ai fini del loro utilizzo in sicurezza in campo medico e non medico, sono stati presi in considerazione due dispositivi per trattamenti di tipo fisioterapico e estetico, costituiti da diffusori a pistone circolare del diametro di circa 6 cm, e dai relativi generatori, operanti rispettivamente alle frequenze di 1 e 3 MHz, disponibili sul mercato a costi relativamente ridotti, e sono stati caratterizzati, valutandone le caratteristiche emissive, ai sensi della norma CEI EN 61689-2009. Va sottolineato che per questa tipologia di apparecchiatura per trattamenti in campo estetico, per descrivere l'energia emessa dal trasduttore possono essere utilizzati, in linea di principio, gli stessi parametri fisici ERA e BNR definiti per la fisioterapia; per il caso specifico, in assenza di specifiche norme tecniche di riferimento, l'applicazione della norma 61689-2009 è stata estesa al trasduttore usato in estetica.



Figura 3.1: immagine dello strumento operante a 1 MHz con relativo trasduttore circolare

La casa produttrice degli strumenti prevede la vendita del trasduttore abbinato ad un kit che consente all'utente di assemblare su precise indicazioni l'elettronica del generatore.

Nessuna indicazione è stata trovata sulle caratteristiche emissive dei sistemi, eccetto l'indicazione che l'intensità massima emessa fosse inferiore ai 3 W/cm^2 , oltre ad un elenco dettagliato delle controindicazioni d'uso.

Gli apparecchi consentono di lavorare in modalità continua e impulsata; quando si utilizza il generatore in modalità continua, il segnale a 1 o 3 MHz viene applicato senza interruzioni al diffusore. Gli strumenti possono lavorare nel range dal 10% al 100% della potenza massima attraverso una manopola sul display dello strumento che consente di variare l'ampiezza dell'onda emessa. Secondo le indicazioni fornite dal costruttore nel manuale d'uso, entrambi i sistemi forniscono un'intensità massima pari a $2,5 \text{ W/cm}^2$ in modalità pulsata.



Figura 3.2: immagine dello strumento operante a 3 MHz con particolare del diffusore circolare

Il lavoro ha previsto la caratterizzazione delle modalità emissive dei trasduttori, che è stata effettuata presso l'Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica (INRIM) di Torino per quanto riguarda la valutazione della potenza totale; presso il CNR IDASC Istituto di Acustica e sensoristica “Orso Maria Corbino”, Roma, per la valutazione dei parametri *ERA* e *BNR* ai sensi della norma CEI EN 61689.

3.2 Caratterizzazione presso INRIM Torino

Al fine di valutare le caratteristiche di *output* degli strumenti, sono state effettuate presso l'Istituto INRIM, Istituto Nazionale di Ricerca Metrologica di Torino, misurazioni di potenza totale con l'ausilio di una bilancia a forza di radiazione.

I trasduttori, uno alla frequenza di 1 MHz l'altro alla frequenza di 3 MHz, sono stati fatti lavorare in collegamento con i loro rispettivi controlli, impostati su onda continua; le misure di potenza totale sono state effettuate al 100% dell'ampiezza dell'onda emessa e al 50% della stessa.

Dal punto di vista operativo, è stata fissata una distanza trasduttore-bersaglio, in corrispondenza della quale sono state effettuate misure di forza di radiazione, ossia della variazione apparente della massa del bersaglio Δm , che si determina tra il settaggio in cui il fascio ultrasonoro non è attivato e il settaggio che corrisponde invece all'attivazione della radiazione ultrasonora (tipicamente 10 msec di misura, seguite da 10 msec di stop, poi ulteriori 10 msec di misura, seguiti da 10 msec di stop), da cui è possibile ricavare la potenza emessa con la semplice relazione:

$$P = c F = c g \Delta m \quad (3.1)$$

dove c è la velocità del suono nel fluido di propagazione, F la forza di radiazione sul target nella direzione di propagazione dell'onda incidente, g accelerazione di gravità, e Δm l'apparente variazione della massa bersaglio. Per ogni acquisizione, è possibile estrapolare i valori del voltaggio V_{rms} (voltaggio), P (potenza) e T (temperatura). Al fine di compensare eventuali errori nella misura della distanza di separazione tra il trasduttore e il mezzo assorbente, la determinazione della potenza è stata effettuata anche a distanze z pari a $z = \lambda/4$ con $\lambda = c/\text{frequenza}$.

I risultati delle misure di potenza totale, misurata sui due strumenti, sono riportati nelle tabelle 3.1 e 3.2 per l'operatività al 100% e al 50% per entrambi gli strumenti.

Si osserva che i valori ottenuti per la potenza media appaiono costanti al variare della distanza trasduttore-bersaglio, sia per l'impostazione al 100%, sia al 50%.

Si osserva inoltre, per entrambi gli strumenti, linearità nella determinazione della potenza totale che si dimezza quando l'ampiezza dell'onda è impostata al 50% sul display del generatore dello strumento.

A partire dalle misurazioni di potenza totale, è possibile ricavare indirettamente il valore del parametro *ERA*, area effettiva radiante (cm^2) per i sistemi in uso. Infatti, le caratteristiche tecniche degli strumenti evidenziano che la *massima intensità effettiva* (W/cm^2) è pari a $2,5 \text{ W}/\text{cm}^2$, come rapporto tra la massima potenza ultrasonora (misurata in Watt) e l'*area effettiva radiante* (in cm^2).

Nota l'intensità fornita dal costruttore e la potenza media misurata, è possibile ricavare indirettamente la misura del parametro geometrico *ERA*, pari a $2,6 \text{ cm}^2$, per il trasduttore a 1 MHz; $1,8 \text{ cm}^2$ per il trasduttore a 3 MHz.

Si osserva che il valore di tale parametro appare compatibile con le caratteristiche tecniche costruttive del trasduttore, poiché l'area dell'elemento piezoelettrico è risultata pari a $5,7 \text{ cm}^2$.

Trasduttore 1 MHz, T=22 °C, 100% continua			
V_{rms} (V) (mediato su 2 acquisizioni)	Distanza trasduttore-bersaglio (mm)	Potenza media (W)	Incertezza
24,19	10 (+0 con 2 acquisizioni)	6,611	±15%
24,11	10 (-λ/4 con 2 acquisizioni)		
24,08	3 (+0 con 2 acquisizioni)	6,535	±15%
24,05	3 (-λ/4 con 2 acquisizioni)		
50% continua			
18,63	10 (+0 con 2 acquisizioni)	3,939	±15%
18,58	10 (-λ/4 con 2 acquisizioni)		
18,575	3 (+0 con 2 acquisizioni)	3,927	±15%
18,565	3 (-λ/4 con 2 acquisizioni)		
Potenza totale 1 MHz (100% continua)= 6,57 W ERA (stimato per trasduttore a 1 MHz)=2,6 cm²			

Tabella 3.1: risultati delle misure di potenza totale per il trasduttore a 1 MHz.

Trasduttore 3 MHz, T=22.6 °C, 100% continua			
V_{rms} (V) (mediato su 2 acquisizioni)	Distanza trasduttore-bersaglio (mm)	Potenza media (W)	Incertezza
14,13	10 (+0 con 2 acquisizioni)	4,724	±15%
14,28	10 (-λ/4 con 2 acquisizioni)		
14,395	8 (+0 con 2 acquisizioni)	4,598	±15%
14,4	8 (-λ/4 con 2 acquisizioni)		
14,41	3 (+0 con 2 acquisizioni)	4,494	±15%
14,46	3 (-λ/4 con 2 acquisizioni)		
50% continua			
7,549	10 (+0 con 2 acquisizioni)	1,334	±15%
7,5135	10 (-λ/4 con 2 acquisizioni)		
7,5735	8 (+0 con 2 acquisizioni)	1,337	±15%
7,6475	8 (-λ/4 con 2 acquisizioni)		
7,571	3 (+0 con 2 acquisizioni)	1,352	±15%
7,648	3 (-λ/4 con 2 acquisizioni)		
Potenza totale 3 MHz (100% continua)= 4,61 W ERA (stimato per trasduttore a 3 MHz)=1,8 cm²			

Tabella 3.2: risultati delle misure di potenza totale per il trasduttore a 3 MHz.

3.3 Caratterizzazione presso CNR-IDASC Roma

Con la finalità di valutare le caratteristiche emissive degli strumenti per fisioterapia e estetica a disposizione, i dispositivi sono stati caratterizzati ai sensi della norma CEI EN 61689-2009 “Ultrasuoni - Sistemi di fisioterapia - le specifiche dei campi e metodi di misura nella gamma di frequenza da 0,5 MHz a 5 MHz” per la determinazione dei parametri emissivi *ERA* e *BNR*, non noti dal costruttore. Tali misurazioni sono state effettuate presso il CNR IDASC Istituto di Acustica e sensoristica “Orso Maria Corbino”, Area della Ricerca di Tor Vergata, Roma, che possiede l’adeguata catena di misura.

3.3.1 Procedure sperimentali e set up di misura

Le misurazioni ai sensi della norma CEI EN 61689-2009, prevedono l'utilizzo di un idrofono ad ago, cioè un microfono progettato per essere usato sott'acqua, che sfrutta l'effetto piezoelettrico ed è quindi in grado di convertire le onde acustiche in segnali elettrici, permettendo la misura della pressione acustica e l'analisi delle sue variazioni nello spazio e nel tempo.

L'idrofono è dotato di un elemento sensibile posto sulla punta dell'ago. Il materiale di cui è costituito è un polimero, Polivinildenfluoruro (PVDF) con impedenza acustica che può essere agevolmente adattata a quella dell'acqua.



Figura 3.3: idrofono ad ago

L'elemento sensibile ha la proprietà di generare un segnale proporzionale alla sollecitazione provocata su di esso dalla pressione istantanea dell'acqua.

Il campo acustico, determinato dal trasduttore ultrasonoro, è fortemente dipendente dalle caratteristiche della sorgente e dal setup sperimentale usato.

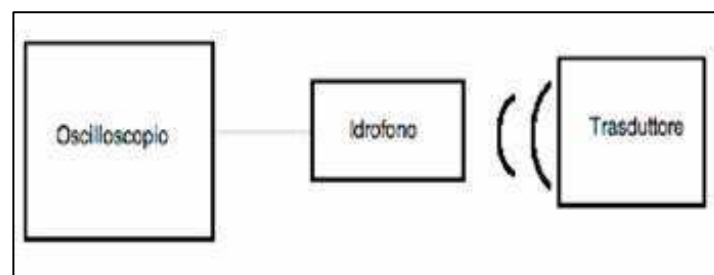


Figura 3.4: catena di misura per le misurazioni ai sensi della norma CEI EN 61689-2009

Posizionando l'idrofono a distanze opportune dal trasduttore e connettendo l'uscita dell'idrofono ad un oscilloscopio, secondo la rappresentazione schematica della catena di misura riportata in figura 3.4, è possibile visualizzare la variazione nel tempo della forma d'onda e quindi della differenza di potenziale, a seguito della deformazione dell'elemento sensibile dell'idrofono, prodotta dall'onda acustica incidente su di esso.

Infatti, i valori di voltaggio letti sull'oscilloscopio collegato all'idrofono, sono legati alla pressione acustica mediante la relazione

$$p = \frac{V}{M(f)} \quad (3.2)$$

dove $M(f)$ è la sensibilità in ricezione dello strumento, p la pressione acustica. $M(f)$ è funzione della frequenza ed è data dal rapporto tra il segnale in uscita e il segnale in ingresso dello strumento. Nel caso degli idrofoni, la sensibilità si rappresenta in decibel ed è riferita a quella di un sensore che presenti una risposta di 1 V per un segnale di 1 μ Pa. L'unità di misura convenzionale per la sensibilità di un idrofono è dBre 1V/ μ Pa dove re sta per "riferita".

Per la caratterizzazione del campo acustico, la sensibilità $M(f)$ può essere estrapolata da curve di taratura riportate in letteratura per idrofoni con caratteristiche simili a quelle dell'idrofono utilizzato alla frequenza considerata.

Il set up sperimentale per le misure presso il CNR-IDASC ha previsto l'utilizzo di una vasca di dimensioni 1,2 x 0,3 x 0,3 m riempita di acqua bidistillata, al fine di eliminare eventuali riverberazioni, equipaggiata con sistemi per il posizionamento dei dispositivi (idrofono e trasduttore, figura 3.5), in base alle indicazioni fornite nella norma CEI EN 61689-2009.

Il trasduttore e l'idrofono sono stati immersi nella vasca fino a circa a metà della sua profondità, con i loro assi principali allineati in posizione orizzontale; prima dell'inizio di ogni sessione di misura, è stato effettuato un controllo sull'allineamento dei due sistemi, utilizzando un puntatore laser in riflessione sulla faccia del trasduttore, successivamente mantenuto in una posizione fissa.

Inizialmente, per valutare la quantità di riverbero presente quando il sistema è operativo in modalità continua, è stata monitorata la pressione acustica in varie posizioni all'interno della vasca. Durante questi primi test è stata rilevata la presenza di rumore di riverberazione eccessivo rispetto al segnale diretto, anche quando è stato impiegato del materiale assorbente per ridurre le riflessioni dalle pareti del serbatoio. Le misure sono state pertanto eseguite in condizioni *echo-free*; il trasduttore non è stato collegato al suo generatore, ma è stato eccitato con un *tone-burst* sinusoidale, utilizzando così una energia totale ridotta rispetto alle normali condizioni di lavoro del trasduttore e tagliando le eventuali riflessioni. A tale scopo, i trasduttori sono stati collegati ad un amplificatore di potenza RF a sua volta guidato da un generatore di funzioni Agilent, impostato su un'opportuna frequenza, ampiezza 2,3 V picco-picco e lunghezza del burst tra gli 80 e i 120 cicli, a seconda del trasduttore, periodo di ripetizione pari a 0,001 s, garantendo così una porzione stazionaria del segnale acquisito. Per le misurazioni è stato impiegato un idrofono ad ago della Precision Acoustics con diametro di 0,5 mm e dotato di un preamplificatore immergibile, che presenta una sensibilità di 29 mV/MPa alle

frequenze di 1 e 3 MHz, collegato infine ad una scheda di acquisizione installata su un PC (12 bit, 10 Msamples/ s, input range utilizzato ± 1 V).

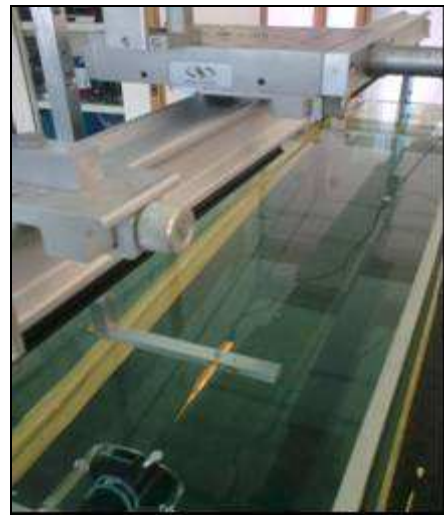


Figura 3.5: particolari del set up di misura presso il CNR.

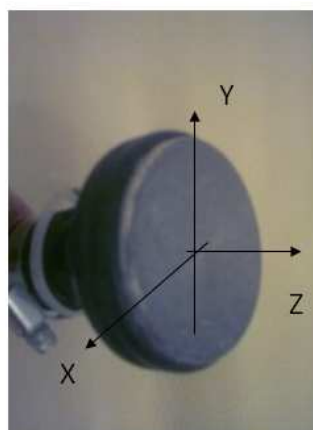


Figura 3.6: sistema di coordinate sul diffusore

Una procedura dedicata, realizzata in ambiente LabView, esegue il calcolo delle ampiezze *rms* su una media di 100 acquisizioni, filtrando il segnale tra le frequenze di taglio 500 kHz e 2 MHz per il trasduttore a 1 MHz, e tra 1 MHz e 4 MHz per il trasduttore a 3 MHz.

Per eliminare la presenza di un disturbo elettromagnetico, riscontrato nel corso delle misure, è stato necessario effettuare la messa a terra della faccia dei trasduttori attraverso il collegamento con il corpo dell'idrofono.

Le misure sono state eseguite nelle seguenti condizioni: temperatura dell'acqua: $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; temperatura ambiente: $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Ai sensi della norma CEI EN 61689-2009, sono stati seguiti i seguenti step, per entrambi i trasduttori a 1 e 3 MHz:

- 1) analisi della risposta in frequenza dei trasduttori e ricerca della frequenza di lavoro, calcolata come *arithmetic-mean acoustic-working frequency* f_{awf} ossia media aritmetica di due frequenze in corrispondenza delle quali l'ampiezza della pressione sonora è di 3 dB al di sotto del picco;
- 2) ricerca della posizione: dell'ultimo massimo z_N del campo di pressione; della pressione di picco z_P nel campo acustico, entrambi mediante la scansione lungo l'asse z orizzontale dei trasduttori ad intervalli di 2 mm a partire da 0,3 cm dalla faccia del trasduttore; ricerca del massimo del campo di pressione p_{max} ;
- 3) raster scan della pressione ultrasonora su 2 piani ortogonali all'asse principale dei trasduttori alle distanze 0,3 cm e z_N ;
- 4) calcolo dei parametri *ERA* e *BNR* ai sensi della norma 61689-2009.

3.3.2 Risultati del diffusore a 1 MHz

Inizialmente il diffusore è stato alimentato con *tone burst* sinusoidale alla sua frequenza "nominale" di 1 MHz ed è stato effettuato uno scan dell'*output* dello stesso in termini di tensione ai capi dell'idrofono lungo l'asse orizzontale z , a partire dalla distanza di 3 mm dal suo centro geometrico. In questa condizione è stata individuata grossolanamente la posizione dell'ultimo massimo z_N del trasduttore, oltre il quale il campo acustico tende a decadere: esso è stato individuato a circa 130 mm dal trasduttore.

In corrispondenza di questa posizione, è stata eseguita la misura della risposta in frequenza del trasduttore, valutata tra 900 kHz e 1,4 MHz a passi di 10 kHz, al fine di individuare la frequenza che massimizza il segnale acustico letto dall'idrofono. I risultati sono riportati in figura 3.7 a); dal grafico si evince che la risposta in frequenza per il trasduttore a 1 MHz non mostra un picco ben definito, ma presenta un andamento con diversi massimi locali.

Ai sensi della norma CEI EN 61689, la frequenza di lavoro del sistema risulta pari alla media aritmetica delle frequenze f_1 e f_2 in corrispondenza delle quali l'ampiezza della pressione acustica è 3 dB al di sotto del picco. Tale calcolo fornisce un valore della frequenza ottimale per il solo

diffusore, pari a 1,320 MHz. Va sottolineato che la frequenza così ottenuta risulta diversa da quella a cui il sistema lavora quando il trasduttore è collegato al suo generatore; infatti, dall'analisi del segnale di *output* del suo generatore, risulta una frequenza di lavoro centrata a 1,040 MHz, corrispondente invece nella risposta in frequenza di figura 3.7, ad un massimo relativo.

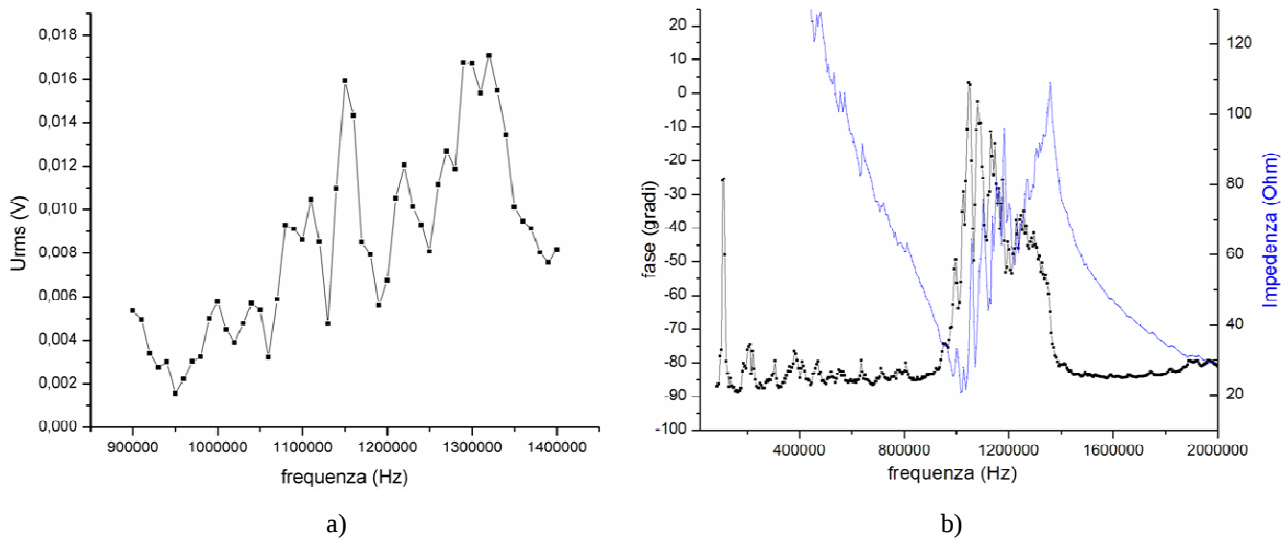


Figura 3.7: (a) risposta in frequenza misurata in z_N ; (b) impedenza misurata con analizzatore HP 4194°.

Per confermare tale risultato, si è misurata l'impedenza del trasduttore (ampiezza e fase) mediante HP 4194 Impedance/Gain Phase Analyzer. In figura 3.7 b) quest'ultima misura è riportata in un intervallo di frequenza tra 1 kHz e 2 MHz, mostrando la corrispondenza con la misura con idrofono e la presenza di un ulteriore picco di risonanza alle basse frequenze.

Trasduttore	Frequenza operativa del sistema trasduttore+generatore	Frequenza ottimale di lavoro f_{awf} per il solo trasduttore
1 MHz	1,040 MHz	1,320 MHz

Tabella 3.3: risultati della risposta in frequenza del trasduttore a 1 MHz.

Si è pertanto fissata la frequenza del segnale sinusoidale di eccitazione del trasduttore a 1,320 MHz, che costituisce la frequenza di risonanza ottimale a cui lavora il diffusore a 1 MHz, ed è stata eseguita la scansione della tensione registrata ai capi dell'idrofono lungo l'asse z principale della testa emittente, a passi di 2 mm a partire dal centro geometrico del trasduttore, alla distanza di 0,3 cm dalla faccia del trasduttore; tale procedura è stata effettuata per individuare in maniera precisa la posizione della tensione rms di picco nell'intero campo acustico e quella della tensione a cui corrisponde l'ultimo massimo z_N .

In figura 3.8 è mostrato l'andamento del campo di pressione lungo l'asse z del trasduttore, che consente di verificare le posizioni dei massimi e dei minimi con quelle previste dalla teoria. I

risultati mostrano che l'ultimo massimo z_N per il trasduttore a 1 MHz è poco marcato e posizionato alla distanza di circa 13 cm dal diffusore; si è scelto pertanto di posizionare l'ultimo massimo z_N in corrispondenza del dato teorico, che fornisce una posizione di z_N pari a 136,6 mm dal diffusore per una frequenza di eccitazione pari a 1,320 MHz.

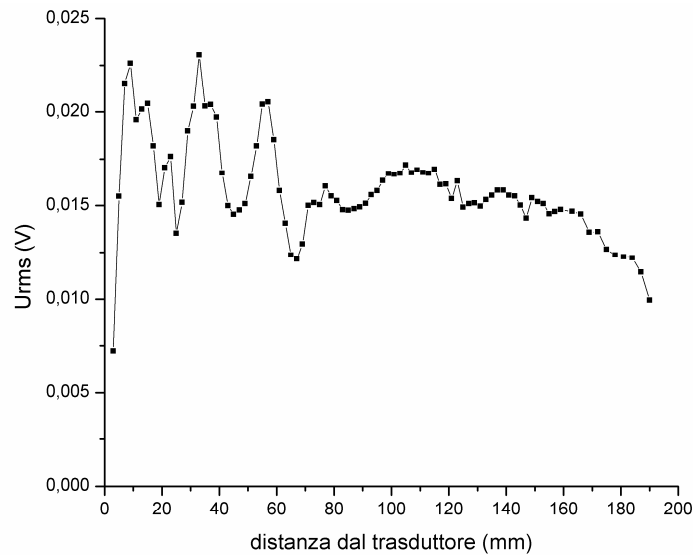


Figura 3.8: valore rms della tensione, lungo l'asse z , in funzione della distanza dal trasduttore per $f=1,320$ MHz.

Inoltre, è stato determinato il valore rms massimo della tensione ($U_{\max}$ (rms)), utile per calcolare la pressione acustica massima nell'intero campo acustico e il parametro BNR , pari a 0,028329 V, posizionato a circa 33 mm dal diffusore.

Le figure 3.9 e 3.10 mostrano i raster scan 2D della tensione U_{rms} (V) misurata e 3D della pressione in dB calcolata sul piano ortogonale all'asse z del trasduttore alla distanza da questo di 0,3 cm, per una frequenza del segnale di eccitazione del trasduttore di 1,320 MHz.

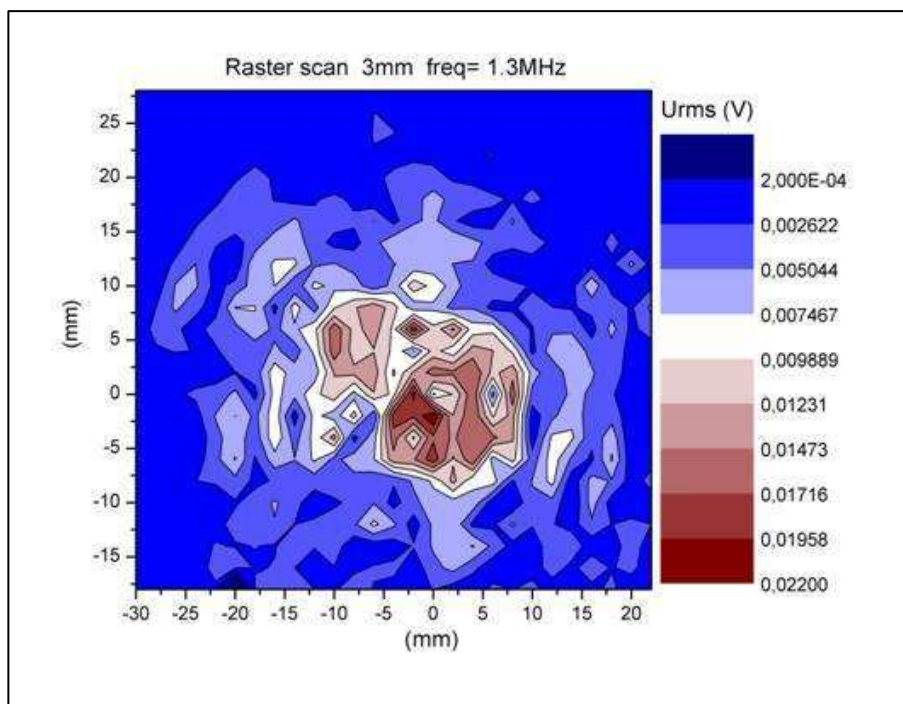


Figura 3.9: raster scan 2D: tensione rms ai capi dell'idrofono misurata sul piano ortogonale all'asse di propagazione del fascio a $z=0,3$ cm dal trasduttore; frequenza=1,320 MHz

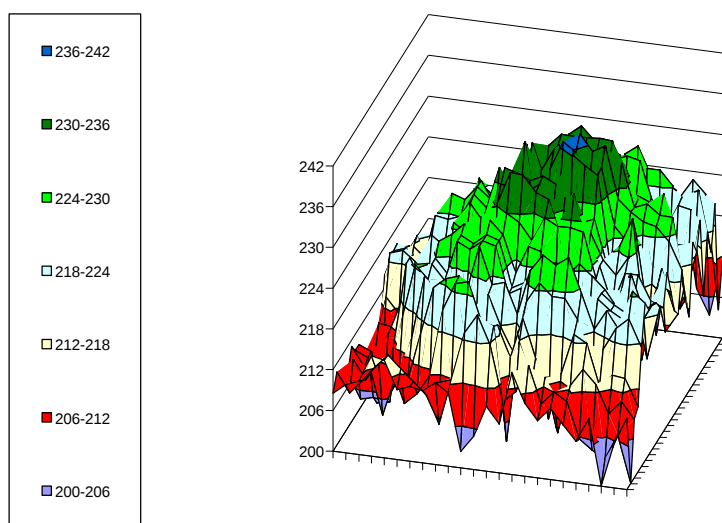


Figura 3.10: raster scan 3D: pressione in dB calcolata sul piano ortogonale all'asse di propagazione del fascio a $z=0,3$ cm dal trasduttore; frequenza=1,320 MHz.

Le figure 3.11 e 3.12 mostrano gli stessi parametri di cui sopra su un piano ortogonale all'asse z del trasduttore, alla distanza di 13,7 cm, corrispondente alla posizione dell'ultimo massimo assiale z_N .

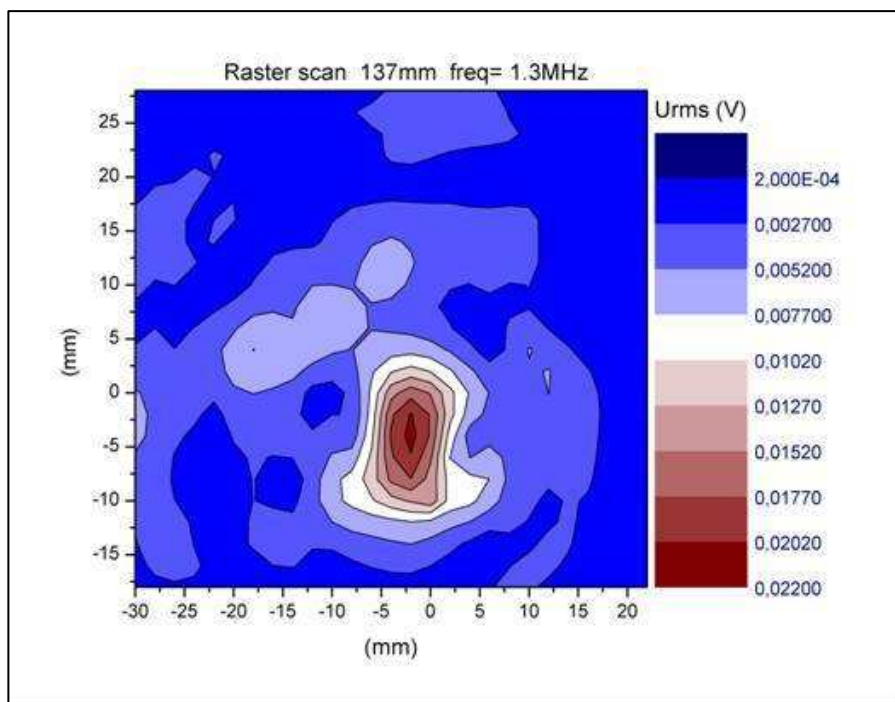


Figura 3.11: raster scan 2D: tensione rms ai capi dell'idrofono misurata sul piano ortogonale all'asse di propagazione del fascio a $z=13,7$ cm dal trasduttore; frequenza=1,320 MHz.

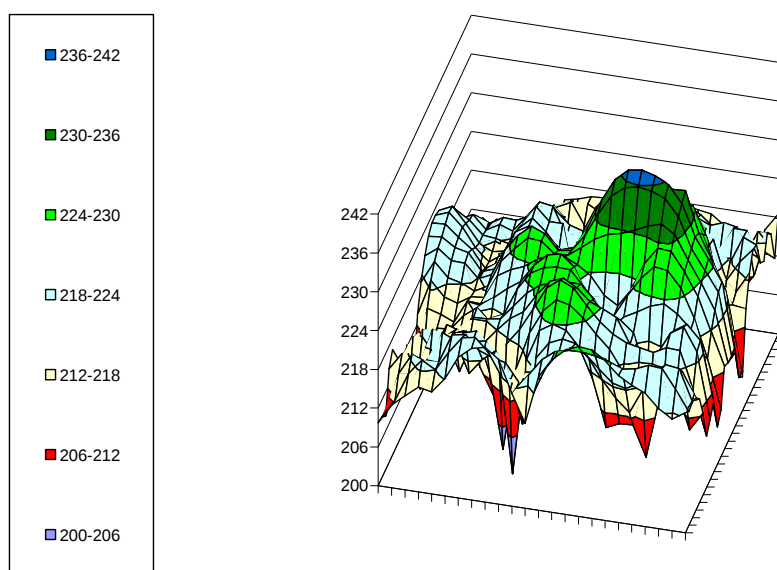


Figura 3.12: raster scan 3D: pressione in dB calcolata sul piano ortogonale all'asse di propagazione del fascio a $z=13,7$ cm dal trasduttore; frequenza=1,320 MHz.

Si evidenzia un lieve errore di centratura del diffusore sul raster scan corrispondente all'ultimo massimo.

In tabella 3.4 sono riportati i risultati delle misure con idrofono per il trasduttore alimentato alla frequenza di 1,320 MHz.

	Trasduttore 1 MHz	Incertezza
Frequenza ottimale di lavoro del diffusore	1,320 MHz	$\pm 0,00001$ MHz
Posizione dell'ultimo massimo assiale	$z_N = 13,7$ cm	$\pm 0,1$ cm
Beam cross sectional area A_{BCS}	$4,28 \text{ cm}^2$	$\pm 20\%$
Area effettiva radiante ERA	$5,8 \text{ cm}^2$	$\pm 20\%$
Beam non uniformity ratio BNR	7,06	$\pm 30\%$

Tabella 3.4: risultati per il trasduttore a 1 MHz, frequenza 1,320 MHz.

Il risultato così ottenuto mostra che il valore di BNR per il trasduttore che lavora a 1,320 MHz rientra nell'istogramma dei valori forniti dalla norma, individuando un trasduttore qualitativamente accettabile.

Per valutare il comportamento del trasduttore nelle sue condizioni reali di funzionamento, ossia quando è collegato al suo generatore, la medesima procedura precedentemente descritta è stata ripetuta eccitando il trasduttore con un *burst* sinusoidale alla frequenza di 1,040 MHz, che è quella a cui lo fa effettivamente lavorare il suo generatore. In figura 3.13 è quindi riportato l'andamento del campo di pressione lungo l'asse z del trasduttore eccitato alla frequenza di 1,040 MHz.

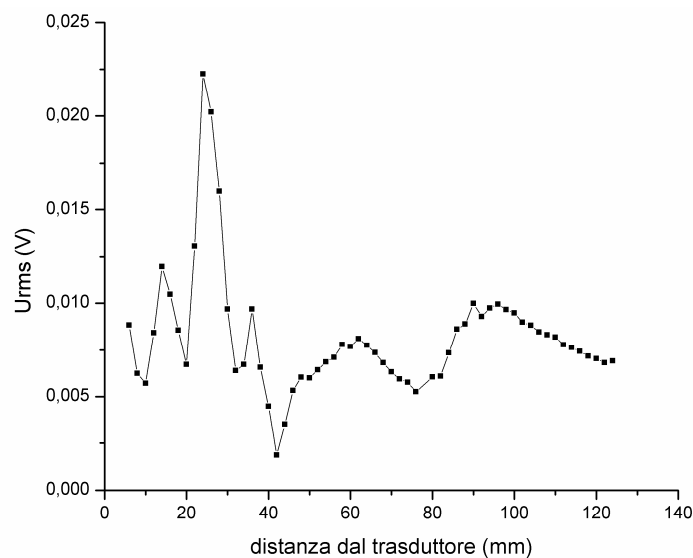


Figura 3.13: valore rms della tensione, lungo l'asse z , in funzione della distanza dal trasduttore per $f=1,040$ MHz.

Nella figura 3.14 sono riportati i raster scan a 3 mm dal trasduttore e in corrispondenza di z_N , individuato per la frequenza di eccitazione di 1,040 MHz a 9,6 cm dalla faccia del trasduttore.

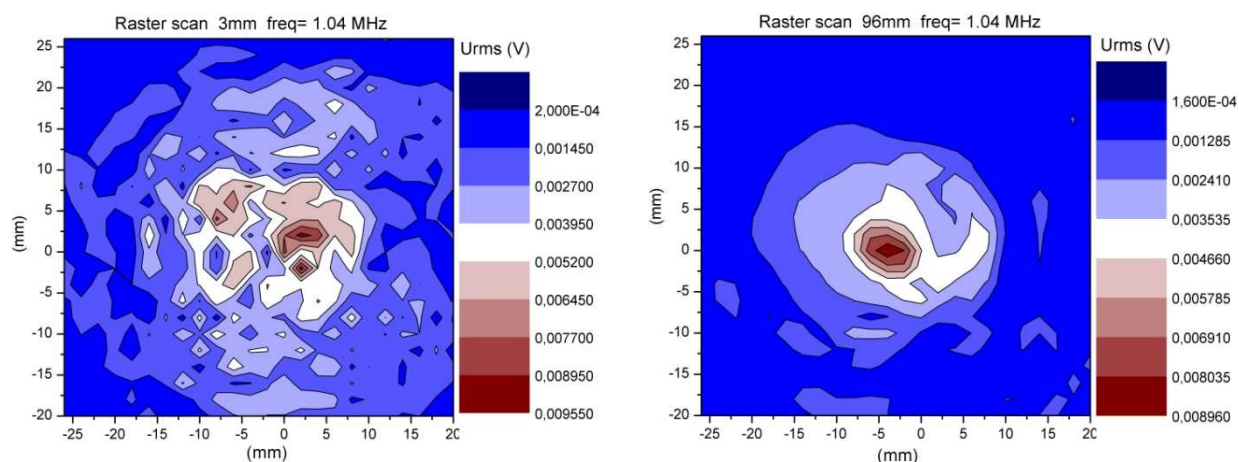


Figura 3.14: raster scan a $z = 0,3$ cm e a $z_N = 9,6$ cm dal trasduttore; frequenza=1,040 MHz.

In tabella 3.5 sono riportati i risultati delle misure con idrofono per il trasduttore alimentato con un segnale alla frequenza operativa di lavoro del sistema diffusore più idrofono, pari a 1,040 MHz.

In questo caso, i risultati di tabella 3.5 mostrano un comportamento anomalo del sistema, che presenta valori di BNR al di fuori del range specificato dalla norma ($BNR=36,85$). In particolare, il diffusore a 1 MHz presenta valori ottimali dei parametri di cui alla norma CEI EN 61689-2009 per una frequenza diversa da quella fornitagli dal suo generatore (vedasi tabella 3.4). La conseguenza è quella di aumentare il valore di BNR , che risulta maggiore di quello accettato dalla norma.

	Trasduttore 1 MHz	Incertezza
Frequenza operativa di lavoro del sistema diffusore+generatore	1,040 MHz	$\pm 0,00001$ MHz
Posizione dell'ultimo massimo assiale	$z_N = 9,6$ cm	$\pm 0,1$ cm
Beam cross sectional area A_{BCS}	6,44 cm ²	$\pm 20\%$
Area effettiva radiante ERA	8,72 cm ²	$\pm 20\%$
Beam non uniformity ratio BNR	36,85	$\pm 30\%$

Tabella 3.5: risultati per il trasduttore a 1 MHz, frequenza 1,040 MHz.

Considerando l'impiego di tali dispositivi per trattamenti fisioterapici, quanto riscontrato sperimentalmente richiede particolare attenzione per valutare gli effetti di un disaccordo in frequenza tra il diffusore e il suo generatore.

In figura 3.15 è riportato il confronto dei due raster scan a 0,3 cm dalla faccia del trasduttore, alle 2 frequenze indagate ossia 1,04 MHz e 1,320 MHz: si osserva una maggiore irregolarità del campo di pressione prodotto alla frequenza di 1,040 MHz, accompagnato, tuttavia, da un complessivo abbassamento del livello di pressione. Ciò potrebbe essere legato ad una ridotta efficacia del

trattamento stesso, ottenuta facendo lavorare il diffusore ad una frequenza differente rispetto a quella di risonanza del trasduttore piezoelettrico.

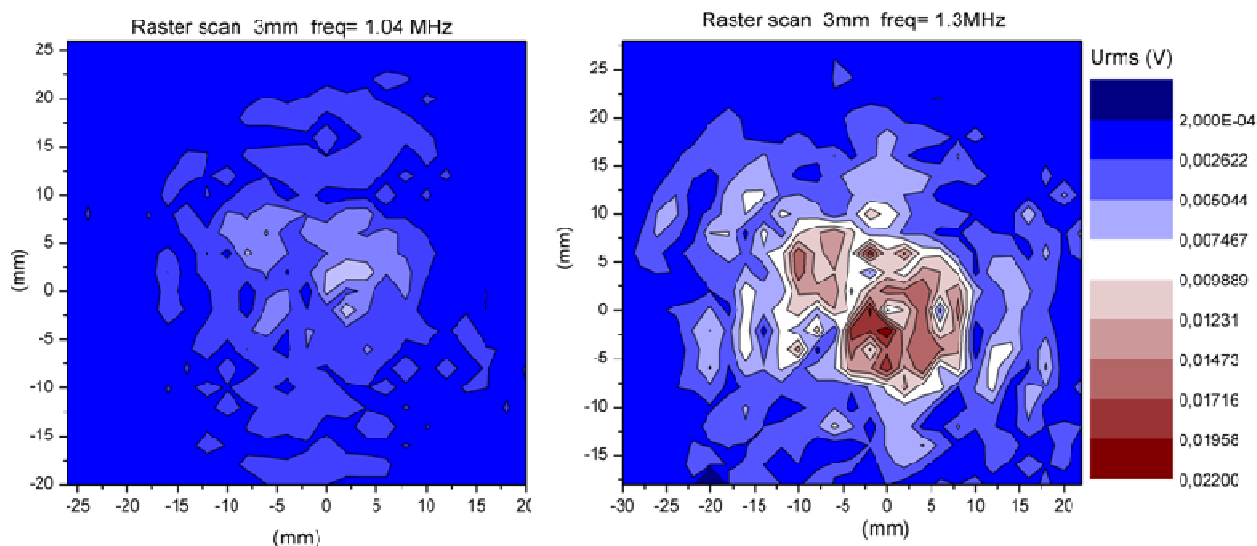


Figura 3.15: confronto tra i raster scan a 0,3 cm per $f = 1,040$ MHz e 1,320 MHz.

Come precedentemente riportato, su questo sistema è stata effettuata presso INRIM Torino, la misurazione della potenza totale con bilancia a forza di radiazione. Nota la potenza totale e noto il valore del parametro *ERA*, ottenuto attraverso misure sperimentali e calcoli ai sensi della norma CEI EN 61689-2009, è possibile calcolare il valore dell'intensità effettiva generata dal trasduttore, come rapporto tra potenza emessa e area effettiva radiante; tale calcolo è stato effettuato a partire dai due diversi valori dell'*ERA*, ottenuti facendo lavorare il diffusore rispettivamente alla frequenza propria di risonanza e alla frequenza del suo generatore. I risultati sono riportati in tabella 3.6.

Frequenza di lavoro	1,320 MHz	1,040 MHz
Area effettiva radiante <i>ERA</i>	5,8 cm ²	8,72 cm ²
Beam non uniformity ratio <i>BNR</i>	7,06	36,85
Potenza	6,6 W	
Intensità effettiva	1,14 W/cm ²	0,76 W/cm ²
Limite massimo di Intensità effettiva dichiarato dal costruttore	2,5 W/cm ²	

Tabella 3.6: risultati del confronto in termini di intensità emessa tra le due frequenze di eccitazione del trasduttore.

Si osserva che l'intensità effettivamente emessa è ben al di sotto dei limiti massimi dichiarati dal costruttore (2,5 W/cm²), sia che il trasduttore lavori alla frequenza di 1,320 MHz (1,14 W/cm²), sia alla frequenza di 1,040 MHz (0,76 W/cm²). Alla luce dei bassi livelli di intensità effettiva calcolati,

i risultati sollevano dubbi in merito all'effettiva efficacia del trattamento eseguito nelle condizioni sperimentali precedentemente descritte.

3.3.3 Risultati del diffusore a 3 MHz

La medesima procedura è stata eseguita anche per la caratterizzazione del diffusore operante a 3 MHz.

L'andamento della risposta in frequenza di questo secondo trasduttore, riportata in figura 3.16, è stata effettuata posizionando l'idrofono in corrispondenza della posizione dell'ultimo massimo del trasduttore, individuata in modo orientativo a circa 320 mm dal trasduttore, e scansionando in frequenza da 2900 kHz a 3300 kHz a passi di 10 kHz.

Come è possibile osservare dalla figura 3.16, la risposta in frequenza di questo secondo trasduttore ha evidenziato un picco con frequenza centrata attorno a 3,158 MHz (f_{awf}).

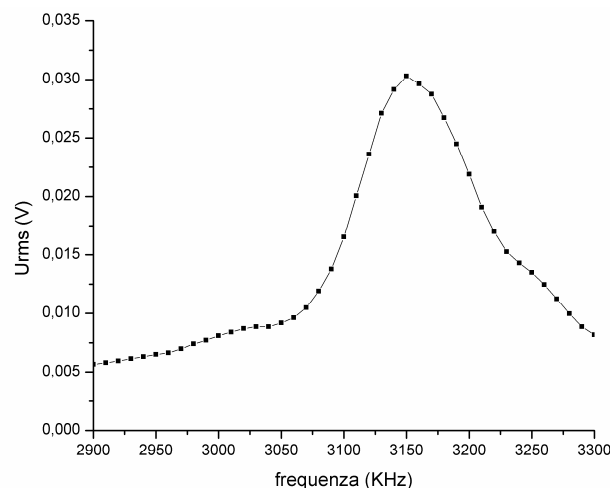


Figura 3.16: risposta in frequenza del trasduttore a 3 MHz alla posizione z_N .

Anche in questo caso, la frequenza di risonanza del trasduttore risulta diversa da quella ottenuta quando il trasduttore è collegato al suo generatore; infatti, dall'analisi del segnale di *output* del suo generatore, risulta una frequenza di lavoro centrata a 3,1 MHz, leggermente inferiore rispetto alla frequenza di risonanza del diffusore.

Trasduttore	Frequenza operativa del sistema diffusore+generatore	Frequenza ottimale di lavoro f_{awf} per il solo trasduttore
3 MHz	3,1 MHz	3,158 MHz

Tabella 3.7: risultati della risposta in frequenza del trasduttore a 3 MHz.

In figura 3.17 è mostrato l'andamento del campo di pressione lungo l'asse z , ottenuto per la frequenza di eccitazione del trasduttore pari a 3,158 MHz, verificando le posizioni dei massimi e dei minimi con quelle previste dalla teoria.

I risultati mostrano che l'ultimo massimo z_N per il trasduttore a 3 MHz, è posizionato a circa 38,5 cm dal diffusore; il risultato ottenuto è sufficientemente in accordo con il dato teorico, che fornisce una posizione di z_N pari a 33,25 cm dal diffusore per una frequenza di eccitazione pari a 3,158 MHz.

La tensione nel massimo ($U_{\max}$ (rms)), utile per calcolare la pressione acustica massima nell'intero campo acustico $p_{\max}$ e quindi il parametro BNR , è risultata pari a 0,027706 V, posizionato a circa 12,1 cm dal diffusore.

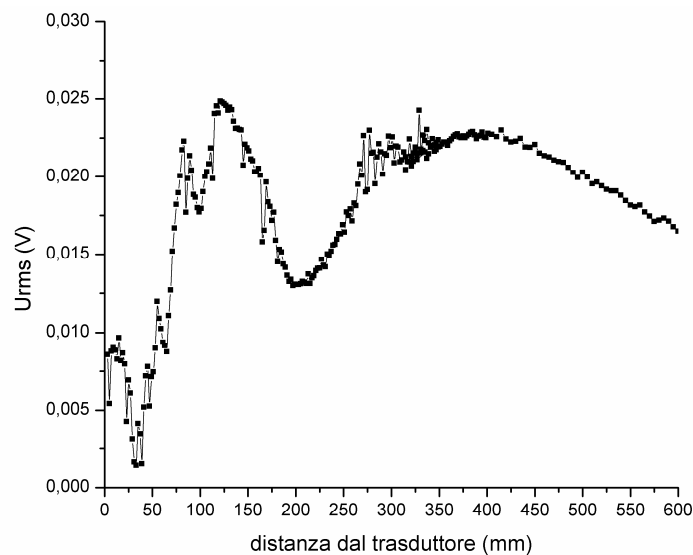


Figura 3.17: ampiezza rms in funzione della distanza dal trasduttore, lungo l'asse z , per $f=3,158$ MHz.

Le figure 3.18 e 3.19 mostrano i raster scan 2D della tensione U_{rms} (V) misurata e 3D della pressione in dB calcolata sul piano ortogonale all'asse z del trasduttore alla distanza da questo di 0,3 cm, ottenuti eccitando il trasduttore con un segnale alla frequenza di risonanza del trasduttore ossia 3,158 MHz.

Le figure 3.20 e 3.21 mostrano gli stessi su un piano ortogonale all'asse z del trasduttore alla distanza di 38,5 cm, corrispondente alla posizione dell'ultimo massimo assiale z_N .

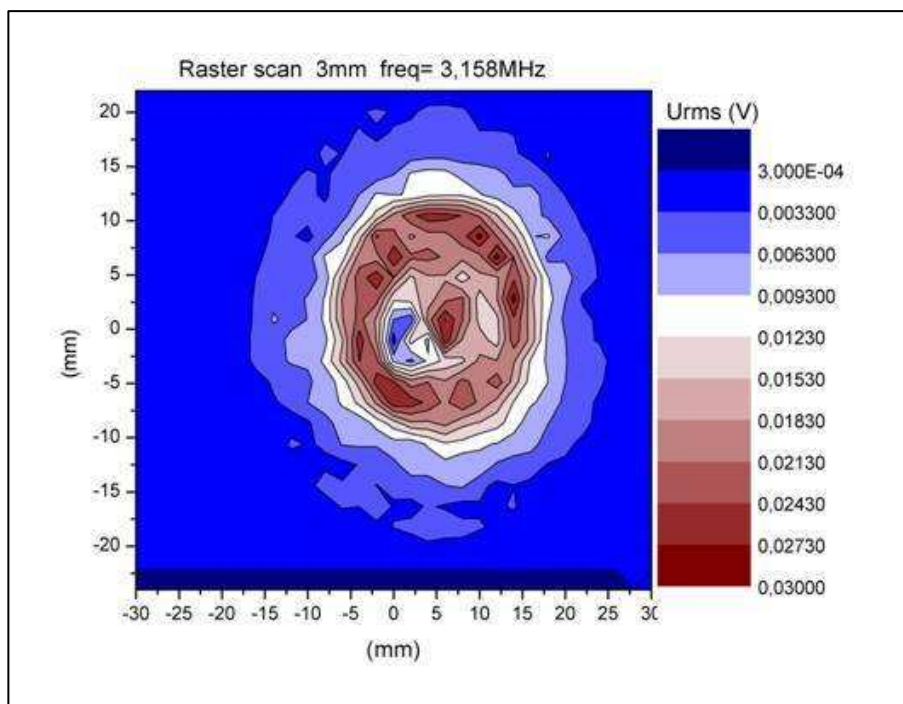


Figura 3.18: raster scan 2D: tensione rms ai capi dell'idrofono misurata sul piano ortogonale all'asse di propagazione del fascio a $z=0,3$ cm dal trasduttore $f=3,158$ MHz.

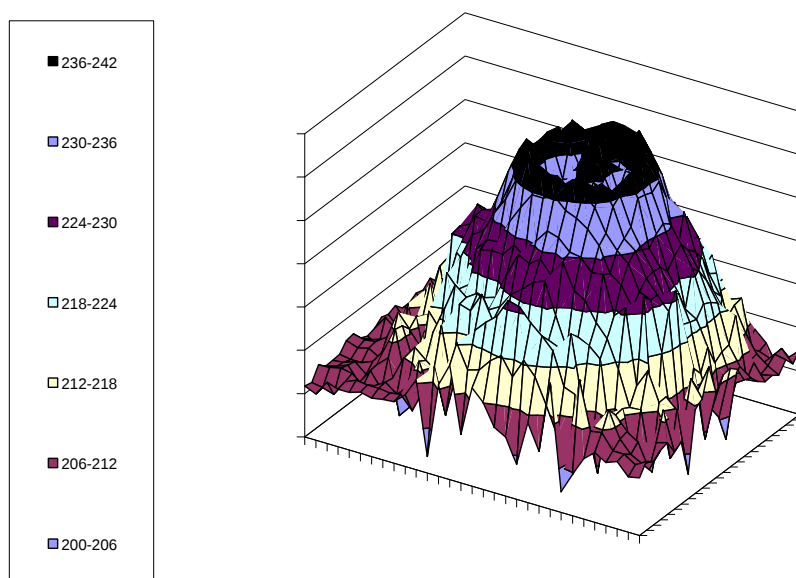


Figura 3.19: raster scan 3D: pressione in dB calcolata sul piano ortogonale all'asse di propagazione del fascio a $z=0,3$ cm dal trasduttore $f=3,158$ MHz.

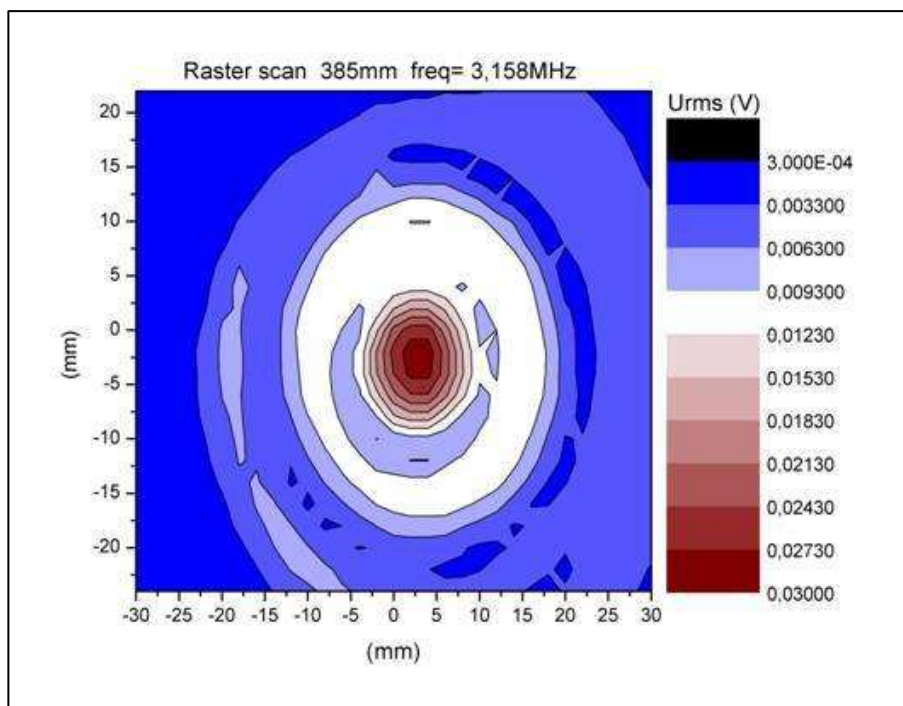


Figura 3.20: raster scan 2D: tensione rms ai capi dell'idrofono misurata sul piano ortogonale all'asse di propagazione del fascio a $z=38,5$ cm dal trasduttore $f=3,158$ MHz.

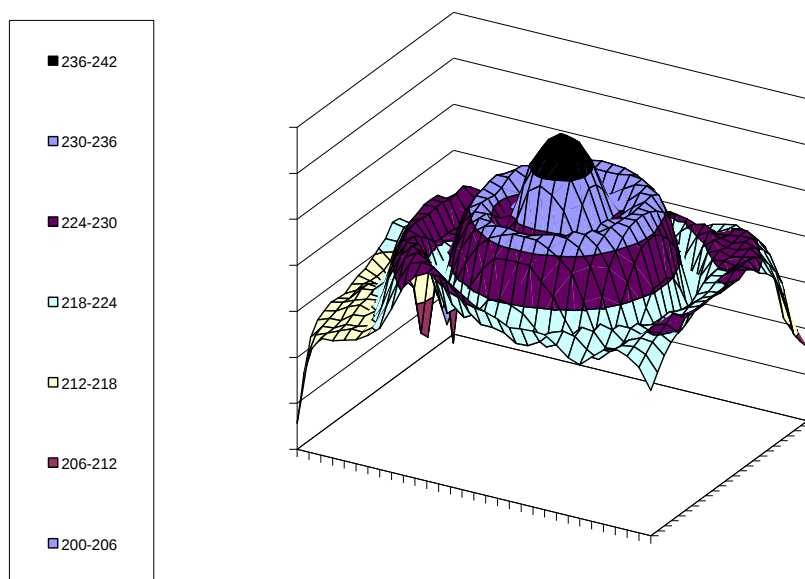


Figura 3.21: raster scan 3D: pressione in dB calcolata sul piano ortogonale all'asse di propagazione del fascio a $z=38,5$ cm dal trasduttore $f=3,158$ MHz

In tabella 3.8 sono riportati i risultati delle misure con idrofono per il trasduttore alimentato alla frequenza di 3,158 MHz. Il risultato così ottenuto mostra che, in questo caso, il BNR rientra nell'istogramma dei valori forniti dalla norma, individuando un trasduttore qualitativamente accettabile.

	Trasduttore 3 MHz	Incertezza
Frequenza ottimale di lavoro del diffusore	3,158 MHz	$\pm 0,00001$ MHz
Posizione dell'ultimo massimo assiale	$z_N=38,5$ cm	$\pm 0,1$ cm
Beam cross sectional area A_{BCS}	$3,52 \text{ cm}^2$	$\pm 20\%$
Area effettiva radiante ERA	$4,77 \text{ cm}^2$	$\pm 20\%$
Beam non uniformity ratio BNR	2,20	$\pm 30\%$

Tabella 3.8: risultati per il trasduttore a 3 MHz, frequenza 3,158 MHz.

Per valutare il comportamento del trasduttore nelle sue condizioni reali di funzionamento, ossia quando è collegato al suo generatore, la medesima procedura precedentemente descritta è stata ripetuta eccitando il trasduttore con un segnale alla frequenza di 3,1 MHz, che è quella a cui lo fa effettivamente lavorare il suo generatore.

In figura 3.22 è quindi riportato l'andamento del campo di pressione lungo l'asse z del trasduttore eccitato alla frequenza di 3,1 MHz.

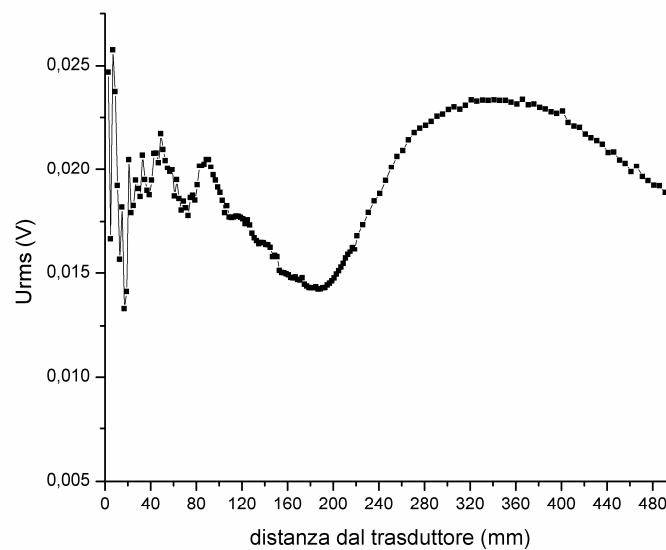


Figura 3.22: ampiezza rms in funzione della distanza dal trasduttore, lungo l'asse z per $f=3,1$ MHz.

Nella figura 3.23 sono riportati i raster scan a 3 mm e in corrispondenza di z_N , stavolta individuato a 330 mm dal trasduttore per una frequenza di eccitazione di 3,1 MHz.

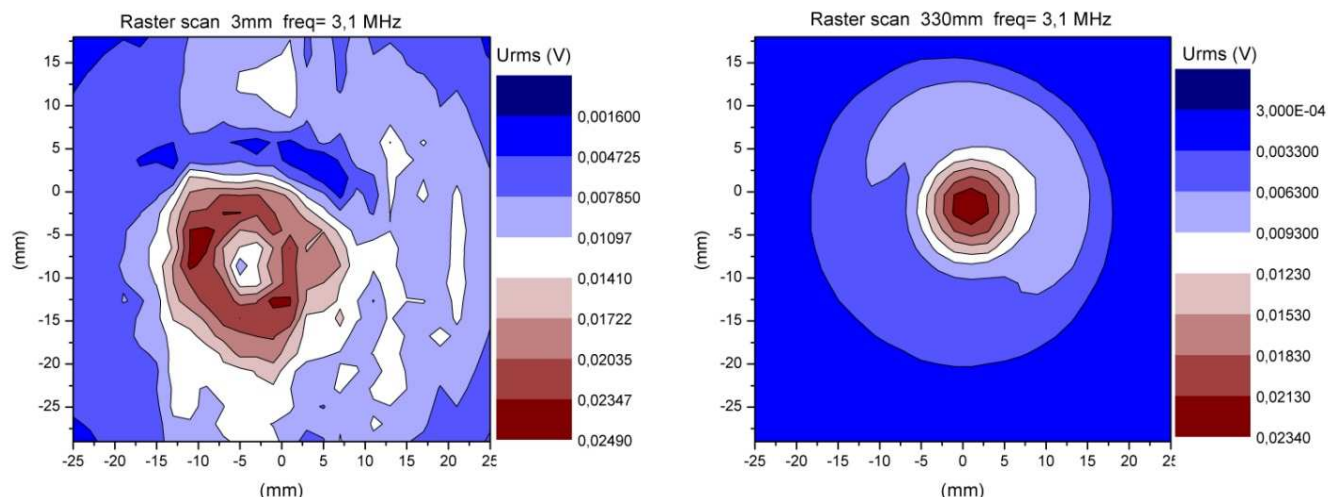


Figura 3.23: raster scan a $z=0,3$ cm e $z=3,3$ cm dal trasduttore alla frequenza di 3,1 MHz.

In tabella 3.9 sono riportati i risultati delle misure con idrofono per il trasduttore alimentato con un segnale alla frequenza operativa di lavoro del sistema trasduttore più generatore, pari a 3,1 MHz. Anche in questo caso, nonostante la leggera differenza tra la frequenza di risonanza del trasduttore (3,158 MHz) e la frequenza operativa di lavoro del sistema diffusore-generatore (3,1 MHz), si osserva una variazione dei parametri *ERA* e *BNR*. Infatti, per il trasduttore eccitato da un segnale alla frequenza di 3,1 MHz, il valore del parametro *BNR* risulta all'interno dei valori previsti dalla norma ($BNR=4,92$), ma l'area effettiva radiante *ERA* presenta un valore incoerente rispetto alle caratteristiche costruttive dello strumento ($14,79 \text{ cm}^2$).

	Trasduttore 3 MHz	Incertezza
Frequenza operativa di lavoro del sistema diffusore+generatore	3,1 MHz	$\pm 0,00001$ MHz
Posizione dell'ultimo massimo assiale	$z_N=33$ cm	$\pm 0,1$ cm
Beam cross sectional area A_{BCS}	$10,92 \text{ cm}^2$	$\pm 20\%$
Area effettiva radiante <i>ERA</i>	$14,79 \text{ cm}^2$	$\pm 20\%$
Beam non uniformity ratio <i>BNR</i>	4,92	$\pm 30\%$

Tabella 3.9: risultati per il trasduttore a 3 MHz, frequenza 3.1 MHz.

Considerando l'impiego di tali dispositivi per trattamenti estetici, quanto riscontrato sperimentalmente richiede particolare attenzione per valutare gli effetti nonché l'efficacia del trattamento stesso.

In figura 3.24 è riportato il confronto dei due raster scan a 0,3 cm dalla faccia del trasduttore, alle 2 frequenze indagate ossia 3,1 MHz e 3,158 MHz: si osserva una maggiore irregolarità del campo di pressione prodotto alla frequenza di 3,1 MHz accompagnato, tuttavia, da una complessivo

abbassamento del livello di pressione, anche se non così evidente come nel caso del trasduttore ad 1 MHz. Come specificato per il trasduttore a 1 MHz, ciò potrebbe essere causa di una ridotta efficacia del trattamento stesso.

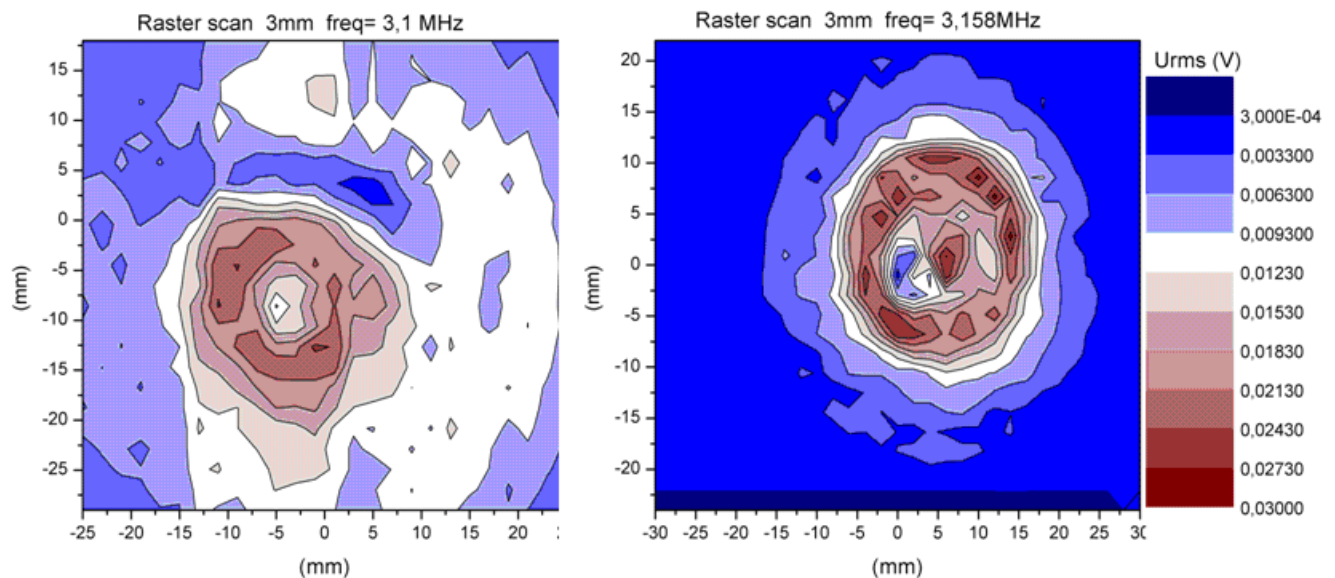


Figura 3.24: confronto tra i raster scan a 0,3 cm per $f = 3,1$ MHz e 3,158 MHz.

Come precedentemente riportato, anche su questo sistema è stata effettuata presso INRIM Torino la misurazione della potenza totale con bilancia a forza di radiazione. Nota la potenza totale e noto il valore del parametro *ERA*, è possibile calcolare il valore dell'intensità effettiva generata dal trasduttore, come rapporto tra potenza emessa e area effettiva radiante; tale calcolo è stato effettuato a partire dai due diversi valori dell'*ERA*, ottenuti per le due frequenze. I risultati sono riportati in tabella 3.10.

Frequenza di lavoro	3,158 MHz	3,1 MHz
Area effettiva radiante ERA	4,77 cm ²	14,79 cm ²
Beam non uniformity ratio BNR	2,2	4,92
Potenza	4,6 W	
Intensità effettiva	0,96 W/cm ²	0,31 W/cm ²
Limite massimo di intensità effettiva dichiarato dal costruttore	2,5 W/cm ²	

Tabella 3.10: risultati del confronto in termini di intensità emessa tra le due frequenze di eccitazione del trasduttore.

Si osserva che l'intensità effettivamente emessa sembrerebbe ben al di sotto dei limiti massimi dichiarati dal costruttore ($2,5 \text{ W/cm}^2$), sia che il trasduttore lavori alla frequenza di 3,158 MHz ($0,96 \text{ W/cm}^2$), sia alla frequenza di 3,1 MHz ($0,31 \text{ W/cm}^2$).

Anche in questo caso ci si pone interrogativi in merito all'effettiva efficacia del trattamento estetico operato nelle condizioni sperimentali precedentemente descritte.

3.4 Valutazione delle performances di due dispositivi ad ultrasuoni per fisioterapia ed estetica: conclusioni

I risultati della valutazione delle *performances* dei due dispositivi per fisioterapia ed estetica, hanno evidenziato innanzitutto l'assenza nelle caratteristiche tecniche degli stessi, fornite dal costruttore, di specifiche indicazioni sui parametri di *output* dei sistemi, con la sola eccezione dell'intensità effettiva massima; tale mancanza appare in accordo con le criticità evidenziate dal lavoro del Ministero della Salute del 2011, per quanto riguarda i sistemi per fisioterapia. Al contrario, la presenza dei suddetti parametri non risulta obbligatoria per le apparecchiature la cui destinazione d'uso è estetica, per la mancanza di norme tecniche specifiche in questo settore.

Da qui la necessità, già riportata nel precedente capitolo, di verificare che effettivamente i costruttori di apparecchi che emettono US per la fisioterapia, dichiarino nel manuale d'istruzioni e/o sugli strumenti, i valori dei parametri che influenzano direttamente la quantità di energia erogata dai trasduttori e l'*output*, nonché la necessità di colmare il vuoto normativo per il settore estetico.

Dai risultati sperimentali delle misurazioni effettuate sulle caratteristiche di *output* dei due trasduttori in esame, operanti alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz, rispettivamente usate per la fisioterapia e i trattamenti estetici, emerge chiaramente una certa variabilità nelle caratteristiche di emissione dei sistemi, fortemente dipendente dalla frequenza a cui i trasduttori vengono fatti lavorare. Infatti i risultati mostrano che i valori dei parametri, ERA e BNR, dai quali è possibile ricavare informazioni sulle proprietà emissive dei diffusori ad US, sono molto diversi se il trasduttore è caratterizzato da solo o se viene preso in considerazione l'intero sistema ossia il trasduttore stesso più la sua unità di controllo.

In particolare, i risultati mostrano che i diffusori si configurano come “*qualitativamente accettabili*” ai sensi della norma CEI EN 61689, mostrando valori ottimali di ERA e BNR, soltanto se vengono fatti lavorare alle loro frequenze di risonanza, peraltro diverse da quelle fornite dai loro rispettivi generatori; in caso contrario, la conseguenza, nel caso del diffusore ad 1 MHz, è quella di aumentare il BNR verso valori maggiori di quelli accettati dalla norma; nel caso del trasduttore a 3 MHz, è quella di fornire un valore incoerente per il parametro ERA. In entrambi i casi, tali risultati

richiedono una attenzione particolare per valutare gli eventuali effetti prodotti dai trattamenti fisioterapici ed estetici, nonchè l'efficacia degli stessi.

I risultati, pertanto, mostrano che un'analisi più approfondita sulle prestazioni di tali dispositivi, può essere fornita da un esame della risposta in frequenza dell'emettitore ad US più estesa di quanto si evince dalla norma stessa, e dalla ulteriore caratterizzazione del generatore. Sarebbe pertanto opportuno che venisse riportata nel manuale d'uso anche la risposta in frequenza del trasduttore, facendo attenzione che per il sistema integrato trasduttore/generatore ci sia accordo sulla frequenza di lavoro, valutando i requisiti tecnici del generatore perché il trasduttore possa effettivamente lavorare alla sua frequenza ottimale. Le prestazioni di tali dispositivi sembrerebbero infatti dipendere dall'insieme delle due unità e non è sufficiente studiare le proprietà del campo emesso dal solo diffusore senza aver verificato anche l'*output* del suo generatore.

Un'ampliamento dell'indagine su un più esteso numero di dispositivi, con verifica dei parametri di *output* eventualmente forniti dal costruttore e caratterizzazione sia dei singoli diffusori che del sistema nel suo insieme, è altamente raccomandato, al fine di concentrarsi sui principali aspetti critici per questo tipo di dispositivi attualmente sul mercato, ed a disposizione degli utenti, e di mettere in relazione questi dati con il livello di prestazione di tali apparecchiature in termini di rischi/benefici ed efficacia dei trattamenti.

CAPITOLO 4:

MATERIALI E METODI PER LO STUDIO DEGLI EFFETTI DEGLI ULTRASUONI SU LINEE CELLULARI

4.1 Linea cellulare NIH-3T3 e condizioni di coltura

Alla luce delle considerazioni fatte nel precedente capitolo, in merito alla necessità, a partire da una più approfondita conoscenza del funzionamento tecnico dei dispositivi emittenti US, di estendere la ricerca verso gli effetti dell'irradiazione ultrasonora sui sistemi biologici, si è proseguito nello studio degli effetti indotti dall'esposizione ad US, generati da apparecchi disponibili sul mercato e comunemente usati per la fisioterapia e l'estetica, operanti alle frequenze di 1 e 3 MHz, su campioni di cellule *in vitro*, provenienti dalla linea cellulare NIH-3T3, fibroblasti murini, che cresce in adesione, al variare dei parametri sperimentali ossia durata dell'esposizione e distanza campione-diffusore.

Le cellule NIH-3T3 provengono da una linea cellulare stabilita nel 1962 da due scienziati del Dipartimento di Patologia della University School of Medicine di New York (con NIH si intende la provenienza dei tessuti di topo da cui è stata generata la linea, “*National Institute of Health*” negli USA). Inizialmente le 3T3 sono state ottenute da embrioni di tessuto di topo, successivamente, sono divenute la linea cellulare standard per i fibroblasti (figura 4.1).



Figura 4.1: foto di un campione di fibroblasti NIH-3T3 non trattato

I fibroblasti sono le cellule più comuni di tessuto connettivo di animali, la cui principale funzione è mantenere l'integrità strutturale dei tessuti mediante la secrezione di precursori della matrice extracellulare. Infatti essi svolgono un ruolo determinante nella guarigione di una ferita, poiché un

danno ai tessuti stimola i fibroblasti e ne induce la mitosi. In particolare, la linea cellulare NIH-3T3 viene utilizzata per effettuare trasfezioni mediante virus.

I fibroblasti sono largamente utilizzati perché non sono cellule tumorali, ma cellule selezionate da tessuto sano, immortalizzate, facilmente coltivabili in laboratorio, con la caratteristica di crescere in adesione a superfici di flasks, piastre petri, in monostrato. Come la maggior parte delle colture cellulari primarie, hanno una durata limitata: dopo un certo numero di divisioni, sono soggette al processo di senescenza e smettono di dividersi.

Le cellule sono state coltivate in incubatore alla temperatura di 37°C e atmosfera modificata con l'aggiunta del 5% di anidride carbonica, con lo scopo di mantenere costante il pH dei campioni incubati.

Per i fibroblasti si è utilizzato un terreno di coltura denominato DMEM (Doulbecco's Modified Eagle's Medium), con l'aggiunta del 10% di Siero Fetale Bovino (SFB), Streptomicina Penicillina (1%) e L-Glutammina (1%).

Per la preparazione di campioni in adesione, si è dovuto tener conto del fatto che cellule di questo tipo devono essere staccate dal contenitore di coltura ad ogni passaggio, ossia in ogni step necessario per portare avanti la linea cellulare. Questa operazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di un enzima proteolitico, in grado cioè di ridurre le proteine a polipeptidi più piccoli, la Tripsina/EDTA dove EDTA sta per acido etilendiamminotetraacetico che aumenta l'attività della tripsina rimuovendo calcio e magnesio dalla superficie delle cellule.

Il protocollo utilizzato per effettuare i passaggi è il seguente:

- 1) si aspira il terreno di coltura dalla flask in cui crescono le cellule;
- 2) si effettua un lavaggio con una quantità di PBS (Phosphate Buffered Saline), una soluzione salina in grado di non alterare la pressione osmotica delle cellule e di mantenere costante il pH;
- 3) si aggiunge un volume di tripsina necessario per coprire il monostrato (da 500 µl a 1 ml a seconda delle dimensioni della flask), si muove la piastra per assicurare un'omogenea distribuzione, si incuba a 37°C per 1 - 2 minuti;
- 4) una volta staccate, le cellule vengono risospese nel terreno di coltura;
- 5) si spipettano le cellule per rompere meccanicamente gli eventuali agglomerati e si procede ad aliquotare le quantità cellulari necessarie per il passaggio.

Dopo alcune prove preliminari, si è deciso di preparare i campioni partendo sempre da una situazione di confluenza per la coltura. Una coltura di cellule adese raggiunge la confluenza quando il monostrato è compatto su tutto il recipiente di coltura. I campioni sono stati preparati sempre partendo da una situazione di confluenza, ma facendo attenzione a non portare mai la coltura nella fase in cui il campione cambia pH per l'eccessivo sfruttamento del terreno, fase che corrisponde ad

uno stato di latenza del ciclo cellulare (fase G_0) in cui le cellule escono temporaneamente dal ciclo. La necessità di avere misure su un insieme statistico di cellule, ha portato a mantenere la coltura sempre al di sotto di questa fase. I campioni per tutte le misure di questo lavoro sono stati fatti crescere in piastre petri di diametro 3,5 cm.

4.2 Esposizione agli ultrasuoni: descrizione del set up di esposizione e misura

Gli esperimenti di esposizione ad US di materiale biologico sono stati effettuati in una vasca in plexiglass di dimensioni 30x30x30 cm, realizzata con la possibilità di variare le condizioni di esposizione delle cellule al campo acustico.

In questo setup sperimentale, i trasduttori a 1 e 3 MHz sono stati posizionati sul fondo della vasca riempita di acqua bidistillata e mantenuta a temperatura ambiente. Una piastra con coperchio (capsula Petri), contenente la coltura cellulare, la cui superficie è di $9,6 \text{ cm}^2$, è stata posizionata a pelo dell'acqua e inserita per metà del suo spessore nel bagno, in linea con il trasduttore. La distanza tra la sorgente di US e la superficie della piastra (d'ora in poi denominata SSD= *ultrasonic source-dish surface distance*), indicata in figura 4.2 con d , è stata variata diminuendo/aumentando il livello dell'acqua.

La temperatura all'interno e all'esterno della capsula è stata monitorata mediante una termocoppia durante l'esposizione ultrasonora; l'aumento massimo della temperatura all'interno della petri è stato valutato in circa 2° C .

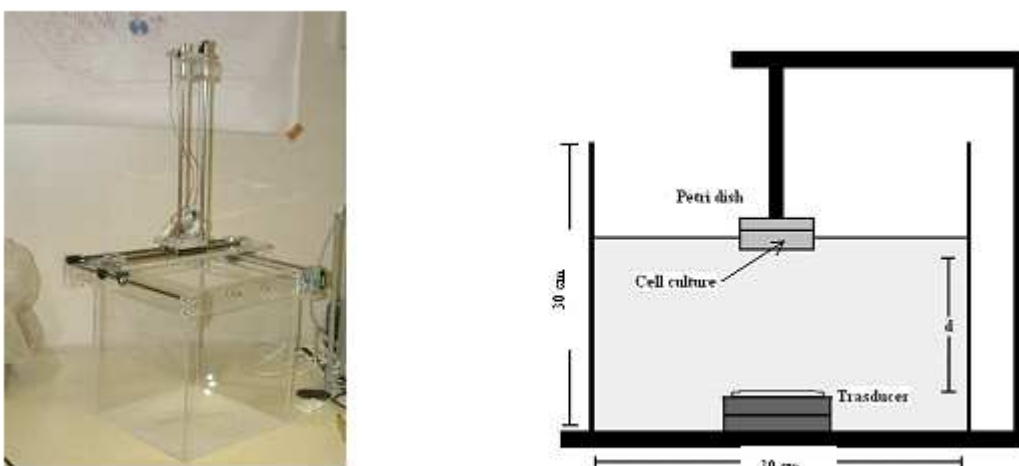


Figura 4.2: foto della vasca utilizzata e schema del set up sperimentale di esposizione

Per l'esposizione agli US, sono stati utilizzati due apparecchi, operanti alle frequenze di 1 e 3 MHz che consentono di lavorare in modalità continua e impulsata; quando si utilizza il generatore in

modalità continua, tutta la potenza indicata dal valore % sul display viene trasferita durante l'applicazione e il segnale a 1 o 3 MHz viene applicato senza interruzioni al diffusore; in questa modalità, gli strumenti possono lavorare nel range dal 10% al 100% della potenza massima.

In modalità pulsata, gli strumenti consentono di selezionare il *duty cycle* dell'onda, definito come il rapporto $d=T/\tau$, dove τ rappresenta il tempo in cui il generatore trasmette il segnale e T il periodo totale. I valori del *duty cycle* sono riportati in percentuale; se si utilizza il generatore in modalità pulsata *High*, il segnale viene erogato per la durata di 750 ms, seguiti da una pausa di 250 ms (figura 4.3); in questo modo, la potenza viene ridotta al 75%; anche in questa modalità, gli strumenti possono lavorare nel range dal 10% al 100% della potenza massima.

Per gli esperimenti di esposizione a 3 MHz, è stato utilizzato il modo pulsato in modalità *High* 100%; per quanto riguarda le esposizioni a 1 MHz, esse sono state effettuate sempre in modalità *High* ma al 75%: il distacco del monostrato dal fondo della petri con perdita del materiale cellulare dopo la sonicazione, osservato per esposizioni nella modalità 100% *High*, ha indotto a diminuire l'ampiezza dell'onda ultrasonora incidente sul campione biologico, fino ad ottenere una condizione adeguata per le osservazioni sperimentali, individuata appunto in 75% *High*.

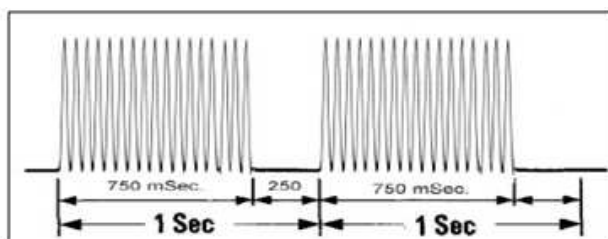


Figura 4.3: caratteristiche dell'impulso con duty cycle *High*.

4.3 Caratterizzazione del campo acustico prodotto dalle sorgenti di ultrasuoni

Il lavoro ha previsto la caratterizzazione del campo acustico prodotto dalle sorgenti degli US a 1 MHz e 3 MHz, attraverso: la misura della pressione acustica con idrofono libero e idrofono inserito nella capsula petri, riempita con PBS, in corrispondenza delle distanze SSD a cui sono stati esposti i campioni biologici; il calcolo dell'intensità del campo acustico generato dai diffusori e della quantità di energia incidente sulle cellule durante la sonicazione, che in questo lavoro abbiamo chiamato "*dose*" (J/cm^2), in termini di prodotto dell'intensità emessa dal trasduttore per il tempo di esposizione.

In accordo con le misure di pressione ultrasonora ai capi dell'idrofono libero, effettuate presso il CNR, a varie distanze trasduttore-idrofono, sono stati individuati i parametri più adeguati per le esposizioni dei campioni biologici, in termini di distanza campione-trasduttore SSD, identificati in

5, 10 e 15 cm; per ciascuna distanza campione-trasduttore, i campioni biologici sono stati sonicati per i tempi di 5, 15, 30, 45 e 60 minuti.



Figura 4.4: set up sperimentale per la caratterizzazione del campo acustico prodotto dal trasduttore.

Per la caratterizzazione è stato utilizzato un idrofono della Precision Acoustics con dimensioni dell'elemento sensibile PVDF pari a 1 mm, e sensibilità alla frequenza di 1 MHz pari a 1670,4 mV/MPa e sensibilità 958,2 mV/MPa alla frequenza di 3 MHz, entrambe riportate con una incertezza di misura pari al 14%.

Il segnale dell'idrofono, opportunamente preamplificato, è stato raccolto da un oscilloscopio e registrato.

I trasduttori sono stati fatti funzionare in modalità continua; in accordo con i set up sperimentali utilizzati nel corso delle esposizioni con i campioni biologici, il trasduttore a 3 MHz è stato fatto lavorare alla potenza massima erogabile (100%), quello a 1 MHz al 75%.

Conoscendo i valori di pressione acustica registrati dall'idrofono, ricavati dalla (3.2), è possibile calcolare l'intensità del campo acustico generato dal diffusore ultrasonoro; assumendo, infatti, che le onde che si propagano nel mezzo siano piane, si può esprimere l'intensità del campo acustico tramite la relazione:

$$I = p^2 / \rho c \quad (4.1)$$

dove p è la pressione acustica, ρ è la densità del mezzo e c la velocità del suono. La densità e la velocità del suono, considerati per il calcolo dell'intensità acustica, sono riferiti all'acqua alla temperatura di 20°C, e sono rispettivamente 1482,3 m/s, che corrisponde ad una lunghezza d'onda pari a 1,5 mm, mentre la densità del mezzo acquoso è $0,9982 \cdot 10^3 \text{ Kg/m}^3$.

I valori di pressione, utilizzati per calcolare l'intensità acustica, sono stati ottenuti misurando l'ampiezza maggiore in modulo della semionda negativa p. del segnale in uscita dall'idrofono.

In tabella 4.1 sono riportati, per i diffusori a 1 MHz 75% e 3 MHz, i valori della pressione acustica in MPa misurati ai capi dell'idrofono libero e della relativa intensità del campo acustico in W/cm^2 alle tre distanze campione-trasduttore indagate nel corso del presente lavoro:

Trasduttore - Idrofono libero				
	1 MHz 75%		3 MHz 100%	
SSD	Pressione (MPa)	Intensità del campo acustico (W/cm^2)	Pressione (MPa)	Intensità del campo acustico (W/cm^2)
5 cm	0,045	0,14	0,028	0,05
10 cm	0,044	0,13	0,019	0,02
15 cm	0,037	0,09	0,015	0,01

Tabella 4.1: pressione e intensità del campo acustico ai capi dell'idrofono libero per i due strumenti a 1 MHz e 3 MHz

All'interno della capsula petri, le misure con l'idrofono hanno rilevato l'attesa attenuazione acustica: in tabella 4.2 sono pertanto riportati i valori dell'intensità del campo acustico in petri (W/cm^2) alle tre distanze diffusore-idrofono, utilizzate nel corso delle esposizioni con i campioni biologici, alle due frequenze 1 MHz e 3 MHz:

	Trasduttore – Idrofono in petri	
	1 MHz 75%	3 MHz 100%
SSD	Intensità del campo acustico in petri (W/cm^2)	
5 cm	0,09	0,03
10 cm	0,08	0,01
15 cm	0,06	0,009

Tabella 4.2: intensità del campo acustico ai capi dell'idrofono in petri per i due strumenti operanti a 1 MHz e 3 MHz

Dalla tabella 4.2 si evince che l'intensità acustica nella capsula Petri si estende da $0,09 W/cm^2$ alla distanza di 5 cm per la frequenza di 1 MHz e scende progressivamente fino a $0,009 W/cm^2$ alla distanza di 15 cm per la frequenza di 3 MHz; i livelli di intensità per l'esposizione ad 1 MHz, in accordo con Krasovitski (2011), appaiono in prossimità della soglia della cavitazione, indicata in letteratura in $100 mW/cm^2$.

In figura 4.5 è riportata, al variare della distanza campione-trasduttore, l'intensità ultrasonora all'interno della capsula Petri per US alle frequenze di 3 MHz 100%, 1 MHz 75% e per altre percentuali della potenza massima ad 1 MHz (10%, 30%, 40%, 50%) investigate.

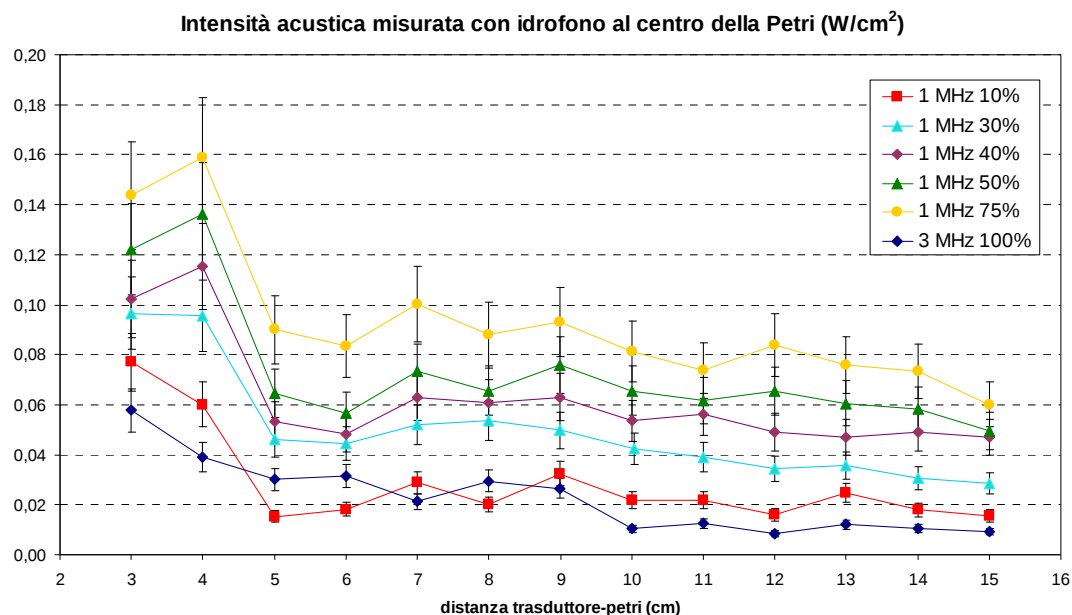


Figura 4.5: intensità acustica misurata con idrofono al centro della petri per le due frequenze 1 e 3 MHz a diverse percentuali della potenza massima.

Nota l'intensità sul campione, è possibile ricavare un parametro indicativo dell'energia del campo acustico che incide sul campione durante il processo di sonicazione (definita "dose" D (J/cm^2)), come prodotto dell'intensità del campo acustico (I) per il tempo di esposizione (t):

$$D (J/cm^2) = I \cdot t \quad (4.2)$$

Nelle tabelle 4.3 e 4.4 sono quindi riportati i calcoli della stima indicativa dell'intensità acustica incidente sul campione per il tempo di trattamento ("dose"), per entrambi gli strumenti (1 MHz modalità 75% High, e 3 MHz 100% High).

1 MHz 75% High			
Stima dell'energia incidente sul campione in Petri durante la sonicazione			
	Dose (J/cm^2) $\pm 14\%$		
Tempo (min)	5 cm	10 cm	15 cm
5	26,7	24,3	17,0
15	76,9	72,9	51,2
30	153,9	145,9	102,5
45	230,9	218,9	153,7
60	307,9	291,9	204,9

Tabella 4.3: "dose" stimata sul campione cellulare per lo strumento operante a 1 MHz 75% High

3 MHz 100% High			
Stima dell'energia incidente sul campione in Petri durante la sonicazione			
	Dose (J/cm²)±14%		
Tempo (min)	5 cm	10 cm	15 cm
5	9,9	4,6	2,6
15	29,9	13,7	7,9
30	59,9	27,4	15,9
45	89,9	41,1	23,8
60	119,8	54,8	31,8

Tabella 4.4: “dose” stimata sul campione cellulare per lo strumento operante a 3 MHz 100% *High*

Tali valori sono stati calcolati per le tre distanze di esposizione (SSD=5, 10, 15 cm) e per i 5 tempi di sonicazione (5, 15, 30, 45, 60 minuti).

4.4 Tecniche d'indagine sui campioni cellulari

Le tecniche sperimentali usate per valutare l'effetto prodotto dagli US sui campioni cellulari per esposizioni alle frequenze di 1 e 3 MHz sono: la spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FTIR), il test dei micronuclei, il test di vitalità, la microscopia a fluorescenza, la citofluorimetria a flusso, la microscopia confocale.

4.4.1 Spettroscopia infrarossa

La spettroscopia infrarossa studia i modi vibrazionali degli atomi di una molecola; infatti i sistemi molecolari, se sottoposti ad una radiazione elettromagnetica, risultano perturbati nei loro livelli vibrazionali e rotazionali. Le frequenze di questi modi sono caratteristiche dei legami formati tra gli atomi, dipendendo: dalle masse degli atomi coinvolti, dalla lunghezza dei legami, dalla forza del legame e in generale da tutti i parametri che costituiscono la struttura della molecola, permettendone quindi l'identificazione. Ogni gruppo funzionale ha infatti un assorbimento ad una precisa lunghezza d'onda e da questi assorbimenti specifici è possibile risalire ai componenti della molecola (figura 4.6).

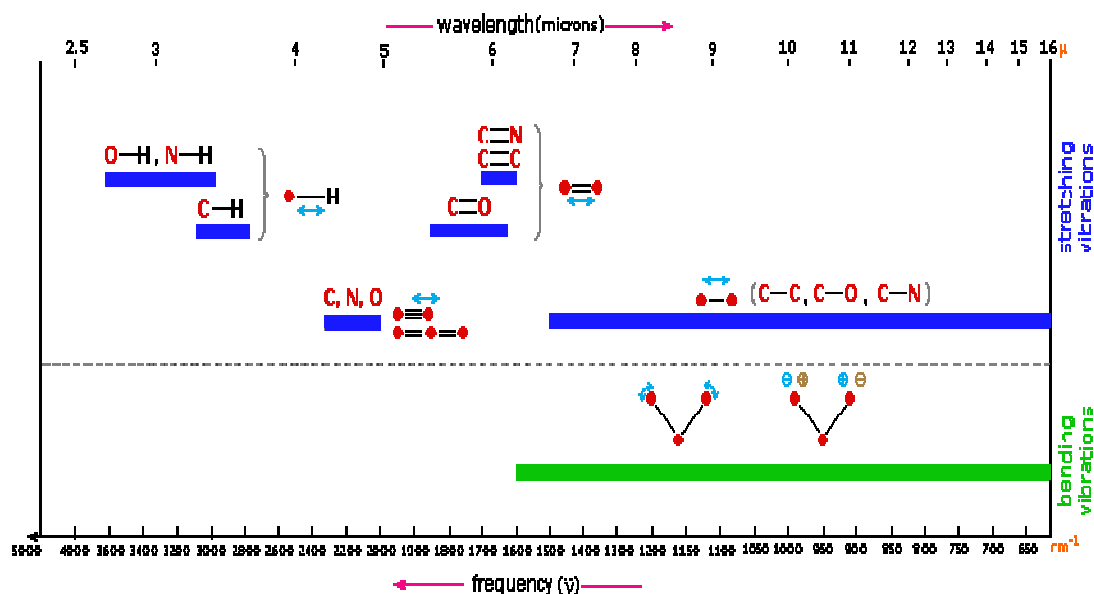


Figura 4.6: vibrazioni dei gruppi funzionali

Per questa ragione, la spettroscopia infrarossa è una tecnica che consente l'identificazione, la quantificazione e l'analisi strutturale di piccole molecole, permettendo di ottenere informazioni sui cambiamenti conformazionali nei gruppi funzionali dei campioni biologici analizzati.

Le bande di assorbimento delle transizioni vibrazionali nello spettro elettromagnetico generalmente sono comprese tra 5000 cm^{-1} e 500 cm^{-1} .

Affinché la radiazione venga assorbita o emessa dal sistema, è necessario che gli atomi del legame chimico coinvolto nella transizione, presentino un dipolo elettrico e che questo dipolo vari durante la vibrazione degli atomi della molecola. Questo assicura l'accoppiamento tra il campo elettromagnetico oscillante della radiazione e gli atomi oscillanti alla stessa frequenza della radiazione.

Gli atomi che fanno parte di un legame possono muoversi in diversi modi, dando luogo a diversi assorbimenti. Per una molecola semplice sono possibili due tipi di modi: ***stretching*** e ***bending***.

Per ***stretching*** si intende un movimento lungo l'asse di legame, con conseguente aumento e diminuzione della distanza interatomica; questo può essere simmetrico o asimmetrico.

Per ***bending*** si intende la deformazione dell'angolo che il legame forma con i legami adiacenti. Si hanno due tipi di ***bending***: *sul piano*, ovvero un movimento a forbice che cambia l'angolo formato tra i legami, nei quali le distanze di legame restano invariate mentre cambiano uno o più angoli di legame; *fuori dal piano* in cui l'oscillazione avviene fuori dal piano definito da almeno tre atomi (figura 4.7).

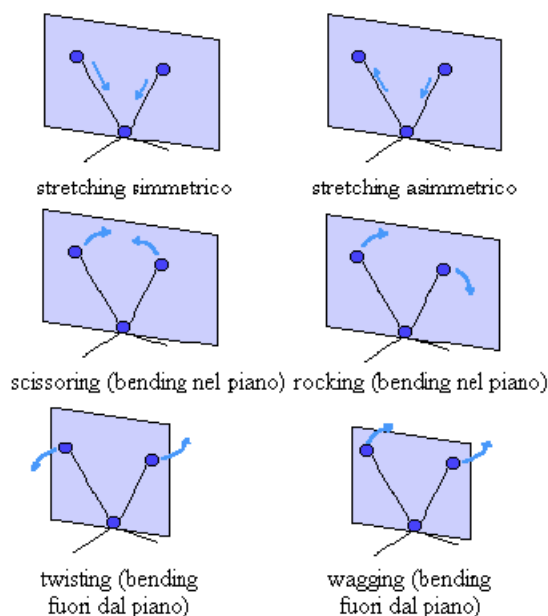


Figura 4.7: stretching e bending

L'assorbimento della radiazione infrarossa è regolato dalla legge di Lambert-Beer. Nelle misure sperimentali di assorbimento si paragona l'intensità I_0 della radiazione incidente sul campione, con l'intensità I della radiazione trasmessa attraverso il campione. Il rapporto I/I_0 dipende dallo spessore, dalla natura e dalla concentrazione del mezzo.

4.4.1.1 Spettroscopia IR a trasformata di Fourier (FT-IR)

L'unità principale che costituisce uno spettrofotometro FTIR è l'interferometro di Michelson, composto da due specchi, uno fisso e l'altro mobile e da uno specchio semitrasparente o Beam Splitter (figura 4.8).

Il raggio luminoso nel campo dell'IR, emesso da una sorgente termica costantemente preriscaldata, giunge allo specchio semiriflettente (beam splitter), che lo divide in due raggi. Un raggio viene riflesso verso lo specchio fisso, l'altro verso lo specchio mobile; i raggi da questi specchi sono inviati nuovamente al beam splitter che li ricongiunge e li invia al rivelatore che trasforma il segnale luminoso in segnale elettrico. Anche se i due raggi hanno raggiunto il rivelatore congiunti, essi hanno compiuto un diverso cammino ottico: a seconda della differenza del cammino ottico dei due raggi, si creano delle interferenze costruttive o distruttive che generano un segnale al rivelatore proporzionale alla differenza di cammino ottico dei due raggi e quindi alla posizione dello specchio mobile in quell'istante.

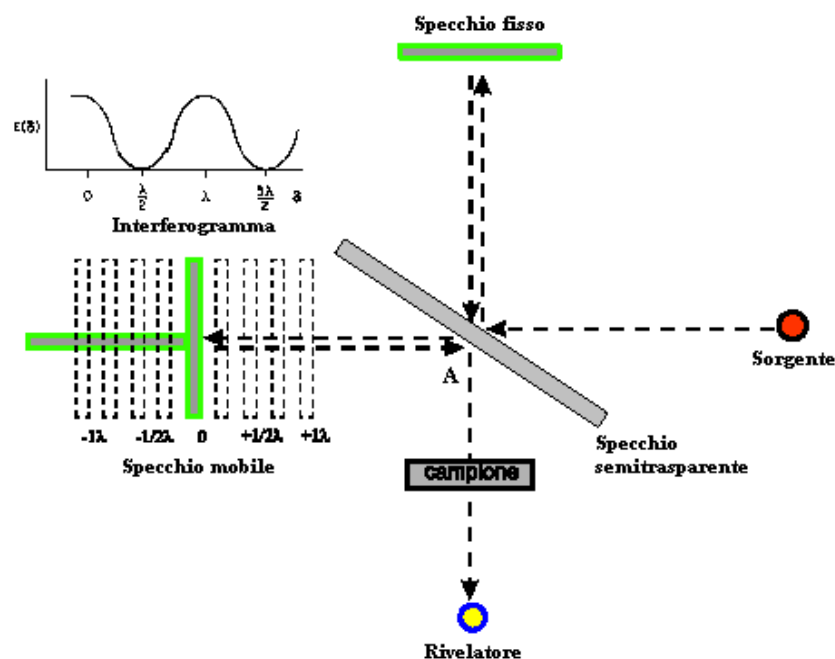


Figura 4.8: spettrofotometro FTIR

In base al movimento dello specchio mobile, tutte le radiazioni monocromatiche contenute nella luce emessa dalla lampada, danno luogo all'interferogramma cioè un segnale complessivo di interferenza, contenente tutte le informazioni riguardanti la frequenza e l'intensità della radiazione emessa, ma non utilizzabile in quanto l'assorbimento è funzione della frequenza.

A questo punto, l'utilizzo del calcolatore permette l'acquisizione di più scansioni dello spettro rapidamente, presentando alla fine una media di tutte le scansioni; lo spettro avrà così un migliore rapporto segnale-rumore, che aumenta infatti in maniera proporzionale alla radice quadrata del numero di scansioni.

La trasformata di Fourier, effettuata dal calcolatore dello strumento una volta che il raggio ha raggiunto il detector, mostra sullo schermo uno spettro infrarosso tradizionale, trasformando il segnale di intensità luminosa in funzione del tempo (spostamento dello specchio) in segnale di intensità in funzione del numero d'onda.

Nel corso di questo lavoro, le misure degli spettri sono state effettuate utilizzando la tecnica della Trasmissione; quest'ultima prevede l'utilizzo di vetrini di Fluoruro di Calcio (CaF_2) trasparente all'infrarosso, su cui i campioni sono fatti crescere. I vetrini vengono poi posizionati in un apposito supporto per le misure in trasmissione di cui è dotato l'interferometro (figura 4.9). La radiazione infrarossa, modulata nel tempo dagli specchi mobili, attraversa direttamente il campione. Nonostante questa tecnica permetta di ottenere un buon segnale di assorbanza, gli spettri ottenuti sono sensibili alla presenza di acqua, che è attiva nella regione dell'infrarosso, e dà luogo quindi ad

un assorbimento importante della radiazione IR. Particolare cura deve quindi essere posta nel processo di asciugatura del campione dall'acqua in esso contenuta.



Figura 4.9: particolare del supporto contenente la finestra di Fluoruro di Calcio

4.4.1.2 Spettroscopia FTIR: preparazione dei campioni

In questo paragrafo, vengono descritti i protocolli per la preparazione dei campioni e le procedure di acquisizione dei dati sperimentali per la linea cellulare NIH-3T3.

Gli spettri sono stati registrati con uno spettrometro FTIR/410 Jasco (Jasco Co. Hachioji City, Tokyo, Japan, figura 4.10). Allo strumento è collegato un circuito attraverso cui fluisce dell'azoto gassoso che ha la doppia funzione di ridurre l'umidità in tutto il sistema e di mantenere pulita l'ottica da eventuali impurità.



Figura 4.10: spettrofotometro FTIR/410 Jasco

Gli spettri di cellule NIH-3T3 sono stati acquisiti in modalità Trasmissione. A questo scopo, le cellule sono state coltivate in piastre petri su una finestra di CaF_2 . I vetrini di diametro 2,5 cm sono stati polilisinati, perché la polilisina agevola l'adesione delle cellule in monostrato sulla superficie di CaF_2 .

I campioni sono stati preparati secondo la procedura seguente:

- 1) l'operazione iniziale è quella di tripsinizzazione e risospensione delle cellule;
- 2) i vetrini polilisinati vengono depositati nelle petri di diametro 3,5 cm;
- 3) un'aliquota di cellule in sospensione viene depositata sul vetrino;
- 4) vengono aggiunti 3 ml di terreno nella petri con vetrino;
- 5) i campioni così preparati vengono incubati per 2-3 giorni a 37°C ; il tempo di incubazione varia al variare della quantità di campione depositato. Soltanto dopo che le cellule formano un monostrato uniforme sulla finestra di CaF_2 , sono pronte per essere sonicate;
- 6) eliminazione del terreno di coltura, che presenta assorbimenti nella regione dell'infrarosso tra 900 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} ; il vetrino viene asportato dalla petri di coltura e in un'altra petri viene effettuato un lavaggio in PBS per 1 minuto;
- 7) asciugatura del vetrino;
- 8) una volta asciugato il vetrino è pronto per la misura spettroscopica.

Per ogni prova, è stato acquisito contemporaneamente ai campioni trattati, uno spettro di controllo. Per ogni spettro, è stata usata una risoluzione di 4 cm^{-1} , e sono stati acquisiti 64 interferogrammi. Gli spettri IR delle cellule non trattate e trattate, sono stati acquisiti nell'intervallo $900\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$.

Per strumenti a singolo fascio, come il Jasco FT-IR 410 è necessario acquisire prima lo spettro della sorgente, che sarà il *background*, e poi quello trasmesso attraverso il campione: in questo modo il software di Jasco sottrae il fondo dall'assorbimento del campione. Il protocollo di misura prevede che l'acquisizione del *background* venga fatta in single beam con un vetrino polilisinato nel supporto; l'andamento di questo spettro è simile a quello di corpo nero, eccetto per l'assorbimento dell'anidride carbonica e del vapore acqueo presenti nell'atmosfera.

Dopo aver acquisito il *background* è possibile mettere nel supporto il vetrino con il campione e acquisire subito lo spettro del campione. Quando si acquisiscono spettri IR, l'idratazione del campione può costituire un problema, in quanto l'acqua è una molecola IR attiva. Il protocollo utilizzato per l'asciugatura dei vetrini consente di minimizzare il grado di idratazione dei campioni, assumendo quindi che l'acqua influenzi allo stesso modo tutti gli spettri acquisiti.

Tutti gli spettri IR sono stati corretti per *baseline* e *smoothing*, e normalizzati per intensità all'amide I. L'analisi dei dati IR è stata effettuata utilizzando il software OPUS 5,0 fornito da Bruker Optik.

4.4.2 Il test dei micronuclei

Il test dei micronuclei è considerato come uno dei metodi migliori per valutare i danni genotossici nella cellula a livello cromosomico, in base alla capacità dell'agente fisico in esame di aumentare la frequenza di cellule nei campioni esposti in cui sono presenti questo tipo di inclusioni (Fenech, 2000).

I micronuclei sono corpi citoplasmatici di forma rotonda o ovale contenenti cromatina; a seconda del contenuto di cromatina, possono avere un diametro variabile tra $1/5$ e $1/20$ del diametro cellulare. Queste inclusioni si possono trovare in ogni tipo di cellula, fuori dal nucleo nel citoplasma, assomigliano al nucleo per forma, struttura e caratteristiche di colorazione; si usa il termine micronuclei proprio a causa delle loro dimensioni ridotte rispetto al nucleo principale.

I micronuclei vengono espressi in cellule che hanno completato la loro divisione nucleare, quindi sono osservabili nella fase del ciclo cellulare in cui la cellula è binucleata. Il rilevamento dei danni citotossici a carico di cellule trattate è rilevabile solo in cellule eucariote in divisione; in altre parole, il protocollo non è utilizzabile in cellule che non si dividono o in cui la cinetica della divisione cellulare non è ancora ben conosciuta o controllata.

Tra i protocolli sviluppati, il più semplice e più utilizzato è il Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN); con citochinesi si intende il processo mediante il quale il citoplasma di una singola cellula viene distribuito tra due cellule figlie. Nel protocollo CBMN, le cellule che hanno completato una divisione nucleare vengono bloccate nel performare la citocinesi mediante la Citocalasina-B (Cyt-B). Le cellule in cui la divisione cellulare è avvenuta una sola volta si presentano come binucleate (figura 4.11). La Citocalasina B inibisce la divisione citoplasmatica, bloccando la formazione di microfilamenti contrattili che costringono il citoplasma tra i nuclei delle cellule figlie durante la citochinesi. Mediante questo test i micronuclei si trovano solo nelle cellule binucleate.

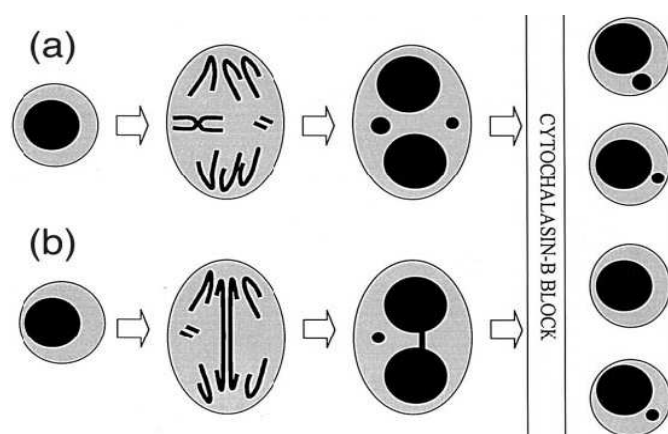


Figura 4.11: formazione dei micronuclei

Le cellule trattate con il protocollo CBMN rilevanti per la conta dei micronuclei, devono avere le seguenti caratteristiche:

- a) devono essere binucleate;
- b) i due nuclei della cellula possono toccarsi, ma non devono sovrapporsi. Anche se i nuclei si toccano, questi devono rimanere distinguibili;
- c) i due nuclei possono essere attaccati da un ponte citoplasmatico, che non deve superare $\frac{1}{4}$ del diametro nucleare;
- d) i due nuclei della cellula devono avere la membrana nucleare intatta;
- e) i due nuclei devono avere, approssimativamente, le stesse dimensioni.

I micronuclei devono avere la stessa morfologia dei nuclei, ma dimensioni più piccole. I criteri per la scelta dei micronuclei devono rispettare le seguenti caratteristiche (figura 4.12):

- a) devono essere ben distinguibili da artefatti o frammenti all'interno della cellula;
- b) non devono essere connessi tramite ponti ai nuclei;
- c) i micronuclei possono toccare i nuclei principali, ma non sovrapporli.

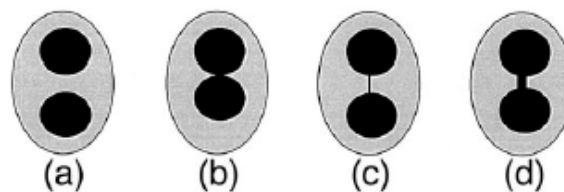


Figura 4.12: criteri per scegliere cellule binucleate nel protocollo CBMN (a) cellula binucleata ideale; (b) cellula binucleata con nuclei in contatto; (c) cellula binucleata con ponte citoplasmatico sottile; (d) cellula binucleata con ponte citoplasmatico ampio.

In figura 4.13 si vede l'aspetto tipico dei micronuclei in cellule binucleate:

- a) cellula con due micronuclei di dimensioni diverse; b) cellula con micronuclei che toccano, ma che non si sovrappongono ai nuclei principali; c) cellula con micronuclei e un ponte citoplasmatico tra i nuclei principali; d) cellula binucleata con sei micronuclei di grandezze diverse (fenomeno raramente osservabile).

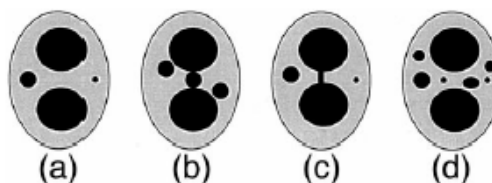


Figura 4.13: aspetto tipico dei micronuclei in cellule binucleate.

Il protocollo utilizzato nella conta dei micronuclei prevede l'analisi della frequenza di micronuclei su 500 cellule binucleate. Un parametro che è possibile analizzare è l'*Indice di Divisione Nucleare* NDI, valutato contando 500 cellule binucleate e rilevando la frequenza di cellule con 1, 2, 3, o 4 nuclei. L'espressione per il calcolo dell'NDI è:

$$NDI = \frac{[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]}{N} \quad (4.3)$$

dove *M1-M4* rappresentano il numero di cellule con 1-4 nuclei rispettivamente e *N* rappresenta il numero totale di cellule conteggiate.

4.4.2.1 Il test dei micronuclei: preparazione dei campioni

Il protocollo sviluppato per la preparazione dei campioni è il seguente:

- a) dopo l'esposizione al campo acustico di una petri contenente il campione, una aliquota dello stesso viene depositata nella petri;
- b) 6 µg/ml di Citocalasina B disciolta in Dimetilsolfossido (DMSO) vengono aggiunti all'aliquota di cellule; lo stesso è stato fatto per le cellule non sonicate e utilizzate come controllo;
- c) i campioni vengono messi in incubatore per 22 ore;
- d) dopo il periodo di latenza i campioni vengono centrifugati per 15' a 1200 rpm;
- e) il pellet di cellule viene risospeso con Cloruro di Potassio tiepido;
- f) le cellule vengono fissate con Carnoy, una soluzione di acido acetico e metanolo in grado di bloccare e stabilizzare le cellule nel loro stato al momento del fissaggio;
- g) le cellule vengono depositate su un vetrino per microscopia;
- h) ai campioni cellulari viene aggiunto il DAPI (4', 6-Diamidino-2-fenilindolo cloridrato 10 µg/ml), un marcatore per la colorazione in fluorescenza del DNA, in grado di penetrare la membrana cellulare integra, legandosi poi al DNA; è stata poi effettuata l'osservazione microscopica dei nuclei cellulari.

La conta delle cellule non è stata eseguita in maniera automatizzata, ma manualmente. Tramite le conte effettuate è stato possibile stabilire la frequenza di micronuclei, ottenuta contando il numero di micronuclei presenti in 500 cellule binucleate. L'indice di divisione nucleare NDI è stato contato direttamente dai vetrini preparati per i micronuclei.

Le conte sono state eseguite su 15 campioni di controllo; per quanto riguarda i campioni sonicati, sono stati trattati 8 campioni per ogni misura di distanza e tempo. I valori per ciascuna esposizione

sono stati confrontati con i relativi controlli utilizzando il test di Dunnett (Kim, 2000), con livello di significatività stabilito a $p < 0,05$.

Nelle prove di fluorescenza, il DAPI è eccitato da radiazione nel range dell'ultravioletto; quando è legato ad una catena di DNA a doppia elica presenta un assorbimento massimo a 358 nm e un'emissione massima a 461 nm.

L'eccitazione nel range dell'UV e l'osservazione microscopica dei campioni cellulari marcati con DAPI è stata effettuata con un microscopio Zeiss Axiophot UV, presso il Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, sezione di Anatomia Comparata (figura 4.14), utilizzando un filtro di eccitazione a 359 nm ed un filtro di barriera a 441 nm.



Figura 4.14: microscopio Zeiss Axiophot UV.

4.4.3 Il test di vitalità Trypan blue

I campioni sono stati sottoposti al test del Trypan Blue, attraverso il quale è possibile determinare il numero di cellule vive e morte in una sospensione cellulare, sfruttando il fatto che cellule sane presentano una membrana cellulare integra. Il Trypan è in grado di passare attraverso la parete lesionata delle cellule morte, colorandole di blu. Il test viene eseguito tramite l'utilizzo di una camera di conta. Conoscendo la concentrazione delle cellule vive e morte in una sospensione cellulare è possibile calcolare la vitalità del campione secondo la relazione:

$$\text{Vitalità} = \frac{\text{concentrazione cellule vive}}{\text{conc. cell. vive} + \text{conc. cell. morte}} \quad (4.4)$$

Il test è stato eseguito subito dopo l'esposizione al campo acustico per entrambe le frequenze 1 MHz e 3 MHz, per le tre distanze SSD=5, 10, 15 cm e per tutti i tempi di esposizione $t=5'$, $15'$.

30', 45', 60'. La vitalità è stata eseguita su 15 campioni di controllo; per quanto riguarda i campioni sonicati, sono stati trattati 8 campioni per ogni misura di distanza e tempo. I valori per ciascuna esposizione sono stati confrontati con i relativi controlli utilizzando il test di Dunnet, con livello di significatività stabilito a $p < 0.05$.

Va sottolineato che il test con Trypan Blue è stato applicato ai campioni prima di ogni esposizione al campo acustico; il test consente di misurare la vitalità del campione e la concentrazione cellulare. Le esposizioni sono state eseguite su campioni con vitalità sempre maggiore del 90%.

4.4.3.1 Il test di vitalità Trypan blue: preparazione dei campioni

La preparazione dei campioni per il test Trypan blue prevede l'effettuazione dei passaggi descritti nel paragrafo 4.1 con tripsinizzazione delle cellule cresciute adese nella petri. Successivamente allo spipettamento delle cellule per rompere gli eventuali agglomerati, viene prelevata una aliquota di campione; 10 μ l di trypan blue vengono depositati su un vetrino e mescolati con la stessa quantità di campione cellulare. Tale aliquota viene poi depositata in una camera di conta per i conteggi delle cellule vive e morte.

4.4.4 Microscopia ottica a fluorescenza

La fluorescenza è la proprietà di alcuni atomi e molecole di assorbire la luce a particolari lunghezze d'onda e, successivamente, di emettere luce dopo un breve intervallo di tempo.

In seguito all'assorbimento di energia da parte degli atomi, gli elettroni si spostano da un livello energetico ad uno superiore, e la permanenza al livello energetico superiore è molto breve; quando gli elettroni tornano al livello energetico originario, liberano l'energia assorbita sotto forma di radiazioni elettromagnetiche. Le radiazioni liberate saranno di lunghezza d'onda superiore e quindi di energia minore rispetto a quella eccitatrice.

La microscopia a fluorescenza rappresenta un eccellente mezzo per studiare materiali che sono in grado di fluorescere sia in maniera naturale, sia nel caso in cui vengano trattati con prodotti chimici capaci di emettere in fluorescenza. Questa forma di microscopia ottica ha come maggiore punto di forza la sua scarsa invasività, che consente di avere immagini di campioni biologici con una buona risoluzione spaziale.

La microscopia in fluorescenza può essere applicata allo studio di materia vivente con l'uso di fluorofori *in vivo* o *in vitro*, spesso molto specifici nella loro selezione del sito e capaci di assorbire e di re-irradiare la luce.

L'assorbimento energetico necessario per l'eccitazione dei fluorofori, richiede una sorgente di illuminazione che deve essere focalizzata sul campione attraverso un sistema di lenti (figura 4.15). La luce di eccitazione viene collimata da una lente e un diaframma per poi giungere ad un filtro di eccitazione che seleziona le lunghezze d'onda di interesse, e poi riflessa verso l'obiettivo che illumina il campione.

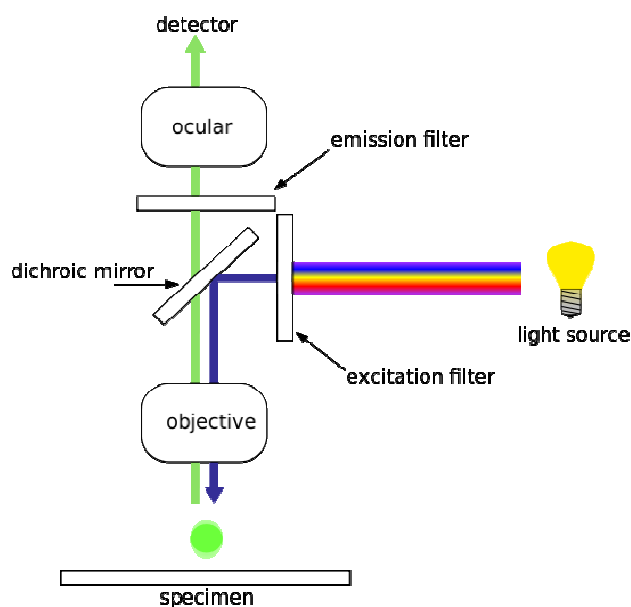


Figura 4.15: sistema di lenti per la microscopia a fluorescenza.

La fluorescenza nel campione dà luogo a luce emessa che è focalizzata sul detector dallo stesso obiettivo usato per l'eccitazione. Un filtro tra l'obiettivo e il detector va a separare la luce di eccitazione dalla luce di fluorescenza; quindi l'obiettivo porta sull'oggetto un fascio di luce incidente a lunghezza d'onda pari a quella della luce eccitante e, in senso inverso, raccoglie la luce fluorescente prodotta dal campione e veicolata dall'oculare.



Figura 4.16: Microscopio Leica DMI.

Nel corso di questo lavoro è stato utilizzato un microscopio ottico invertito Leica DM IL dotato di lampada a fluorescenza e un modulo con tre filtri con cui osservare la fluorescenza emessa dal campione nei range 470-490 nm (azzurro); 515-560 nm (verde), 620-660 nm (rosso) (figura 4.16). Per studiare l'internalizzazione di molecole extracellulari è stata utilizzata la calceina (PM 622 Da, lunghezza d'onda del picco massimo di assorbimento=494 nm e lunghezza d'onda del picco massimo di emissione= 514 nm) (Guzman, 2002) ad una concentrazione finale 10 μ M.

4.4.4.1 La Calceina

I campioni per la microscopia a fluorescenza sono stati marcati con la calceina (Sigma, St. Louis, MO) con lo scopo di valutare l'uptake di molecole da parte delle cellule NIH-3T3 esposte ad US alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz. Tale fluoroforo presenta un basso peso molecolare pari a 622 Da, λ picco massimo di assorbimento= 494 nm e λ picco massimo di emissione= 514 nm.

Dalla letteratura (Guzman, 2002) si evince che sono stati quantificati per la calceina i livelli di trasferimento intracellulare; è stato inoltre osservato che la calceina raggiunge un equilibrio termodinamico con la soluzione extracellulare, mostrando grande variabilità dipendente dalla tipologia cellulare in esame; tale variabilità risulta riproducibile e correlata fortemente con l'energia acustica di esposizione.

Nel lavoro di Guzman (2002), campioni di cellule linea DU145 del cancro della prostata, sono stati esposti a US a 500 kHz, utilizzando un *duty cycle* al 6% con tempi di esposizione di 120, 545 e 1000 ms e osservati al microscopio confocale per visualizzare l'uptake di molecole fluorescenti nelle cellule. Tale strumento è stato utilizzato per determinare se l'uptake ha luogo nel citoplasma e/o nei nuclei delle cellule vive; in figura 4.17 a) viene riportata l'immagine al microscopio confocale di tre cellule adiacenti. L'immagine mostra che la calceina si distribuisce all'interno dell'intera cellula, mostrando la simultanea presenza di 3 differenti subpopolazioni di uptake di calceina. La cellula A1 evidenzia una fluorescenza luminosa, indicativa di un elevato uptake di calceina; la cellula A2 evidenzia un basso uptake, mentre la cellula A3 è indicativa di un uptake nominale.

In figura 4.17 b) sono riportati i risultati di un ulteriore lavoro di Guzman del 2001.

In questo studio, la citofluorimetria a flusso è stata usata per identificare e quantificare l'eterogeneità degli effetti dell'esposizione a US sull'uptake di molecole per la linea cellulare DU145 del cancro della prostata. I campioni sono stati esposti a pressioni acustiche da 0,6-3 MPa, per tempi di esposizione di 120-2000 ms e lunghezza degli impulsi di 0,02-60 ms in presenza dell'agente di contrasto Optison. Anche in questo caso, le immagini del microscopio confocale di

tre cellule adiacenti mostrano la presenza di 3 popolazioni di uptake di calceina: A) indicativa di un elevato livello di uptake di calceina; B) indicativa di un basso livello di uptake di calceina; C) indicativa di un uptake nominale. I nuclei delle cellule sono identificati da un asterisco.

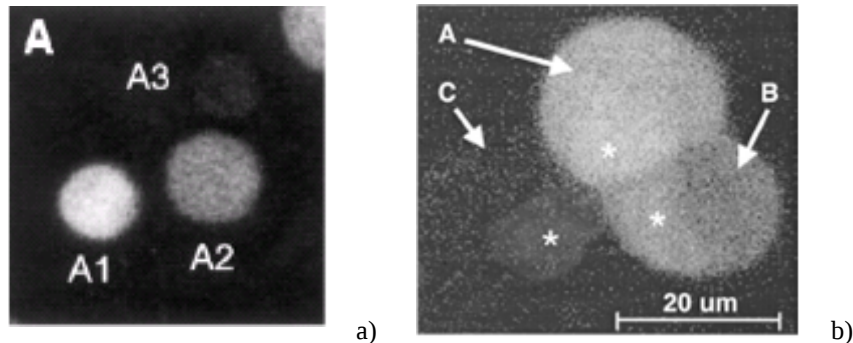


Figura 4.17: immagine al microscopio confocale di 3 cellule adiacenti che mostrano la simultanea presenza di 3 differenti subpopolazioni di uptake di calceina.

Il lavoro di Kodama del 2000 studia la variazione della permeabilità di membrana delle cellule utilizzando onde di shock per introdurre macromolecole e piccole molecole polari nel citoplasma. L'uptake della calceina viene studiato in cellule umane leucemiche HL-60; le cellule sono state esaminate mediante la microscopia confocale. Tale tecnica consente di ottenere sottili sezioni ottiche attraverso il campione cellulare; i risultati mostrano che la calceina produce una fluorescenza uniforme nelle cellule; la figura 4.18 mostra i risultati dello studio.

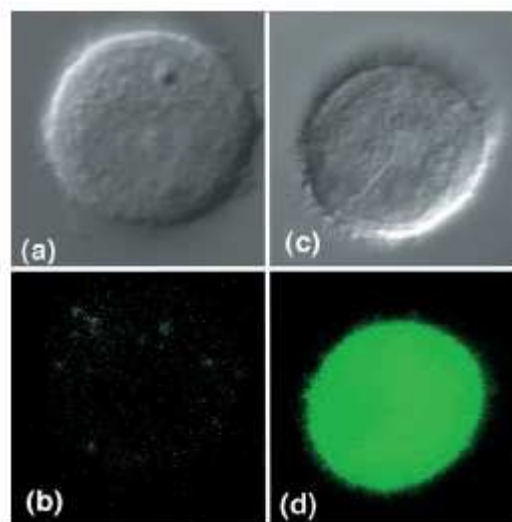


Figura 4.18: immagine al microscopio confocale di cellule umane HL-60 esposte a un'onda di shock in presenza di calceina.

In particolare i campioni a) e c) rappresentano immagini di cellule viventi della linea HL-60 in contrasto di fase; l'immagine b) mostra la fluorescenza del campione di controllo che si presenta molto debole a causa di lieve uptake di calceina; l'immagine d) è relativa al campione trattato con

un'onda di shock in presenza di calceina: si osserva una intensa fluorescenza uniformemente distribuita attraverso l'intera cellula.

4.4.4.2 Microscopia ottica a fluorescenza: preparazione dei campioni

Il protocollo utilizzato per effettuare le misure in fluorescenza è il seguente:

- 1) le cellule vengono preparate direttamente nelle petri ed incubate fino a confluenza;
- 2) dalle petri lasciate in incubazione viene aspirato il terreno di coltura;
- 3) viene effettuato un lavaggio nella petri con PBS, per 1 minuto, poi il PBS viene aspirato.
- 4) si aggiunge calceina ad una concentrazione finale 10 μ M;
- 5) si effettuano le sonicazioni, al termine delle quali, in accordo con quanto previsto dalla letteratura (Schlicher, 2006) è stato previsto un recovery di 10', al termine dei quali sono stati effettuati lavaggi con PBS per eliminare la calceina non internalizzata rimasta nel fluido extracellulare per poi procedere all'osservazione al microscopio. Ipotizzando infatti di produrre, a seguito dell'esposizione ad US, pori transienti di membrana, si ritiene che possa determinarsi, a causa del gradiente di concentrazione del fluoroforo tra l'ambiente extracellulare, ricco di calceina e l'ambiente intracellulare, povero della stessa, la presenza di un fenomeno dinamico all'interno delle cellule, con entrata e uscita del fluoroforo dai pori prodotti. Si ipotizza che i 10' di attesa dopo la sonicazione possano consentire la chiusura dei pori di membrana eventualmente prodotti dall'esposizione ad US, per l'osservazione del fluoroforo rimasto intrappolato all'interno della cellula;
- 6) al termine dei 10' vengono effettuati almeno 3 lavaggi con PBS per eliminare la calceina non internalizzata, dal fluido extracellulare;
- 7) si aggiungono 2 ml di PBS e si osserva la fluorescenza al microscopio;
- 8) al termine dell'osservazione il campione viene marcato con 20 μ l di Ioduro di Propidio.

Per valutare la vitalità delle cellule successivamente alla sonicazione con marcatore fluorescente, è stato usato lo Ioduro di Propidio (IP), marcatore con peso molecolare 668,4 Da, λ picco massimo di assorbimento = 535 nm e λ picco massimo di emissione = 617 nm; tale marcatore ha la caratteristica di legarsi al DNA, fluorescendo solo se si intercala alla doppia elica, mentre non è in grado di fluorescere allo stato libero. Lo IP non è in grado di penetrare la membrana cellulare, ma entra solo se nella membrana sono presenti zone di rottura. Di conseguenza, le cellule fluorescenti alla lunghezza d'onda dello IP sono cellule danneggiate; infatti questo marcatore viene utilizzato anche per valutare l'integrità della membrana plasmatica (Jamin N., 2003).

Le misure in microscopia a fluorescenza sono state eseguite esponendo i campioni di cellule NIH-3T3 alle due frequenze (1 MHz 75% *High* e 3 MHz 100% *High*) per i tempi di sonicazione di 30', 45' e 60' e alle 3 distanze campione-trasduttore 5, 10 e 15 cm.

4.4.5 Citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria a flusso è una metodica largamente utilizzata nella routine di laboratorio e nella ricerca, che permette di valutare contemporaneamente più parametri (fisici e chimici) di diverse migliaia di particelle biologiche o cellule contenute in sospensione in un fluido. A questo scopo, si usa la luce diffusa dalle particelle del campione e la luce di fluorescenza emessa da opportuni agenti chimici detti fluorocromi; si tratta di molecole che, quando sono colpite (eccitate) da una luce di una certa lunghezza d'onda, emettono luce di lunghezza d'onda maggiore. I segnali di fluorescenza sono misurati come impulsi di ampiezza proporzionale al numero di molecole di fluorocromo che si legano a determinate strutture cellulari.

Il citofluorimetro trova applicazione in diversi settori della medicina e della biologia cellulare, quali diagnosi di linfomi, leucemie, differenziazione di popolazioni di linfociti B e T, studi sulla replicazione del DNA e sulla proliferazione neoplastica, identificazione di condizioni di sofferenza cellulare che precedono la morte della cellula tramite apoptosi.

Nel citofluorimetro, la sospensione cellulare viene aspirata da un ago e spinta da aria compressa (pressione differenziale) in un capillare ($\varnothing 200\mu\text{m}$), all'uscita del quale incontra il liquido "guaina" (*sheath fluid*) proveniente da una tanica esterna. Dopo aver attraversato un filtro salino $0,45\ \mu\text{m}$ per eliminare le impurità, il campione viene iniettato dalla pressione generata da una pompa ad aria nel centro di un flusso laminare il quale orienta le cellule verso una sorgente luminosa, tipicamente una luce laser (figura 4.19).

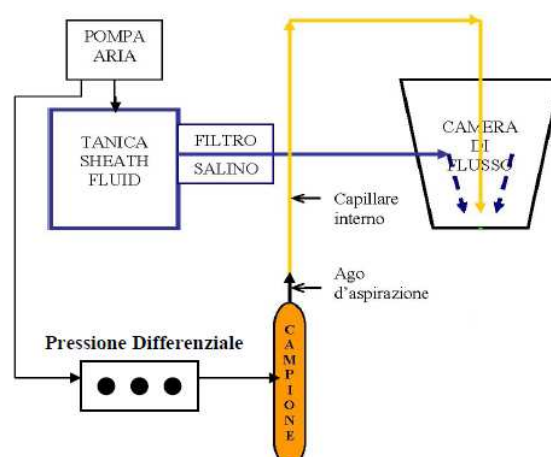


Figura 4.19: sistema di aspirazione del campione in un citofluorimetro.

Il flusso laminare attraversa ortogonalmente un raggio laser; nella maggior parte degli strumenti viene impiegato un laser a ioni di Argon con lunghezza d'onda di 488 nm (blu) che può eccitare fino a 3 diversi fluorocromi in contemporanea. Al passaggio del campione, la luce laser viene diffusa e i fluorocromi vengono eccitati. Ogni singola cellula del campione viene attraversata dal fascio di luce laser che eccita i fluorocromi ad uno stato di energia più alto; i fotoni, emessi a seguito della diseccitazione determinano l'emissione di un segnale fluorescente. Il segnale passando attraverso un sistema di filtri e specchi raggiunge un rivelatore, viene quindi processato elettronicamente, trasformato da analogico a digitale e inviato all'analizzatore, che elabora il dato e lo visualizza tramite un grafico. Attraverso piastre di deflessione, le cellule analizzate possono essere raccolte separatamente tramite un processo definito "*sorting*".

Dopo aver attraversato il punto di misura, il campione prosegue nel capillare trasportato dallo sheath fino allo scarico in una tanica.

A fine acquisizione è importante curare con attenzione la pulizia interna dello strumento, utilizzando ipoclorito di sodio ed acqua distillata per eliminare le impurità residue ed impedire ostruzioni del sistema.

La citofluorimetria a flusso consente di ricavare informazioni sui parametri fisici dei campioni in esame: quando viene colpita dal fascio di luce emesso dal laser, la cellula emette segnali di luce diffusa in base alle proprie caratteristiche fisiche e morfologiche, per fenomeni di rifrazione, riflessione, e diffrazione. In particolare la luce dispersa in avanti (*forward scatter*) è legata alle dimensioni delle cellule, mentre la luce riflessa a 90° (*side scatter*) è da attribuire a parametri della morfologia cellulare come la granulosita' del citoplasma, il rapporto nucleo/citoplasma, la rugosità di superficie. Il cistogramma, diagramma bidimensionale ottenuto dalla combinazione del *forward* (dimensioni) e del *side* (granulosità) scatter, permette di discriminare tra diverse popolazioni cellulari, basandosi solamente sulle loro caratteristiche fisiche. In un cistogramma, ogni punto rappresenta un evento contato, dotato di un definito valore correlato ai parametri misurati, nel nostro caso due tipi di fluorescenza; per le nostre misure, abbiamo infatti usato due fluorocromi: 1) lo ioduro di propidio (IP); 2) la calceina (C).

In figura 4.20 è riportato, a titolo di esempio, il risultato di una misura ottenuta mediante citofluorimetro costituita da un istogramma a due parametri.

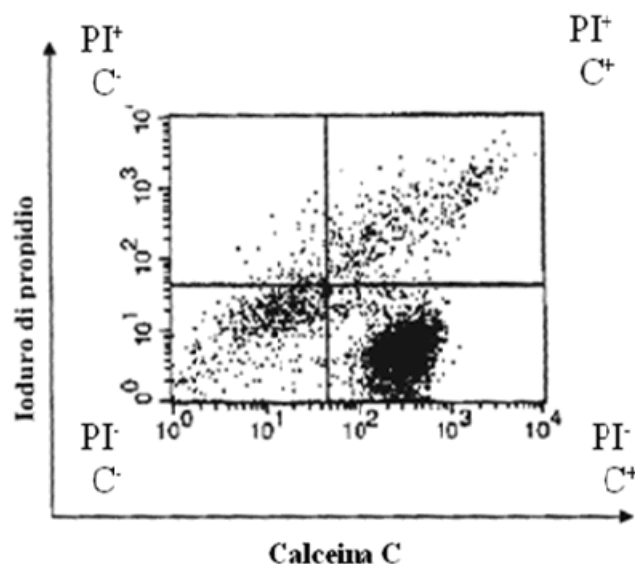


Figura 4.20: esempio del risultato di una misura con citofluorimetro a flusso: istogramma a 2 parametri

Si tratta in pratica di un grafico in scala logaritmica che riporta due parametri misurati sugli assi x e y, che si riferiscono agli eventi relativi alla fluorescenza della Calceina (asse x) e dello Ioduro di Propidio (asse y); il risultato rappresenta il numero di cellule conteggiate tramite un gradiente di densità. Ogni figura è divisa in 4 quadranti e in ognuno dei quattro quadranti è rappresentato lo stato delle cellule del campione considerato. All'aumentare del numero di cellule marcate con ioduro di propidio, ma non con la calceina C, si passa dal quadrante in cui si trovano le cellule vive che non hanno internalizzato i due fluorocromi (quadrante in basso a sinistra, negativo alla calceina C così come allo ioduro di propidio, PI^- , C^-) a quello in cui si trovano le cellule morte (quadrante in alto a sinistra: PI^+ , C^-).

Al crescere del numero di cellule marcate con C ma non con PI, si passa dal quadrante in cui si trovano le cellule vive (quadrante in basso a sinistra: PI^- , C^-) a quello in cui si trovano le cellule che hanno internalizzato la calceina (quadrante in basso a destra: PI^- , C^+).

Nel quadrante in alto a destra ci dovrebbero essere, invece, le cellule apoptotiche che cominciano ad avere alterazioni a livello delle funzioni di membrana e che legano entrambi i fluorocromi in grosse quantità (PI^+ , C^+).

Esistono diversi modi per rappresentare un dato citofluorimetrico; la rappresentazione più semplice è costituita dall'istogramma dove l'ascissa riporta l'intensità di fluorescenza e l'ordinata la frequenza ovvero il numero di eventi che esprimono una data proprietà. L'analisi statistica consente di porre dei *gates* basati sull'impostazione di cursori che delimitano le aree di interesse, e sulla quantificazione degli eventi cellulari che rientrano in tali aree. Per ogni picco rilevato nel diagramma è possibile calcolare dati statistici (valore medio, deviazione standard, coefficiente di variazione, ecc)

Nel nostro lavoro è stato utilizzato un citofluorimetro a flusso modello FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences) dotato di due sorgenti luminose: laser argon raffreddato ad aria con emissione a 488 nm e laser allo stato solido (Visible Red Diode Laser) con emissione a 635 nm, situato presso il Dipartimento di Patologia Generale dell'Università Sapienza di Roma.



Figura 4.21: citofluorimetro a flusso FACSCalibur.

La citofluorimetria a flusso è stata utilizzata per investigare l'induzione di danni sulla membrana cellulare a seguito di irradiazione dei campioni cellulari con US alle frequenze di 1 e 3 MHz; a tal proposito, si fa riferimento al meccanismo della sonoporazione, ossia il fenomeno transiente e reversibile attraverso il quale, a seguito di esposizione ad onde ultrasonore, aumenta la permeabilità della membrana cellulare (Karshafian, 2010), consentendo l'ingresso di molecole bioattive con alta efficienza e senza significativi cambiamenti della vitalità cellulare. Tale processo è impiegato in numerose applicazioni mediche, tra cui la terapia genica e la *drug delivery*, con la finalità di favorire il trasporto intracellulare di piccoli composti, macromolecole, DNA, farmaci in cellule bersaglio in maniera efficiente e precisa, ed investigato mediante numerosi esperimenti *in vitro* (Hynynen, 2008). Il meccanismo fisico alla base della sonoporazione non è tuttora completamente noto, tuttavia è probabile che siano coinvolti meccanismi associati alla generazione di onde d'urto e microjets (Ohl, 2006), alla presenza di microstreaming acustici (Wu, 2007), alla produzione di radicali liberi (Miller, 1993), causati dalla cavitazione acustica, ossia l'implosione di bolle di vapore in presenza di un campo di pressione acustica. Tale meccanismo determina danni sulle membrane cellulari che possono essere reversibili, determinando uptake in cellule vitali, o non reversibili, causando la morte delle cellule. Anche se alcune applicazioni possono trarre beneficio dalle morte delle cellule, la maggior parte dei meccanismi come la *drug delivery* e la terapia genica cercano di massimizzare la captazione intracellulare, mantenendo alta vitalità delle cellule (Guzman, 2002). L'uso futuro della sonoporazione nelle applicazioni cliniche dipende molto sia dalla conoscenza di quali dei meccanismi suddetti, mediatori del processo di sonoporazione, produce i cambiamenti nella permeabilità della membrana cellulare, sia dalla progettazione dell'esposizione agli US che massimizza tale effetto (Forbes, 2011). In realtà, i bioeffetti possono essere difficili da controllare e

riprodurre, anche in sistemi *in vitro* semplificati, poiché la cavitazione è un ambiente stocastico caratterizzato da oscillazioni di bolle e collassi.

Gli US sono stati utilizzati in svariati esperimenti con l'impiego di cellule in sospensione, in monostrato e tessuti, *in vivo* e *in vitro*, cellule di mammifero e vegetali. Il trasferimento intracellulare è stato investigato utilizzando piccole molecole fluorescenti, macromolecole, come proteine e DNA fino alle nanoparticelle, al variare dei parametri acustici quali frequenza, energia, pressione, tempo di esposizione e *duty cycle* (Hallow, 2006).

4.4.5.1 Citofluorimetria a flusso: preparazione dei campioni

Le cellule, lasciate crescere nelle capsule petri in terreno al fine di creare un monostrato adeguato, vengono preparate per l'esposizione, come per la microscopia a fluorescenza: il protocollo per la preparazione dei campioni prevede per la calceina la medesima molarità usata in microscopia a fluorescenza (10 μ M).

I campioni vengono poi sottoposti a sonicazione alle tre distanze campione-trasduttore (SSD= 5, 10, 15 cm) e per i tempi 30', 45' e 60'.

Al termine della sonicazione, l'intero contenuto della petri viene raccolto e depositato in un falcon; il restante campione, ancora adeso viene tripsinizzato per staccare il residuo del monostrato; il campione viene poi sottoposto a due centrifugazioni (1800 rpm) con eliminazione del sovrantante; il pellet di cellule viene infine raccolto, depositato in tubi adatti per la misura al citofluorimetro, risospeso in PBS e marcato con 10 μ l di Ioduro di Propidio.

4.4.6 Microscopia confocale

La microscopia confocale è una tecnica ottica principalmente utilizzata per lo studio tridimensionale di strutture biologiche isolate o *in situ*, mediante il loro sezionamento ottico, consistente nella raccolta di una serie di immagini di piani paralleli, spostando il fuoco dell'obiettivo lungo un asse che generalmente coincide con l'asse di propagazione della luce.

Per ottenere una perfetta rappresentazione di un singolo piano del campione, si dovrebbe idealmente raccogliere soltanto la luce proveniente da quel particolare piano; poiché tuttavia, anche i piani sovrastanti e sottostanti emettono luce, vi è una perdita di nitidezza dell'immagine.

La chiave del successo della tecnica confocale consiste nella rimozione delle interferenze provenienti dai piani adiacenti a quello ove si è focalizzati, mediante l'uso del cosiddetto *pinhole*. La microscopia confocale usa, per eccitare le molecole, una sorgente luminosa molto intensa, il

laser. La luce del laser viene fatta convergere dalle lenti dell'obiettivo in un punto estremamente piccolo del campione osservato; il punto stesso, attraverso un sistema di specchi oscillanti, viene spostato attraverso tutto il campo visivo dell'obiettivo, così da effettuare una scansione completa di tutto il piano focale. I campioni utilizzati per l'analisi devono essere marcati con un probe (o dye) fluorescente. Nella scelta del probe è necessario considerare vari fattori: le lunghezza d'onda di eccitazione ed emissione, le linee di laser disponibili, i filtri da utilizzare, ecc. Il laser eccita i soli fluorocromi appartenenti al piano focale, corrispondenti al punto di massima concentrazione del raggio; in questo modo le sezioni non appartenenti al tale piano non vengono eccitate e il risultato complessivo è una riduzione degli aloni e del rumore di fondo.

Il principio di funzionamento di un microscopio confocale è illustrato in figura 4.22: la luce emessa dal laser viene deviata dallo specchio dicroico, investe il campione e lo eccita.

I fluorocromi emettono una radiazione luminosa che, catturata dalle lenti dell'obiettivo, colpisce nuovamente lo specchio dicroico, attraverso il quale la luce riflessa è deviata, mentre la luce fluorescente viene inviata prima al pinhole e poi ad un filtro, giungendo così al fotomoltiplicatore. Il pinhole funge da diaframma e impedisce che la luce proveniente dalle zone fuori fuoco raggiunga il fotomoltiplicatore. In questo modo, solo il segnale luminoso relativo al piano focale contribuisce alla formazione dell'immagine finale. Il fotomoltiplicatore trasforma invece l'intensità luminosa rilevata in un segnale elettrico proporzionale all'intensità stessa. Tale segnale è poi elaborato via software, e viene così registrata l'intensità luminosa in ogni punto; i valori di intensità sono utilizzati per ricostruire l'immagine.

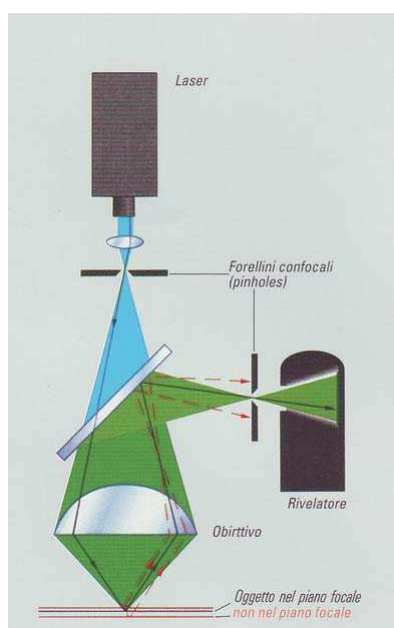


Figura 4.22: Principio di funzionamento del microscopio confocale

Per ottenere la rappresentazione non di una porzione microscopica del campione ma di un intero piano, si muove il fascio di luce lungo il campione di punto in punto, in modo che tutto il piano situato alla profondità voluta venga illuminata dal fascio di luce secondo una precisa sequenza. Questo processo viene detto scansione. Variando la messa a fuoco, è possibile effettuare scansioni a piani focali variabili; queste sono dette sezioni ottiche, e la loro unione consente di ricostruire un'immagine complessiva dell'intero volume (figura 4.23).

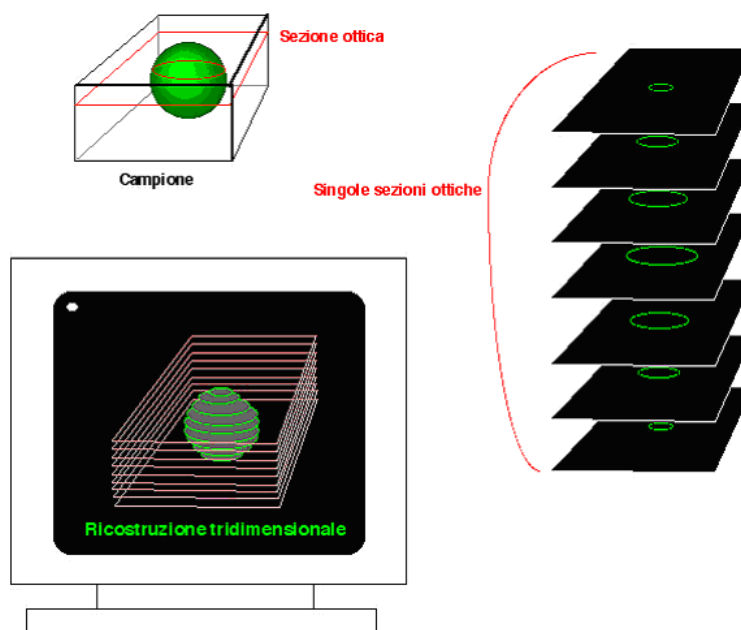


Figura 4.23: Sezioni ottiche e ricostruzione 3D di un'immagine al confocale

Nel corso del presente lavoro, è stato utilizzato un microscopio confocale invertito, disponibile presso il Laboratorio Centralizzato di Microscopia Ottica ed Elettronica dell'Università Cattolica Sacro Cuore (DMIRE2, Leica Microsystems, Germania) dotato di un obiettivo ad immersione in olio $40 \times$ (NA 1.4) e software di acquisizione LCS 2.61 (Leica Microsystems, Germania, figura 4.24). Le ricostruzioni 3D e l'analisi delle immagini acquisite sono state eseguite utilizzando ImageJ 1.41 (NIH).



Figura 4.24: Microscopio Confocale con sorgente multispettrale ad eccitazione multifotonica

4.4.6 1 *Microscopia confocale: preparazione dei campioni*

Le cellule, lasciate crescere in terreno in capsule petri con fondo adatto per le misure in microscopia confocale, al fine di creare un monostrato adeguato ma non confluyente, sono state preparate per l'esposizione nelle medesime condizioni indicate per la microscopia in fluorescenza.

I campioni, marcati con calceina alla concentrazione finale 10 μM , sono stati esposti in PBS ad US alla frequenza di 1 MHz 10% *High* e 3 MHz 100% *High* in corrispondenza della sola distanza campione-trasduttore pari a SSD=5 cm e per i tempi di 15 e 30 minuti per 1 MHz, solo 30' per 3 MHz. Tali configurazioni sperimentali sono state individuate in accordo con le peculiarità della metodica, poiché lasciano integro il monostrato e consentono la sua visualizzazione ed analisi post sonicazione.

Successivamente all'esposizione, i campioni sono stati sottoposti a lavaggio con PBS per eliminare il fondo di fluorescenza della calceina non internalizzata nella matrice extracellulare, analogamente a quanto effettuato nella microscopia a fluorescenza.

Sono state acquisite infine immagini di sezioni ottiche del campione esposto pari a 1 μm , ottenute attraverso un sezionamento ottico ripetuto.

CAPITOLO 5:

RISULTATI SPERIMENTALI E DISCUSSIONE

5.1 Misure di spettroscopia FTIR: parametri spettrali

Tutti gli spettri FTIR ottenuti, hanno mostrato un buon rapporto segnale-rumore e sono risultati riproducibili. Le differenti bande di assorbimento, dovute all'elevato numero di modi vibrazionali, possono essere fittate sommando il contributo delle principali macromolecole come proteine, lipidi, carboidrati e polinucleotidi.

La figura 5.1 mostra uno spettro di controllo di cellule NIH-3T3, ove vengono evidenziati gli assorbimenti delle varie strutture che compongono lo spettro.

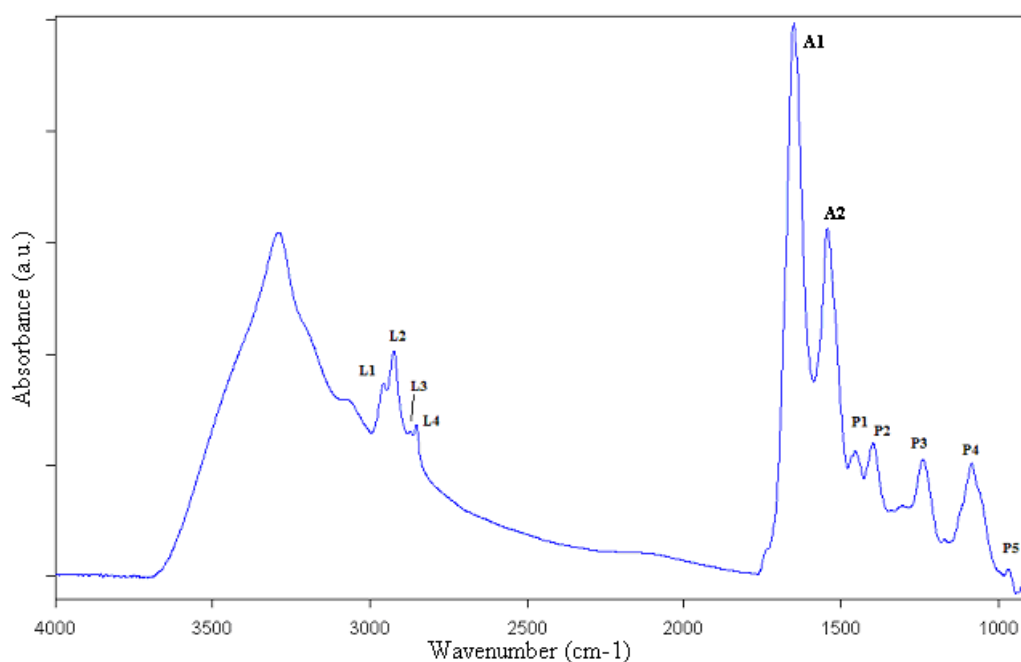


Figura 5.1: spettro di cellule NIH-3T3 con le bande di assorbimento caratteristiche

L'assegnazione delle bande osservate è stata effettuata in base a dati precedentemente pubblicati (Lin, 2004).

Nella Tabella 5.1, vengono riportate le assegnazioni delle varie strutture presenti nella figura 5.1 e in particolare: il numero d'onda dei picchi (cm^{-1}), le labels e l'assegnazione delle bande di assorbimento negli spettri IR delle cellule.

Banda	numero d'onda (cm^{-1})	Assegnazione
L1	2960	Stretching asimmetrico di CH nel gruppo metile ($-\text{CH}_3$) terminale dei fosfolipidi di membrana
L2	2920	Stretching asimmetrico di CH nel gruppo metilene ($-\text{CH}_2$) dei fosfolipidi di membrana
L3	2875	Stretching simmetrico di CH nel gruppo metile ($-\text{CH}_3$) nei lipidi di membrana
L4	2850	Stretching simmetrico di CH nel gruppo metilene ($-\text{CH}_2$) presente negli acidi grassi dei fosfolipidi di membrana
AMIDE I	1640	$-\text{C}=\text{O}$ stretching accoppiato al bending nel piano di NH dell'Amide I, proteine
AMIDE II	1545	NH bending accoppiato con lo stretching di C-N dell'Amide II, proteine
P1	1455	$-\text{CH}$ bending dei gruppi metilene ($-\text{CH}_2$) nei lipidi
P2	1395	$-\text{CH}$ bending del gruppo metile ($-\text{CH}_3$) nei lipidi di membrana e in alcune proteine cellulari
P3	1240	Stretching asimmetrico dei gruppi fosfato ($-\text{PO}_2^-$) presenti negli acidi nucleici
P4	1080	Stretching simmetrico dei gruppi fosfato ($-\text{PO}_2^-$) presenti negli acidi nucleici e in particolare nel DNA e in alcuni lipidi fosforilati
P5	970	C-O e C-C stretching per lo scheletro del DNA

Tabella 5.1: assegnazione delle bande caratteristiche dello spettro di cellule viventi.

Il comportamento spettrale di ciascuna regione, attribuita a lipidi ($3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$), alle proteine (bande dell'amide I e II centrate rispettivamente a 1660 cm^{-1} e 1545 cm^{-1}), ai fosfolipidi di membrana ($1500\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$) e gli acidi nucleici ($1300\text{-}950\text{ cm}^{-1}$), è stato analizzato per misurare le possibili variazioni relative al numero d'onda del picco, all'area delle bande spettrali rispetto alle stesse bande nello spettro dei controlli.

Lo studio delle aree delle bande dello spettro IR permette di ricavare informazioni sulle variazioni strutturali dei gruppi funzionali presenti nella cellula. Una variazione strutturale si riflette in una variazione dell'assorbimento di un gruppo, determinando quindi un cambiamento nel segnale in assorbanza nel campione trattato. Al fine di rendere confrontabili gli spettri IR tra di loro, tenendo conto allo stesso modo del fondo, è stata eseguita una linea di base spezzata che comprende i numeri d'onda ($2996\text{-}2832$; $1766\text{-}1486\text{-}1356\text{-}1184\text{-}935$) cm^{-1} . Gli spettri sono stati normalizzati all'Amide I. La preparazione dei campioni per le prove di spettroscopia IR, infatti, causa la perdita di informazioni sulla concentrazione cellulare e porta ad avere spettri con assorbanze diverse tra loro.

Le aree delle bande sono state calcolate con il software OPUS e quindi confrontate con l'area della corrispondente banda nel controllo.

La necessità di confrontare ogni spettro acquisito per il campione sonicato con il rispettivo controllo ci ha condotto a considerare il rapporto tra l'area di ciascuna banda dello spettro sonicato e l'area della stessa banda relativa al controllo. E' stato pertanto definito il parametro R_i , definito come rapporto di aree:

$$R_i = \frac{\text{Area del picco sonicato}}{\text{Area del picco di controllo}} \quad (5.1)$$

dove l'indice i diventa L nella regione dei lipidi (R_L) e P nella regione degli acidi nucleici (R_P); il parametro R_i è stato infatti valutato per ogni singola banda nella regione dei lipidi, delle proteine e degli acidi nucleici. Gli spettri IR di polipeptidi mostrano una serie di bande, chiamate Amidi, direttamente correlate a diversi modi vibrazionali del legame idrogeno. In particolare, l'Amide I è una banda compresa tra 1600 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} , ed è associata per il 70-80% allo stretching del gruppo C=O . L'Amide II, compresa tra 1500 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} , è associata per il 40-60% al bending del gruppo NH e per il 18-40% allo stretching del gruppo CN .

La banda più intensa di uno spettro cellulare è sicuramente l'Amide I, la cui forma è influenzata dall'intera struttura secondaria delle proteine cellulari.

L'analisi degli spettri IR nella zona dell'Amide I consente lo studio dei cambiamenti della struttura secondaria del contenuto proteico delle cellule, dove per struttura secondaria si intende l'arrangiamento in strutture spaziali regolari e ripetitive, mediante legami idrogeno, tra punti della catena amminoacidica. Esistono tipi diversi di struttura secondaria, i principali sono α -elica, foglietto- β e random coil.

Alfa elica (α -elica), che consiste in un arrangiamento elicoidale della catena di amminoacidi. In questa conformazione lo scheletro del polipeptide è strettamente arrotolato attorno a un asse centrale immaginario.

Foglietto beta (β -sheet), che consiste in una struttura planare formata da due o più sequenze amminoacidiche. A differenza della struttura ad α -elica che può essere assimilata ad un "bastoncino", la struttura β può essere assimilata ad un foglietto ripiegato. Le strutture foglietto β hanno una caratteristica conformazione a "zig-zag". Le porzioni di sequenza legate possono avere: la stessa direzione e allora si definiscono foglietti- β paralleli; la direzione opposta: si definiscono foglietti- β antiparalleli.

Ripiegamento beta (β -turns): si tratta di strutture che spesso uniscono due filamenti β antiparalleli a formare un'ansa simile a una "forcina per capelli": tale ripiegamento è responsabile dei

cambiamenti di direzione delle catene polipeptiche tipici delle proteine che assumono forma globulare.

Strutture disordinate (random coils): date dalla disposizione non ordinata e ripetitiva della catena amminoacidica.

In questo lavoro, al fine di risalire alle eventuali variazioni sulla struttura secondaria del contenuto proteico presente nei campioni cellulari per effetto dell'esposizione ad US, è stata effettuata una procedura di *fitting* sull'Amide I e sull'Amide II. La procedura di *fitting* è stata effettuata assumendo che le bande analizzate siano scomponibili in un certo numero di gaussiane, ove ogni gaussiana rappresenta il contributo di un tipo di struttura secondaria. Il numero d'onda, l'area e la larghezza delle gaussiane sono i dati in input per il fit. Di questi parametri si sono fissati solo i numeri d'onda delle campane sotto l'Amide I, lasciando liberi gli altri.

Le assegnazioni dei picchi delle gaussiane corrispondenti a ciascuna struttura, utilizzate in questa analisi, sono quelle riportate in letteratura (Lin, 2004) in accordo con lo studio della derivata seconda degli spettri (tabella 5.2).

Strutture secondarie	Numero d'onda (cm ⁻¹)
antip.β-sheets	1670-1683
β-turns	1660-1683
3-10 helix	1650-1658
unordered	1652-1660
α-helix	1640-1648
β-sheet	1628-1633
β-strands	1618-1628
saddle	≈ 1585
amide II	≈ 1545

Tabella 5.2: strutture secondarie usate nella deconvoluzione delle regioni dell'amide I e II attraverso curve Gaussiane con i corrispondenti range di numeri d'onda.

Per fittare l'Amide I, si è ipotizzato che possa essere deconvoluta in sei Gaussiane, mentre per l'Amide II la deconvoluzione è stata effettuata con due curve (figura 5.2 ove è riportato il fit di uno spettro di controllo di cellule NIH-3T3).

Si è scelto di aggiungere alle campane relative a ciascuna struttura, altre due campane che assorbono in prossimità della coda dell'Amide I; infatti una campana è centrata nel massimo dell'Amide II e l'altra nel punto di sella tra le due Amidi. La coda delle gaussiane di queste strutture, infatti, cade nell'Amide II e verrebbe troncata nel caso in cui il *fit* venisse fatto solo sull'Amide I.

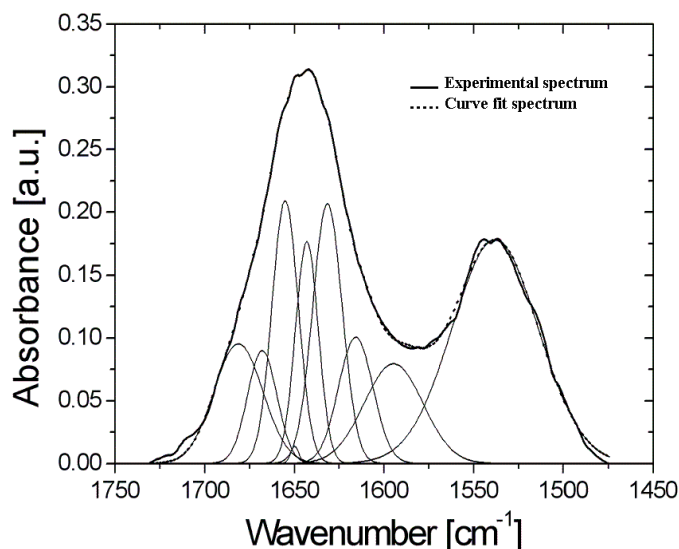


Figura 5.2: fit di uno spettro di controllo di cellule NIH-3T3. Nella figura lo spettro di controllo ha linea spessa, le otto curve gaussiane sono riportate con linee sottili e il fit risultante ha la linea tratteggiata.

I fit sui dati sperimentali sono stati eseguiti con il programma OPUS 5.0 (Bruker Optik).

Agli spettri analizzati con questa procedura di fitting, è stata fatta una *baseline* tra i numeri d'onda (1730-1475) cm^{-1} , anche in questo caso per rendere gli spettri confrontabili e per tenere conto del fondo, allo stesso modo per tutti gli spettri analizzati.

Una volta eseguito il *fit*, per determinare il contributo percentuale delle varie strutture alla struttura secondaria, viene calcolato il peso dell'area di ciascuna gaussiana rispetto alla somma delle aree delle singole gaussiane, ovviamente omettendo nel calcolo i contributi dovuti ad amide II e sella.

E' stato pertanto introdotto un ulteriore parametro R_s , definito come

$$R_s = \frac{\% \text{Area della curva gaussiana relativa a ciascuna struttura secondaria}}{\% \text{Somma delle aree di tutte le curve gaussiane}} \quad (5.2)$$

dove l'indice s è relativo a ciascuna struttura secondaria presente nella tabella 5.2.

Effettuare misure di spettroscopia infrarossa su cellule viventi vuol dire misurare sistemi dinamici. Le caratteristiche strutturali delle cellule si modificano nel tempo a seconda di fattori esterni, quali le perturbazioni apportate dal procedimento di misura e la preparazione dei campioni, e fattori intrinseci alle cellule quali la vitalità e le caratteristiche biologiche dei campioni. Insieme alle misure di spettroscopia su campioni trattati sono state eseguite misure su cellule non esposte al campo acustico (campioni di controllo). Nel presentare i risultati sperimentali relativi alla variazione di struttura secondaria nelle cellule esposte al campo acustico, si è scelto pertanto di considerare un parametro R che è definito come

$$R = \frac{\%struttura\ secondaria\ campione\ sonicato}{\%struttura\ secondaria\ campione\ controllo} \quad (5.3)$$

La variazione del rapporto tra percentuali di struttura secondaria del campione sonicato rispetto al relativo controllo permette di tenere conto delle diverse caratteristiche dei campioni per ogni prova.

5.2 Analisi statistica dei dati FTIR: la PCA

L'analisi statistica dei dati spettroscopici è stata effettuata mediante *l'Analisi delle componenti principali* (PCA), tecnica utilizzata nell'ambito della statistica multivariata per estrarre la massima informazione possibile contenuta in una struttura di dati (Bombalska, 2011). L'idea principale su cui si basa la PCA è quella di rappresentare un insieme di dati più o meno complesso con un numero inferiore di variabili non correlate, che siano ottenute da una particolare combinazione lineare delle variabili originali e che riassumano le caratteristiche dei dati stessi. Ciò avviene tramite una trasformazione lineare delle variabili in un nuovo insieme di variabili composite (componenti principali) ortogonali (cioè indipendenti) tra di loro, che conservano al massimo la variabilità dei dati da cui provengono; tale trasformazione proietta le variabili originarie in un nuovo sistema cartesiano, nel quale le variabili vengono ordinate in ordine decrescente di varianza. Dal punto di vista geometrico, la PCA consiste in un processo di rotazione dei dati originali, effettuato in modo che il primo nuovo asse (che costituisce la prima componente principale PC1) sia orientato nella direzione di massima varianza dei dati, il secondo PC2, sia perpendicolare al primo e sia nella direzione della successiva massima varianza dei dati, e così di seguito. Poiché i componenti principali sono gli assi relativi alle direzioni di massima varianza, in ordine via via decrescente, la prima componente principale sarà in grado di spiegare la maggior percentuale di varianza, la seconda ne spiegherà un po' meno, la terza meno ancora e così via, fino a che le ultime componenti contribuiranno a spiegare poco o nulla della variabilità presente nei dati in esame. In questi casi è quindi possibile eliminare parte della variabilità residua (e quindi anche parte del "rumore" che accompagna l'informazione rilevante) prendendo in considerazione solo un numero di componenti minore del numero delle variabili originali.

Nel corso di questo lavoro, per l'analisi dei dati, due PCs sono state selezionate dai dati spettroscopici; PCA procede sostituendo tutte le variabili spettrali in combinazioni lineari di PCs. Similarità e differenze tra gli spettri IR, ottenuti alle 3 distanze campione-trasduttore per i differenti tempi di esposizione agli US, possono essere individuate realizzando uno score-plot bidimensionale in cui l'informazione spettroscopica viene ridotta in un unico punto che ha come coordinate le

componenti PCA scelte come assi per lo score-plot. Una crescente separazione spaziale tra i punti nello score-plot è proporzionale al livello di dissimilarità negli spettri in termini di assorbanza.

Attraverso l'analisi dei *loading plot*, le componenti PCA consentono di individuare le regioni (ossia i numeri d'onda) dello spettro FTIR, che più contribuiscono al clustering osservato nello score plot.

Gli spettri IR sono stati elaborati prendendone la derivata seconda secondo l'algoritmo Savitzky-Golay con 13 punti di smoothing e normalizzati all'intensità dell'Amide I.

5.3 Spettroscopia FTIR: risultati sperimentali

Di seguito sono riportati i risultati sperimentali relativi alla spettroscopia FTIR su campioni di cellule NIH-3T3 irradiati con US alle frequenze di 1 MHz 75% *High* e 3 MHz 100% *High*, al variare della distanza campione-trasduttore (SSD= 5, 10, 15 cm) e del tempo di esposizione (t=5', 15', 30', 45', 60').

5.3.1 Effetti degli ultrasuoni sulle strutture lipidiche

Lo studio degli spettri IR di campioni cellulari permette di valutare variazioni conformazionali di gruppi funzionali appartenenti a strutture lipidiche.

In base all'assegnazione delle bande dello spettro IR, si ha che le bande denominate L₁, L₂, P₁ e P₂ possono essere correlate ai lipidi presenti nella cellula.

La regione dello spettro tra 3000 - 2800 cm⁻¹ è assegnata principalmente alle strutture lipidiche dei fosfolipidi di membrana, di cui L₁ e L₂ sono le bande più intense. Le bande L₁ (2960 cm⁻¹) ed L₂ (2920 cm⁻¹) sono riferite allo stretching asimmetrico di CH rispettivamente nel gruppo metile (-CH₃) e metilene (-CH₂) dei fosfolipidi di membrana, che rappresentano in genere il 70% del peso lipidico totale. Variazioni nell'assorbanza relativa ai gruppi CH presenti nei gruppi metile e metilene terminale di queste strutture rappresentano quindi un parametro in grado di caratterizzare lo stato strutturale e funzionale delle membrane cellulari.

In figura 5.3 sono riportati gli spettri FTIR nella regione dei lipidi (tra 3000 e 2800 cm⁻¹) registrati per esposizione dei campioni ad US alla frequenza di 1 MHz 75% *High* e 3 MHz 100% *High*, alle 3 distanze campione trasduttore SSD=5, 10, 15 cm per i diversi tempi di sonicazione t=5', 15', 30', 45' 60'.

Per esposizioni ad US alla frequenza di 1 MHz, la figura 5.4 mostra l'analisi PCA applicata alla derivata seconda degli spettri relativi alla regione dei lipidi, in relazione alla distanza campione-trasduttore SSD=5 cm, per i 5 tempi di sonicazione considerati; la figura 5.4b mostra il loading plot utilizzato per individuare le regioni dello spettro IR che maggiormente contribuiscono al clustering

osservato nello score plot. L'analisi statistica evidenzia che, per SSD=5 cm, le popolazioni relative ai campioni esposti ad US per 45' e 60' sono nettamente separate rispetto al controllo e dagli altri esposti, che formano invece un cluster. Dallo score plot si evince pertanto che la sonicazione per i suddetti tempi agisce in maniera significativa sulle strutture lipidiche dei campioni esposti alla distanza campione trasduttore pari a 5 cm.

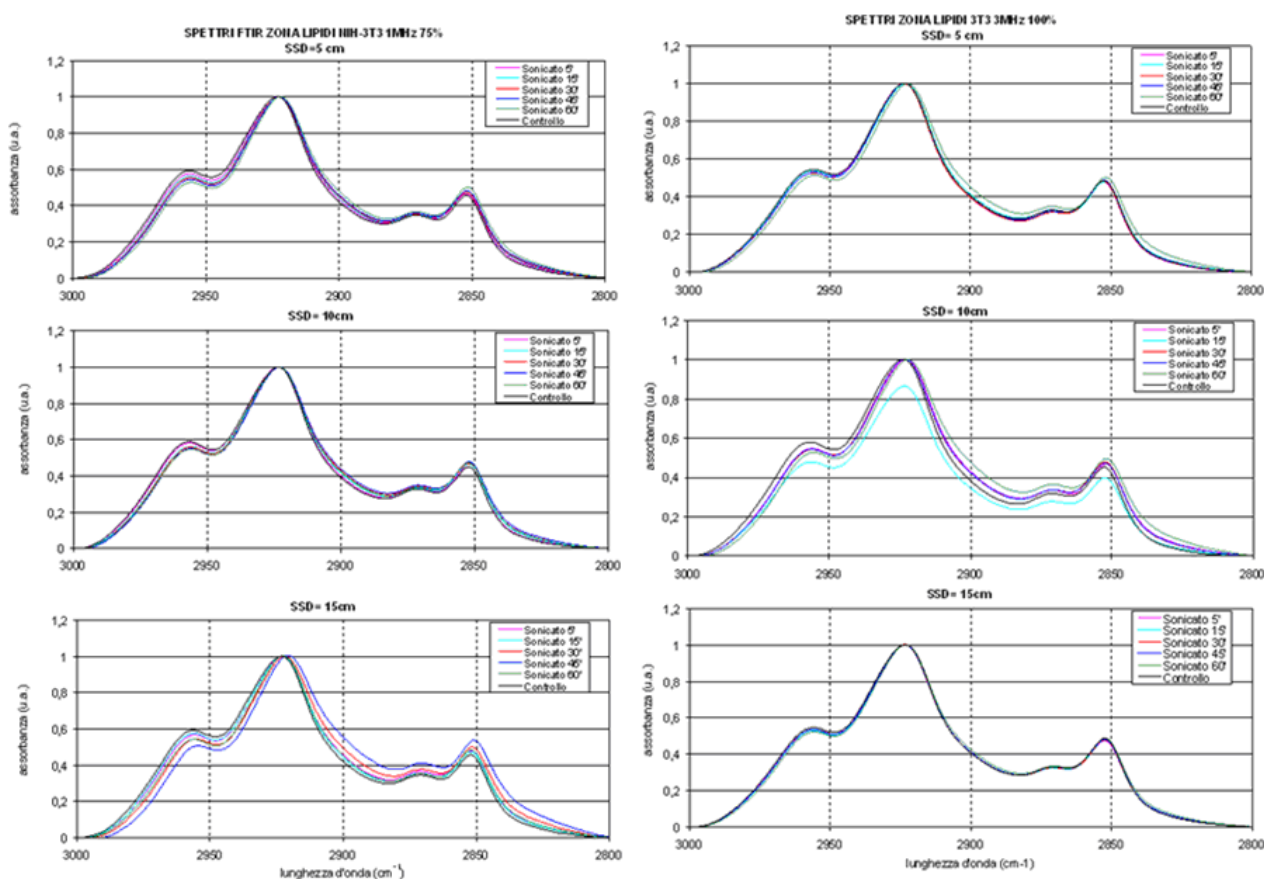


Figura 5.3: spettri FTIR del controllo e dei campioni esposti a US a 1 MHz 75% e 3 MHz 100%, alle distanze campione-trasduttore SSD=5, 10, 15 cm ai tempi di sonicazione 5', 15', 30', 45' e 60'; zona lipidi

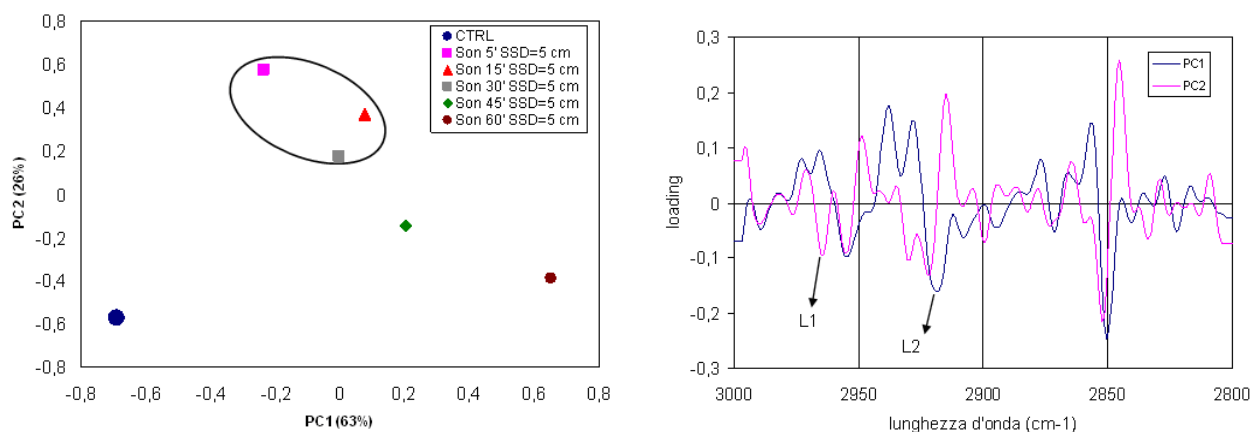


Figura 5.4: PCA su dati spettroscopici per esposizioni a US a 1 MHz SSD=5 cm regione dei lipidi e relativo loading plot

La figura 5.5 mostra l'analisi PCA effettuata sui dati spettroscopici riferiti alla sonicazione alla frequenza di 1 MHz, in corrispondenza della distanza campione-trasduttore pari a SSD=10 cm, per tutti i tempi. In questo caso, i risultati mostrano che le popolazioni esposte per 5' e 45' appaiono distinte dal controllo e dagli altri esposti; si ipotizza pertanto, per i suddetti tempi di sonicazione, una significatività statistica dell'effetto dell'esposizione ad US in corrispondenza della distanza SSD=10 cm.

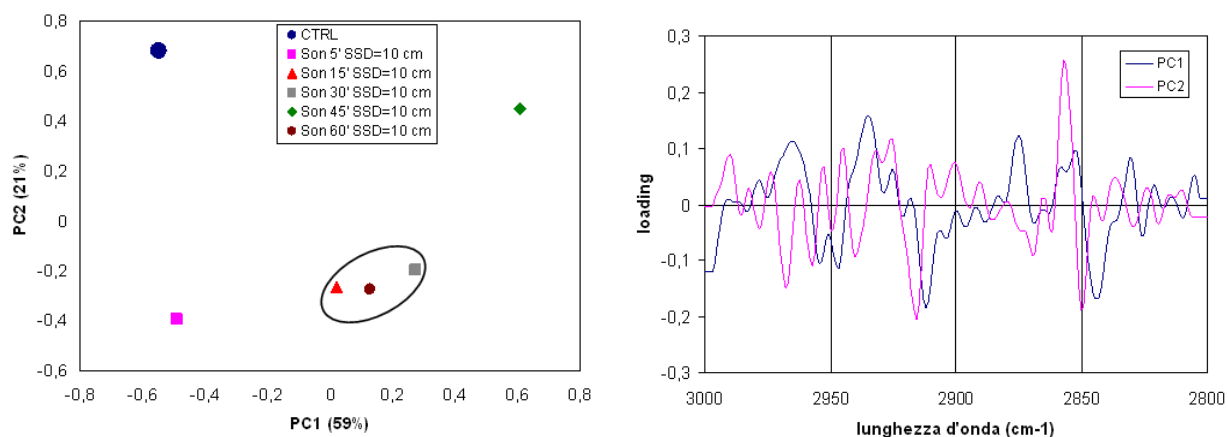


Figura 5.5: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz SSD=10 cm regione dei lipidi e relativo loading plot

In figura 5.6 sono riportati i risultati dell'analisi PCA applicata ai dati spettroscopici ottenuti per esposizioni dei campioni cellulari ad US alla distanza campione-trasduttore SSD=15 cm per tutti i tempi di esposizione; la figura 5.6b mostra il relativo loading plot. I risultati mostrano che, in questa configurazione, la popolazione relativa al tempo di sonicazione di 45' è l'unica non clusterizzata e separata rispetto al controllo.

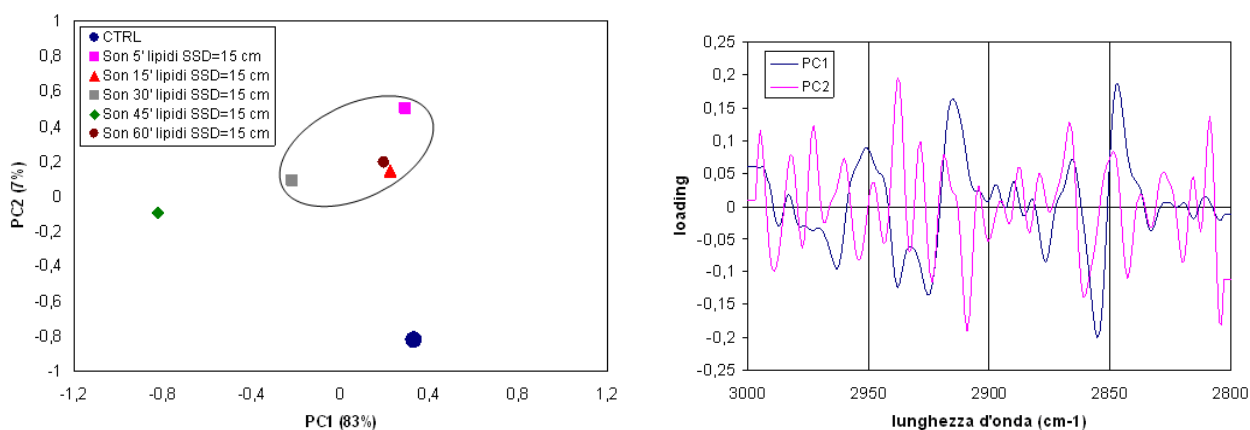


Figura 5.6: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz SSD=15 cm regione dei lipidi e relativo loading plot

La figura 5.7 mostra l'analisi PCA sui dati spettroscopici relativi alla regione dei lipidi, per esposizioni dei campioni cellulari ad US alla frequenza di 3 MHz alla distanza SSD=5 cm, con il relativo loading plot; in questa condizione sperimentale, le popolazioni spettrali dei campioni esposti per 15' e 60' appaiono nettamente distinte dal controllo e dagli altri esposti, i quali formano un cluster.

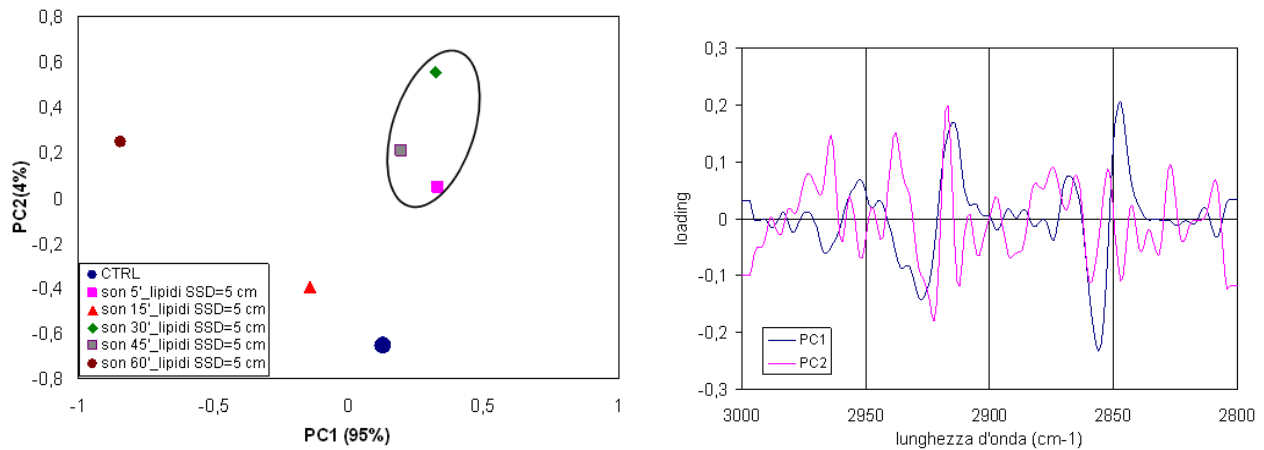


Figura 5.7: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 3 MHz SSD=5 cm regione dei lipidi e relativo loading plot

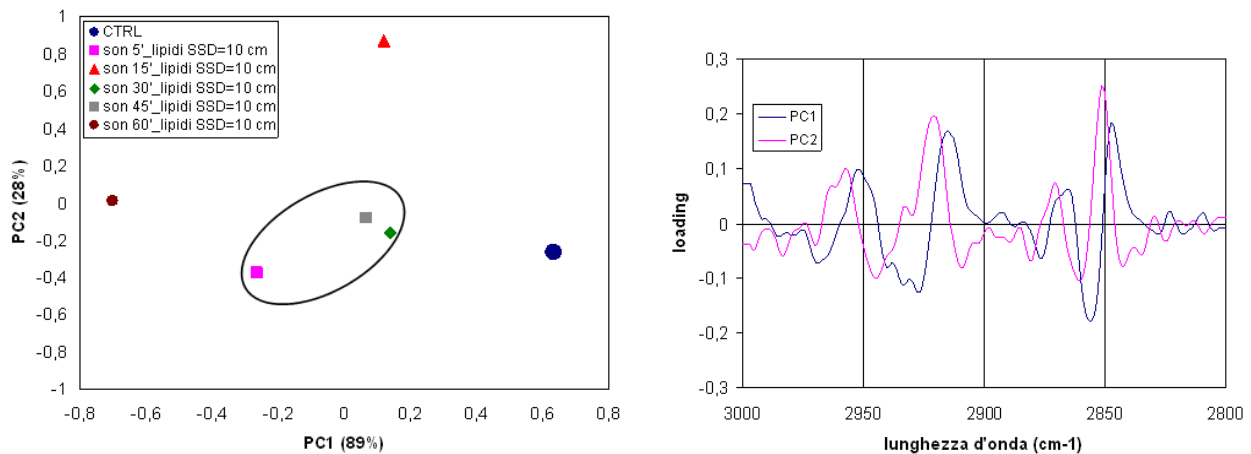


Figura 5.8: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 3 MHz SSD=10 cm regione dei lipidi e relativo loading plot

Alla distanza campione-trasduttore di 10 cm, l'analisi PCA (figura 5.8 con relativo loading plot) mostra che le popolazioni spettrali relative ai tempi di sonicazione di 15' e 60' appaiono distanti dal controllo e dalle popolazioni relative ad altri tempi, che formano invece un cluster. La sonicazione sembra pertanto agire in maniera significativa per i soli tempi di esposizione di 15' e 60' alla distanza SSD=10 cm.

Per quanto riguarda la distanza SSD=15 cm, l'analisi PCA (figura 5.9 e relativo loading plot) mostra che la sonicazione sembra produrre variazioni significative nelle strutture lipidiche per esposizioni a 5' e 60', che risultano separate dal controllo e dagli altri esposti.

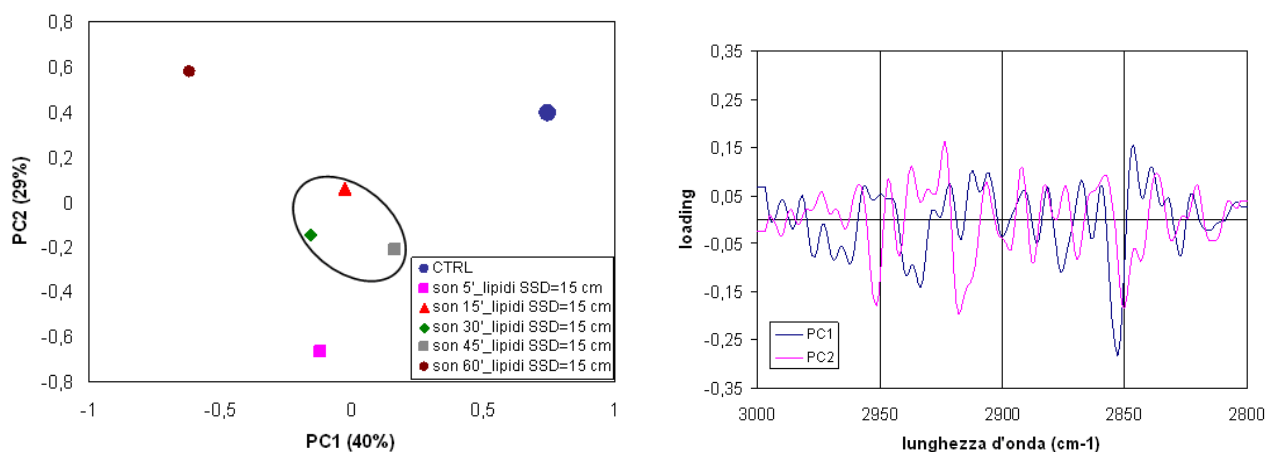


Figura 5.9: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 3 MHz SSD=15 cm regione dei lipidi e relativo loading plot

In figura 5.10 sono riportati le variazioni dei parametri R_{L1} e R_{L2} , in funzione del tempo, per differenti distanze campione-trasduttore, per esposizioni ad US a 1 MHz e 3 MHz.

I parametri spettroscopici R_L sono stati calcolati in accordo con la (5.1), considerando il rapporto tra l'area di una banda dello spettro sonicato e l'area della stessa banda relativa al controllo; tali parametri si riferiscono ai seguenti rapporti di aree: $R_{L1} = L_{1sonicato} / L_{1controllo} = (L_{1s} / L_{1c})$ e $R_{L2} = L_{2s} / L_{2c}$ per i differenti tempi di esposizione in corrispondenza delle 3 distanze SSD=5, 10 e 15 cm, alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz. Si considera che il parametro R_L varia in maniera significativa solo se la differenza rispetto all'unità è maggiore di 0,2 ($0,8 > R > 1,2$).

Dalla figura 5.10, si osserva una diminuzione dei modi vibrazionali di stretching associati alle strutture CH_3 (banda L_1) per esposizione alla frequenza di 1 MHz. In particolare, in accordo con l'analisi PCA, si osserva che variazioni significative dei parametri analizzati possono essere attribuite alle configurazioni espositive relative alla distanza campione-trasduttore SSD=15 cm per il tempo di sonicazione di 45' e alla distanza SSD=5 cm e al tempo di sonicazione di 60'.

L'area della banda L_2 dei campioni sonicati alla frequenza di 1 MHz non mostra variazioni al crescere del tempo di sonicazione rispetto ai controlli.

I parametri R_{L1} e R_{L2} alla frequenza di 3 MHz, non mostrano variazioni significative, eccetto che per la distanza SSD=10 cm, per i tempi di sonicazione 15' e 60'; tale risultanza appare in accordo con la significatività statistica dei dati analizzati con PCA in figura 5.8.

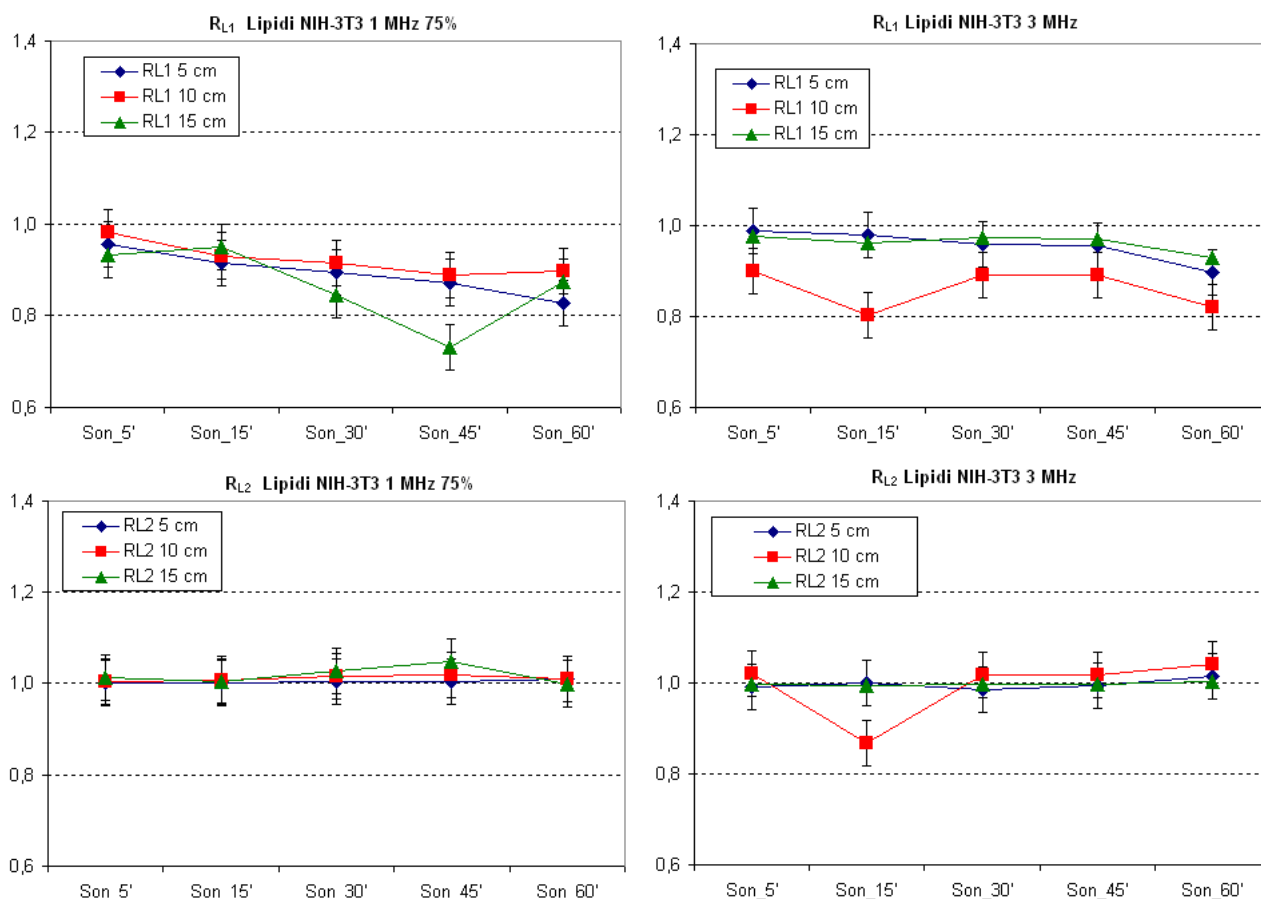


Figura 5.10: andamenti dei parametri R_{L1} R_{L2} in funzione del tempo di sonicazione per le 3 distanze SSD=5, 10, 15 cm alle due frequenze 1 MHz e 3 MHz.

La figura 5.11 mostra l'intero spettro FTIR in assorbanza della regione amidica (Amide I e II) fino agli acidi nucleici, per esposizioni a 1 MHz e 3 MHz, in corrispondenza delle 3 distanze campione-trasduttore SSD=5, 10, 15 cm e per i tempi 5', 15', 30', 45', 60'.

In questa regione sono localizzate anche le bande P_1 (1455 cm^{-1}) e P_2 (1395 cm^{-1}), tipicamente associate al bending dei gruppi metilene (CH_2) e metile (CH_3) presenti nei lipidi di membrana.

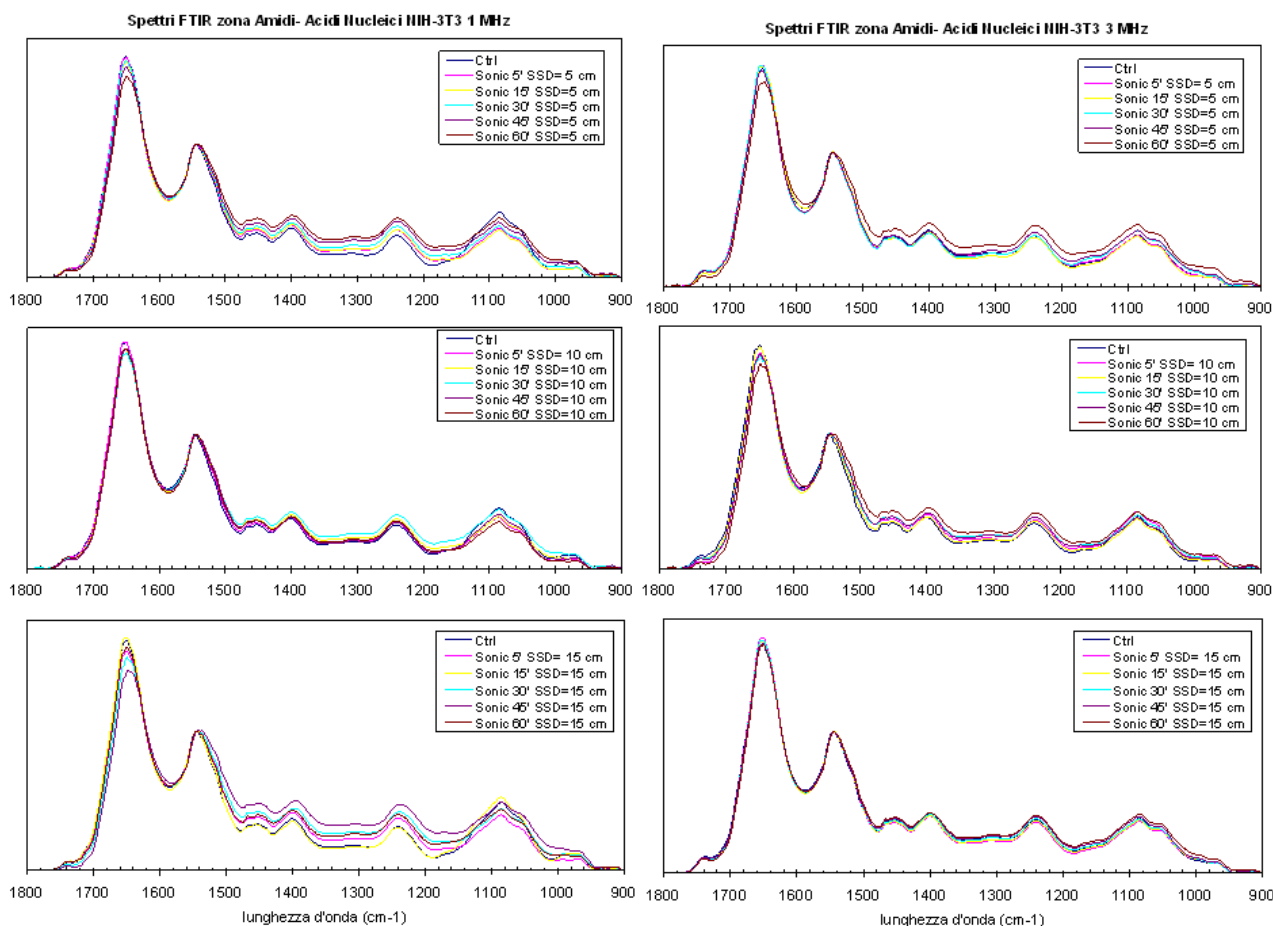


Figura 5.11: spettro FTIR delle regione amidica e nucleotidica per esposizioni a US a 1 MHz e 3 MHz

Per quanto riguarda la regione spettrale corrispondente alle bande P_1 e P_2 , compresa tra 1500-1300 cm^{-1} , la figura 5.12 mostra l'analisi PCA applicata alla derivata seconda degli spettri ottenuti per esposizione ad US alla frequenza di 1 MHz, alla distanza campione-trasduttore di 5 cm, per tutti i tempi di esposizione. I risultati mostrano che, per questa configurazione espositiva, la sonicazione sembra agire in maniera significativa per esposizioni ai tempi 5' e 60'.

La figura 5.13 mostra lo scatter plot per i dati spettroscopici nella stessa regione, relativi alla esposizione ad US alla distanza SSD=10 cm. In questo caso è possibile rilevare una ampia separazione spaziale tra i punti dello score plot corrispondenti alle esposizioni per i tempi di 5' e 30', distinti dal restante cluster di dati e dal controllo.

Da ultimo, per questa regione spettrale, la figura 5.14 si riferisce all'analisi PCA per campioni relativi alla distanza campione-trasduttore di 15 cm. I risultati mostrano che in corrispondenza della suddetta distanza, appaiono significativi i dati relativi ad esposizioni a 15', 30', 45' e 60'.

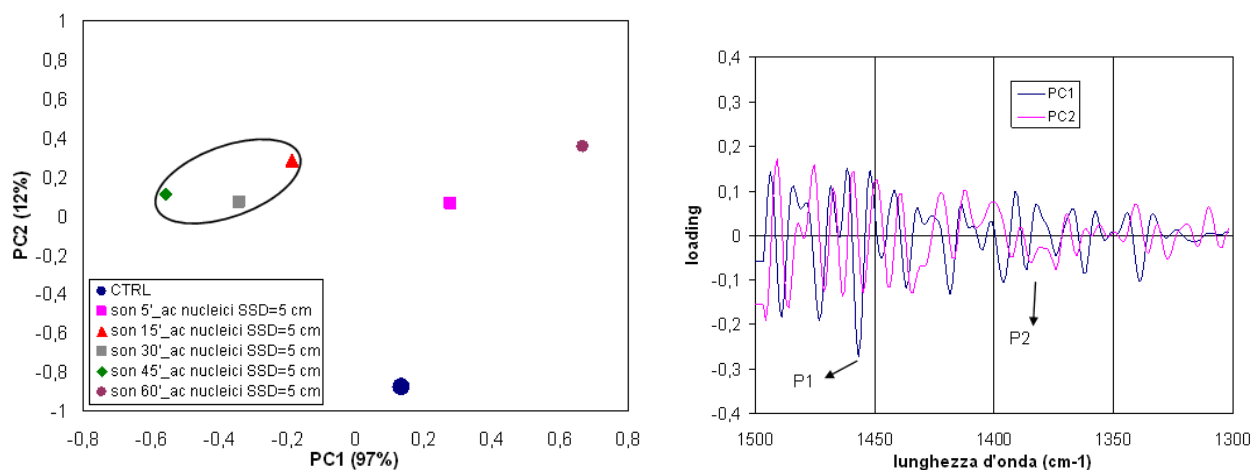


Figura 5.12: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz SSD=5 cm, regione spettroscopica associata alle bande P_1 e P_2 e relativo loading plot.

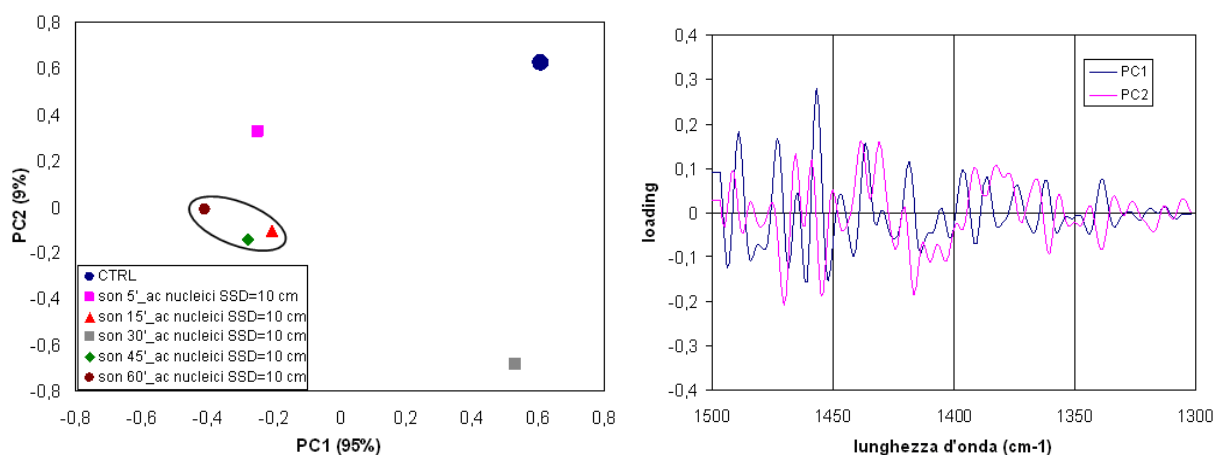


Figura 5.13: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz SSD=10 cm, regione spettroscopica associata alle bande P_1 e P_2 e relativo loading plot.

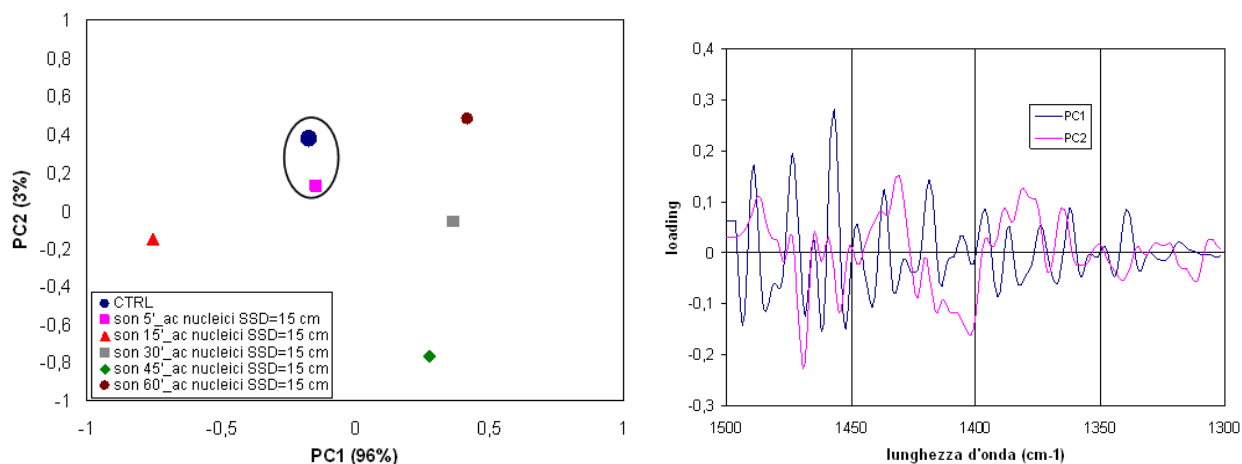


Figura 5.14: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz SSD=15 cm, regione spettroscopica associata alle bande P_1 e P_2 e relativo loading plot.

Per quanto riguarda la regione spettrale a cui appartengono le bande P_1 e P_2 per esposizioni dei campioni cellulari ad US alla frequenza di 3 MHz, l'analisi PCA per la distanza campione-trasduttore SSD=5 cm (figura 5.15 con relativo loading plot), mostra che gli spettri per i quali è presente una significatività sono quelli relativi ad esposizioni a 15', 45' e 60'.

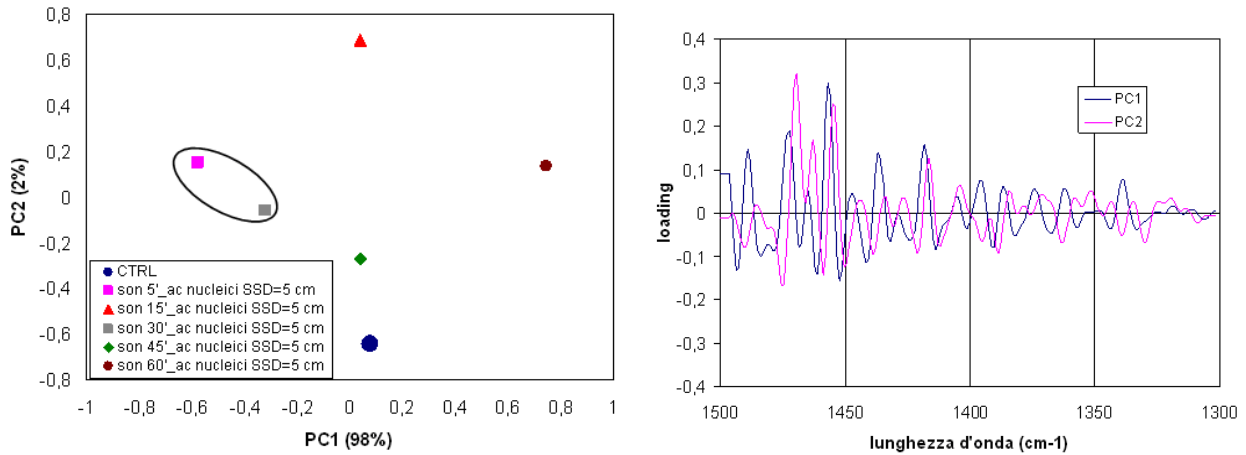


Figura 5.15: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 3 MHz SSD=5 cm, regione spettroscopica associata alle bande P_1 e P_2 e relativo loading plot.

Dalla figura 5.16 si osserva che per esposizione dei campioni a 3 MHz, distanza di sonicazione di 10 cm, i tempi di esposizione in corrispondenza dei quali gli US sembrano produrre un effetto significativo sono 30' e 60', che appaiono separati dal restante cluster di dati e dal controllo.

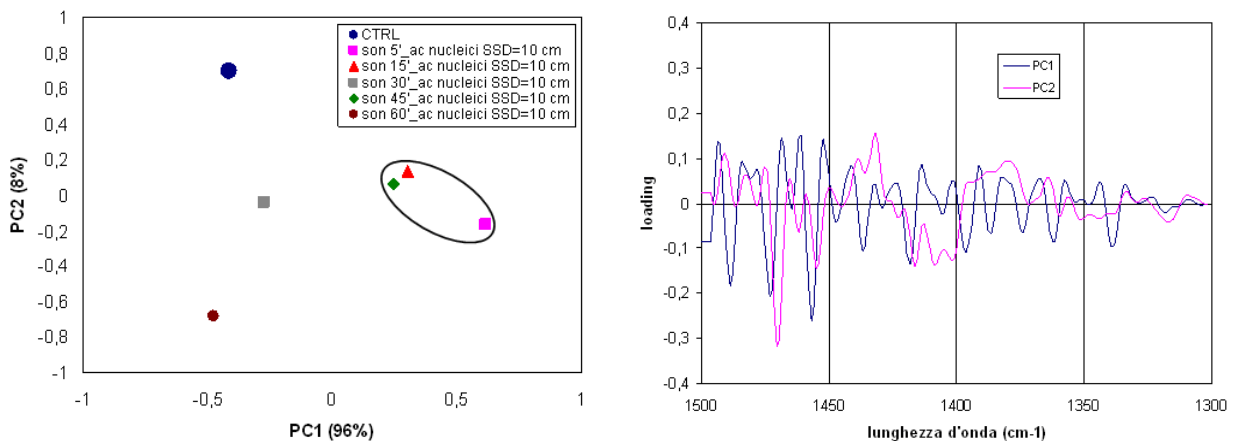


Figura 5.16: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 3 MHz SSD=10 cm P_1 P_2 , regione spettroscopica associata alle bande P_1 e P_2 e relativo loading plot.

Per quanto riguarda le bande P_1 e P_2 , sono stati calcolati, in accordo con la (5.2) i parametri spettroscopici riferibili a rapporti di aree R_{P1} e R_{P2} : $R_{P1} = P_{1sonicato} / P_{1controllo}$ (P_{1s} / P_{1c}) e $R_{P2} = P_{2s} / P_{2c}$. La

Figura 5.17 mostra i cambiamenti nei parametri R_p in corrispondenza dei differenti tempi di esposizione, per le 3 distanze SSD=5, 10, 15 cm, rispettivamente alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz.

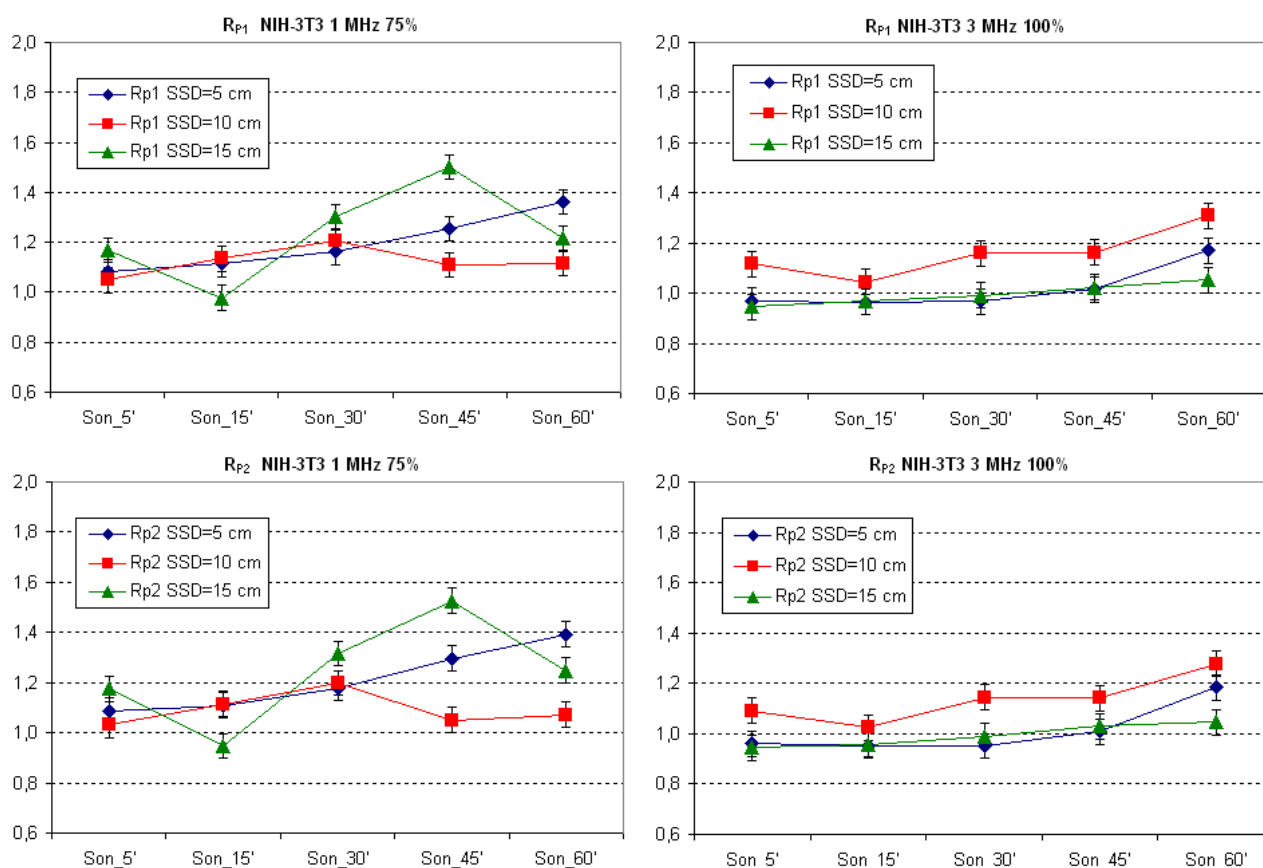


Figura 5.17: andamenti dei parametri R_{p1} R_{p2} in funzione del tempo di sonicazione per le 3 distanze SSD=5, 10, 15 cm alle due frequenze 1 MHz e 3 MHz.

La figura 5.17 mostra come nei campioni sonicati alla due frequenze, l'andamento dei rapporti tra le aree dei campioni sonicati rispetto ai controlli è simile per le due bande prese in considerazione. In particolare, per la frequenza 1 MHz, gli andamenti del parametro R per le bande P_1 (bending asimmetrico del gruppo metilenico CH_2), e P_2 (bending del gruppo metile CH_3 nei lipidi di membrana) mostrano che l'area del campione sonicato è quasi sempre maggiore di quella del controllo e comunque superiori rispetto a P_2 , con aumento dell'assorbanza dei campioni trattati rispetto ai controlli.

Va sottolineato che la distanza con variazioni più rilevanti nei parametri R_{p1} e R_{p2} è sicuramente SSD=15 cm 1 MHz per tempi di sonicazione superiore ai 30', in accordo con quanto rilevato con l'analisi PCA. Anche alla distanza SSD=5 cm si evidenziano variazioni importanti per tempi di sonicazione di 45' e 60'. In accordo con quanto ottenuto dall'analisi delle componenti principali, la variazione dei parametri R_{p1} e R_{p2} che, a questa distanza, può essere considerata significativa è quella relativa a SSD=5 cm, t=60'. Per quanto riguarda la distanza SSD=10 cm, in accordo con

l'analisi statistica dei dati, si può riconoscere significatività nella variazione dei parametri R_p in corrispondenza del tempo di esposizione $t=30'$.

Si evidenzia un differente assorbimento dei modi di stretching e bending del gruppo CH alla frequenza di 1 MHz, con diminuzione dell'assorbanza dei modi di stretching (R_{L1}) e un aumento dell'assorbanza del modo di bending (R_{P1}) dei campioni sonicati rispetto al controllo. Va sottolineato che la distanza con variazioni più rilevanti in entrambi i casi è SSD=15 cm 1 MHz, $t=45'$.

Per la frequenza di 3 MHz, aumenti dell'assorbanza per le 2 bande P_1 e P_2 sono rilevabili per la distanza SSD=10 cm e per tempi di sonicazione pari a 30' e 60', in accordo con quanto ottenuto dall'analisi statistica.

Quindi in generale possiamo concludere che gli US a 1 MHz e a 3 MHz su fibroblasti sembrano produrre effetti sulla struttura lipidica più evidenti per la frequenza di 1 MHz, prevalentemente in corrispondenza delle configurazioni espositive SSD=5 cm $t=60'$ e SSD=15 cm e il tempo di sonicazione di 45'; per la frequenza di 3 MHz in corrispondenza della distanza SSD=10 cm e per il tempo di sonicazione più lungo pari a 60'.

5.3.2 Effetti degli ultrasuoni sulle strutture dell'Amide I e Amide II

Lo studio delle bande Amide I e Amide II mediante spettroscopia IR è utile in quanto ci permette di osservare eventuali variazioni nell'assorbimento da parte di strutture proteiche presenti nella cellula. In figura 5.11 sono già stati riportati gli spettri registrati nella regione amidica, in cui è evidente il picco importante dell'Amide I, posizionato a circa 1640 cm^{-1} .

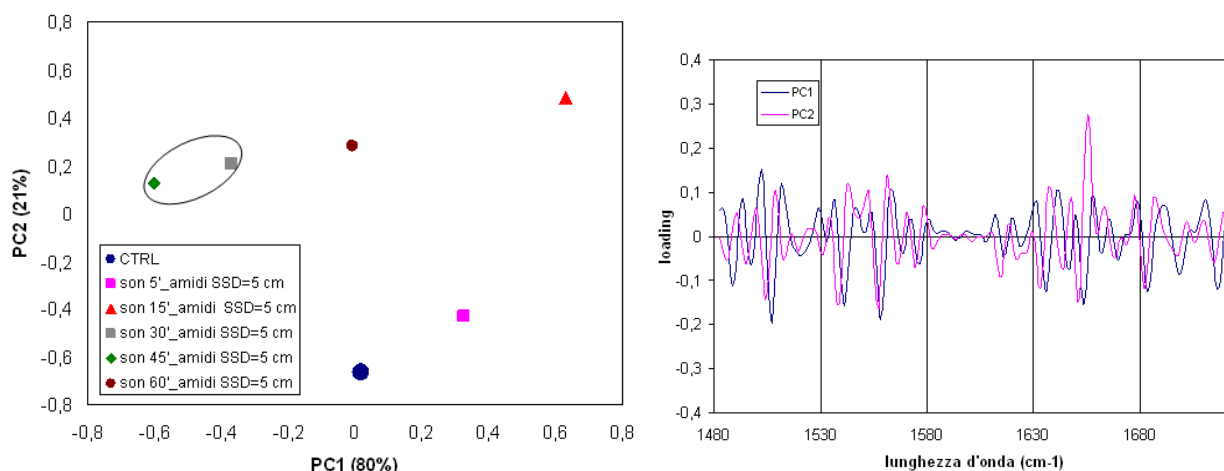


Figura 5.18: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz SSD= 5 cm, regione amidica

In questa regione, l'analisi PCA applicata alla derivata seconda degli spettri ottenuti per esposizioni dei campioni cellulari ad US alla frequenza di 1 MHz per le distanze SSD=5, 10, 15 cm per i differenti tempi, è riportata nelle figure 5.18, 5.19, 5.20.

I risultati mostrano che per SSD=5 cm, la sonicazione sembra produrre variazioni significative per esposizioni a t=5', 15' e 60'; per SSD=10 cm per t=30'; per SSD=15 cm per t=15', 30', 45' e 60'.

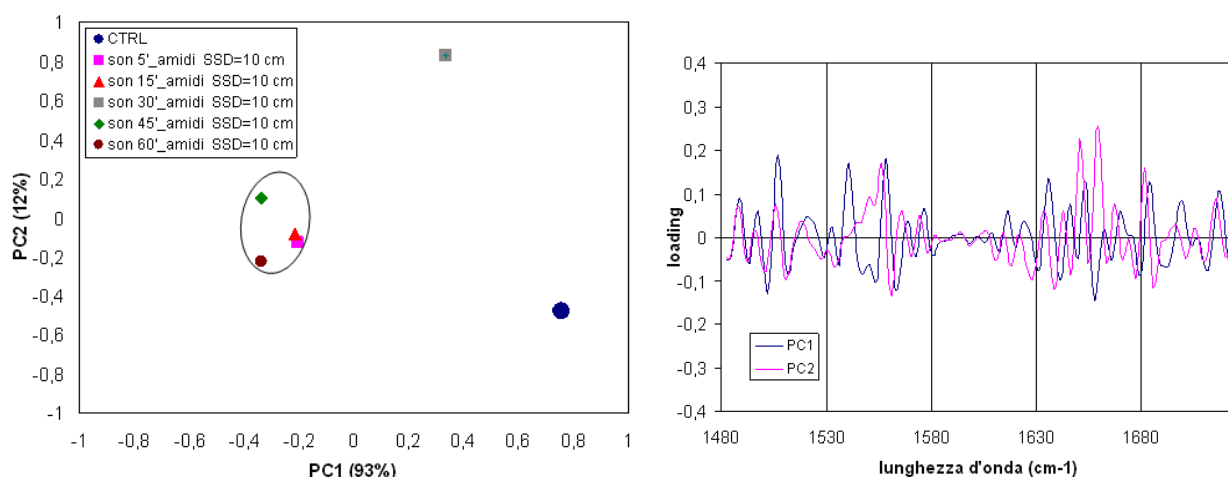


Figura 5.19: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz SSD= 10 cm, regione amidica

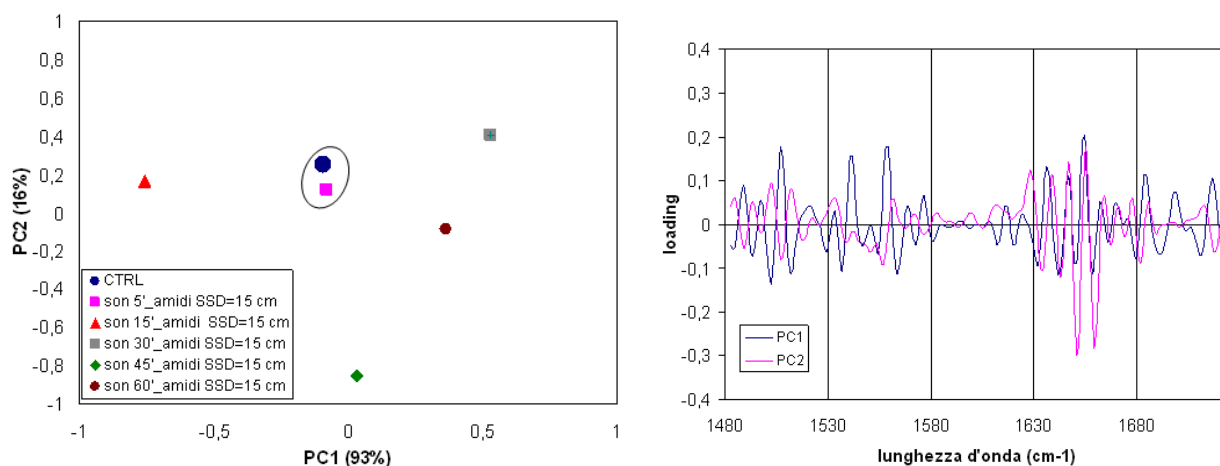


Figura 5.20: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz SSD= 15 cm, regione amidica

Per analizzare gli effetti degli US sulla struttura secondaria del contenuto proteico delle cellule, nella figura 5.21 viene riportato l'andamento del parametro R riferibile alle equazioni (5.2) e (5.3), per la frequenza di sonicazione di 1 MHz e per le tre distanze campione-trasduttore investigate (SSD=5, 10, 15 cm).

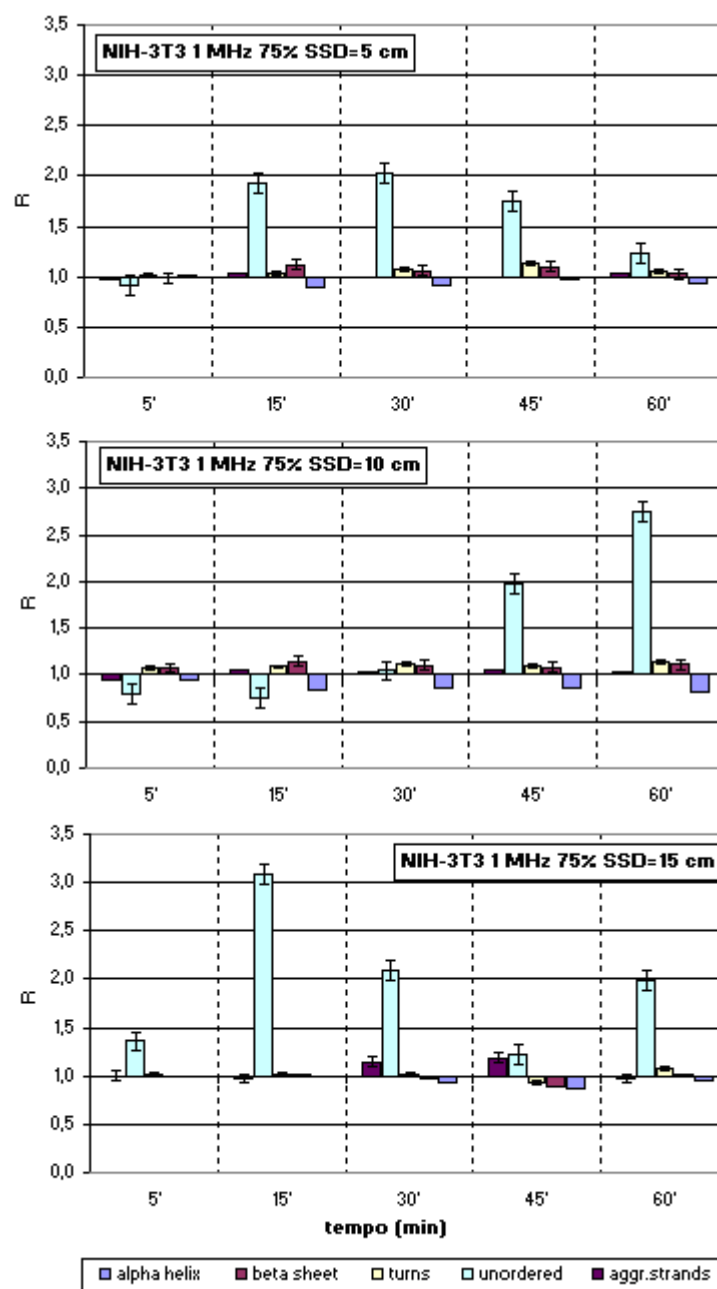


Figura 5.21: variazioni nelle strutture secondarie nella regione dell'Amide I per esposizione a US a 1 MHz

La figura 5.22 si riferisce al medesimo parametro calcolato per la frequenza di sonicazione di 3 MHz. In particolare, le variazioni del rapporto tra percentuale di struttura secondaria del campione sonicato e percentuale di struttura secondaria del controllo, sono state graficate in funzione del tempo di esposizione per entrambe le frequenze. Le variazioni dei rapporti tra le strutture secondarie considerate, sono quelle relative alle alfa eliche, ai foglietti beta, ai turns, alle strutture disordinate e agli aggregati strands.

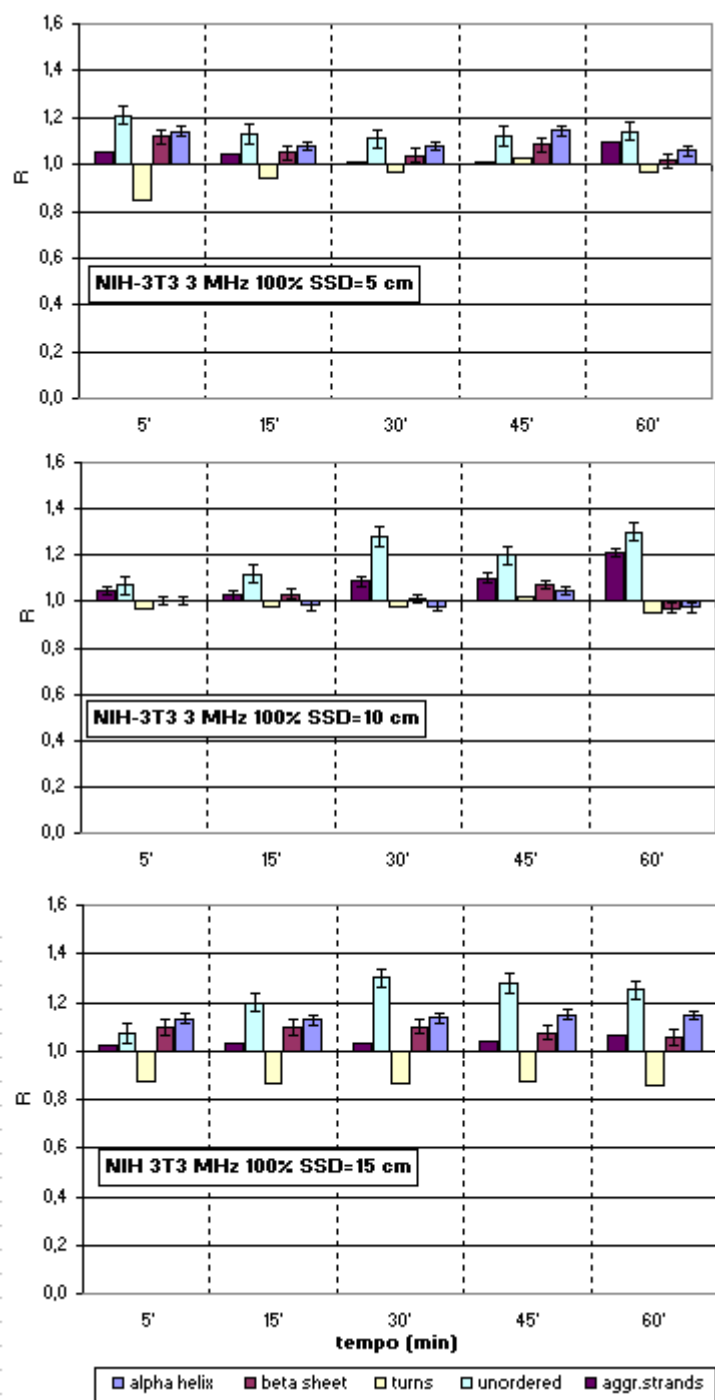


Figura 5.22: variazioni nelle strutture secondarie nella regione dell'Amide I per esposizione a US a 3 MHz

La Figura 5.21 mostra che la sonicazione alla frequenza di 1 MHz 75% *High* determina un aumento della percentuale di strutture disordinate nei campioni sonicati rispetto al controllo, tendenzialmente a tutte le distanze, con diminuzione delle strutture ordinate alfa elica. Tale risultato risulta in accordo con quanto rilevabile nei loading plots dell'analisi PCA, nei quali è possibile individuare che le più grandi differenze sono a carico di cambiamenti della struttura secondaria dell'Amide I identificabili con le strutture disordinate (tabella 5.2). In accordo con l'analisi PCA precedentemente riportata, la variazione nella percentuale di strutture secondarie più significativa

può considerarsi in corrispondenza della distanza SSD=5 cm, tempo di esposizione 15' e in corrispondenza di SSD=15 cm per esposizioni ai tempi 15', 30' e 60'.

Dalla figura 5.22 si evince che la sonicazione a 3 MHz non produce differenze sostanziali in merito alla variazione della percentuale di strutture secondarie dei sonicati rispetto ai controlli.

5.3.3 Effetti degli ultrasuoni nella regione degli acidi nucleici

Nella regione dello spettro attribuita principalmente agli acidi nucleici ($1300-950\text{ cm}^{-1}$), sono state valutate anche le variazioni di due ulteriori bande, denominate P₃ e P₄ (vedi tabella 5.1). Le bande P₃ (1240 cm^{-1}) e P₄ (1080 cm^{-1}) sono associate allo stretching rispettivamente asimmetrico e simmetrico dei gruppi fosfato presenti negli acidi nucleici.

In figura 5.11 sono già stati riportati gli spettri FTIR relativi a questa regione spettrale.

L'analisi PCA, applicata alle derivate seconde degli spettri, nella regione a cui appartengono le bande P₃ e P₄, per la frequenza di esposizione di 1 MHz e le distanze campione trasduttore di 5, 10 e 15 cm, è riportata nelle figure 5.23, 5.24 e 5.25 con i relativi loading plots.

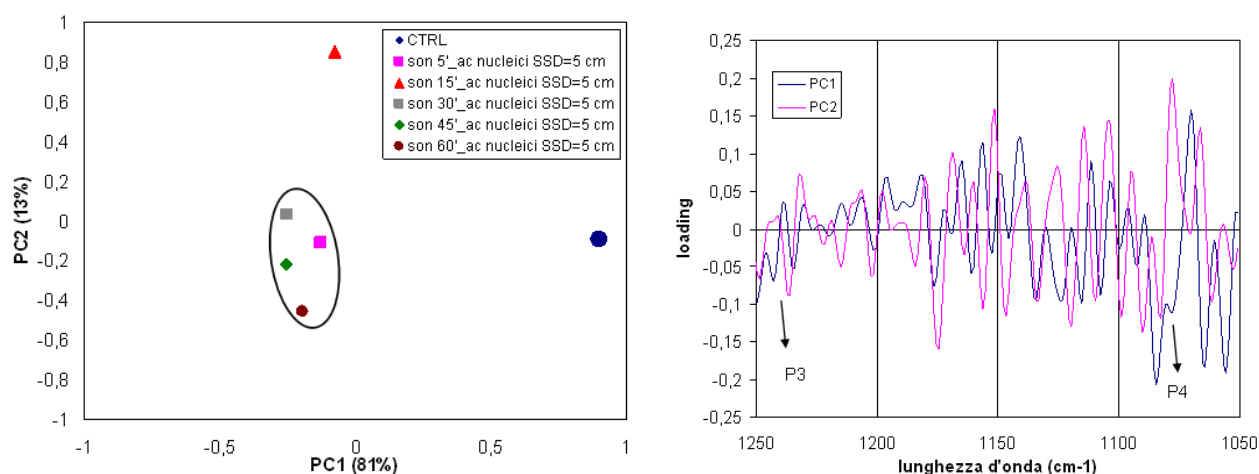


Figura 5.23: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz SSD= 5 cm, regione acidi nucleici

I risultati mostrano che, per la distanza SSD=5 cm, l'unico dato significativo è quello relativo al tempo di sonicazione di 15'; per SSD=10 cm (figura 5.24), le popolazioni relative ai tempi di esposizione di 15' e 30' risultano lontane dal controllo e dagli altri esposti; per SSD=15 cm (figura 5.25), sono individuabili 3 distinti cluster di dati.

Per quanto riguarda l'esposizione ad US alla frequenza di 3 MHz, l'analisi PCA applicata ai dati spettroscopici è riportata nelle figure 5.26, 5.27 e 5.28.

I risultati mostrano la significatività dell'effetto della sonicazione per i tempi di $t=30'$, $45'$ e $60'$ alla distanza $SSD=5$ cm; per $SSD=10$ cm risultano significativi i dati ottenuti in corrispondenza di $t=5'$ e $15'$, mentre per la distanza $SSD=15$ cm i dati a $15'$ e $60'$.

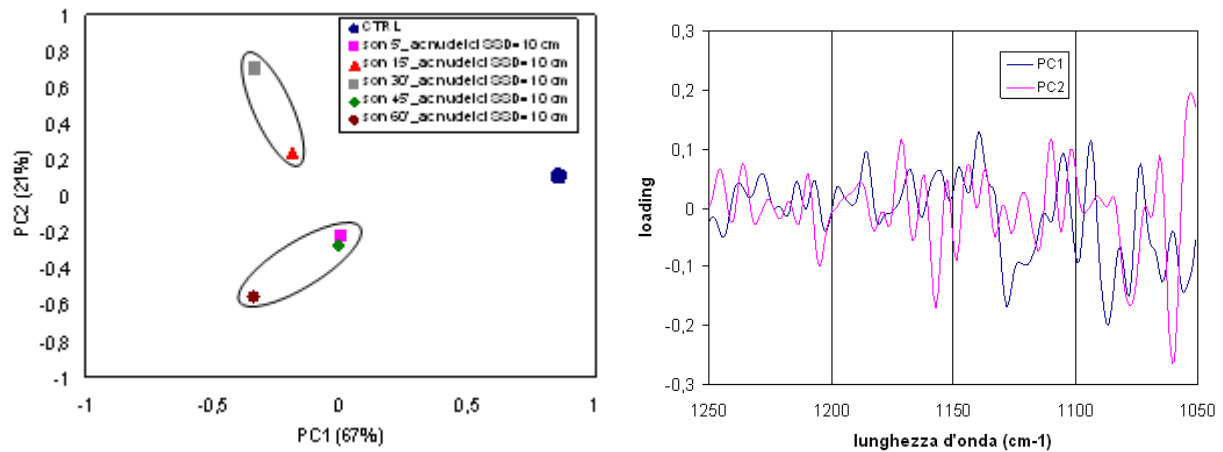


Figura 5.24: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz $SSD=10$ cm, regione acidi nucleici

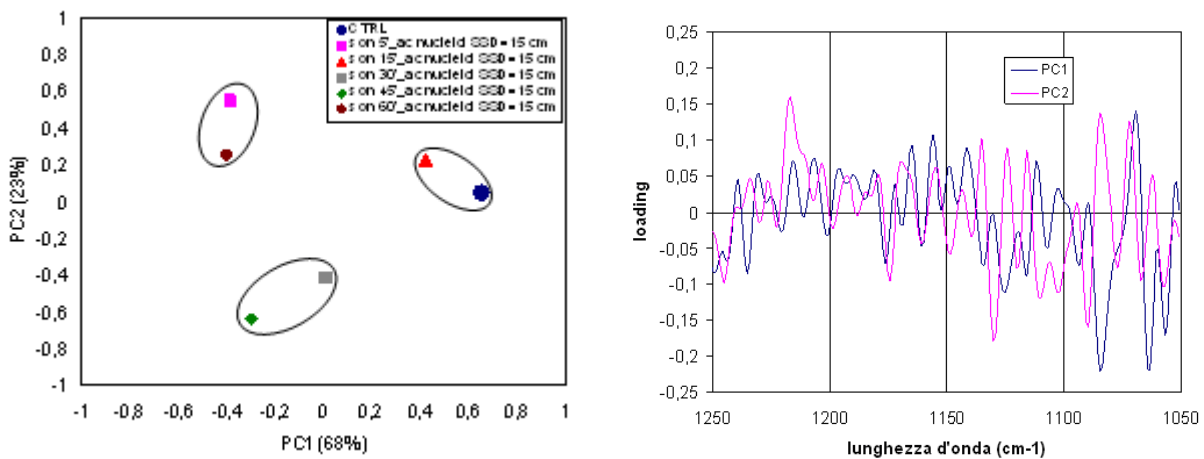


Figura 5.25: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 1 MHz $SSD=15$ cm, regione acidi nucleici

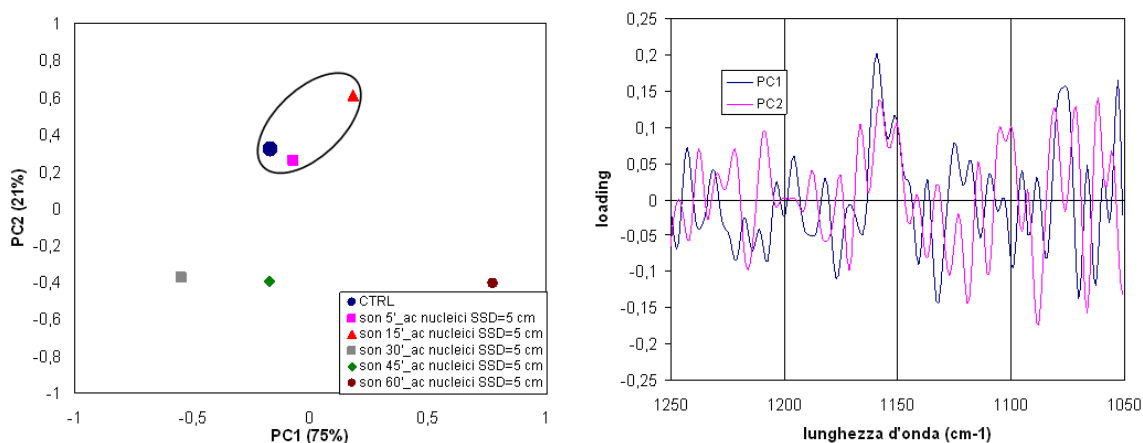


Figura 5.26: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 3 MHz $SSD=5$ cm, regione acidi nucleici

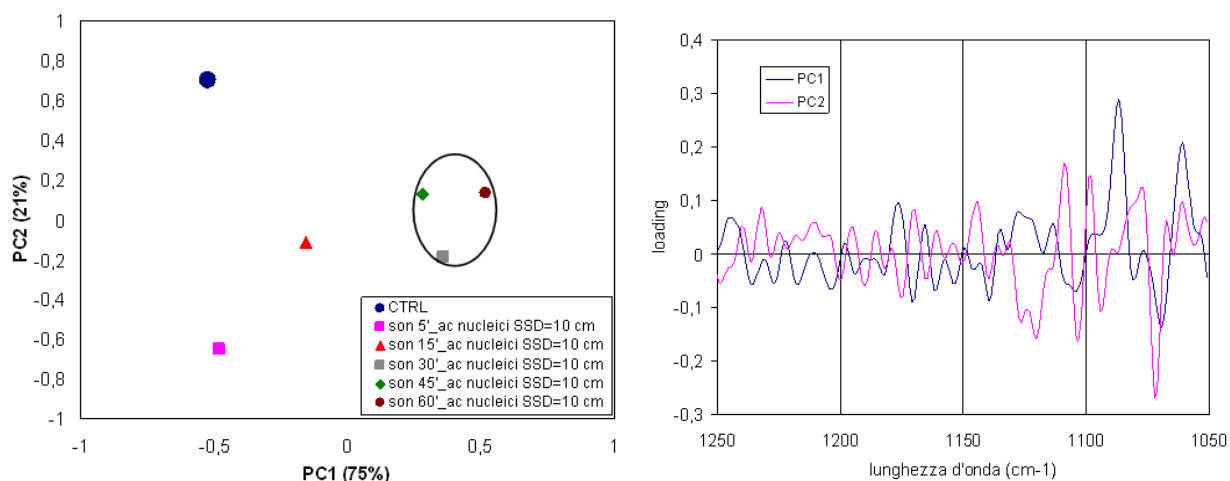


Figura 5.27: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 3 MHz SSD= 10 cm, regione acidi nucleici

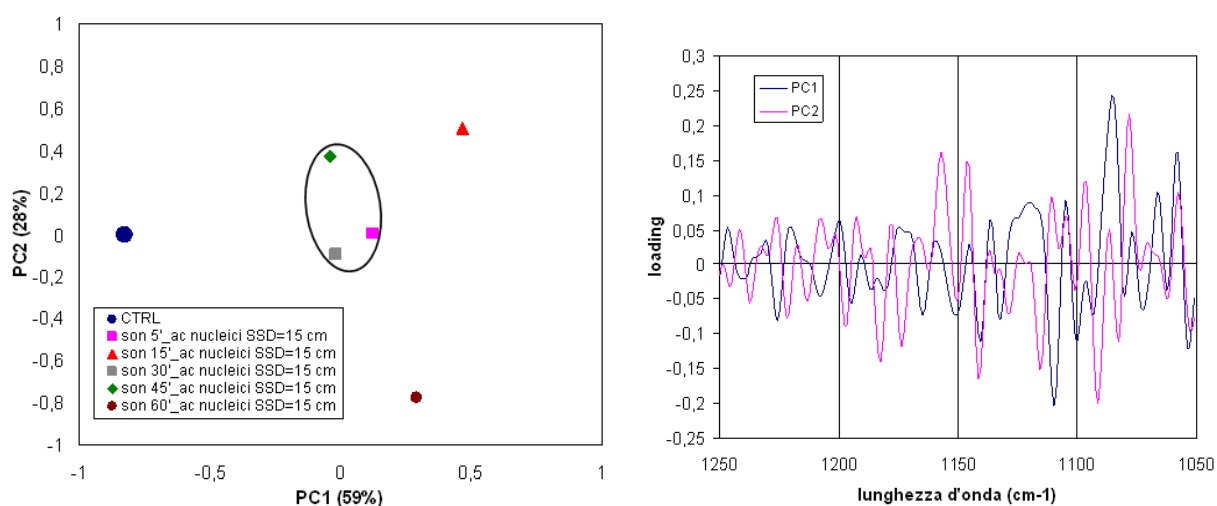


Figura 5.28: PCA su dati spettroscopici per esposizione a US a 3 MHz SSD= 15 cm, regione acidi nucleici

Anche per le bande spettroscopiche P_3 e P_4 sono stati valutati i parametri spettroscopici R_{P3} e R_{P4} , dove $R_{P3}=P_{3s}/P_{3c}$ e $R_{P4}=P_{4s}/P_{4c}$; i risultati sono riportati in figura 5.29. Cambiamenti del parametro R_p con il tempo, la distanza e la frequenza di sonicazione, denotano variazioni conformazionali dei gruppi fosfato caratteristici degli acidi nucleici.

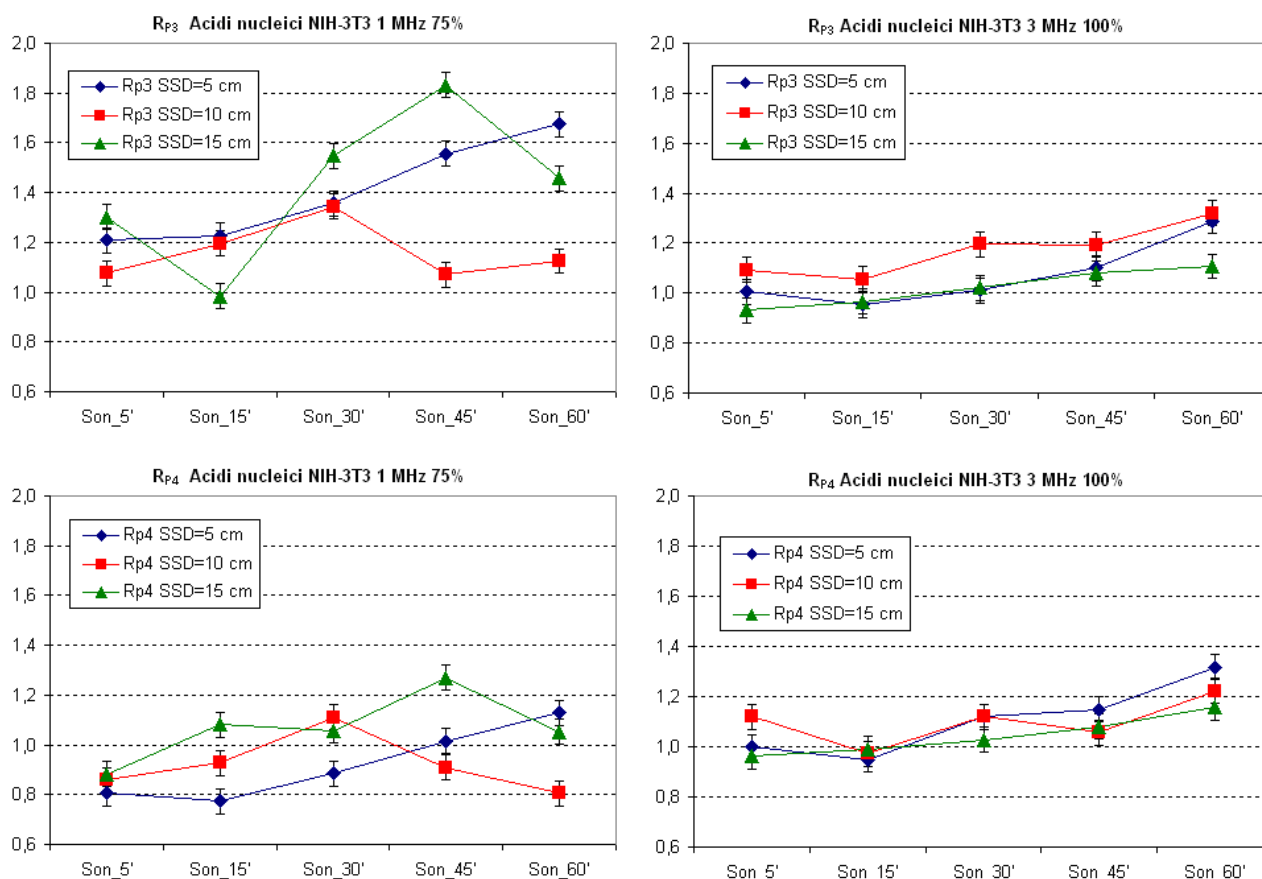


Figura 5.29: andamento del parametro Rp in funzione del tempo di sonicazione per esposizioni della linea cellulare a 1 MHz e a 3 MHz alle 3 distanze SSD=5, 10, 15 cm.

Si osserva che lo stretching asimmetrico del gruppo $-\text{PO}_2^-$, valutato dal parametro R_{p3} , presenta per la frequenza di 1 MHz, variazioni per quasi tutti i tempi di sonicazione, indipendentemente dalla distanza di sonicazione SSD. In accordo con l'analisi statistica è possibile individuare le configurazioni espositive che determinano variazioni significative nelle aree dei campioni trattati rispetto ai controlli, in SSD=5 cm t=15', SSD=10 cm sonicazione t=30' e 60' e SSD=15 cm t=45' e 60'.

Per la frequenza di 3 MHz, i parametri R_{p3} e R_{p4} non mostrano variazioni importanti, eccetto che per le distanze SSD=5 e tempi di esposizione pari a 60'.

5.3.4 Risultati complessivi delle misure di spettroscopia FTIR

Le misure di spettroscopia FTIR su campioni biologici esposti ad US alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz, hanno consentito di rilevare variazioni conformazionali di gruppi funzionali nella regione dei lipidi, delle proteine e degli acidi nucleici, principalmente per effetto di sonicazione dei campioni alla frequenza di 1 MHz.

In accordo con i risultati di Pozzi (2011), che per esposizioni della stessa linea cellulare alla frequenza di 1 MHz, rilevava formazione di radicali liberi, e con il modello proposto da Krasovitski (2011) relativo ai movimenti indotti dagli US sulla membrana cellulare con relativi effetti (paragrafo 1.2), le variazioni osservate nelle bande L_1 , L_2 , P_1 e P_2 possono essere legate sia a modificazioni della struttura lipidica, con formazione di pori transienti nella membrana, favoriti dalla formazione di radicali liberi o da fenomeni meccanici quali microflussi e onde di shock, sia a danni permanenti. L'attività cavitatoria intracellulare indotta dagli US può portare a variazioni conformazionali delle strutture lipidiche possono dar luogo a una variazione di fluidità di membrana con cambiamenti della risposta funzionale della stessa. Per quanto riguarda i radicali liberi prodotti dalla sonicazione, essi interagiscono con i gruppi metile e metilene, modificandone gli assorbimenti. L'azione dei radicali liberi può provocare il fenomeno della perossidazione lipidica; infatti i radicali liberi contengono elettroni non legati che li rendono particolarmente reattivi. I lipidi vengono ossidati dall'ossigeno molecolare, causando la degradazione delle strutture lipidiche stesse. Anche nel terreno di coltura delle cellule possono formarsi radicali idrossilici, a causa della dissociazione dell'acqua; la migrazione dei radicali liberi dall'esterno all'interno della cellula può essere facilitata da un aumento nella permeabilità della membrana cellulare. In questo caso, i radicali liberi prodotti nel mezzo di coltura, possono penetrare all'interno della cellula e interagire con le strutture lipidiche e nucleotidiche, insieme con i radicali prodotti direttamente all'interno della cellula.

Per quanto riguarda le variazioni osservate nell'assorbanza dei gruppi funzionali associati alle bande P_3 e P_4 , esse concordano con l'ipotesi che l'interazione con i radicali liberi e le reazioni sonochimiche che avvengono per effetto del campo acustico, possono contribuire alla modificazione del DNA. In particolare, un aumento di R_p può essere attribuito a modificazioni strutturali dovute all'interazione degli acidi nucleici, carichi negativamente per la presenza di gruppi fosfato sullo scheletro, con i radicali idrossido e perossido di idrogeno generati nel mezzo per idrolisi. Dai risultati sperimentali si evince che tali variazioni avvengono soprattutto per sonicazioni alla frequenza di 1 MHz.

Per sonicazione dei campioni con US alla frequenza di 1 MHz 75% *High*, l'analisi dei risultati ottenuti ha permesso di rilevare che, le configurazioni espositive in corrispondenza delle quali si verifica con maggior frequenza una variazione significativa dei parametri spettroscopici analizzati (R_L , R_P , R_{Amide}), sono SSD=15 cm t=45' e SSD=15 cm t=60' a cui corrisponde un'intensità acustica incidente sui campioni ($0,06 \text{ W/cm}^2$) inferiore rispetto a quanto rilevato per le distanze SSD= 5 cm e 10 cm (rispettivamente $0,09 \text{ W/cm}^2$ e $0,08 \text{ W/cm}^2$). Le variazioni riscontrate nei parametri spettroscopici sembrano suggerire un relazione tra frequenza del campo ultrasonoro incidente (1 e 3

MHz) ed effetto indotto. A parità di frequenza, sembra giocare un ruolo importante anche la distanza a cui è posizionato il trasduttore rispetto al campione, a cui corrispondono variazioni dell'intensità acustica.

In figura 5.30 è riportato un tentativo di correlare le variazioni di ciascun parametro spettroscopico con l'energia incidente sul campione nel tempo di sonicazione ("dose": dati in tabella 4.3) a cui corrisponde tale valore, per la frequenza di esposizione di 1 MHz.

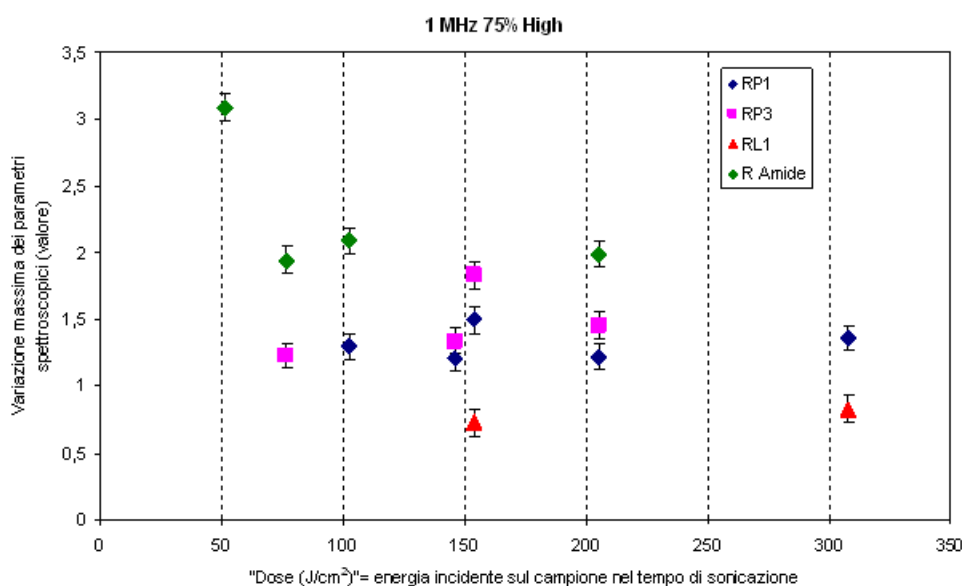


Figura 5.30: massima variazione dei parametri spettroscopici in funzione della “dose” per esposizione ad US a 1 MHz

La massima variazione dei parametri spettroscopici è concentrata nel range di “dosi” comprese tra circa 100 e circa 200 J/cm², all'interno del quale le variazioni di un numero maggiore di parametri spettroscopici si riscontrano in corrispondenza delle “dosi” 153,7 e 204,9 J/cm², riferibili appunto alla distanza campione-trasduttore SSD=15 cm per i tempi t=45' e 60'; anche con questa rappresentazione si evidenzia che le suddette configurazioni espositive appaiono essere quelle più significative in termini di effetto spettroscopico indotto da esposizione ad US alla frequenza di 1 MHz.

5.4 Il test di vitalità del Trypan Blue: risultati sperimentali

Il test di esclusione del Trypan Blue permette di misurare la vitalità dei campioni cellulari a seguito di esposizione all'agente fisico. Il test è stato eseguito subito dopo l'esposizione al campo acustico per entrambe le frequenze di esposizione 1 MHz e 3 MHz, per le tre distanze SSD=5, 10, 15 e per tutti i tempi t=5', 15', 30', 45', 60'.

Il test di vitalità per i campioni trattati è stato effettuato sempre in concomitanza con i rispettivi controlli.

I risultati sono riportati nelle tabelle 5.3 e 5.4 per quanto riguarda rispettivamente le esposizioni ad US a 1 MHz 75% *High* e 3 MHz 100% *High*.

1 MHz 75% High				
		Vitalità % dei campioni sonicati		
Tempo di esposizione	n. dei campioni	SSD= 5 cm I=0,09 W/cm ²	SSD=10 cm I=0,08 W/cm ²	SSD=15 cm I=0,06 W/cm ²
CTRL	8	97,1±0,8		
5'	8	94,06±2,66	91,30±1,05	87,05±6,95
15'	8	89,14±7,39	88±5	89,14±7,39
30'	8	87,9±4,2	85,74±2,85	80,54±13,63
45'	8	86,13±2,43	94,18±5,09	86,36±5,21
60'	8	72,63±9,36	92,42±3,88	84,99±8,14

Tabella 5.3: vitalità dei campioni esposti alla frequenza di 1 MHz. I corrisponde a intensità incidente sul campione in corrispondenza della relativa SSD.

3 MHz 100% High				
		Vitalità % dei campioni sonicati		
Tempo di esposizione	N.ro dei campioni	SSD= 5 cm I= 0,03 W/cm ²	SSD=10 cm I= 0,01 W/cm ²	SSD=15 cm I= 0,009 W/cm ²
CTRL	8	95,76±1,68		
5'	8	89,65±7,54	92,92±3,56	94,45±3,09
15'	8	89,98±7,55	92,8±4,2	88,65±6,61
30'	8	92,00±5,02	93,83±2,55	90,95±4,98
45'	8	93,50±4,02	89,89±4,63	91,21±6,59
60'	8	90,52±6,83	88,98±7,80	90,35±3,15

Tabella 5.4: vitalità dei campioni esposti alla frequenza di 3 MHz. I corrisponde a intensità incidente sul campione in corrispondenza della relativa SSD.

Tutti i campioni esposti, sia alla frequenza di 1 MHz che a quella di 3 MHz, mostrano una vitalità inferiore rispetto al controllo ma nessuna differenza è risultata significativa.

Per quanto riguarda l'esposizione a 1 MHz, è stata riscontrata una correlazione negativa statisticamente significativa tra il tempo di esposizione e la vitalità alla distanza SSD=15 cm ($r=-0,9354$, $p=0,0061$).

Per quanto riguarda l'esposizione a 3 MHz, è stata riscontrata una correlazione negativa statisticamente significativa tra il tempo di esposizione e la vitalità alla distanza SSD=10 cm ($r=-0,8621$, $p=0,0272$).

5.5 Il test dei micronuclei: risultati sperimentali

La figura 5.31 e la tabella 5.5 mostrano le frequenze dei micronuclei dei campioni sonicati alla frequenza di 1 MHz. I risultati mostrano che tutti i campioni esposti presentano frequenze di micronuclei maggiori del controllo. L'aumento è risultato statisticamente significativo per le cellule esposte alla distanza SSD=5 cm per 30, 45, 60 minuti di esposizione ad US, e per i campioni esposti a SSD=10 cm per 15, 30, 45, 60 minuti ($p<0,05$). Al contrario, a 15 cm nessuna differenza è risultata significativa.

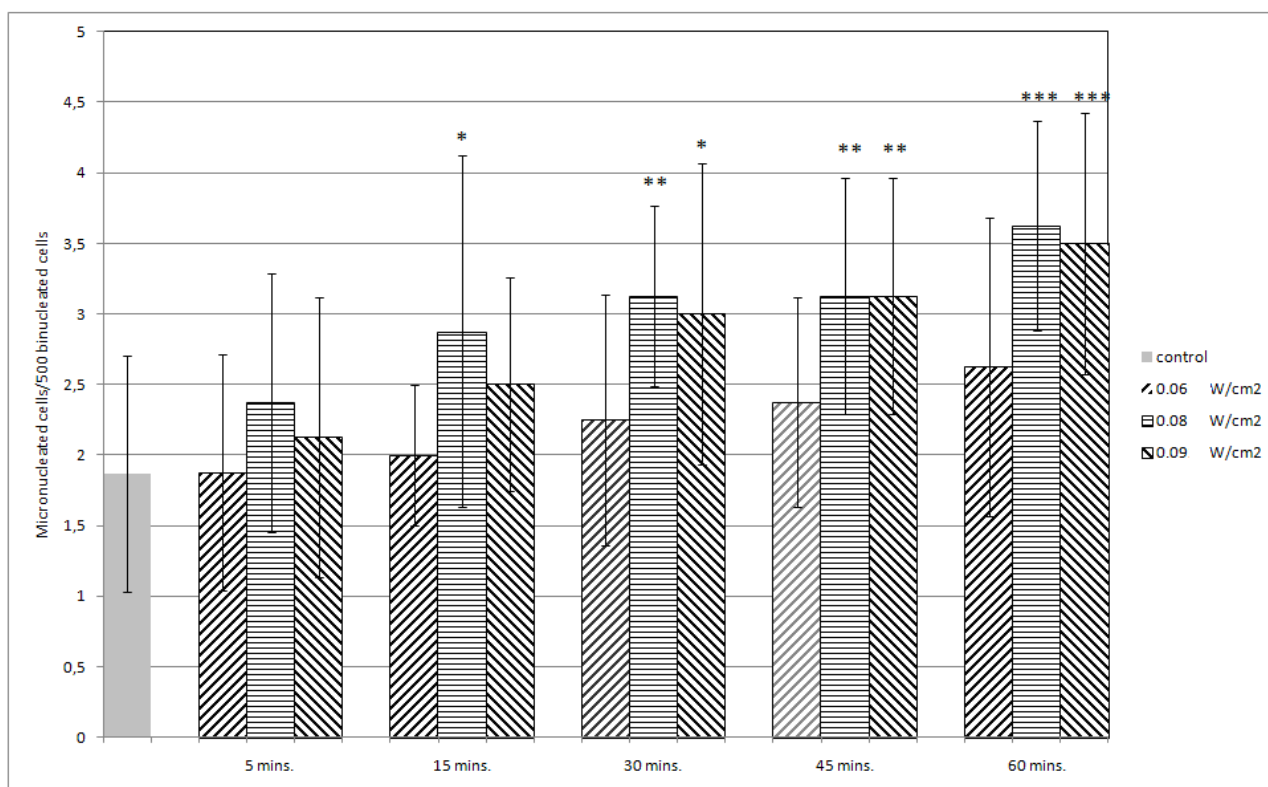


Figura 5.31: frequenze dei micronuclei dei campioni sonicati alla frequenza di 1 MHz per le 3 distanze SSD con esplicitate le relative intensità incidenti sul campione e per 5, 15, 30, 45 e 60 minuti di esposizione.

Per quanto riguarda l'esposizione a 1 MHz, è stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa tra il tempo di esposizione e la frequenza dei micronuclei alla distanza SSD=5 cm ($r=0,9789$, $p=0,0007$), a SSD=10 cm ($r=0,9257$, $p=0,0081$) e a SSD=15 cm ($r=0,9945$, $p=0,00004$). La figura 5.32 e la tabella 5.6 mostrano le frequenze dei micronuclei dei campioni sonicati alla frequenza di 3 MHz.

1 MHz 75% High				
Tempo di esposizione	N.ro di campioni	Micronucleated cells/Binucleated cells $\pm$ Standard Deviation		
		SSD=5 cm $I=0,09 \text{ W/cm}^2$	SSD=10 cm $0,08 \text{ W/cm}^2$	SSD=15 cm $0,06 \text{ W/cm}^2$
0'	15	1,87 $\pm$ 0,83		
5'	8	2,13 $\pm$ 0,99	2,38 $\pm$ 0,92	1,88 $\pm$ 0,83
15'	8	2,5 $\pm$ 0,7	2,88 $\pm$ 1,25*	2,0 $\pm$ 0,5
30'	8	3,00 $\pm$ 1,07*	3,13 $\pm$ 0,64**	2,25 $\pm$ 0,89
45'	8	3,13 $\pm$ 0,83**	3,13 $\pm$ 0,83**	2,38 $\pm$ 0,74
60'	8	3,51 $\pm$ 0,93***	3,63 $\pm$ 0,74***	2,63 $\pm$ 1,06

Tabella 5.5: frequenze dei micronuclei dei campioni sonicati alla frequenza di 1 MHz per le 3 distanze SSD e per 5, 15, 30, 45 e 60 minuti di esposizione. I= intensità incidente sul campione in corrispondenza della selezionata SSD.

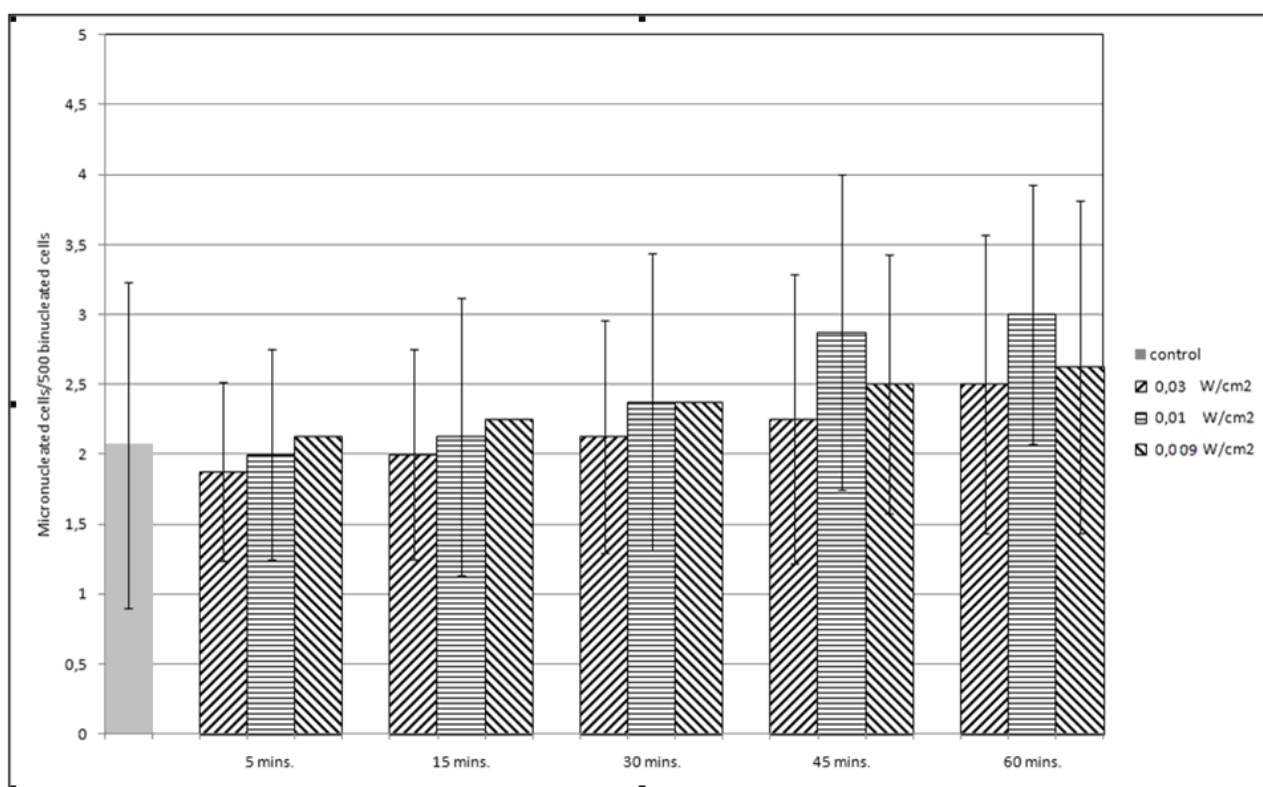


Figura 5.32: frequenze dei micronuclei dei campioni sonicati alla frequenza di 3 MHz per le 3 distanze SSD con esplicitate le relative intensità incidenti sul campione e per 5, 15, 30, 45 e 60 minuti di esposizione.

I risultati mostrano che tutti i campioni esposti presentano frequenze di micronuclei maggiori del controllo, eccetto che per i campioni sonicati per 5 minuti a SSD=10 e 15 cm; nessuna differenza è risultata statisticamente significativa. E' stata riscontrata una correlazione statisticamente significativa tra il tempo di esposizione e la frequenza dei micronuclei dei campioni esposti alla distanza SSD=5 cm ($r=0,9083$, $p=0,0122$), alla distanza di 10 cm ($r=0,9722$, $p=0,0011$) e a SSD=15 cm ($r=0,9969$, $p=0,00001$).

3 MHz 100% High				
Tempo di esposizione	N.ro di campioni	Micronucleated cells/Binucleated cells $\pm$ Standard Deviation		
		SSD=5 cm I=0,03 W/cm ²	SSD=10 cm I=0,01 W/cm ²	SSD=15 cm I=0,009 W/cm ²
0'	15	2,07 $\pm$ 1,16		
5'	8	1,87 $\pm$ 0,64	2,0 $\pm$ 0,8	2,13 $\pm$ 0,64
15'	8	2,0 $\pm$ 0,8	2,13 $\pm$ 0,99	2,25 $\pm$ 1,04
30'	8	2,13 $\pm$ 0,83	2,38 $\pm$ 1,06	2,38 $\pm$ 0,92
45'	8	2,25 $\pm$ 1,04	2,88 $\pm$ 1,13	2,5 $\pm$ 0,9
60'	8	2,5 $\pm$ 1,07	3,0 $\pm$ 0,9	2,63 $\pm$ 1,19

Tabella 5.6: frequenze dei micronuclei dei campioni sonicati alla frequenza di 3 MHz per le 3 distanze SSD e per 5, 15, 30, 45 e 60 minuti di esposizione. I= intensità incidente sul campione in corrispondenza della selezionata SSD.

Tali esperimenti mostrano che la sonicazione può produrre danni genotossici, e il principale meccanismo attraverso il quale ciò avviene potrebbe essere la formazione dei radicali liberi a seguito della sonicazione (Fuciarelli, 1995; Milowska, 2007; Pozzi, 2011).

I risultati evidenziano che l'esposizione ultrasonora sembra causare un aumento della frequenza dei micronuclei dipendente dal tempo, per esposizione dei campioni ad entrambe le frequenze 1 MHz e 3 MHz, e l'aumento è maggiore nei campioni esposti ad US a 1 MHz. Per entrambe le esposizioni, le frequenze dei micronuclei sono più elevate in corrispondenza delle minori distanze campione-trasduttore.

5.6 Microscopia a fluorescenza: risultati sperimentali

In tabella 5.7 è riportato lo schema delle esposizioni eseguite a 1 MHz e 3 MHz, effettuate a partire dai 30 minuti di esposizione per tutte le distanze SSD e per tutti i tempi di sonicazione.

	1 MHz 75% High		3 MHz 100% High
	Distanza diffusore-bersaglio (SSD)		
	5 cm	10 cm	15 cm
Tempo di esposizione (min)	30'	30'	30'
	45'	45'	45'
	60'	60'	60'

Tabella 5.7: tabella delle misure di microscopia in fluorescenza effettuate per esposizioni a 1 MHz e 3 MHz

Per la valutazione dell'uptake di molecole da parte delle cellule NIH-3T3 esposte ad US alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz, nel corso delle nostre misure è stata utilizzata la calceina (10 μ M). Per valutare la vitalità delle cellule successivamente alla sonicazione con marcatore fluorescente, è stato usato lo Ioduro di Propidio (IP, 20 μ l).

Le immagini registrate a seguito della marcatura dei campioni con calceina, hanno consentito di valutare in modo qualitativo la fluorescenza in termini di “*Elevato uptake di calceina*”, “*Medio uptake di calceina*”, “*Scarso uptake di calceina*” nei campioni cellulari investigati.

5.6.1 Risultati per esposizione ad ultrasuoni a 1 MHz, 75% High

5.6.1.1 Il campione di controllo

In figura 5.33 vengono riportate le immagini in fluorescenza ottenute per il controllo, non esposto e lasciato con calceina (10 μ M) in PBS per 30 minuti al buio.

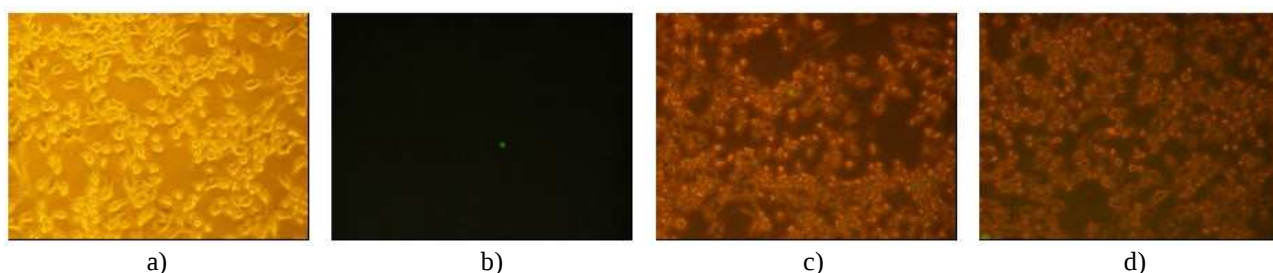


Figura 5.33: immagini del controllo in contrasto di fase e in fluorescenza con calceina e IP

Le immagini si riferiscono ad un obiettivo 20X; le a) e c) si riferiscono al campione in contrasto di fase, mentre le b) e d) fanno riferimento agli stessi campi ottici ma analizzati in fluorescenza.

I risultati non evidenziano uptake del fluoroforo nelle cellule del campione di controllo, caratterizzato da scarsa emissione in fluorescenza e buona vitalità cellulare a seguito dell'aggiunta di un'aliquota di IP (20 μ l).

5.6.1.2 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=5 cm, t=30'

In figura 5.34 sono riportate le immagini dei campioni di cellule NIH-3T3 marcate con calceina ed esposte per 30' ad US a 1 MHz 75% High, alla distanza dal trasduttore di 5 cm.

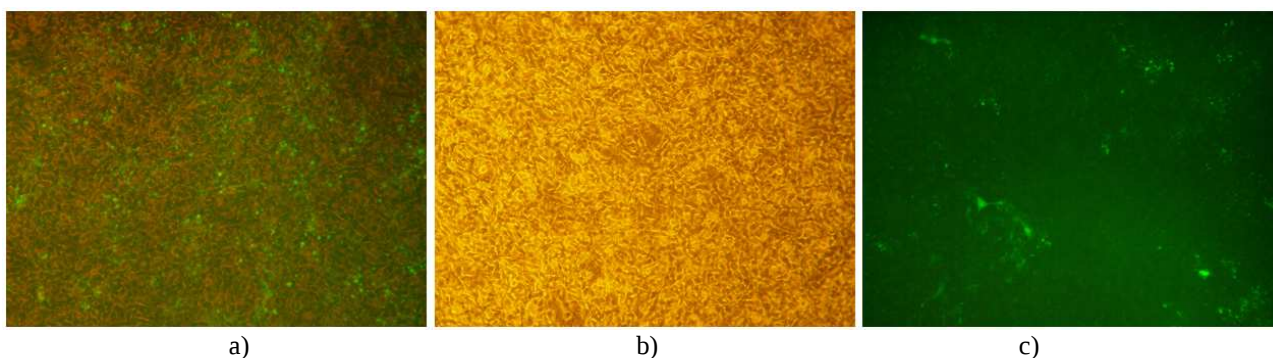


Figura 5.34: immagini in fluorescenza (calceina) del campione sonicato 1 MHz alla distanza SSD=5 cm per $t=30'$.

La figura 5.34 a) mostra sovrapposti il monostrato di cellule e la relativa fluorescenza della calceina; le figure 5.34 b) e c) riportano separatamente il monostrato in contrasto di fase (b) e lo stesso campo investigato in sola fluorescenza c).

Le figure 5.35 a), b), c) mostrano particolari del bordo del monostrato.

Le suddette immagini mostrano che tale configurazione espositiva appare responsiva in fluorescenza rispetto al controllo, evidenziando un elevato livello di uptake del fluoroforo, sia nel monostrato, che nei bordi dello stesso. In corrispondenza di alcuni set-up espositivi, le cellule ai bordi del monostrato tendono ad internalizzare in maniera importante la calceina, risultando più esposte all'agente fisico.

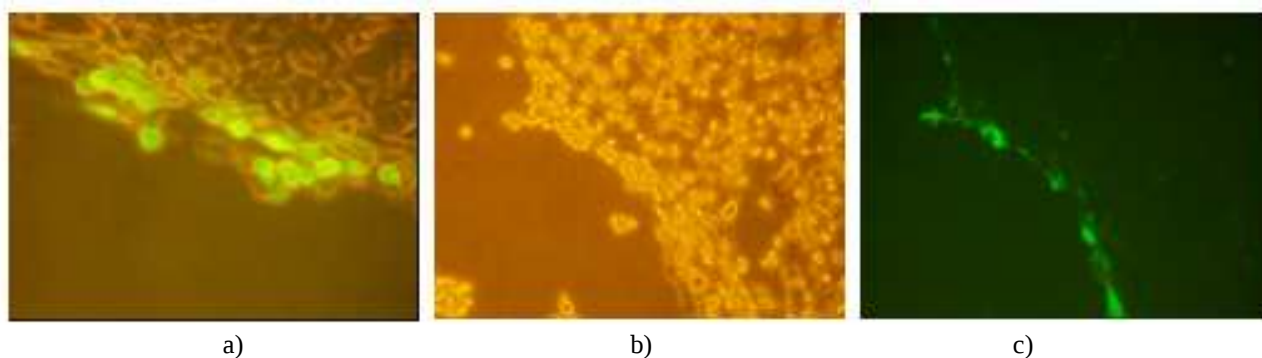


Figura 5.35: immagini in fluorescenza (calceina) del campione sonicato 1 MHz alla distanza SSD=5 cm per $t=30'$.

Nelle figure 5.36 è possibile osservare, per questa configurazione espositiva, particolari di cellule che hanno internalizzato la calceina, catturati con obiettivo 40X.

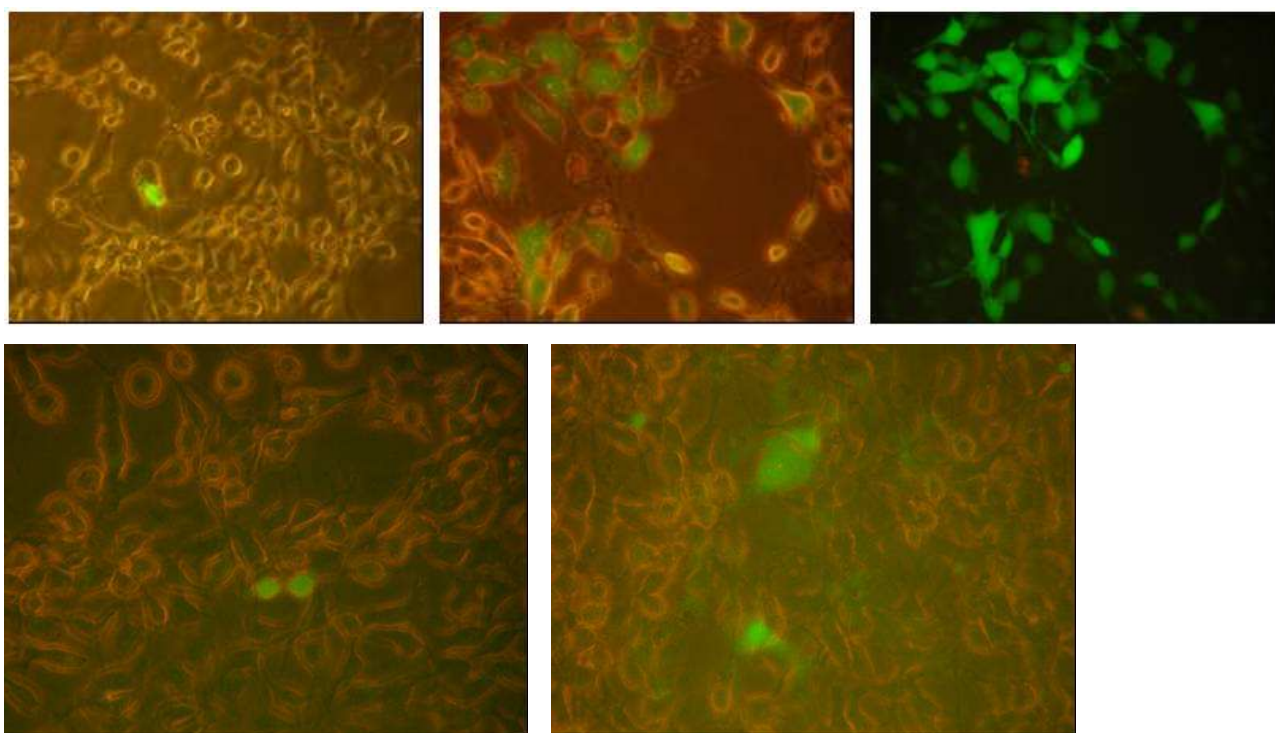


Figura 5.36: differenti livelli di uptake di calceina per esposizioni ad US a 1 MHz SSD=5 cm t=30'.

Si evidenziano una colorazione non uniforme delle cellule, differenti livelli di uptake del fluoroforo, come riportato dalla letteratura (Guzmann, 2001; 2002) e variazioni morfologiche (Krasovitski, 2011); le cellule prive di uptake sembrano mantenere la propria morfologia originaria rispetto alle cellule con internalizzazione del fluoroforo, che presentano invece una forma allungata e appiattita. L'aggiunta di IP evidenzia una mortalità cellulare superiore al controllo, ma con netta separazione tra cellule che hanno internalizzato la calceina e cellule morte che legano IP (figura 5.37), come evidenziato dalla 5.37 c) in cui la fluorescenza per entrambi i fluorofori (calceina e IP) è stata osservata con il filtro passa-banda nel range 515-560 nm (verde), al fine di analizzare contemporaneamente entrambe le fluorescenze (IP e calceina) presenti nel campione.

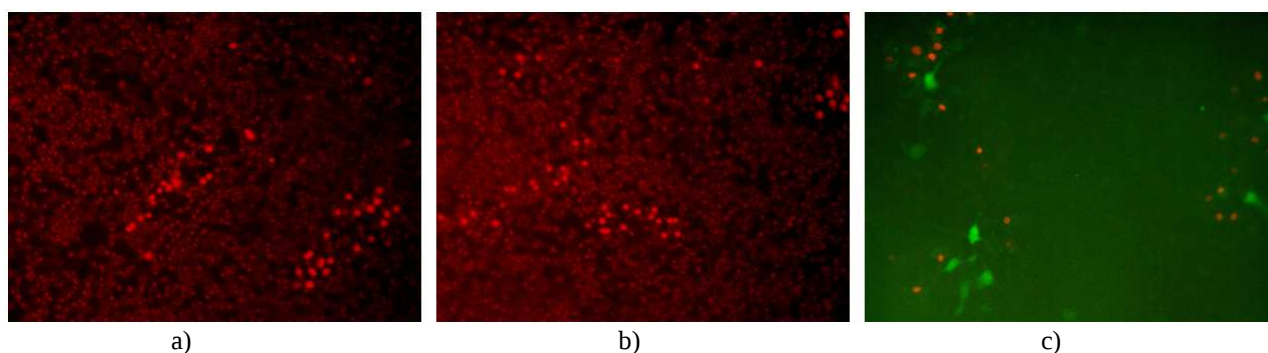


Figura 5.37: vitalità cellulare (IP) per esposizioni a 1 MHz SSD=5 cm t=30'.

5.6.1.3 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=5 cm, t=45'

In figura 5.38 sono riportati i risultati dell'esposizione a SSD=5 cm per 45'.

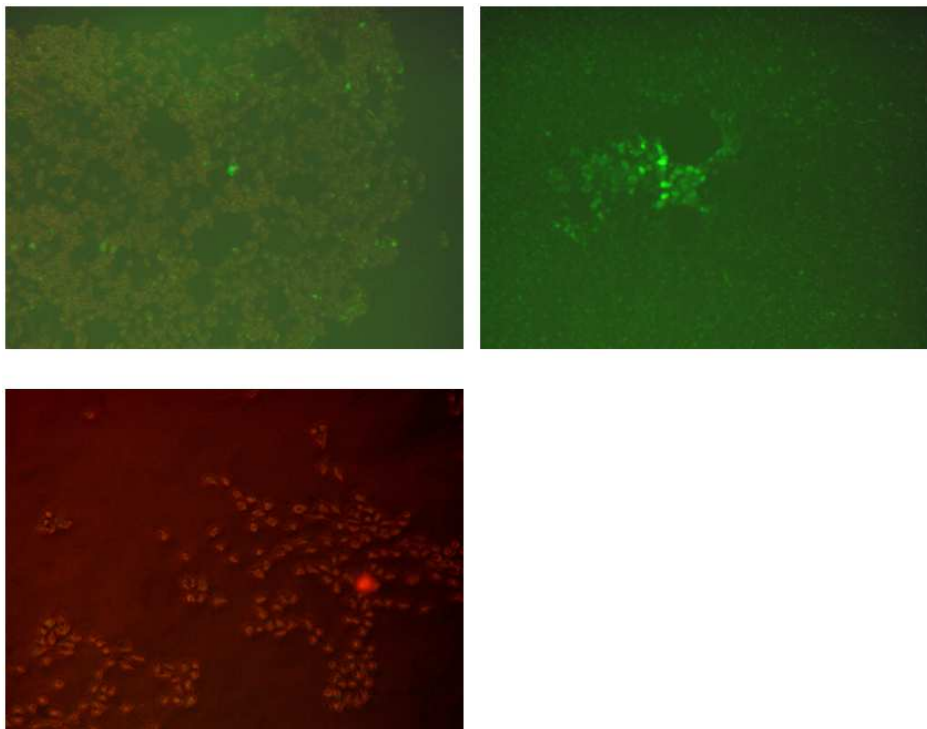


Figura 5.38: immagini del campione sonicato 1 MHz alla distanza SSD=5 cm per t=45' per la fluorescenza della calceina e con IP.

Tale configurazione espositiva appare mediamente responsiva in fluorescenza, con mortalità cellulare non dissimile rispetto al controllo.

5.6.1.4 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=5 cm, t=60'

In figura 5.39 sono riportati i risultati dell'esposizione a SSD=5 cm per 60'. Anche tale configurazione evidenzia un livello medio di uptake del fluoroforo, con discreta mortalità cellulare, valutata con IP.

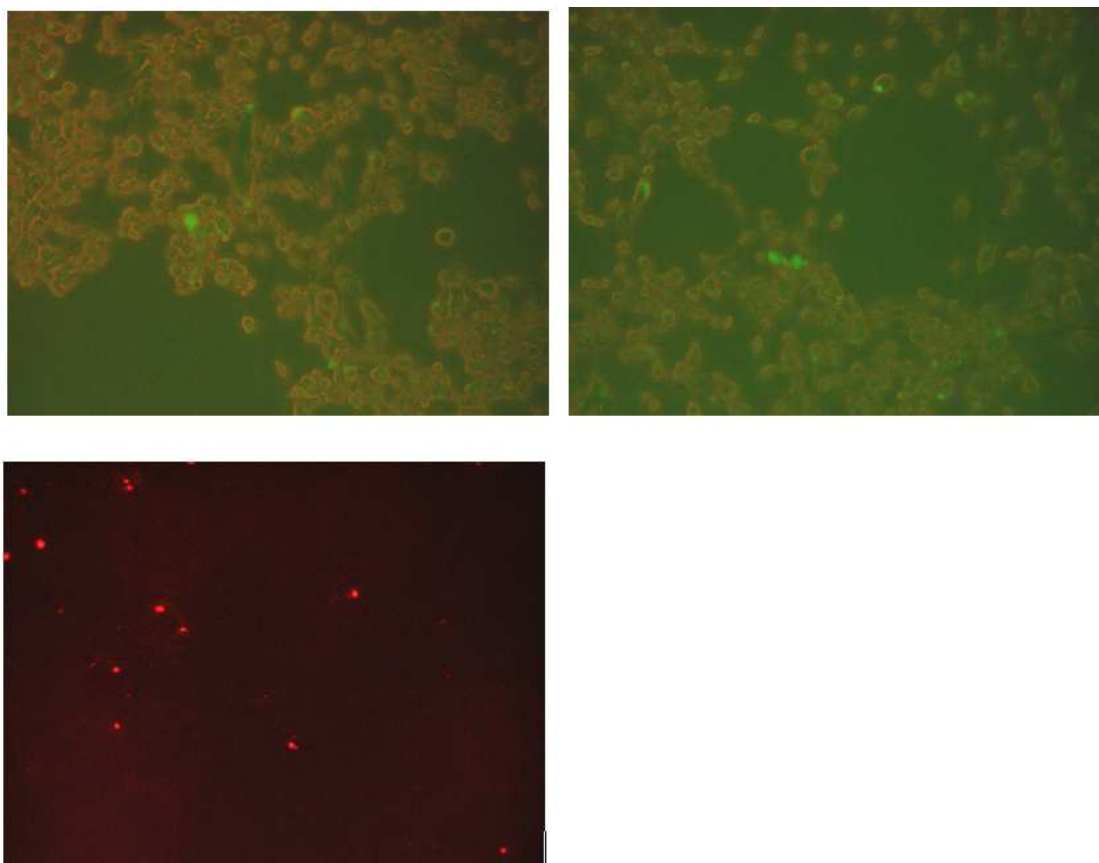


Figura 5.39: immagini del campione sonicato 1 MHz alla distanza SSD=5 cm per $t=60'$.

5.6.1.5 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=10 cm, $t=30'$

In figura 5.40 sono riportati esempi di immagini relative ai risultati dell'esposizione di campioni di fibroblasti ad US alla distanza SSD=10 cm per 30'; ogni immagine in fluorescenza (5.40 d-e-f) presenta il suo corrispondente in contrasto di fase (5.40 a-b-c). Si osserva la presenza di un effetto bordo simile a quello osservato per il set-up espositivo SSD=5 cm $t=30'$. A differenza della precedente configurazione espositiva, le cellule che appartengono al monostrato presentano una risposta inferiore in termini di internalizzazione del fluoroforo (figura 5.40 g-h)).

L'aggiunta di IP evidenzia una scarsa mortalità cellulare, con netta separazione tra cellule che hanno internalizzato la calceina e cellule che legano IP (figura 5.41).

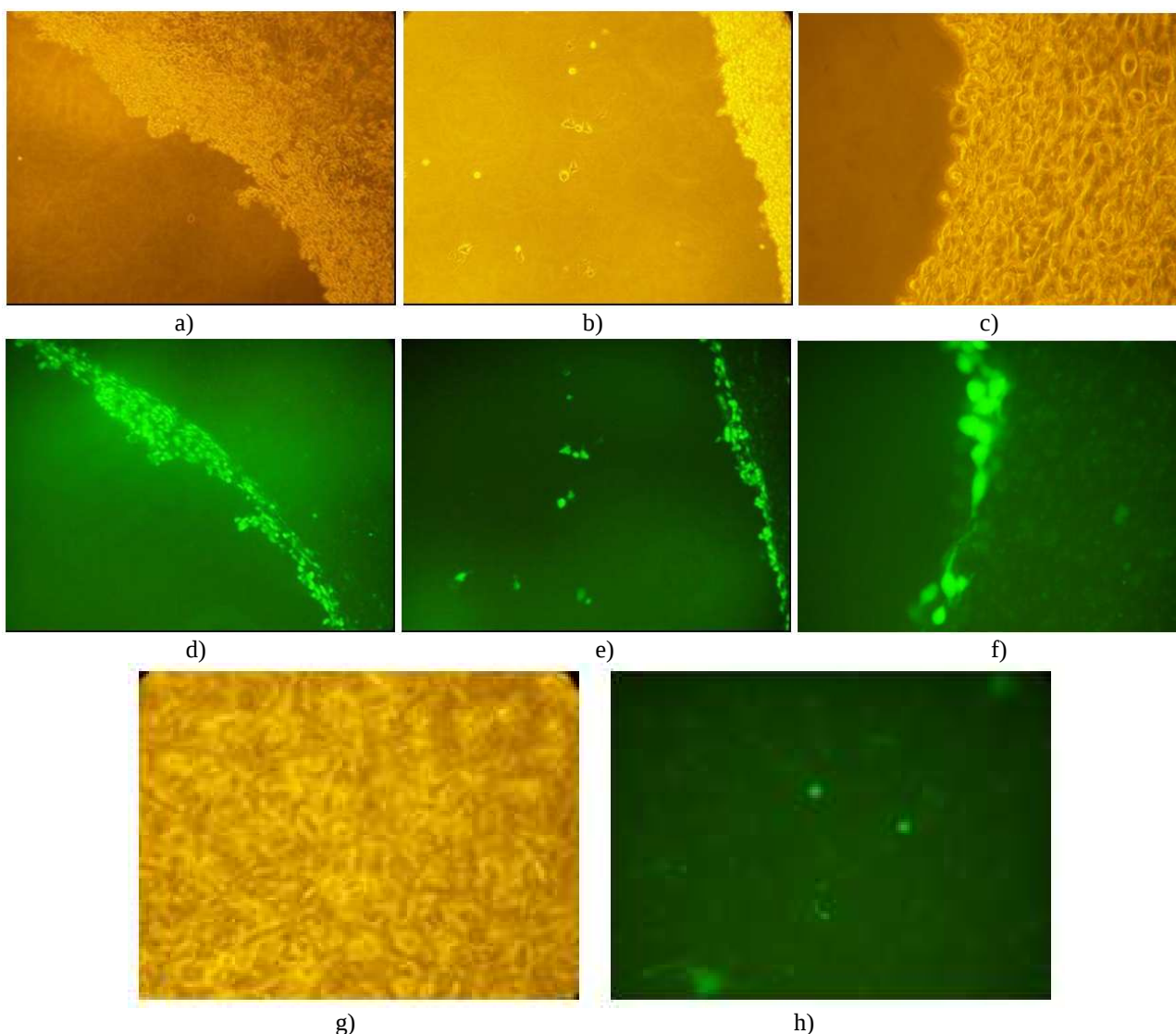


Figura 5.40: immagini dei bordi del campione sonicato 1 MHz alla distanza SSD=10 cm per $t=30'$; a), b), c) sono immagini in contrasto di fase; d), e), f) rappresentano gli stessi campi in fluorescenza; g) e h) rappresentano immagini del monostrato.

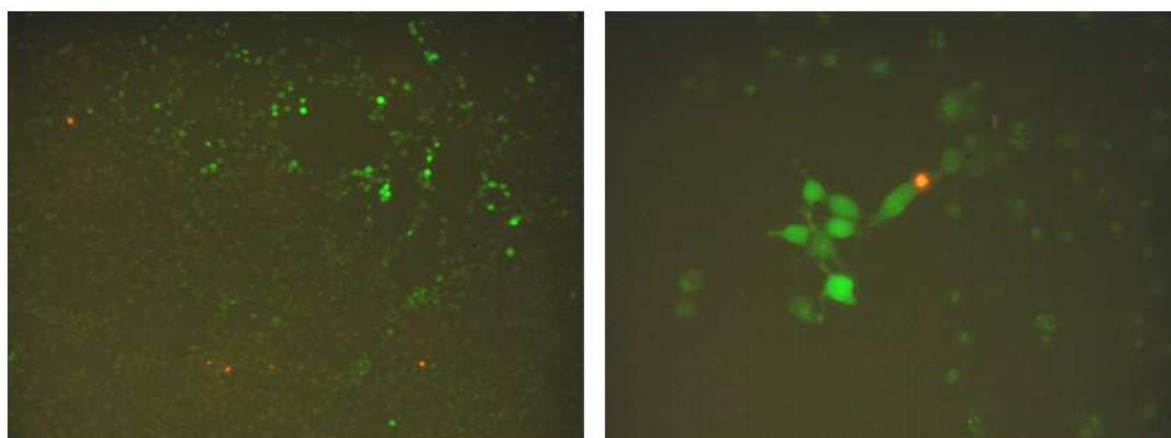


Figura 5.41: immagini del campione sonicato 1 MHz alla distanza SSD=10 cm per $t=30'$ con IP

5.6.1.6 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=10 cm, t=45'

La figura 5.42 mostra i risultati dell'esposizione a SSD=10 cm per 45'. Tale configurazione espositiva evidenzia un medio livello di uptake del fluoroforo nelle cellule esposte.

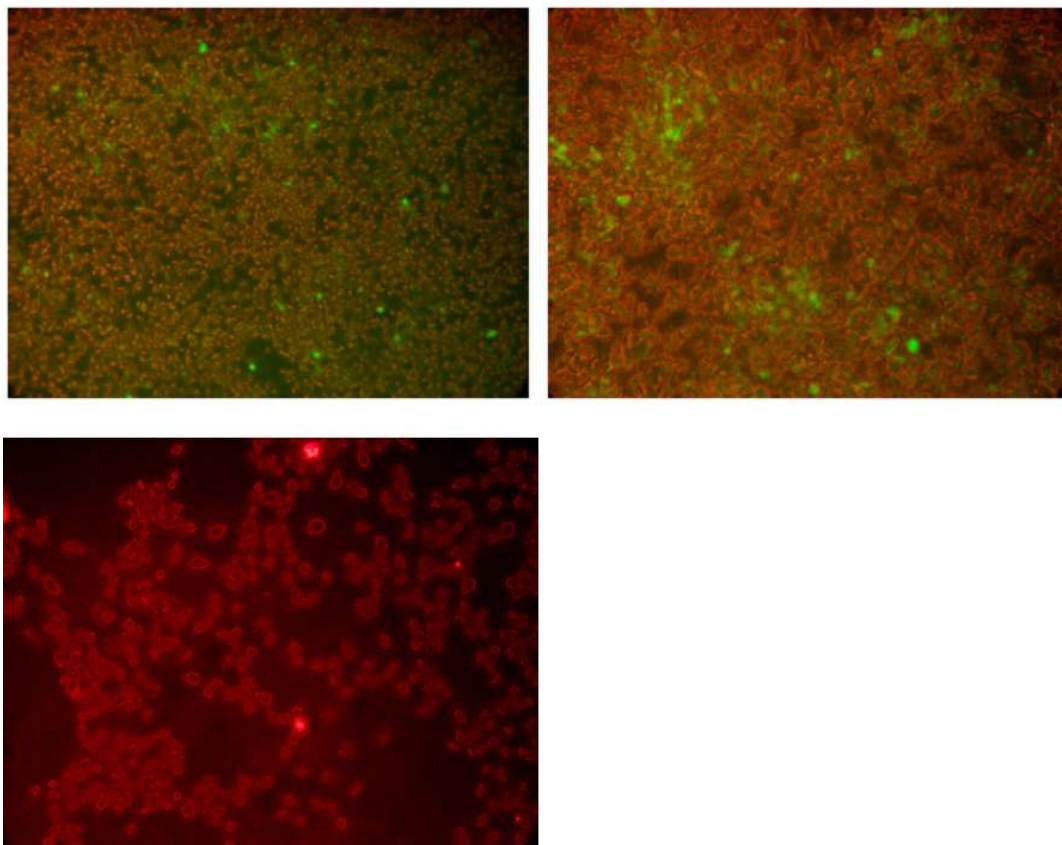


Figura 5.42: immagini del monostrato del campione sonicato 1 MHz alla distanza SSD=10 cm per t=45'

La mortalità cellulare, valutata con IP, appare non superiore rispetto al controllo, sempre senza evidenza di co-localizzazione tra cellule che hanno internalizzato la calceina e cellule che legano IP.

5.6.1.7 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=10 cm, t=60'

La figura 5.43 mostra i risultati dell'esposizione a SSD=10 cm per 60'. Anche tale configurazione espositiva evidenzia un medio livello di uptake del fluoroforo nelle cellule esposte.

La mortalità cellulare, valutata con IP, appare superiore rispetto al controllo, ma senza evidenza di co-localizzazione tra cellule che hanno internalizzato la calceina e cellule che legano IP.

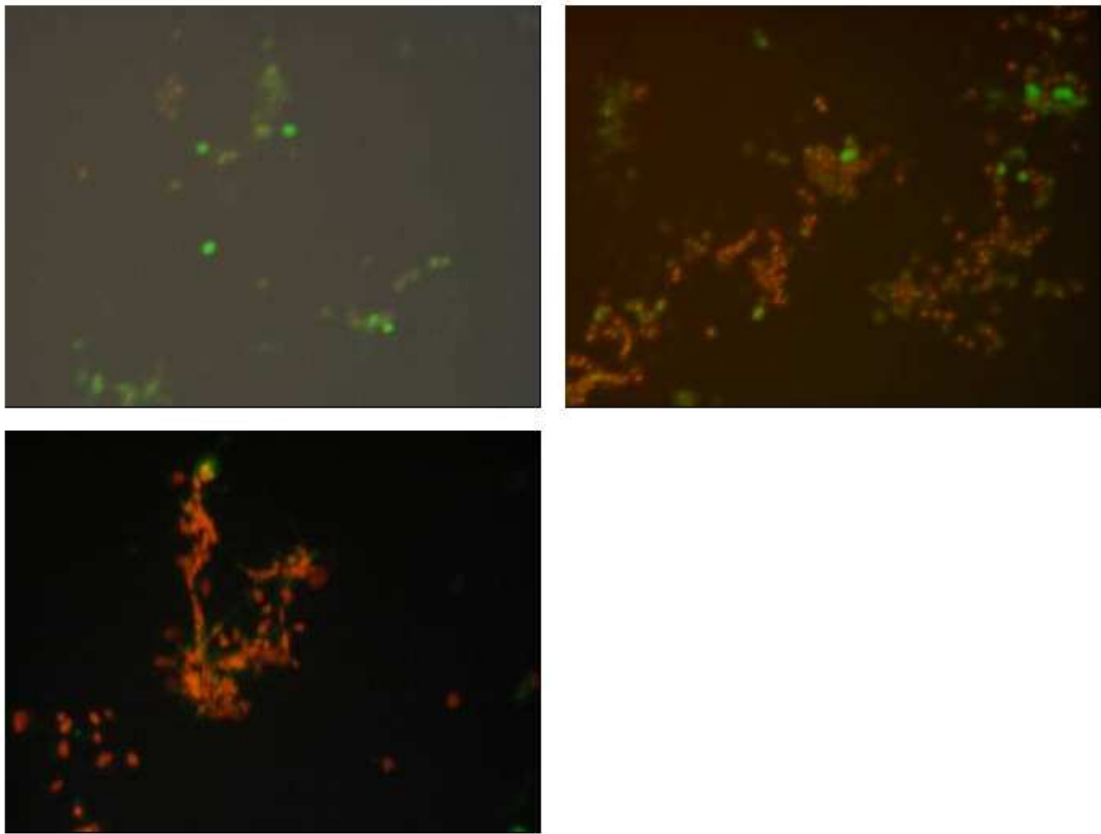


Figura 5.43: immagini del campione sonicato 1 MHz alla distanza SSD=10 cm per $t=60'$

5.6.1.8 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=15 cm, $t=30'$

La figura 5.44 mostra i risultati dell'esposizione a SSD=15 cm per 30'.

Tale configurazione evidenzia una risposta agli US a 1 MHz non dissimile dal controllo, con scarso livello di uptake della calceina. Anche la mortalità cellulare, valutata con IP (figura 5.45) appare leggermente superiore rispetto al controllo.

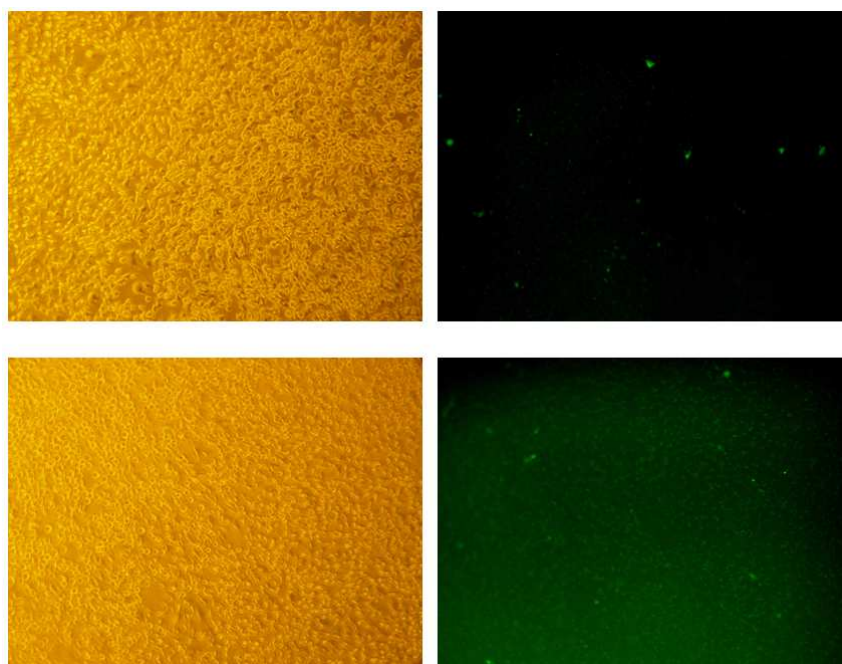


Figura 5.44: immagini del monostrato del campione sonicato 1 MHz alla distanza SSD=15 cm per $t=30'$ in contrasto di fase e in fluorescenza

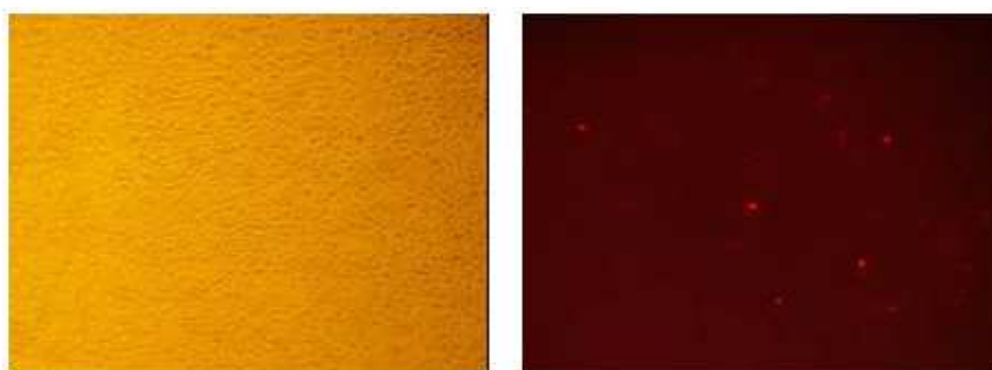


Figura 5.45: immagini con IP del campione sonicato 1 MHz alla distanza SSD=15 cm per $t=30'$ in contrasto di fase e fluorescenza (IP)

5.6.1.9 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=15 cm, $t=45'$

La figura 5.46 mostra i risultati dell'esposizione a SSD=15 cm per 45'. Si evidenzia un elevato livello di uptake del fluoroforo nel monostrato e ai bordi dello stesso.

La mortalità cellulare, valutata con IP, appare superiore rispetto al controllo, ma senza evidenza di co-localizzazione tra cellule che hanno internalizzato la calceina e cellule che legano lo IP (figura 5.47).

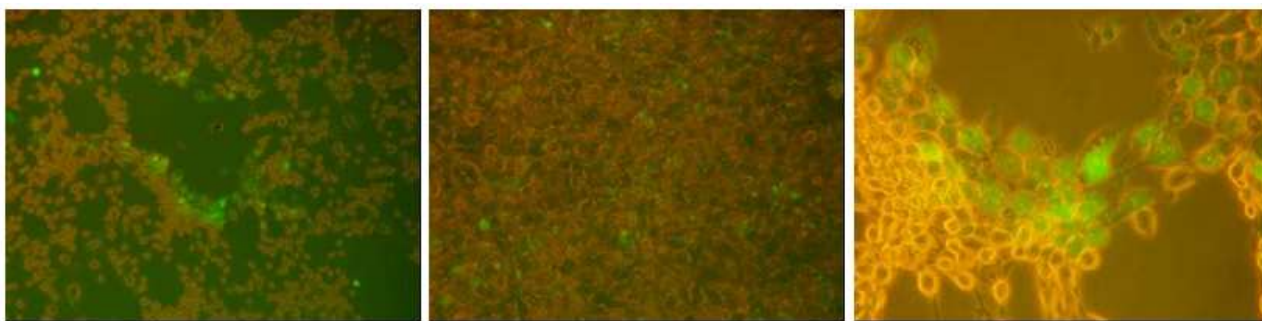


Figura 5.46: immagini in fluorescenza del monostrato del campione sonicatedo 1 MHz alla distanza SSD=15 cm per $t=45'$

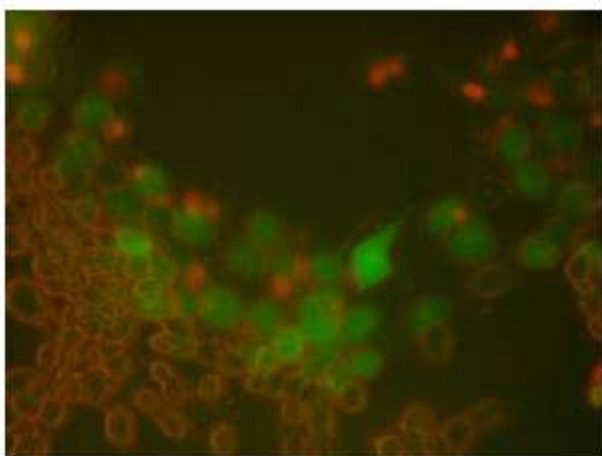


Figura 5.47: immagini in fluorescenza (calceine e IP) del campione sonicatedo 1 MHz alla distanza SSD=15 cm per $t=45'$

5.6.1.10 Risultati per esposizioni a 1 MHz 75% High, SSD=15 cm, $t=60'$

La figura 5.48 mostra i risultati dell'esposizione a SSD=15 cm per 60'. Si evidenzia un elevato livello di uptake del fluoroforo nel monostrato ed ai bordi dello stesso.

La mortalità cellulare, valutata con IP, appare superiore rispetto al controllo, ma senza evidenza di co-localizzazione tra cellule che hanno internalizzato il fluoroforo e cellule morte che hanno legato lo IP.

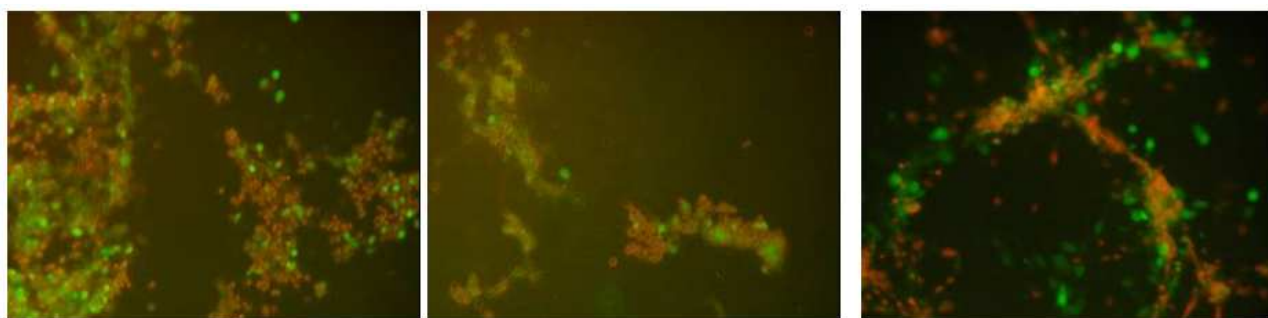


Figura 5.48: immagini del campione sonicatedo 1 MHz alla distanza SSD=15 cm per $t=60'$

5.6.1.11 **Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti per esposizione ad ultrasuoni a 1 MHz 75% High**

La tabella 5.8 mostra lo schema riassuntivo dei risultati ottenuti con la microscopia a fluorescenza per esposizione dei campioni ad US alla frequenza di 1 MHz 75% High, in termini di “Elevato livello di uptake di calceina”, “Medio livello di uptake di calceina”, “Scarso livello di uptake di calceina” per ciascuna distanza campione-trasduttore (SSD=5, 10, 15 cm) e relativa intensità incidente sul campione, per tutti i tempi di sonicazione (30', 45', 60').

Si osserva che un elevato uptake di calceina è stato rilevato per le configurazioni espositive SSD=5 cm t=30', SSD=10 cm t=30', SSD=15 cm t=45' e t=60'. Anche in questo caso, un'importante internalizzazione del fluoroforo si riscontra in corrispondenza della configurazione espositiva SSD=15 cm, a cui corrisponde un'intensità acustica incidente sul campione pari a $0,06 \text{ W/cm}^2$, per i tempi di sonicazione di 45' e 60'. Tale risultato, assieme alle variazioni dei parametri spettroscopici rilevati per la stessa distanza campione-trasduttore mediante la spettroscopia FTIR, consente di supporre che, in queste condizioni di esposizione, vengano indotti da esposizione ad US, cambiamenti a livello di membrana quali formazione di pori, che costituiscono condizione favorevole all'internalizzazione del fluoroforo.

Frequenza US	1 MHz 75% high			LEGENDA: ESPOSIZIONE DELLE CELLULE AD US 1 MHz	
SSD	5 cm	10 cm	15 cm		
Intensità	0,09 W/cm ²	0,08 W/cm ²	0,06 W/cm ²		
Tempo di esposizione (minuti)	30' BOR	30' BOR	30'		Elevato livello di uptake di calceina
	45'	45'	45' BOR		Medio livello di uptake di calceina
	60'	60'	60'		Scarso livello di uptake di calceina
				BOR	Evidenza di effetto bordo

Tabella 5.8: schema riassuntivo degli esiti della microscopia in fluorescenza per le esposizioni a 1 MHz 75%.

In tabella 5.9 è riportato un tentativo di correlare l'effetto riscontrato in microscopia in fluorescenza con l'energia incidente sul campione per il tempo di sonicazione (“dose”). In particolare, si osserva che elevati livelli di uptake di calceina nelle cellule esposte agli US a 1 MHz si ottengono per configurazioni espositive a cui corrisponde una energia incidente sui campioni durante la sonicazione compresa tra 146 e 205 J/cm^2 .

Medi livelli di uptake del fluoroforo si osservano per “dosi” superiori a 205 J/cm^2 fino a 308 J/cm^2 , mentre scarsi livelli per “dosi” inferiori a 146 J/cm^2 e in particolare pari a 102 J/cm^2 .

1 MHz 75% high Stima dell'energia incidente sul campione in petri durante la sonicazione "dose"				LEGENDA: ESPOSIZIONE DELLE CELLULE AD US 1 MHz		
tempo (min)	"Dose (J/cm ²)"					
	5 cm	10 cm	15 cm			
30'	153,9	145,9	102,5		Elevato livello di uptake di calceina	146 ≤dose≤ 205 J/cm ²
45'	230,9	218,9	153,7		Medio livello di uptake di calceina	dose>205 J/cm ²
60'	307,9	291,9	204,9		Scarso livello di uptake di calceina	dose< 146 J/cm ²

Tabella 5.9: schema riassuntivo degli esiti della microscopia in fluorescenza per le esposizioni a 1 MHz 75% in termini di "dose".

5.6.2 Risultati per esposizione ad ultrasuoni a 3 MHz, 100% High

Anche per questo esperimento, il campione di controllo non ha evidenziato uptake del fluoroforo.

5.6.2.1 Risultati per esposizioni a 3 MHz 100% High, SSD=5 cm, t=30', t=45' e t=60'

Le figure 5.49, 5.50 e 5.51 mostrano i risultati dell'esposizione ad US a 3 MHz SSD=5 cm e tempi di esposizione 30', 45' e 60'.

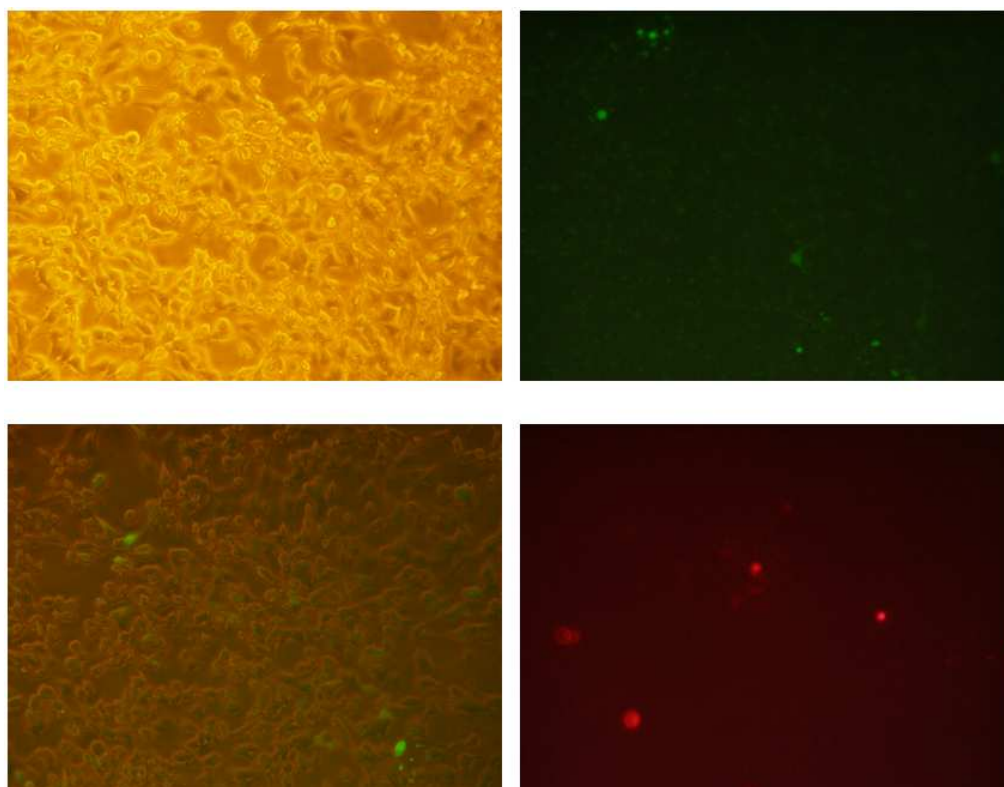


Figura 5.49: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=5 cm per t=30'

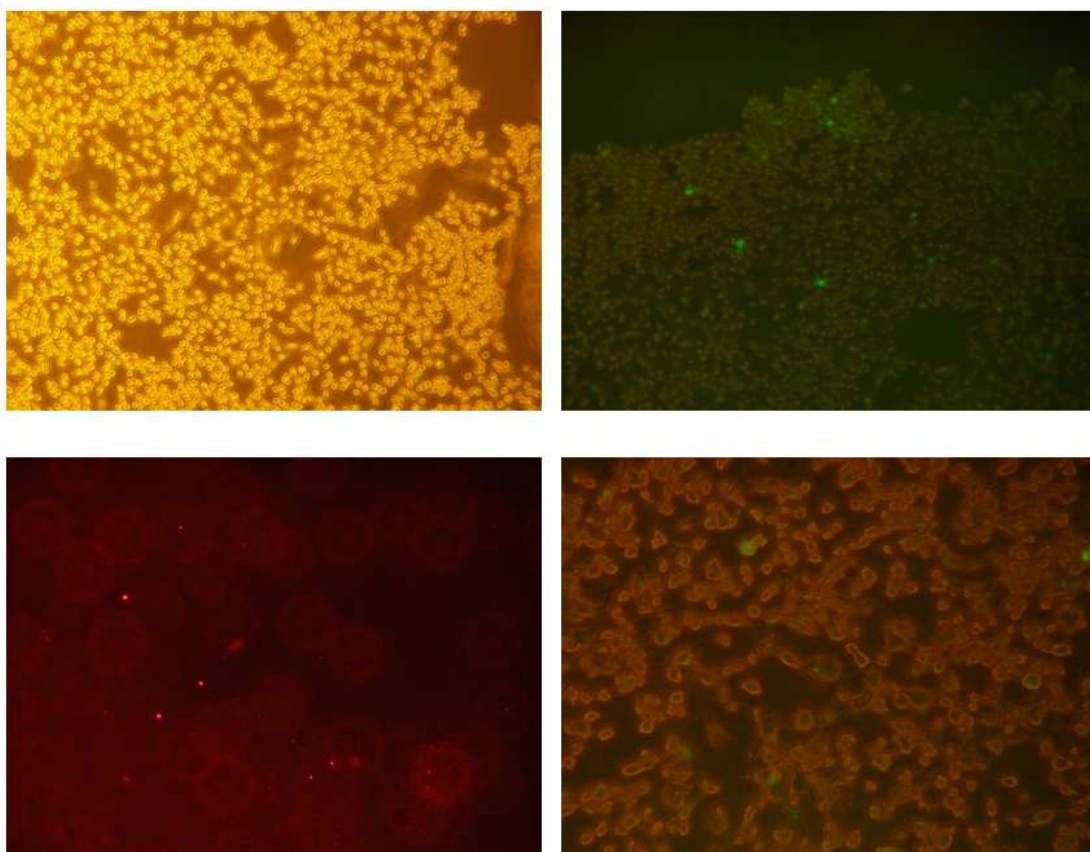


Figura 5.50: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=5 cm per t=45'

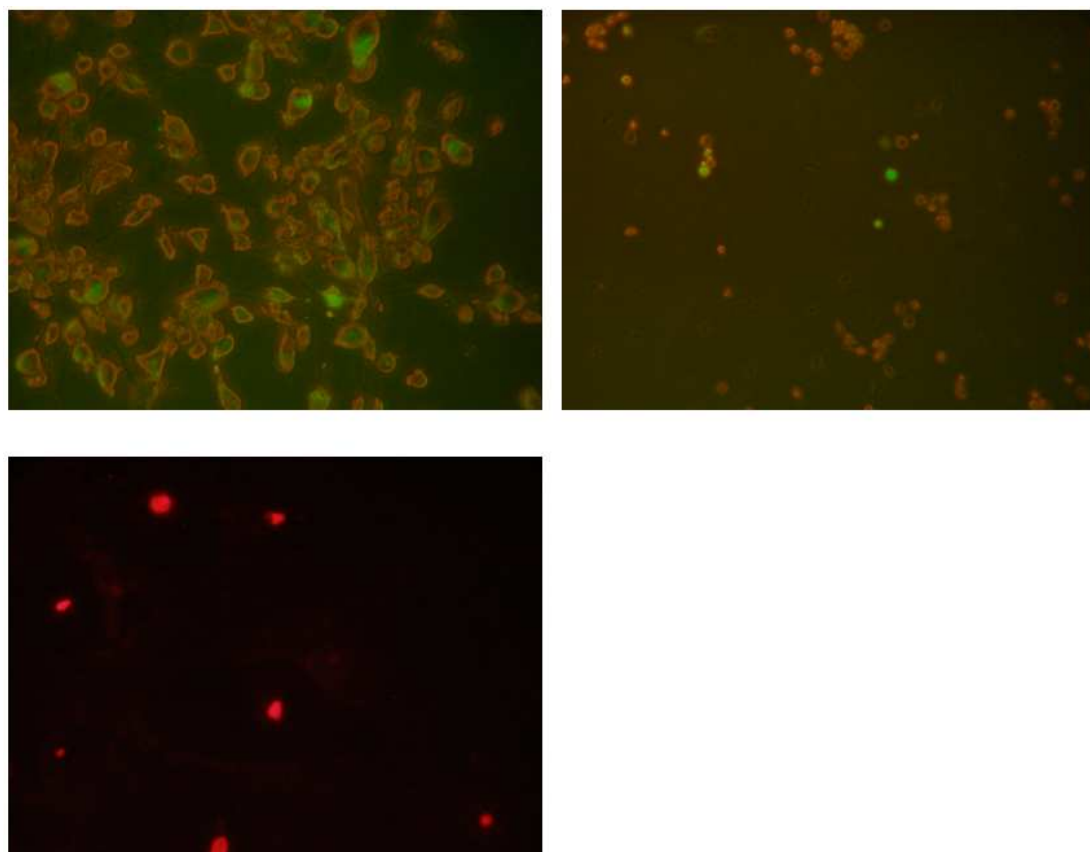


Figura 5.51: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=5 cm per t=60'

Per tutte le configurazioni espositive, si osserva scarso uptake della calceina e una mortalità cellulare leggermente superiore rispetto al controllo.

5.6.2.2 Risultati per esposizioni a 3 MHz 100% High, SSD=10 cm, t=30'

La figura 5.52 mostra i risultati dell'esposizione a SSD=10 cm per 30'. In particolare, vengono riportati due esempi di monostrato in contrasto di fase, seguiti dallo stesso campo in fluorescenza. Anche in corrispondenza di questa configurazione espositiva si osserva una scarsa internalizzazione del fluoroforo. L'inserimento di IP sul campione cellulare evidenzia un aumento della mortalità cellulare rispetto al controllo, mostrando comunque che le cellule che hanno internalizzato la calceina sono nettamente distinte da quelle che legano IP (figura 5.53).

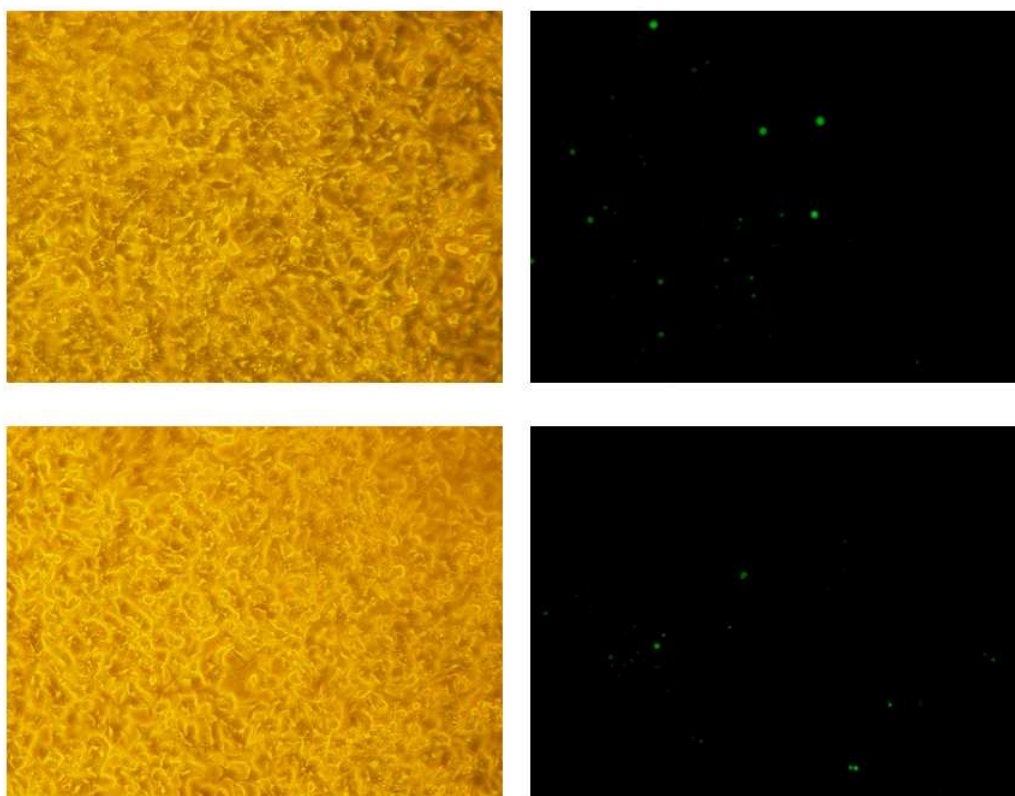


Figura 5.52: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=10 cm per t=30'

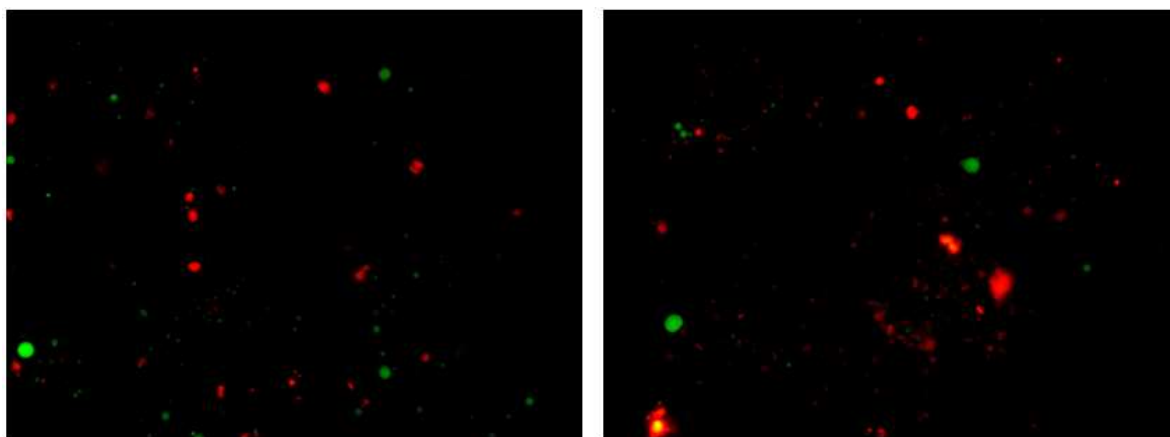


Figura 5.53: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=10 cm per t=30' con IP.

5.6.2.3 Risultati per esposizioni a 3 MHz 100% High, SSD=10 cm, t=45'

La figura 5.54 mostra i risultati dell'esposizione a SSD=10 cm per 45'. I risultati mostrano una scarsa internalizzazione della calceina e mortalità cellulare comparabile con il controllo (figura 5.55).

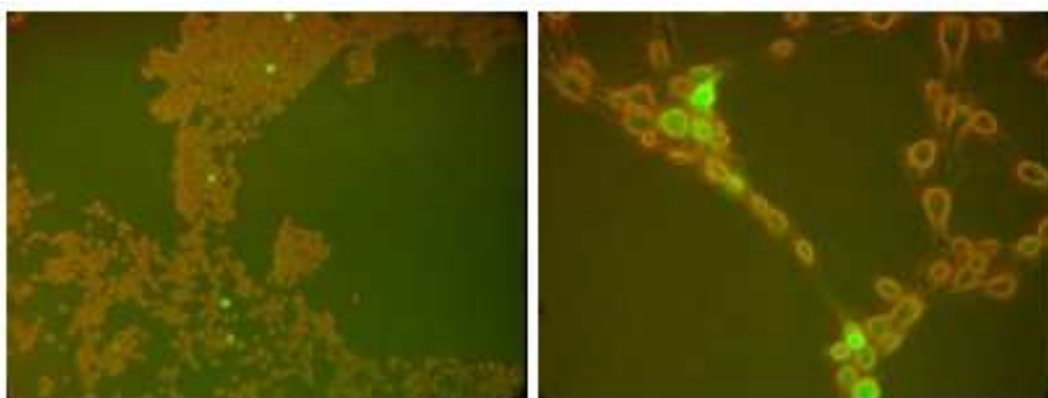


Figura 5.54: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=10 cm per t=45'.

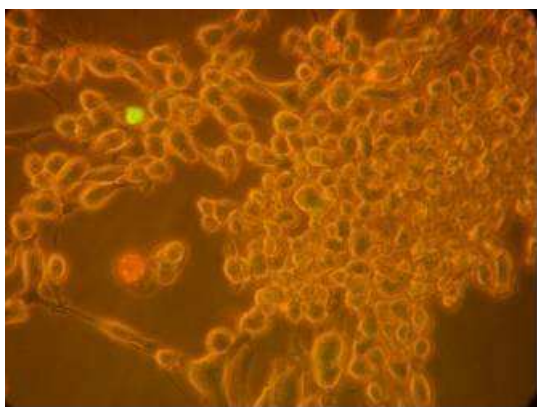


Figura 5.55: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=10 cm per t=45' con IP.

5.6.2.4 Risultati per esposizioni a 3 MHz 100% High, SSD=10 cm, t=60'

La figura 5.56 mostra le immagini relative all'esposizione dei campioni cellulari ad US a SSD=10 cm per 60'. I risultati mostrano anche in questo caso una scarsa internalizzazione della calceina nelle cellule esposte e una mortalità cellulare anch'essa non dissimile rispetto al controllo.

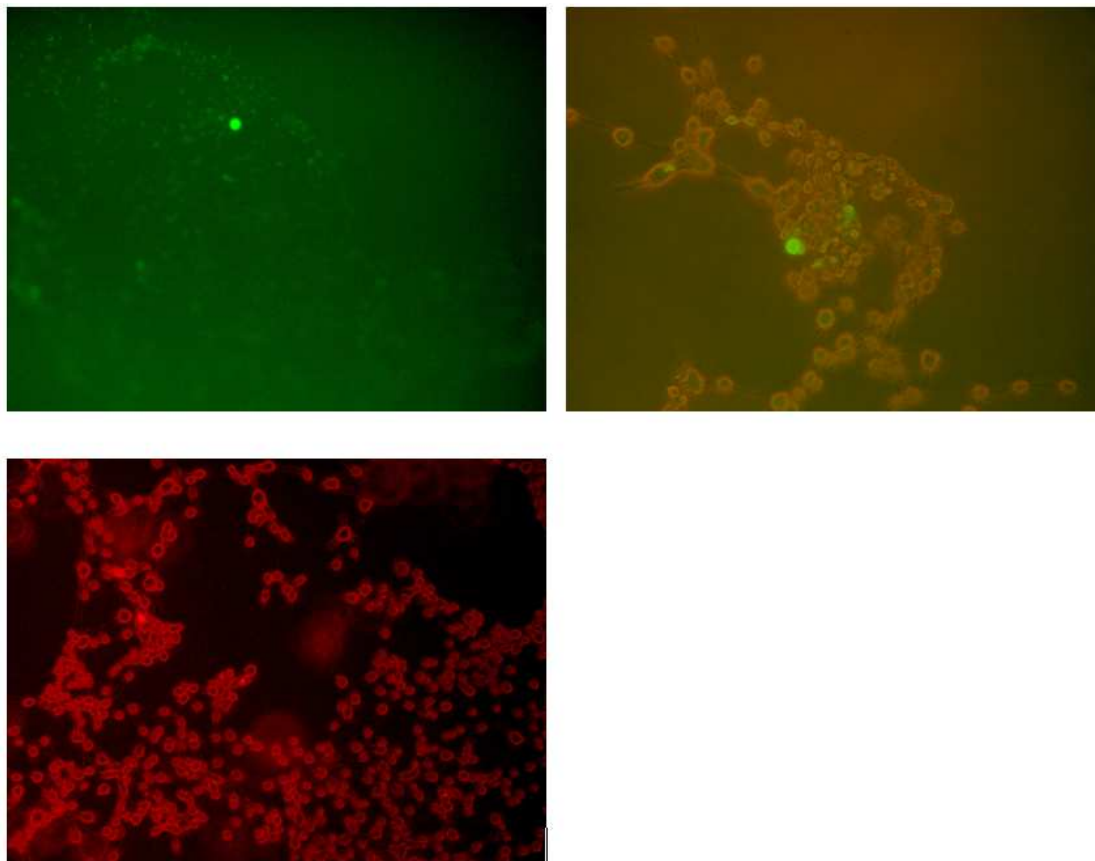


Figura 5.56: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=10 cm per t=60'.

5.6.2.5 Risultati per esposizioni a 3 MHz 100% High, SSD=15 cm, t=30', t=45' e t=60'

Le figure 5.57, 5.58 e 5.59 mostrano i risultati dell'esposizione dei campioni ad US alla frequenza di 3 MHz in corrispondenza della distanza campione-trasduttore SSD=15 cm e per i tempi di esposizione di 30', 45' e 60'.

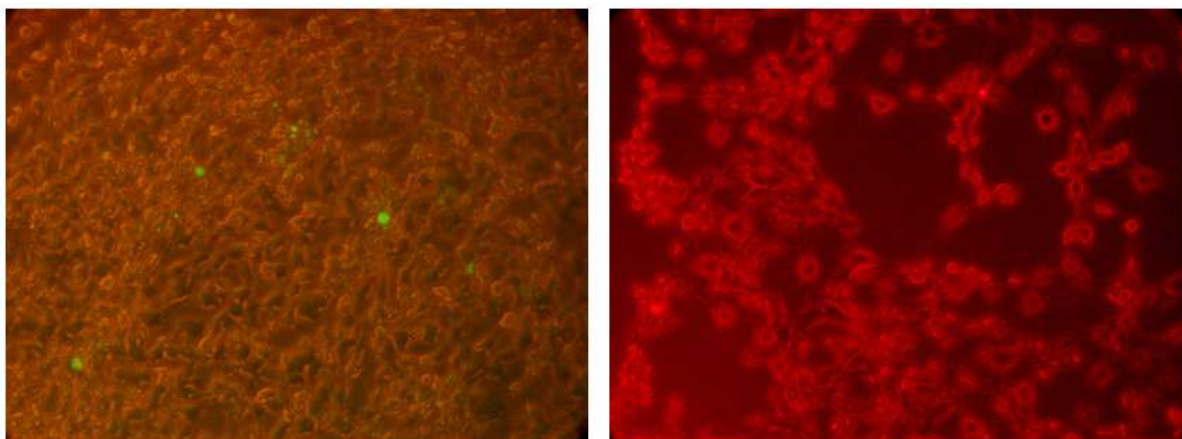


Figura 5.57: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=15 cm per t=30'.

I risultati mostrano scarsa fluorescenza e scarsa mortalità cellulare, evidenziando netta distinzione tra cellule che internalizzano la calceina e cellule morte che legano lo IP.

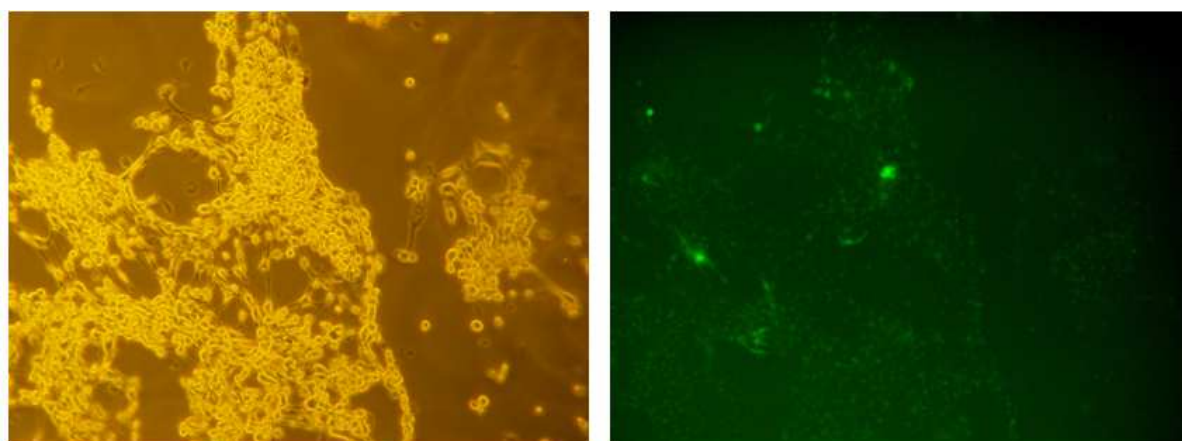


Figura 5.58: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=15 cm per t=45'.

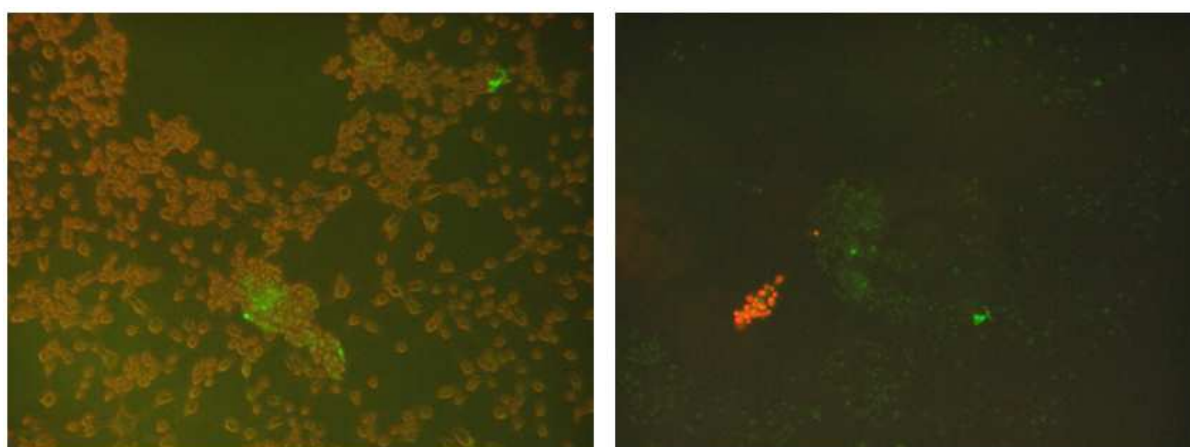


Figura 5.59: immagini del monostrato del campione sonicato 3 MHz alla distanza SSD=15 cm per t=60'.

5.6.2.6 *Tabella riassuntiva dei risultati ottenuti per esposizione ad ultrasuoni a 3 MHz 100% High*

La tabella 5.10 mostra lo schema riassuntivo dei risultati ottenuti con la microscopia a fluorescenza per esposizione dei campioni ad US alla frequenza di 3 MHz 100% *High*, in termini di “*Elevato livello di uptake di calceina*”, “*Medio livello di uptake di calceina*”, “*Scarso livello di uptake di calceina*” per ciascuna distanza campione-trasduttore (SSD=5, 10, 15 cm) e relativa intensità incidente sul campione, per tutti i tempi di sonicazione (30', 45', 60').

Si osserva che in corrispondenza di tutte le intensità acustiche incidenti sul campione, inferiori rispetto a quelle relative all'esposizione ad US a 1 MHz 75%, per tutti i tempi di sonicazione, sono presenti scarsi livelli di uptake di calceina.

Frequenza US	3 MHz 100% high		
SSD	5 cm	10 cm	15 cm
Intensità	0,03 W/cm ²	0,01 W/cm ²	0,009 W/cm ²
Tempo di esposizione (minuti)	30'	30'	30'
	45'	45'	45'
	60'	60'	60'

LEGENDA: ESPOSIZIONE DELLE CELLULE AD US 3 MHz	
	Scarso livello di uptake di calceina

Tabella 5.10: schema riassuntivo dei risultati della microscopia in fluorescenza per le esposizioni a 3 MHz 100% in termini di intensità acustica incidente sul campione.

Tale risultato, assieme con quanto rilevato in spettroscopia FTIR, con la microscopia a fluorescenza per esposizione dei campioni a 1 MHz 75% *High*, sembra confermare un relazione tra frequenza e quindi intensità del campo ultrasonoro incidente (1 e 3 MHz) ed effetto indotto.

In tabella 5.11 è riportato un tentativo di correlare i risultati ottenuti in microscopia a fluorescenza con l'energia incidente sul campione per il tempo di sonicazione (“dose”).

3 MHz 100% high Stima dell'energia incidente sul campione in petri durante la sonicazione “dose”			
tempo (min)	“Dose (J/cm ²)”		
	5 cm	10 cm	15 cm
30'	59,9	27,4	15,9
45'	89,9	41,1	23,8
60'	119,8	54,8	31,8

LEGENDA: ESPOSIZIONE DELLE CELLULE AD US 3 MHz		
	Scarso livello di uptake di calceina	dose < 146 J/cm ²

Tabella 5.11: schema riassuntivo dei risultati della microscopia in fluorescenza per le esposizioni a 3 MHz 100%

Si osserva la corrispondenza con quanto rilevato per esposizione dei campioni a 1 MHz 75% High; infatti, in questa configurazione espositiva, le “dosi” risultano comunque inferiori a 146 J/cm², energia incidente sul campione nel tempo di sonicazione, al di sotto della quale si osservava un scarso uptake del fluoroforo per esposizione a 1 MHz 75% High.

5.7 Citofluorimetria a flusso: risultati sperimentali

In tabella 5.12 è riportato lo schema delle esposizioni per le misure di citofluorimetria a flusso, eseguite con US alla frequenza di 1 MHz e 3 MHz, a partire dai 30 minuti di esposizione per tutte le distanze SSD e per tutti i tempi di sonicazione.

Per studiare l’internalizzazione di molecole extracellulari da parte delle cellule NIH-3T3 esposte ad US alle frequenze di 1 e 3 MHz, anche in questo caso è stata utilizzata la calceina (10 µM). Per valutare la vitalità delle cellule post sonicazione con marcatore fluorescente, è stato usato IP (20 µl).

	1 MHz 75% High		3 MHz 100% High
	Distanza diffusore-bersaglio (SSD)		
	5 cm	10 cm	15 cm
Tempo di esposizione (min)	30'	30'	30'
	45'	45'	45'
	60'	60'	60'

Tabella 5.12: tabella delle misure di citofluorimetria a flusso effettuate per esposizioni a 1 MHz e 3 MHz

Inizialmente sono stati acquisiti i risultati per il campione di controllo e per il campione non marcato, quest’ultimo utile per la rilevazione dell’autofluorescenza dei campioni.

Per ogni campione si è scelto di conteggiare 10.000 eventi cioè 10.000 cellule e sono stati acquisiti:

- 1) *l’istogramma a due parametri*, in cui ciascun punto corrisponde ad 1 evento contato, dotato di un definito valore correlato ai parametri misurati, nel nostro caso due tipi di fluorescenza (IP e calceina);
- 2) *l’istogramma ad un parametro*, dove l’ascissa riporta l’intensità di fluorescenza e l’ordinata la frequenza ovvero il numero di eventi che esprimono tale proprietà.

Dall’istogramma a due parametri dei campioni misurati è possibile ricavare la percentuale di cellule vive, delimitando una regione denominata R1 (o R2, ecc) che consente di stabilire un *gate* (soglia) oltre il quale le cellule sono considerate positive a IP, e quindi morte.

L’istogramma ad un parametro consente la determinazione quantitativa degli eventi considerati positivi per la fluorescenza della calceina, attraverso il posizionamento di un marker (M1) che

definisce un *gate* sul campione di controllo; il parametro % *Gated M1* fornisce la percentuale degli eventi che cadono all'interno del gate prefissato nei campioni sonicati.

5.7.1 Risultati sperimentali per esposizione ad ultrasuoni a 1 MHz 75% High

In figura 5.60 è riportato l'istogramma a due parametri registrato per il campione di controllo, il quale mostra che la maggior parte dei conteggi è spostata nel quadrante in basso a sinistra in cui sono posizionate le cellule vive, negative per la calceina e per lo Ioduro di Propidio (C⁻, PI⁻).

La figura 5.60 evidenzia inoltre l'estensione e il posizionamento per il campione di controllo della regione R1, che identifica la vitalità cellulare, all'interno della quale la percentuale di cellule vive è dell'89,7%.

L'istogramma ad un parametro mostra che l'intensità della fluorescenza della calceina nel campione di controllo, in accordo con quanto atteso, è posizionata su livelli bassi (tra 10^0 e 10^1). Inoltre si evidenzia la determinazione del *gate* (M1), regione considerata positiva per l'uptake della calceina, nel confronto con i campioni sonicati. Per il campione di controllo, la percentuale degli eventi *gated* che cadono nella regione M1 (%*Gated M1*) è 2,63 %.

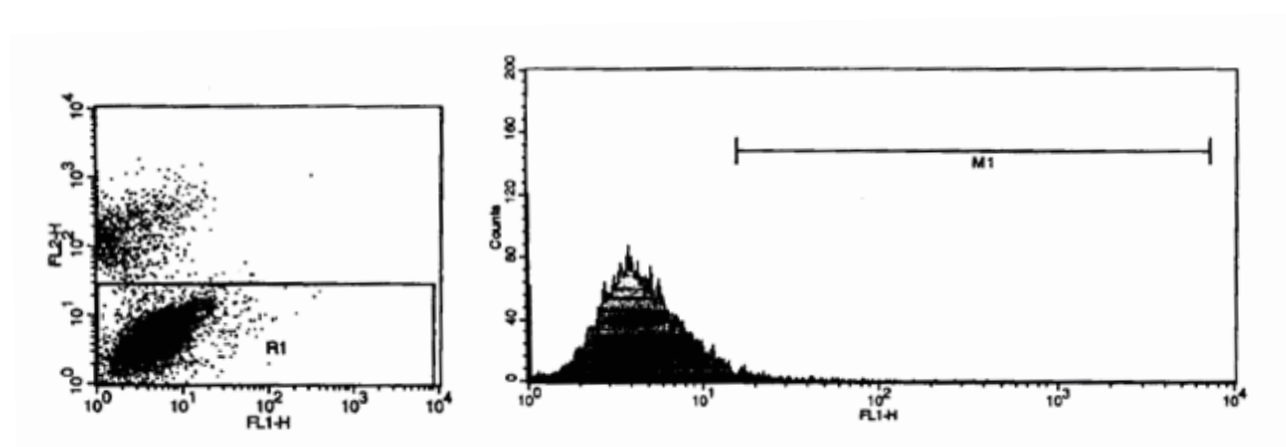


Figura 5.60: istogramma a 2 parametri e a 1 parametro per il campione di controllo (1 MHz)

In figura 5.61 è riportato un esempio di istogramma per una delle configurazioni espositive indagate che ha mostrato un buon uptake della calceina, in particolare SSD=10 cm t=60'.

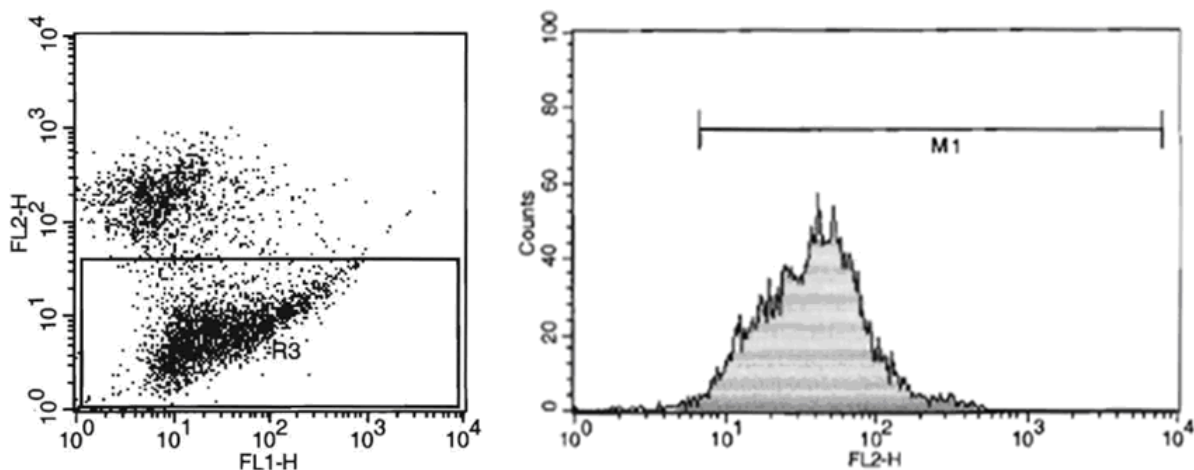


Figura 5.61: istogramma a 2 parametri e a 1 parametro per il campione sonicato a 1 MHz SSD=10 cm t=60'

In tabella 5.13 sono riportati i risultati complessivi delle misure di citofluorimetria per esposizioni dei campioni ad US alla frequenza di 1 MHz, con riferimento alla percentuale degli eventi che cadono nel gate M1 (*%gated M1*). Si evidenzia un elevato uptake della calceina nei campioni sonicati rispetto al controllo, per tutte le distanze campione-trasduttore e tutti i tempi di sonicazione. I risultati riportati in tabella 5.13 mostrano che per ciascuna intensità ultrasonora incidente sul campione, l'internalizzazione della calceina tende ad aumentare al crescere del tempo di sonicazione; inoltre, a parità di tempo di sonicazione, si evidenzia un uptake indipendente dall'intensità incidente sul campione. Tale risultato potrebbe essere associato ad una sorta di saturazione dell'effetto indotto dagli US, con uptake della calceina che sembrerebbe dipendere più dal tempo di sonicazione che dall'intensità, per tempi di sonicazione uguali o superiori ai 45'.

% gated M1 - 1 MHz 75% High			
	SSD=5 cm I=0,09 W/cm ²	SSD=10 cm I=0,08 W/cm ²	SSD=15 cm I=0,06 W/cm ²
Controllo 2,63±1,1			
t=30'	74,8±2,9	49,45 ±1,6	64,63±1,3
t=45'	84,06±4,1	86,79±1,5	87,04±1,7
t=60'	97,48±0,9	99,27±0,5	99,5±0,5

Tabella 5.13: risultati delle misure di citofluorimetria a flusso effettuate per esposizioni a 1 MHz.

Tali dati mostrano un buon accordo con quanto precedentemente rilevato in microscopia a fluorescenza e spettroscopia; anche in questo caso le configurazioni con percentuale più elevata di eventi positivi alla fluorescenza sono quelle corrispondenti alla distanza SSD=15 cm per i tempi di sonicazione più lunghi, pari a 60'. Tale risultato sembra confermare che le modificazioni indotte dagli US alla frequenza di 1 MHz a livello della membrana, costituiscono condizione favorevole

all'internalizzazione del fluoroforo, evidenziata in modo quantitativo dalle misure di citofluorimetria.

In figura 5.62 è riportato il grafico della vitalità cellulare, rilevata attraverso le misure di citofluorimetria per esposizioni dei campioni ad US a 1 MHz nelle configurazioni indagate.

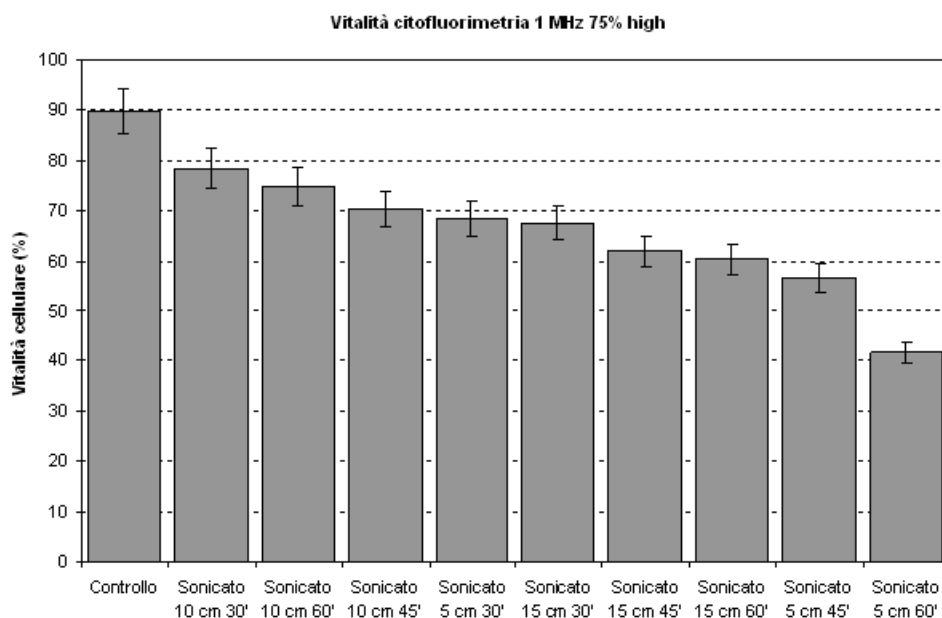


Figura 5.62: vitalità cellulare per esposizioni ad US 1 MHz nelle varie configurazioni espositive.

I risultati mostrano che i valori più bassi per la vitalità (41,7 % e 56,6%) si ottengono alla minima distanza trasduttore campione (SSD=5 cm) e per i tempi di sonicazione più elevati (45' e 60').

Inoltre, per quanto riguarda la vitalità cellulare, è stato effettuato un confronto tra quanto determinato con la tecnica del Trypan blue ed i dati ottenuti con la citofluorimetria a flusso: i risultati mostrano una buona compatibilità tra le tecniche, con un coefficiente di correlazione $r=0,7$.

Il processo di sonoporazione, ossia la porazione delle membrane delle cellule esposte agli US, che consente l'uptake di molecole del fluoroforo, richiede l'individuazione delle sue condizioni ottimali che da una parte mantengano una buona vitalità cellulare, dall'altra garantiscano una buona efficienza di internalizzazione nelle cellule di molecole di interesse; a tale scopo, è stato determinato il cosiddetto "therapeutic ratio" (TR) (Karfhafian, 2009), ossia il rapporto tra il numero delle cellule in cui è stata indotta permeabilità a seguito di esposizione ad US, e il numero delle cellule che sono state conteggiate come morte nell'ambito della medesima esposizione. Tale parametro determina una sorta di bilanciamento tra l'effetto desiderato dell'esposizione ultrasonora (uptake) e l'effetto distruttivo prodotto (morte delle cellule esposte).

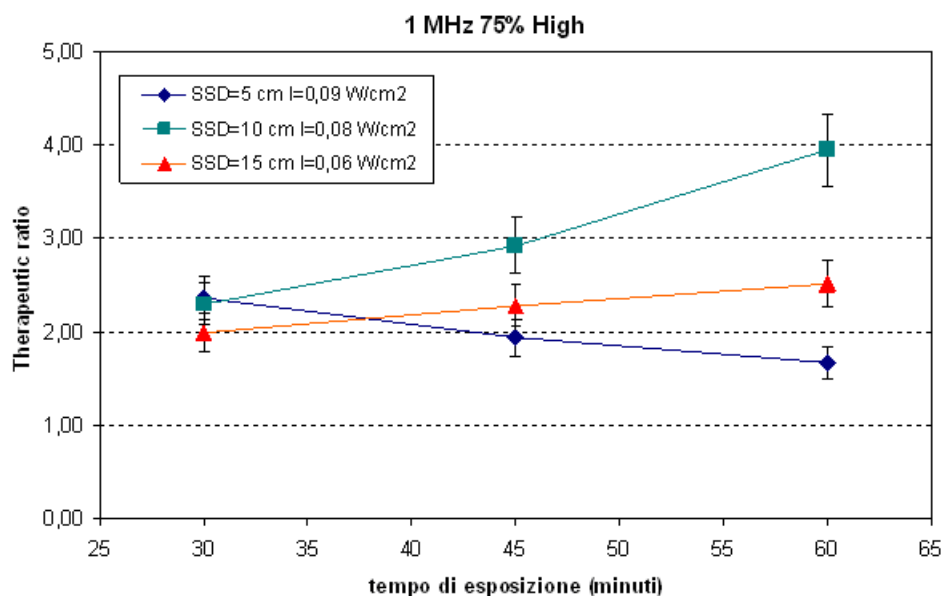


Figura 5.63: Therapeutic ratio in funzione del tempo di sonicazione nelle differenti configurazioni espositive indagate (1 MHz 75% High).

I risultati, riportati in figura 5.63, mostrano che l'andamento di TR dipende dalle condizioni sperimentali; il massimo del TR si ottiene in corrispondenza della configurazione espositiva relativa alla distanza campione-trasduttore SSD=10 cm per lunghi tempi di sonicazione (60'), in considerazione di una elevata permeabilità della membrana indotta dall'esposizione ad US a 1 MHz 75% High e di una elevata vitalità dei campioni, mentre il minimo per SSD=5 cm.

5.7.2 Risultati sperimentali per esposizione ad ultrasuoni a 3 MHz 100% High

In tabella 5.14 sono riportati i risultati complessivi delle misure di citofluorimetria per esposizioni dei campioni ad US alla frequenza di 3 MHz, con riferimento alla percentuale degli eventi che cadono nel gate M1 (%gated M1), quindi positivi alla fluorescenza della calceina.

% gated M1 - 3 MHz 100% High			
	SSD=5 cm I=0,03 W/cm ²	SSD=10 cm I=0,01 W/cm ²	SSD=15 cm I=0,009 W/cm ²
Controllo	1,4±1,1		
t=30'	1,96±0,5	1,29±1,4	2,16±0,5
t=45'	2,11±1,1	5,87±2,1	1,58±0,7
t=60'	3,64±0,8	1,79±0,5	3,88±1,2

Tabella 5.14: risultati delle misure di citofluorimetria a flusso effettuate per esposizioni a 3 MHz.

Un confronto quantitativo in termini di uptake di calceina tra quanto ottenuto per esposizione dei campioni ad US alle due frequenze di 1 MHz e 3 MHz (tabelle 5.13 e 5.14) mostra che, al crescere della frequenza, diminuisce in modo importante la permeabilità cellulare, divenendo comparabile con il controllo.

Tale risultato, assieme con quanto rilevato con la spettroscopia FTIR e con la microscopia in fluorescenza, sembra ulteriormente confermare una relazione tra frequenza (1 e 3 MHz) ed eventualmente intensità del campo ultrasonoro incidente ed effetto indotto.

Infine, in figura 5.64 è riportato il grafico della vitalità cellulare rilevata attraverso le misure di citofluorimetria per esposizioni dei campioni ad US a 3 MHz nelle configurazioni indagate.

Si osserva che la vitalità più bassa si ottiene per la configurazione espositiva SSD=5 cm t=60' (40,88% contro 85,03% del controllo), mentre la più alta per le configurazioni espositive riferibili alla distanza campione-trasduttore più elevata pari a 15 cm.

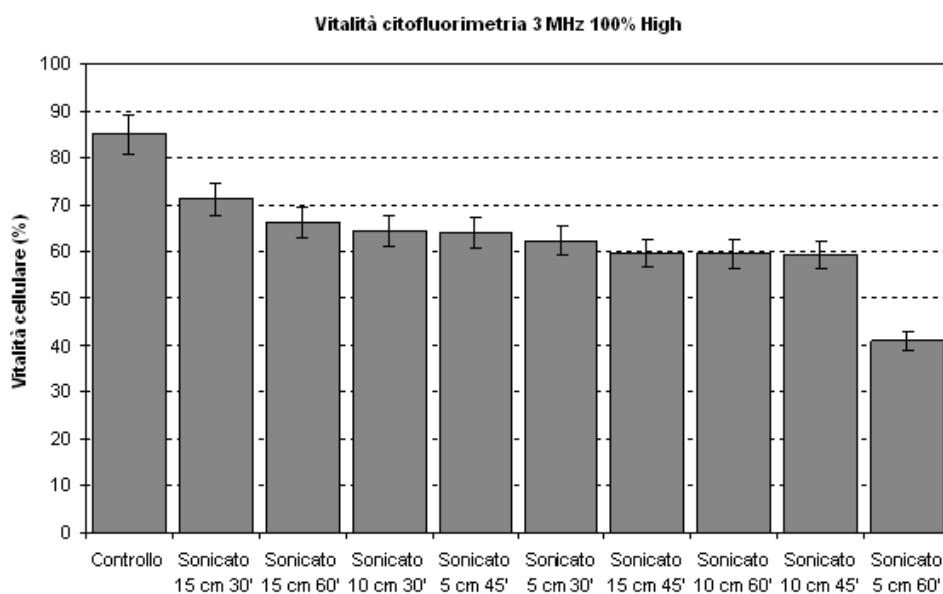


Figura 5.64: vitalità cellulare per esposizioni ad US alla frequenza di 3 MHz nelle varie configurazioni espositive.

5.8 Microscopia confocale: risultati sperimentali

Con la finalità di confermare che, in accordo con la letteratura, la calceina, entra uniformemente all'interno delle cellule, è stato utilizzato un microscopio confocale che fornisce sottili sezioni ottiche dei campioni cellulari; a garanzia che le cellule che internalizzano il fluoroforo sono vitali, è stato utilizzato lo ioduro di propidio (10 µl), inserito all'interno del campione al termine della sonicazione e successivamente all'acquisizione delle immagini in fluorescenza della calceina.

Al fine di eliminare sovrapposizioni nella fluorescenza emessa dai due fluorofori in esame, calceina (λ picco massimo di assorbimento=494 nm e λ picco massimo di emissione= 514 nm) e IP (λ picco massimo di assorbimento = 535 nm e λ picco massimo di emissione =617 nm) sono stati eccitati da due linee di laser a ioni argon (lunghezza d'onda di eccitazione rispettivamente 458 e 543 nm, ed un intervallo di emissione compreso tra 490 e 550 nm per la calceina e tra 550-650 nm per IP), (figura 5.65).

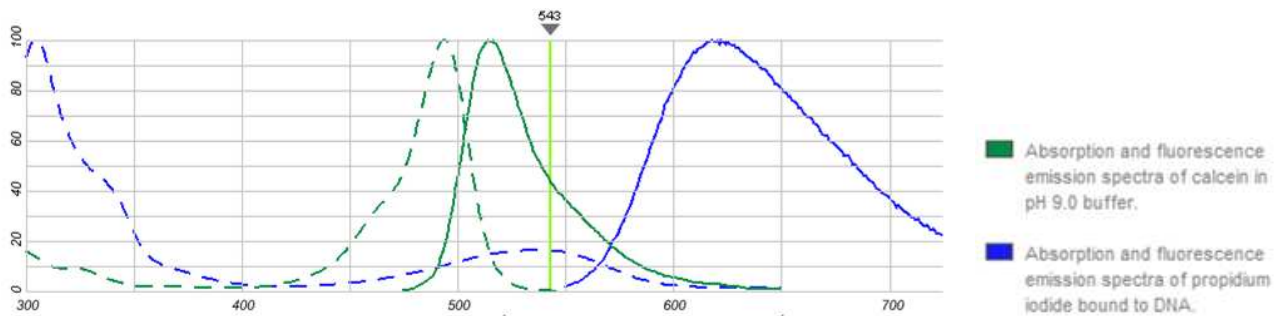


Figura 5.65: Lunghezze d'onda di assorbimento ed emissione per calceina e IP

In figura 5.66 è riportata un'immagine del campione di controllo, non sonicato, marcato con calceina 10 μ M per $t=30'$; successivamente, il campione è stato sottoposto ad un lavaggio con PBS al fine di eliminare il fondo della fluorescenza della calceina non internalizzata. Dopo l'osservazione, è stato introdotto IP, nella concentrazione suddetta. L'immagine mostra assenza di fluorescenza di calceina e IP a carico delle cellule.

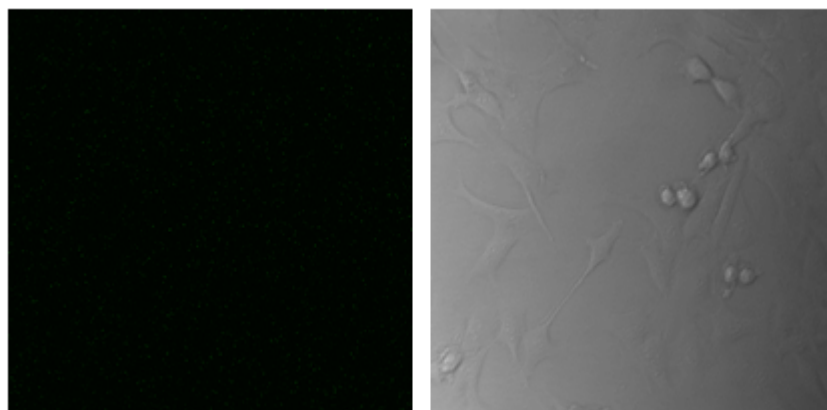


Figura 5.66: immagine in fluorescenza e in trasmittanza del campione di controllo marcato con calceina

Successivamente, si è proceduto ad effettuare esposizioni dei campioni ad US alla frequenza di 1 MHz, in una configurazione già indagata con citofluorimetria a flusso ossia 1 MHz 75% *High* distanza campione trasduttore 5 cm e tempo di esposizione 60'; la mancanza di integrità del

monostrato successivamente alle sonicazioni non ha consentito di acquisire le immagini nelle predette condizioni sperimentali con questa metodica.

I campioni marcati con calceina sono stati pertanto esposti in corrispondenza di intensità ultrasonore inferiori, individuate dalla caratterizzazione di figura 4.5; in particolare, si è scelto di sonicare sempre alla frequenza di 1 MHz ma alla distanza campione-trasduttore SSD=5 cm a cui corrisponde un'intensità ultrasonora dello stesso ordine di grandezza di quella misurata, per la stessa distanza con il trasduttore a 3 MHz 100% *High* ($0,015 \text{ W/cm}^2$ (1 MHz) a fronte di $0,03 \text{ W/cm}^2$ per lo strumento a 3 MHz); tale set up sperimentale mantiene integro il monostrato per l'osservazione in microscopia confocale. Dal momento che, con le metodiche precedentemente descritte, non è stato rilevato, a seguito di esposizione dei campioni ad US alla frequenza di 3 MHz 100% *High*, un significativo uptake della calceina nelle cellule alla distanza campione-trasduttore di 5 cm, si è scelto di investigare se, a parità di basse intensità ultrasonore incidenti sul campione, l'internalizzazione del fluoroforo dipenda o meno dalla frequenza (1 MHz o 3 MHz). I campioni cellulari sono stati pertanto irradiati con US alla frequenza di 1 MHz 10% *High* alla distanza campione trasduttore di 5 cm per tempi di esposizione pari a 15 e 30 minuti; le relative immagini sono riportate nelle figure 5.67 e 5.68, ottenute sommando lungo l'asse z, le emissioni in fluorescenza provenienti da tutti i piani ottici della cellula investigati.

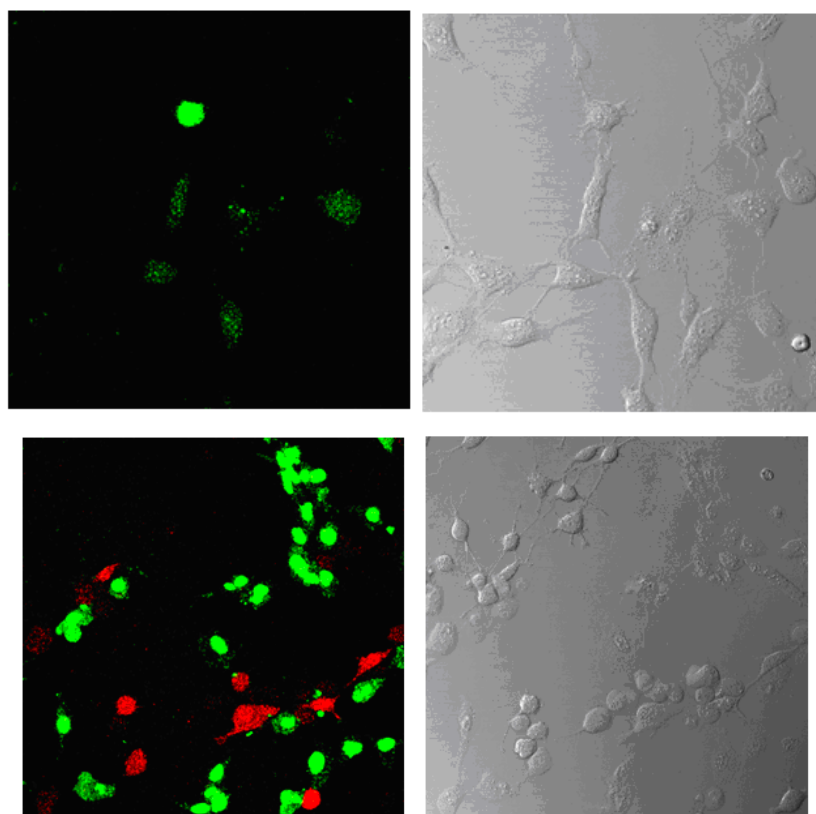


Figura 5.67: immagini in microscopia confocale per il campione sonicato 1 MHz 10% *High* alla distanza SSD=5 cm per $t=15'$; in rosso l'emissione di IP, in verde l'emissione della calceina con i corrispondenti risultati in trasmittanza.

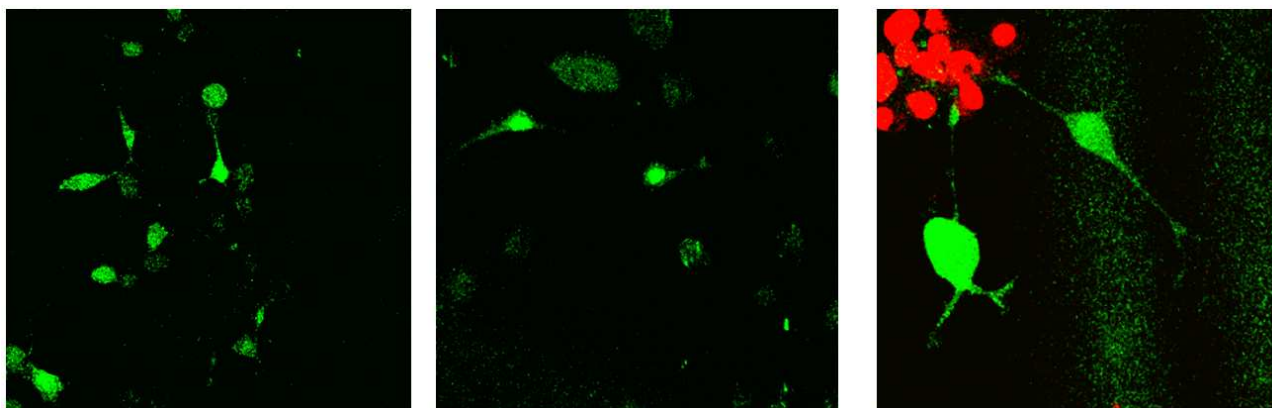


Figura 5.68: immagini in microscopia confocale per il campione sonicato 1 MHz 10% High alla distanza SSD=5 cm per $t=30'$.

Per entrambi i setup si evidenzia importante internalizzazione della calceina all'interno della cellula; i risultati mostrano assenza di colocalizzazione tra cellule con uptake positivo della calceina e cellule morte che hanno legato IP.

Ulteriori investigazioni hanno consentito di escludere la presenza di segnale di autofluorescenza proveniente dalle cellule, stante il medesimo spettro di emissione della fluorescenza post sonicazione proveniente dalla calceina e dalle cellule per entrambe le configurazioni espositive (figura 5.69).

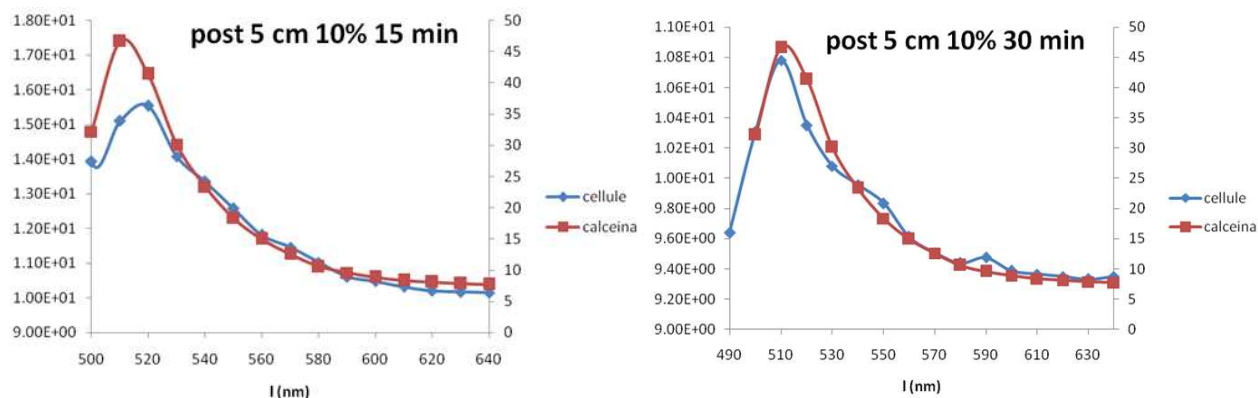


Figura 5.69: Assenza di autofluorescenza dei campioni per esposizioni a 1 MHz 10% High alla distanza SSD=5 cm per $t=15'$ e $30'$.

L'efficienza di uptake, valutata per entrambe le configurazioni espositive indagate, è stata stimata in 34% per SSD=5 cm $t=15'$, 52% per sonicazioni a SSD=5 cm $t=30'$.

Ulteriori investigazioni, effettuate in corrispondenza della distanza campione-trasduttore SSD=5 cm per esposizioni dei campioni cellulari alla frequenza di 3 MHz 100% High per $t=30'$ hanno consentito di stimare l'efficienza di uptake della calceina post sonicazione al 2%, in accordo con i risultati ottenuti in citofluorimetria a flusso.

Le suddette misure mostrano che, esposizioni dei campioni cellulari ad US alla frequenza di 1 MHz per tempi brevi (15' e 30'), anche ad intensità ultrasonore inferiori rispetto a quelle investigate in citofluorimetria e microscopia a fluorescenza, e comunque inferiori alla soglia di cavitazione, determinano modificazioni della membrana cellulare che favoriscono l'uptake della calceina all'interno della cellula.

L'assenza di internalizzazione in corrispondenza di esposizioni ad US alla frequenza di 3 MHz, ad intensità ultrasonore comparabili tra le due frequenze di esposizione (1 MHz e 3 MHz) indica che il parametro determinante ai fini della rilevazione dell'effetto dell'agente fisico sul campione cellulare è la frequenza dell'onda ultrasonora piuttosto che l'intensità (W/cm^2) alla quale esso è sottoposto.

CONCLUSIONI

Tra gli agenti fisici potenzialmente nocivi per la salute, gli ultrasuoni (US), in relazione al loro crescente utilizzo nelle applicazioni mediche, dalla fisioterapia, alla *drug delivery* e all'*HIFU*, fino all'estetica medica e non medica, presentano nuove problematiche che vanno dalle questioni legate all'efficacia dei trattamenti, agli aspetti connessi all'efficienza e affidabilità delle apparecchiature impiegate, fino alla conoscenza delle caratteristiche del fascio durante la sua propagazione nei tessuti, ed allo studio dei relativi effetti biologici.

Alla luce della recente diffusione dei dispositivi ad US, soprattutto in ambito fisioterapico ed estetico, è stata effettuata un'analisi delle problematiche sanitarie connesse alla qualità e alla sicurezza dei suddetti trattamenti, attraverso l'esame della letteratura scientifica, della legislazione e delle norme tecniche, al fine di fotografare lo stato dell'arte, evidenziare le criticità e formulare proposte rivolte sia all'autorità sanitaria, sia al settore produttivo.

Per il settore estetico, dal punto di vista normativo, i risultati evidenziano l'assenza, sia in campo medico che non medico, di norme tecniche specifiche, volte a dare indicazioni sulle definizioni delle quantità fisiche utili per determinare le caratteristiche di *output* dei sistemi, sui valori massimi di tali grandezze e sulle modalità di effettuazione delle misure, in analogia con le norme presenti per la fisioterapia.

Per quanto riguarda le applicazioni degli US in medicina estetica, si evidenzia la necessità di documentare scientificamente l'effetto biologico indotto, le eventuali controindicazioni, gli effetti collaterali. A maggior ragione, dovrebbe sussistere l'obbligo di documentare con riferimenti scientifici, gli effetti biologici prodotti dai dispositivi utilizzati nell'estetica non medica, garantendo la sicurezza dei trattamenti estetici per mezzo di limiti di esposizione scientificamente fondati.

Per quanto riguarda le applicazioni fisioterapiche, in cui le persone sono deliberatamente esposte agli US allo scopo di ottenere un beneficio terapeutico, esistono ancora margini di incertezza circa la reale efficacia dei trattamenti: sono necessari pertanto ulteriori studi, sia clinici che di laboratorio, volti a determinare i meccanismi di azione dell'agente fisico, i benefici dei trattamenti, nonché a valutare i rischi connessi alle esposizioni, al fine di ottimizzare le terapie.

Per entrambi i settori, fisioterapico ed estetico, si evidenzia la necessità di stabilire metodi accurati per predire la "dose", o comunque le grandezze fisiche più significative nella propagazione del fascio ultrasonoro nei tessuti, che possano mettere in relazione le esposizioni con gli effetti biologici.

La qualità dei trattamenti è ovviamente influenzata anche dalle prestazioni delle apparecchiature che emettono gli US, che dovrebbero essere garantite dal rispetto delle relative norme tecniche. In

realtà, alcune criticità sono riscontrabili nelle norme tecniche stesse, per esempio per quanto riguarda la manutenzione delle apparecchiature per fisioterapia: la norma CEI EN 60601-2-5 potrebbe essere migliorata se prevedesse indicazioni più precise circa la periodicità della verifica delle caratteristiche di emissione delle apparecchiature, nonché un riferimento alla necessità di utilizzare strumenti di misura con riferibilità metrologica. Per quanto riguarda la fisioterapia, sarebbe inoltre auspicabile che le norme tecniche prevedessero un limite di intensità effettiva inferiore per trattamenti prolungati, o con trasduttore immobile rispetto alla parte del corpo trattata, evidenziando inoltre che il limite prescritto di 3 W/cm^2 non è una garanzia di assoluta innocuità del trattamento, anche alla luce del fatto che tale valore viene assunto arbitrariamente come limite per alcuni trattamenti di natura estetica non medica.

Il sempre maggiore utilizzo degli US pone problematiche in relazione all'efficienza e all'affidabilità degli apparecchi utilizzati, caratteristiche anch'esse che dovrebbero essere garantite dal rispetto delle relative norme tecniche. In realtà, l'analisi della letteratura internazionale ha evidenziato che spesso le apparecchiature non rispettano i limiti di tolleranza stabiliti dalle norme, in termini di parametri di output, quali potenza, ERA, BNR, frequenza, intensità effettiva. E' stata pertanto approfondita la valutazione delle caratteristiche emissive di due dispositivi commerciali, emittenti US a 1 MHz e 3 MHz, utilizzati rispettivamente per la fisioterapia e l'estetica, ai sensi della norma tecnica CEI EN 61689-2009.

I risultati della caratterizzazione dei trasduttori ad US, mostrano che la frequenza del segnale di eccitazione dei trasduttori rappresenta un parametro cruciale per determinare le condizioni ottimali di funzionamento degli stessi; in particolare, i valori dei parametri ERA e BNR, definiti dalla norma tecnica, dai quali è possibile ricavare informazioni sulle proprietà emissive dei diffusori ad US, sono molto diversi se il trasduttore è caratterizzato da solo o se viene preso in considerazione l'intero sistema ossia il trasduttore più il suo generatore. In particolare, i risultati mostrano che i diffusori si configurano come *“qualitativamente accettabili”* ai sensi della norma, mostrando valori ottimali degli indicatori ERA e BNR, soltanto se eccitati alle loro frequenze di risonanza, peraltro diverse da quelle fornitegli dai loro rispettivi generatori.

Questa indagine ha pertanto evidenziato che non è sufficiente studiare le proprietà emissive del singolo diffusore senza aver verificato l'output del suo generatore: gli apparecchi devono pertanto essere caratterizzati sia singolarmente sia come sistema nel suo insieme.

Emerge pertanto l'esigenza di ampliare lo studio al fine di effettuare test per verificare le caratteristiche emissive di dispositivi simili in commercio, verificando il livello delle loro prestazioni in termini di rischi/benefici, la funzionalità degli stessi e l'efficacia dei trattamenti.

Tali risultati evidenziano la necessità di approfondire la valutazione dei possibili effetti connessi con l'utilizzo di tali apparecchi. A tale scopo, in questo lavoro sono stati studiati gli effetti prodotti su campioni *in vitro* provenienti dalla linea cellulare NIH-3T3, fibroblasti murini, dall'esposizione al campo acustico dei due dispositivi, normalmente utilizzati per trattamenti di tipo fisioterapico ed estetico, costituiti da diffusori circolari e dai loro generatori, operanti rispettivamente alle frequenze di 1 MHz e 3 MHz in modalità pulsata (75% *High* per 1 MHz, 100% *High* per 3 MHz). Gli effetti sono stati studiati con diverse tecniche: Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier, Test dei Micronuclei, Test di vitalità, Microscopia a Fluorescenza, Citofluorimetria a flusso, Microscopia confocale, in un set up sperimentale costituito da una vasca (30x30x30 cm) che consente di variare la distanza trasduttore-campione (SSD=5, 10, 15 cm), a differenti tempi di esposizione (t=5, 15, 30, 45 e 60 minuti).

I due dispositivi sono stati caratterizzati nel set up sperimentale all'interno del quale sono state effettuate le esposizioni cellulari, consentendo il calcolo della intensità del campo acustico incidente sui campioni per le varie distanze campione-trasduttore indagate.

Il test di esclusione del Trypan Blue ha permesso di misurare la vitalità dei campioni cellulari a seguito di esposizione all'agente fisico; il test è stato eseguito subito dopo l'esposizione al campo acustico per entrambe le frequenze di esposizione, per le tre distanze campione-trasduttore e per tutti i tempi, in concomitanza con i rispettivi controlli. I risultati mostrano una vitalità dei campioni esposti ad US a 1 MHz e 3 MHz non dissimile rispetto al controllo.

Per quanto riguarda la genotossicità indotta da esposizione ad US, i risultati mostrano che l'esposizione ultrasonora ad entrambe le frequenze 1 MHz e 3 MHz causa un aumento della frequenza dei micronuclei tempo-dipendente, alle minori distanze campione-trasduttore, e l'aumento è maggiore nei campioni esposti ad US a 1 MHz.

La spettroscopia FTIR è stata usata come strumento per rilevare cambiamenti strutturali nelle principali molecole biologiche. I risultati, combinati con l'analisi statistica PCA, con riferimento a tutte le componenti cellulari (lipidi, proteine, acidi nucleici) mostrano che le cellule NIH-3T3 sono sensibili agli US principalmente alla frequenza di 1 MHz, mostrando variazioni significative dei parametri spettroscopici nella regione dei lipidi, delle proteine e degli acidi nucleici; i set up sperimentali in corrispondenza dei quali si verifica con maggior frequenza una variazione significativa dei parametri spettroscopici sono SSD=15 cm t=45' e SSD=15 cm t=60' alla frequenza di 1 MHz.

Le misure di microscopia a fluorescenza e citofluorimetria, a seguito di esposizione dei campioni ad US alla frequenza di 1 MHz e 3 MHz, sono state effettuate marcando i campioni con la calceina e valutandone la vitalità con lo Ioduro di Propidio, per tutte le distanze campione-trasduttore e per i

tempi di sonicazione superiori ai 30'. I risultati dell'esposizione a 1 MHz mostrano che, in corrispondenza delle stesse configurazioni espositive considerate spettroscopicamente attive nelle misure FTIR, vengono indotte dagli US modificazioni a livello di membrana quali formazione di pori, che costituiscono condizione favorevole all'internalizzazione del fluoroforo nelle cellule, determinando elevati livelli di uptake di calceina. Tale risultato può risultare molto importante per esempio per la *drug delivery*. Al contrario, l'esposizione dei fibroblasti alla frequenza di 3 MHz determina scarsi livelli di uptake della sonda fluorescente calceina, quindi assenza di modificazioni significative indotte a livello di membrana dalla sonicazione alla suddetta frequenza.

Ulteriori investigazioni eseguite con la microscopia confocale alla frequenza di 1 MHz (10%) per la sola distanza campione-trasduttore SSD=5 cm e t=15' e 30', e alla frequenza di 3 MHz (100%) per la stessa SSD e t=30', a basse intensità ultrasonore, comparabili tra le due frequenze e al di sotto della soglia di cavitazione, hanno confermato che l'uptake del fluoroforo è efficiente per sonicazione dei campioni alla frequenza di 1 MHz ed evidenziano che il parametro determinante per la rilevazione dell'effetto biologico è la frequenza del fascio piuttosto che l'intensità alla quale il campione biologico è sottoposto.

Una interessante conclusione di questo studio, in relazione alla caratterizzazione degli apparati emittenti e agli effetti su campioni biologici, è che particolare attenzione deve essere dedicata alla valutazione degli eventuali effetti sulla salute degli US terapeutici ad 1 MHz e alla verifica dell'effettiva efficacia dei trattamenti per esposizioni ad US alla frequenza di 3 MHz.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmadi F, McLoughlin IV, Chauhan S, Ter-Haar G., Bio-effects and safety of low-intensity, low-frequency ultrasonic exposure, *Prog Biophys Mol Biol.* 2012 Apr;108(3):119-38.
- Apfel R. E. and Holland C. K. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound *Ultrasound in Med. & Biol.*, 1991; 17 (2): 179-185.
- Artho P.A., Thyne J.G, Warring B.P., Willis C.D., Brismée J.-M., Latman N.S., A calibration study of therapeutic ultrasound units, *Phys. Ther.* 82 (3) (2002) 257–263.
- Asher, B Safety and efficacy of UltraShape Contour I treatments to improve the appearance of body Contours: multiple treatments in shorter intervals, *Aesthetic Surgery Journal*, 2010, 30(2) 217–224.
- Baker, Robertson, Duck, A review of therapeutic ultrasound; biophysical effects. *Physical therapy*, vol 81, 7, 1351-1358, 2001.
- Barnett SB (1980) The effect of ultrasonic irradiation on the structural integrity of the inner ear labyrinth. *Acta Otolaryngol* 89: 424-432.
- Barnett SB, Walsh DA, Angles JA (1990) Novel approach to evaluate the interaction of pulsed ultrasound with embryonic development. *Ultrasonics* 28: 166-170.
- Barnett, Free radical production: its biological consequences, *Ultrasound Med. Biol.* 24 (Suppl. 1) (1998) S29–S34.
- Barth G, Wachsmann F: Biological effects of ultrasonic therapy. Stuttgart, Congress Bericht, Ter Erlanger Ulyruschall-Tagung, 1949, pp 162-205.
- Bombalska A., Mularczyk-Oliwa M., Kwasny M., Wlodarski M., Kaliszewski M., Kopczynska K., Szpakowska M. and Trafny E.A.. Classification of the biological material with use of FTIR spectroscopy and statistical analysis, *Spectrochim. Acta, Part A*, 78 (2011), pp. 1221–1226.
- Brown S.A., Greenbaum L., Shtukmaster S., Zadok Y., Ben-Ezra S., Kushkuley L. Characterization of non thermal focused ultrasound for non invasive selective fat cell disruption (lysis): technical and preclinical assessment, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 124, 1 (2009).
- Busse, J.W 2004 Therapeutic ultrasound and fracture healing: a survey of beliefs and practices. *Arch Phys Med Rehabil* 85(10):1653-6.
- Canada, 1989, Guidelines for the safe use of ultrasound: part I-Medical and paramedical Applications (excerpt from safety code 23, 1989) Health Canada www.hc-sc.gc.ca

Canada, 2010, Radiation Emitting Devices Act, Canadian Minister of Justice.

CEI 62-39 (1998) Apparecchi elettrici per uso estetico. Guida generale per la sicurezza.

Conti L., Grimaldi P., Udriou I., Bedini A., Giliberti C., Giuliani L., Palomba R., Congiu Castellano A., "Effects induced in cells by ultrasound revealed by ATR-FTIR spectroscopy", *Vibrational Spectroscopy* 52 (2010) 79–84.

Crisci AR, Ferreira AL (2002) Low-intensity pulsed ultrasound accelerates the regeneration of the sciatic nerve after neurotomy in rats. *Ultrasound Med Biol* 28: 1335-1341.

da Cunha A, Parizotto NA, Vidal BC (2001) The effect of therapeutic ultrasound on repair of the achilles tendon (tendo calcaneus) of the rat. *Ultrasound Med Biol* 27: 1691-169.

Dalecki D (2004) Mechanical bioeffects of ultrasound. *Annu Rev Biomed Eng* 6: 229-248.

Daniel D.M., Rupert R.L., Calibration and electrical safety status of therapeutic ultrasound used by chiropractic physicians, *J. Manip. Physiol. Ther.* 26 (3) (2003) 171–175.

Di Giambattista L., Grimaldi P., Udriou I., Pozzi D., Cinque G., Frogley M.D., Bedini A., Giliberti C., Palomba R., Giuliani L., Buogo S., Giansanti A. and Congiu Castellano A. "The Ultrasound effects on non tumoral cell line at 1 MHz therapeutic frequency" *Journal of Physics: Conference Series* 279 (2011).

Direttiva 2004/108/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 15 dicembre 2004 concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative alla compatibilità elettromagnetica e che abroga la direttiva 89/336/CEE.

Direttiva 2006/95/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 12 dicembre 2006 concernente il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative al materiale elettrico destinato ad essere adoperato entro taluni limiti di tensione.

Direttiva Europea 93/42, European Communities, 1993, Council Directive 93/42/EEC of 14 June 1993 concerning medical devices. *Off. J. Eur. Communities* 169, 12.7.1993.

Duck FA, Medical and non-medical protection standards for ultrasound and infrasound, *Progress in Biophysics and molecular biology* 93 (2007) 176-191.

Dyson M. (1985), "Therapeutic Applications of Ultrasound", Ch. 11 in "Biological Effects of Ultrasound", W.L. Nyborg and M.C. Ziskin (eds), Churchill Livingstone.

Dyson M. Mechanisms involved in therapeutic ultrasound. *Physiotherapy* 1987; 73:116-20.

Edwards MJ, Walsh DA, Li Z (1997) Hyperthermia, teratogenesis and the heat shock response in mammalian embryos in culture. *Int J Dev Biol* 41: 345-358.

EHC, Environmental Health Criteria 22, 1982, Ultrasound.

FDA, 1997, Information for manufacturers seeking marketing clearance of diagnostic ultrasound systems and transducers. Division of Reproductive, Abdominal, Ear, Nose, Throat and Radiological Devices: Office of Device Evaluation. US Department of Health and Human Services: Food and Drug Administration. /www.fda.gov/cdrh/ode/ulstran.pdf.

FDA, 2006, Performance standards for sonic, infrasonic, and ultrasonic radiation emitting products. Food and Drug Administration. Available at <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFRSearch.cfm?CFRPart=1-5&showFR=1>. Accessed September 22, 2006

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 455 (2000) 81-95.

Ferrari C.B., Andrade, JC Adamowski, RRJ Guirro Evaluation of therapeutic ultrasound equipments performance, *Ultrasonics* 50 (2010) 704-709.

Forbes MM, Steinberg RL, O'Brien WD Jr. Frequency-dependent evaluation of the role of definity in producing sonoporation of Chinese hamster ovary cells, *J Ultrasound Med*. 2011 Jan;30(1):61-9.

Frieder SJ, Weisberg B, Fleming B, et al. A pilot study: the therapeutic effect of ultrasound following partial rupture of Achilles tendon in male rats. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1988;10:39–46.

Fuciarelli A.F., Sisk E. C., Ronald M. T. and Miller D. L. “Induction of base damage in DNA solutions by ultrasonic cavitation” *Free Radical Biology and Medicine*, 1995; 18 (2): 231-238.

Fyfe M., Bullock M. Acoustic output from therapeutic ultrasound units, *The Australian Journal of Physiotherapy* , vol 32 n.1 1986, 13-16.

Fyfe MC, Parnell SM. The importance of measurement of effective transducers radiating area in the testing and calibration of “therapeutic” ultrasonic instruments. *Health Phys*. 1982;43:377–381.

Gadsden E, Aguilar MT, Smoller BR, Jewell ML, Evaluation of a novel high-intensity focused ultrasound device for ablating subcutaneous adipose tissue for noninvasive body contouring: safety studies in human volunteers. *Aesthet Surg J*. 2011 May;31(4):401-10.

Gann N. Ultrasound: current concepts. *Clin Manage* 1991; 11:64-9.

Gledhill M. Survey of physiotherapy ultrasound equipment calibrations, National Radiation Laboratory (New Zealand) Report NRL, 1996/4. 1996.

- Grimaldi P, Di Giambattista L, Giordani S., Udroi I, Pozzi D., Gaudenzi S., Bedini A., Giliberti C., Palomba R., Congiu Castellano A. Ultrasound-mediated structural changes in cells revealed by FTIR spectroscopy: a contribution to the optimization of gene and drug delivery, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2011 Dec 15;84(1):74-85.
- Guiot C., Spagnolo R. *Ultrasuoni in Medicina, Principi fisici e applicazioni*, UTET, 2010.
- Guirro R.J., Serrão F., Elias D., Bucalon A.J., Calibration of therapeutic ultrasound equipment, *Physiotherapy* 83 (8) (1997) 419–422.
- Guirro, R. S Britshcy Dos Santos Evaluajation of the acoustic intensity of the new ultrasound therapy equipment, *Ultrasonics* 39 (2002) 553-557.
- Guzmán H. R, Nguyen D.X., McNamara A. J., Prausnitz M.R., Equilibrium loading cells with macromolecules by ultrasound: effect of molecular size and acoustic energy, *Journal of pharmaceutical sciences* vol. 91, n.7 july 2002.
- Guzman H. R., Nguyen D. X., Khan S., and Prausnitza M. R., Ultrasound-mediated disruption of cell membranes. II. Heterogeneous effects on cells, *J. Acoust. Soc. Am.* 110 (1), July 2001.
- Hallow DM, Mahajan AD, McCutchen TE, Prausnitz MR. Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects, *Ultrasound Med Biol.* 2006 Jul; 32(7):1111-22.
- Hekkenberg R.T. Characterising ultrasonic physiotherapy systems by performance and safety now internationally agreed *Ultrasonics* 36 (1998) 713-720.
- Hekkenberg, R T, Reibold, R and Zeqiri, B (1994). ‘Development of standard measurement methods for essential properties of ultrasonic therapy equipment’, *Ultrasound in Medicine and Biology* 20, 1, 83-98.
- Hill C.R., ter Haar G., Ultrasound in non-ionizing radiation protection, in: M.J. Suess (Ed.) WHO Regional Publications, European Series No. 10, WHO, Copenhagen, 1981.
- Huang YM, Sun SQ, Zhao J, Yu X and Zhong W. Effects of free radicals on the molecular fluidity and structure of the membrane. *RBS Biorheology*, 1995; 2 (2): 321-21.
- Humphrey V. F. 2007. Ultrasound and matter – Physical interaction. *Biophys. Mol. Bio.* 93: 195-211.
- Hynynen and Mc Dannold N. MRI guided and monitored focused ultrasound thermal ablation methods: a review of progress. *Int J of Hypertherm.* 2004; 20: 725-737.

Hynynen K., Watmough D.J. and Mallard J.R. (1981), “The Effects of Some Physical Factors on the Production of Hyperthermia by Ultrasound in Neoplastic Tissues”, *Radiat. Environ. Biophys.*, Vol. 19, pp. 215-226.

Hynynen K. Ultrasound for drug and gene delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1209–1217.

IEC 150 (1995) (International Electrotechnical Commission (1995). ‘Physiotherapy systems - Performance requirements and methods of measurement in the frequency range 0.5 to 5 MHz’, IEC, draft revision of publication 150, IEC, Geneva.

IEC 61161-2007 Ultrasuoni - Misure di potenza - Bilanci della forza di radiazione e requisiti di prestazione International Electrotechnical Commission, Geneva, Switzerland.

IEC 61689-2009- Ultrasuoni- Sistemi per fisioterapia-specifiche di campo e metodo di misura nel campo delle frequenze comprese tra 0,5 MHz e 5 MHz.

IEC, 2001, IEC 60601 part 2–5: Medical Electrical Equipment: Particular Requirements for the Safety of Ultrasound Physiotherapy Equipment. International Electrotechnical Commission, Geneva.

IEC, 2001b. IEC 60601 part 2–37: Medical Electrical Equipment: Particular Requirements for the Safety of Ultrasound Diagnostic and Monitoring Equipment 2001 and Amendment 1, 2005. International Electrotechnical Commission, Geneva.

IPSM, 1988, Institute of Physical Sciences in Medicine, Report 58: ‘Guidelines for the routine performance checking of medical ultrasound equipment’, edited by R E Richardson, IPSM, York.

Ishikawa N.M., Alvarenga A.V., Paes L.F.C., Pereira W.C.A., Machado J.C., Análise do desempenho de equipamentos de ultra-som para fisioterapia, operando na cidade do Rio de Janeiro, conforme a norma NBR/IEC 1689 da ABNT, *Rev. Bras. Fisioter.* 6 (2) (2002) 63–69.

Jamin N., Miller L., Moncuit J., Fridman W.-H., Dumas P., Teillaud J.-L., “ chemical heterogeneity in cell death: combined synchrotron IR and fluorescence microscopy studies of single apoptotic and necrotic cells”, *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 2003, 72: 366-373.

Johns L.D., Straub S.J., Howard S.M., Analysis of effective radiating area, power, intensity, and field characteristics of ultrasound transducers, *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 88 (1) (2007) 124–129.

Johns, S., Straub, Howard Variability in Effective Radiating Area and Output, Power of New Ultrasound Transducers at 3 MHz, *Journal of Athletic Training* 2007;42(1):22–28.

- Karshafian R, Bevan PD, Williams R, Samac S, Burns PN. Sonoporation by ultrasound-activated microbubble contrast agents: effect of acoustic exposure parameters on cell membrane permeability and cell viability, *Ultrasound Med Biol*. 2009 May;35(5):847-60.
- Karshafian R, Samac S, Bevan PD, Burns PN. Microbubble mediated sonoporation of cells in suspension: clonogenic viability and influence of molecular size on uptake. *Ultrasonics*. 2010 Jun;50(7):691-7.
- Kim B.S., Cho M. and Kim H.J. *Mutat. Res.*, Statistical analysis of in vivo rodent micronucleus assay 469 (2000), pp. 233–241.
- Kimmel E (2006) Cavitation bioeffects. *Crit Rev Biomed Eng* 34:105–161.
- Kodama T., Hamblin M. R., and Doukas A. G. Cytoplasmic Molecular Delivery with Shock Waves: Importance of Impulse Biophysical Journal Volume 79 October 2000, 1821–1832.
- Kolar J., Babickj, A., Kaslova, J., & Kasi, J. (1965) The effect of ultrasound on the mineral metabolism of bones.] *Travmatol. protezinov.*, 26(8): 43-51.
- Krasovitski B.,Frenkel V.,Shoham S, Kimmel E.,Intramembrane cavitaion as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 22;108(8):3258-63.
- Langton N.H., Vaugan P. “Cavitation and the ultrasonic degradation of high polymers” *Brit.J.Appl.Phys.*, 1962; 13: 478-482.
- Lazar DA, Curra FP, Mohr B, McNutt LD, Kliot M, Mourad PD (2001) Acceleration of recovery after injury to the peripheral nervous system using ultrasound and other therapeutic modalities. *Neurosurg Clin N Am* 12: 353-357.
- Lehmann J.F. and de Lateur B.J. (1982), in “Therapeutic Heat and Cold”, Ch. 10, J.F. Lehmann, (Ed.), Williams and Wilkins, Baltimore.
- Lehmann JF. Clinical evaluation of a new approach in the treatment of contracture associated with hip fracture after internal fixation. *Arch Phys Med Rehabil*. 1961;42:95.
- Leighton TG (1997) *The Acoustic Bubble* (Academic, London, San Diego), pp 312–426.
- Lele P.P. (1979), “Safety and Potential Hazards in the Current Applications of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology”, *Ultrasound in Med. and Biol.*, Vol. 5, pp. 307-320.8.
- Lin S.-Y., Wei Y.-S., Li M.-J. and Wang S.-L., Effect of ethanol or/and captopril on the secondary structure of human serum albumin before and after protein binding, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 (2004) 457–464.

Marchioni C, Riccardi E, Spinelli S, Dell'Unto F, Grimaldi P, Bedini A, Giliberti C, Giuliani L, Palomba R, Congiu Castellano A. Structural changes induced in proteins by therapeutic ultrasounds, *Ultrasonics*. 2009 Jun; 49 (6-7): 569-76.

Miller M. W., Brayman A. A. "Biological effect of ultrasound. The perceived safety of diagnostic ultrasound within the context of ultrasound biophysics: a personal perspective" *Echocardiography: A Jnl. Of CV Ultrasound and Allied Tech.*, 1997, 14 (6): 615-627.

Miller DL, Thomas RM. Ultrasonic gas body activation in elodea leaves and the mechanical index. *Ultrasound Med Biol* 1993; 19:343–351.

Miller M. W., Miller D. L. and Brayman A. A. "A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective" *Ultrasound in Med. and Biol.*, 1996, 22 (9): 1131-1154.

Milowska K., Gabryelak T. "Reactive oxygen species and DNA damage after ultrasound exposure" *Biomol. Eng.*, 2007; 24: 263-267.

Ministero della Salute, Sicurezza ed efficacia delle apparecchiature in riabilitazione, Quaderni del Ministero della Salute, n.8, marzo-aprile, 2011.

Moreno-Moraga J., Valero-Alte´s T., Mart´nez Riquelme A., Isarria-Marcosy M.I., and J. Royo de la Torre Body Contouring by Non-Invasive Transdermal Focused Ultrasound, *Lasers in Surgery and Medicine* 39:315–323 (2007).

Mourad PD, Lazar DA, Curra FP, Mohr BC, Andrus KC, Avellino AM, McNutt LD, Crum LA, Klot M (2001) Ultrasound accelerates functional recovery after peripheral nerve damage. *Neurosurgery* 48: 1136-1140.

NCRP Report No. 74 (1983), "Biological Effects of Ultrasound: Mechanisms and Clinical Implications", National Council on Radiation Protection and Measurements, 7910 Woodmont Avenue, Bethesda, MD, 20814, issued December 30.

Oakley E.M. (1978), "Dangers and Contraindications of Therapeutic Ultrasound", *Physiotherapy*, Vol. 64, p. 174.

O'Brien WD, Jr. (2007) Ultrasound-biophysics mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 93:212–255.

Ohhashi Y., Kihara M., Naiki H., Goto Y. "Ultrasonication-induced amyloid fibril formation of β 2-microglobulin" *J. Biol. Chem.*, 2005; 280: 32843-32848.

Ohl CD, Arora M, Ikink R, de Jong N, Versluis M, Delius M, Lohse D. Sonoporation from jetting cavitation bubbles. *Biophys J* 2006;91: 4285–4295.

- Okada K., Kudo N., Niwa K., Yamamoto K., “A basic study of sonoporation with microbubble exposed to pulsed ultrasound” *J. Med. Ultrasonics*, 2005, 32: 3-11.
- Paik NJ, Cho SH, Han TR (2002) Ultrasound therapy facilitates the recovery of acute pressure-induced conduction block of the median nerve in rabbits. *Muscle Nerve* 26: 356-361.
- Payton, Lamb and Kasey (1975), “Effects of Therapeutic Ultrasound on Bone Marrow in Dogs”, *Phys. Ther.*, 55:270-275.
- Pepe J., Rincon M., Wu Junru “Experimental comparison of sonoporation and electroporation in cell transfection application” *Acoustics Research Letters Online*, 2004; 5 (2): 62-67.
- Perkins, M A (1989). ‘A versatile force balance for ultrasound power measurement’, *Physics in Medicine and Biology*, 34, 11, 1645-51.
- Plaja, J. 2003. *Analgesia por Medios Físicos*, Editorial Mc Graw-Hill.
- Pozzi D, Fattibene P, Viscomi D, Di Giambattista L, Grimaldi P, Udriou I, Bedini A, Giliberti C, Palomba R, Congiu Castellano A., Use of EPR and FTIR to detect biological effects of ultrasound and microbubbles on a fibroblast cell line. *Eur Biophys J*. 2011, Vol. 40, No 10, pp. 1115-1120.
- Preston, R.C. *Output measurements for medical ultrasound*, Springer Verlag, 1991.
- Pye S, C. Milford, C. 1994. The Performance of Ultrasound Physiotherapy machines in Lothian, Scotland. *Ultrasound Med. Biol.* 20 (4): 347-359.
- Pye S. Ultrasound therapy equipment-does it perform? *Physiotherapy*, January 1996, vol. 82, n.1, 39-44.
- Reid D.C. (1981), “Possible Contraindications and Precautions Associated with Ultrasound Therapy”, In: A. Mortimer, N. Lee (eds.), *Proceedings of International Symposium on Therapeutic Ultrasound*, Canadian Physiotherapy Association.
- Repacholi, M.H. & Benwell, D.A. (1979) Using surveys of ultrasound therapy devices to draft performance standards. *Health Phys.*, 36: 679-686.
- Riesz, P., Kondo, T., 1992. “Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications”. *Free Radic. Biol. Med.* 13, 247–270.
- Rivest M, Quirion-de Girardi C, Seaborne D, et al. Evaluation of therapeutic ultrasound devices: performance stability over 44 weeks of clinical use. *Physiother Can* 1987;39:77–86.
- Robertson, V., 2002. Dosage and treatment response in randomised clinical trials of therapeutic ultrasound. *Physical Ther. Sport* 3,124–133.

Robertson V., Therapeutic Ultrasound at 1 MHz, Invited Commentary, Physical Therapy, vol. 88 number 1, 2008.

Schabrun, Walzer, Chipchase, How accurate are therapeutic ultrasound machines? Hong Kong Physiotherapy Journal, Volume 26, 2008.

Schlicher RK, Radhakrishna H, Tolentino TP, Apkarian RP, Zarnitsyn V, Prausnitz MR. Mechanism of intracellular delivery by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol* 2006;32:915–924.

Shaw, Hodnett, Calibration and measurement issues for therapeutic ultrasound, *Ultrasonics* 48 (2008) 234–252.

Sicurezza e Igiene del Lavoro, Raccolta Normativa a cura della Te.Si.A S.r.l., anno 2000

Speed C.A. Review, Therapeutic Ultrasound in soft tissue, *Rheumatology* 2001; 40:1331-1336

Teitelbaum, S. A., Burns J, Kubota J., Matsuda H., Otto M., Shirakabe Y., Suzuki Y., Brown S. Noninvasive Body Contouring by Focused Ultrasound: Safety and Efficacy of the Contour I Device in a Multicenter, Controlled, Clinical Study, *Plastic and Reconstructive Surgery*, September 1, 2007

ter Haar G., Therapeutic applications of ultrasound, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 93 (2007) 111–129.

Wells PNT: Biomedical Ultrasonics. New York, Academic Press, Inc, 1977.

Wessling KC, DeVane DA, Hylton CR. Effects of static stretch versus static stretch and ultrasound combined on triceps surae muscle extensibility in healthy women. *Phys Ther.* 1987;67:674–679.

WHO, International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria, 22, 1982.

Wu J. Shear stress in cells generated by ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;93:363–373.

Zarnitsyn V., Rostad C.A., Prausnitz M.R., Modeling transmembrane transport through cell membrane wounds created by acoustic cavitation, *Biophysical Journal* 95, 4124–4138, 2008.

Zhou Y., Cui J, Deng C.X., Dynamics of sonoporation correlated with acoustic cavitation activities, *Biophysical Journal: Biophysical Letters* 94, L51-L53, 2008.

Ziskin M, McDiarmid T, Michlovitz S. Therapeutic ultrasound. In: Michlovitz S. ed Thermal agents in rehabilitation. Philadelphia: F. A. Davis, 1990.