

Biophysical effects of high frequency electrical field (4-64 MHz) on muscle fibers in culture

Marco Dal Maschio (1,2), Marta Canato (1), Filippo M. Pigozzo (3), Alberto Cipullo (4), GianAntonio Pozzato (4), Carlo Reggiani (1)

(1) Dipartimento di Anatomia e Fisiologia, Università di Padova; (2) IIT, Italian Institute of Technology, Genova; (3) Department of Information Engineering, Università di Padova; (4) Telea srl, Quinto Vicentino, Italia

Abstract

Gli effetti dei campi elettrici oscillanti sulle cellule viventi dipendono dalla frequenza. Il campo elettrico che oscilla nell'intervallo di MHz può indurre la deformazione della membrana cellulare che può causare danneggiamento o stimolazione delle cellule. Il problema è stato studiato nei globuli rossi, ma mai in cellule eccitabili. In questo studio abbiamo studiato il comportamento dei muscoli murini e delle singole fibre muscolari esposte in vitro ad un campo elettrico oscillante nella gamma MHz. La configurazione commerciale Rexionage™ (Telea srl), che fornisce un particolare spettro di frequenza nella gamma 4-64 MHz brevettato come "stimolazione a risonanza molecolare quantica", è stato utilizzato come generatore di campo elettrico ed è stata esaminata una vasta gamma di potenze. Muscoli o fibre muscolari sono stati posti sul fondo delle piastre di Petri e il campo elettrico è stato applicato tra un elettrodo ad ago immerso nel mezzo e mobile mediante un micromanipolatore e un elettrodo posto sotto il fondo del piatto. Mentre la stimolazione ad alta potenza ha prodotto un taglio rapido e ben localizzato delle fibre, la stimolazione a bassa potenza ha causato una deformazione reversibile della membrana. Tale deformazione è stata accompagnata da una depolarizzazione della membrana e un aumento del calcio libero citosolico, che sono stati rilevati con sonde fluorescenti. Sia i cambiamenti del potenziale di membrana che le variazioni della concentrazione di calcio libero seguivano rigorosamente il decorso temporale dell'applicazione e della rimozione del campo elettrico. In conclusione, i risultati attuali dimostrano che le cellule eccitabili, come le fibre muscolari, rispondono all'applicazione del campo elettrico ad alta frequenza anche quando non viene raggiunta la soglia per il potenziale d'azione. Ciò potrebbe portare all'attivazione di percorsi di segnalazione intracellulare anche senza contrazione.

Parole chiave: campo elettrico ad alta frequenza, potenziale di membrana, calcio citosolico, fibre muscolari

Il comportamento dei materiali biologici esposti ai campi elettromagnetici è diventato un settore di ricerca in crescita negli ultimi anni. L'interesse è stimolato dalla varietà dei fenomeni dipendenti dalla frequenza che si verificano nei tessuti biologici, comunemente spiegati da un punto di vista teorico in termini di modelli di dispersione dielettrica [7]. Gli studi sono principalmente incentrati sulla caratterizzazione delle risposte di diversi tipi di cellule [7, 12] e su possibili implicazioni nella diagnostica e applicazioni alla manipolazione cellulare [16].

I fenomeni di dispersione sono comunemente classificati come α -dispersione, β -dispersione e γ -dispersione a seconda del corrispondente spettro di frequenza dei processi fisici sottostanti [1]. La dispersione α è correlata al rilassamento dielettrico dell'acqua libera e si verifica nell'intervallo di GHz. La dispersione β si verifica nella regione di frequenza tra 10 kHz e 100 MHz ed è ben spiegata dai fenomeni di polarizzazione strutturale o dal cosiddetto effetto di Maxwell-Wagner, che coinvolge il citoplasma, la membrana plasmatica e il mezzo extracellulare circostante [8]. La dispersione γ si verifica nell'intervallo 100 Hz-10 kHz ed è correlata alla variazione della capacità della membrana cellulare.

Sfruttando gli effetti indotti dalla stimolazione del campo alternato [11], come la generazione del dipolo che porta allo spostamento delle cellule e alla deformazione cellulare, sono state condotte numerose ricerche sulla caratterizzazione strutturale dei componenti cellulari [10]. Le proprietà viscoelastiche della membrana cellulare sono state studiate in eritrociti immersi in un campo elettrico oscillante [5, 6] e le applicazioni di questi fenomeni sono state sviluppate al fine di fabbricare dispositivi per lo screening cellulare basati su meccanismi dielettroforetici [2, 13]. Altri studi hanno considerato la stimolazione AC (Alternating Current) come un mezzo per rompere la struttura della membrana negli esperimenti di elettrofusione e porizzazione cellulare non solo dal punto di vista della deformazione dielettroforetica [15] ma anche dal punto di vista del potenziale transmembrana variazioni indotte durante l'applicazione in campo CA [14]. Nel presente rapporto, ci siamo concentrati principalmente sugli effetti indotti dalla stimolazione AC a bassa potenza non uniforme con frequenze alte (MHz) su un tipo specifico di modelli biologici: muscoli e fibre muscolari. Tenendo conto dell'eccitabilità di queste cellule, gli esperimenti hanno esaminato gli effetti fisiologici della stimolazione AC in termini di fluttuazioni del potenziale transmembrana e alterazioni della concentrazione di calcio citoplasmatico. La stimolazione ad alta frequenza è stata anche confrontata direttamente sulle stesse preparazioni con la classica stimolazione del campo bipolare ottenuta con due elettrodi di platino e in grado di suscitare potenziali d'azione, transienti di calcio e contrazioni.

Materiali e metodi

Protocollo di preparazione per tessuti e cellule muscolari

Gli esperimenti sono stati condotti su fibre muscolari adulte murine enzimaticamente dissociate e mantenute in coltura come descritto da [4]. I topi sono stati uccisi mediante dislocazione cervicale e il muscolo flessore breve delle dita (FDB) è stato disseccato e posto in soluzione Tyrode (NaCl 140 mM; KCl 2 mM; CaCl₂ 0,5 mM; MgCl₂ 2 mM; HEPES

10 mM; glucosio 5 mM) contenente lo 0,2% collagene di tipo I e siero bovino fetale al 10% (FBS) per 1 ora a 4 °C e quindi per 1 ora a 37 °C. Dopo diversi lavaggi in soluzione Tyrode contenente FBS al 10% per bloccare l'effetto di collagenasi e stabilizzare le fibre, il muscolo è stato delicatamente dissociato attraverso una pipetta Pasteur con una grande apertura in una provetta di vetro Falcon per ottenere singole fibre. Fibre isolate sono state placcate su coprivetri ricoperti con laminina di topo, che ha prodotto l'adesione di fibre entro 1 ora. Le fibre sono state mantenute in soluzione Tyrode supplementata con FBS al 10% e 1% di penicillina-streptomomicina in un incubatore, con il 5% di CO₂ a

36,5 °C e utilizzate per esperimenti il secondo giorno dopo la dissociazione.

Pochi esperimenti sono stati condotti su interi muscoli estensori lunghi delle dita (EDL) appena sezionati dalla gamba e immediatamente bloccati su entrambe le estremità sul fondo coperto con Silgard di una piastra di Petri riempita con soluzione di Krebs ossigenata.

L'uso degli animali e il protocollo sperimentale sono stati approvati dal Comitato Etico del Dipartimento. Sono stati adottati tutti gli sforzi per ridurre al minimo la sofferenza degli animali e utilizzare solo il numero di animali strettamente necessari per ottenere dati affidabili.

Configurazione sperimentale

La configurazione sperimentale è stata progettata per generare il campo elettrico oscillante attorno a singole fibre muscolari o

muscoli EDL posizionati all'interno di una piastra di Petri. Uno stimolatore commerciale (Rexonage™, Telea), che rappresenta la tecnologia all'avanguardia applicata in molte attività chirurgiche e mediche, è stato adottato a causa della sua particolare gamma di frequenza di stimolazione. Infatti il segnale di uscita dello stimolatore è un segnale sinusoidale periodico con un particolare spettro armonico nell'intervallo tra 4 e 64 MHz brevettato da TELEA srl come "stimolazione a risonanza molecolare quantica". L'ampiezza varia da pochi volt a circa 1 kV a seconda dell'impostazione di potenza. Una valutazione dettagliata dell'ampiezza del segnale di uscita come funzione delle impostazioni di potenza è stata eseguita al fine di valutare l'intensità del campo elettrico indotta nell'ambiente extracellulare. Il protocollo di stimolazione prevedeva l'applicazione del campo elettrico tra un microelettrodo Pt di 65 μ m di diametro, immerso nel mezzo perfusivo molto vicino (<100 μ m) alla superficie della membrana, e il lato inferiore del piatto di coltura in contatto con una piastra di riferimento a terra per chiudere il percorso di corrente. Il supporto del microelettrodo è stato montato su uno stadio manipolatore passo-passo a 3 assi che ha permesso il controllo del posizionamento della punta dell'elettrodo in relazione alla membrana cellulare con l'aiuto di uno stereomicroscopio. È stata sviluppata una simulazione delle proprietà spaziali del campo di stimolazione, generata con l'elettrodo immerso nel mezzo di perfusione (con nota costante dielettrica e parametri di conduttività) a diverse distanze e angoli di inclinazione con la superficie della fibra muscolare. La simulazione è illustrata nella Figura 1 e consente la valutazione della concentrazione del campo elettrico e della sua massima estensione spaziale.

Microscopio ottico

Uno stereomicroscopio verticale personalizzato da uno stadio Mytutoyo con obiettivi di distanza operativi molto lunghi (10X, 20X e 50X) è stato utilizzato con illuminazione a luce visibile per l'imaging di regioni selezionate di muscoli isolati o di singole fibre di FDB prima, durante e dopo le sessioni di stimolazione. Mediante una telecamera monocromatica (SONY-CCD) e una scheda DAQ di acquisizione video installata in un PC, i filmati delle fibre cellulari sono stati registrati e digitalizzati. L'analisi dei dati di imaging è stata effettuata mediante il software ImageJ.

Sonde fluorescenti e microscopia

Gli effetti della stimolazione su parametri fisiologici, concentrazione di calcio citosolico e potenziale di membrana, sono stati studiati mediante coloranti fluorescenti che cambiano la loro intensità di fluorescenza in risposta al legame degli ioni di calcio o ad un cambiamento nel potenziale di membrana. Per l'imaging del calcio citosolico, l'estere AM a membrana Fluo4 (F14201, Molecular Probes) è stato diluito con una concentrazione di $3\mu\text{M}$ nel tampone di caricamento cellulare (125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 1 mM KH_2PO_4 , 5,5 mM glucosio, 1 mM CaCl_2 , 20 mM HEPES e 1% BSA). Dopo 30 minuti di caricamento a 37°C , le cellule sono state incubate in soluzione di caricamento senza BSA e Fluo4 per 10 minuti a 37°C e quindi il coprivetrino è stato montato nella camera di imaging. Per registrare le variazioni di potenziale di membrana, le fibre FDB sono state immerse per 60 min in $4\mu\text{M}$ Di-8-ANEPPS (D3167, Sonde molecolari) disciolto nel tampone di caricamento al fine di ottenere un legame omogeneo con la membrana cellulare. L'impostazione di imaging a fluorescenza era composta da un microscopio di ricerca invertito Nikon TE2000 con un obiettivo di immersione in olio APO TIRF NA1.45 60X e un obiettivo asciutto 20X NA 0.8. Tutti i dati di imaging sono stati acquisiti utilizzando una fotocamera multi-stagnante con back-shot Hamamatsu ImageM controllata dal software Nikon NIS Advanced Research e dal software proprietario Hamamatsu Wasabi. La configurazione del filtro a fluorescenza per l'imaging Di-8-ANEPPS si basava su un filtro di eccitazione a 488/30 nm, uno specchio dicroico a 505 nm e un filtro a lungo passaggio a 590 nm; per Fluo4 era simile tranne per il filtro di emissione che è stato sostituito con un 535/50 nm. Il protocollo sperimentale mirava a confrontare nella stessa cellula i cambiamenti di potenziale di membrana/transienti di calcio ottenuti con l'elettrodo di stimolazione ad alta frequenza con le risposte ottenute con stimolazione di campo normale con stimoli singoli bipolari quadrati supramassimali da 30V.

Risultati

Simulazione del campo elettrico ad alta frequenza

La distribuzione spaziale del campo elettrico di stimolazione ad alta frequenza (MHz) in un sistema fisico composto da un elettrodo Pt, un mezzo extracellulare e un substrato di perspex è stata studiata con una simulazione al computer. La simulazione, calcolata per la frequenza di stimolazione di 4 MHz, ha dimostrato che, a causa della particolare forma e dimensione dell'elettrodo, il volume interessato dalla stimolazione era molto limitato (Figura 1).

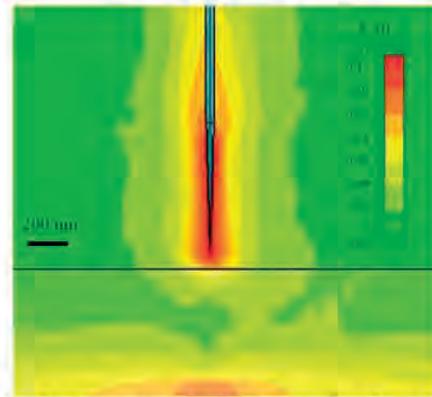


Fig. 1 Distribuzione spaziale del campo elettrico ad alta frequenza. La linea orizzontale nera rappresenta la parte inferiore della piastra di Petri in cui è posizionato un secondo elettrodo a piastra. La grandezza del campo è rappresentata mediante una scala pseudo-colore normalizzata.

Ad una distanza media di $80\mu\text{m}$ dall'elettrodo, il valore assoluto del campo elettrico indotto era circa il 30% del suo valore massimo e diminuiva al 6% a una distanza dalla punta di $200\mu\text{m}$. Oltre al confinamento, la simulazione prevedeva un grado molto alto di polarizzazione del campo elettrico, che è principalmente diretto lungo l'asse longitudinale dell'elettrodo (Figura 1). In realtà, i componenti trasversali hanno raggiunto al massimo solo il 40% dei valori longitudinali, anche quando l'angolo di inclinazione è stato ridotto da 90° a valori più bassi.

Effetti del campo elettrico MHz sulle fibre muscolari in relazione alla potenza applicata

Tenendo conto della forma e della polarizzazione del campo elettrico predetto dalla simulazione e sfruttando il controllo fine del posizionamento dell'elettrodo consentito dal micromanipolatore, la punta dell'elettrodo è stata posizionata a una distanza ottimale dalla membrana cellulare.

Durante esperimenti a bassa potenza, la punta era situata a circa $50\mu\text{m}$ dalla superficie della membrana, mentre in esperimenti di potenza più elevata, condotti per indurre cambiamenti morfologici permanenti cellulari, la punta era posizionata ancora più vicino alla membrana cellulare. Le impostazioni di alimentazione corrispondevano all'ampiezza della tensione picco-picco applicata nell'intervallo 500 V-800 V nella configurazione ad alta potenza e nell'intervallo 100 V-400 V in quella a bassa potenza. Gli effetti sulle cellule muscolari causati dall'alta potenza e dall'applicazione a bassa potenza del campo elettrico (successivamente indicati come stimolazione) erano molto diversi e sono mostrati nelle Figure 2-4.

La stimolazione ad alta potenza con l'elettrodo posizionato perpendicolarmente a $100\mu\text{m}$ di distanza dalla membrana ha causato la disorganizzazione nell'impalcatura muscolare con cambiamenti permanenti nella forma e nella posizione delle fibre precedentemente allineate lungo l'asse longitudinale del muscolo. Se la punta era più vicina alla membrana, le fibre muscolari venivano tagliate trasversalmente in una posizione corrispondente alla punta dell'elettrodo con un movimento caotico di particelle di fondo (Figura 2).

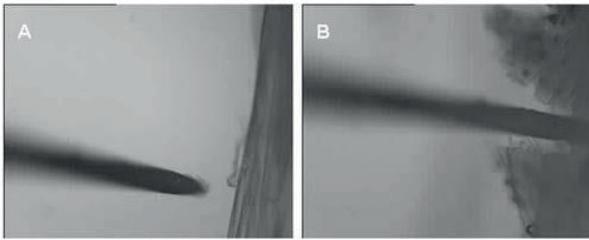


Fig. 2 Effetti di taglio del campo elettrico ad alta potenza sulle fibre muscolari. Il pannello A mostra l'elettrodo posizionato perpendicolare alla superficie del muscolo prima che venga applicato il campo elettrico. Il pannello B mostra il taglio prodotto dal campo elettrico ad alta potenza ad alta frequenza. Si noti il taglio netto delle singole fibre.

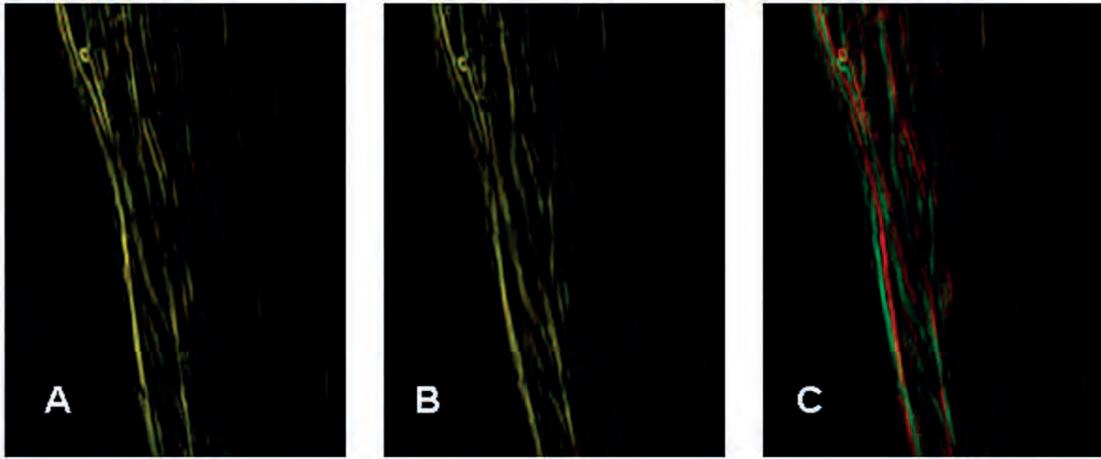


Fig. 3 Cambiamenti nella forma della fibra muscolare indotti dal campo elettrico a bassa potenza. A) dettaglio del muscolo EDL isolato vicino all'elettrodo prima della stimolazione, B) la stessa regione durante la stimolazione, C) unione delle due immagini: A in rosso e B in verde. I cambiamenti di forma delle singole fibre sono rilevabili con mezzi dopo l'elaborazione delle immagini con un "algoritmo di rilevamento del bordo".

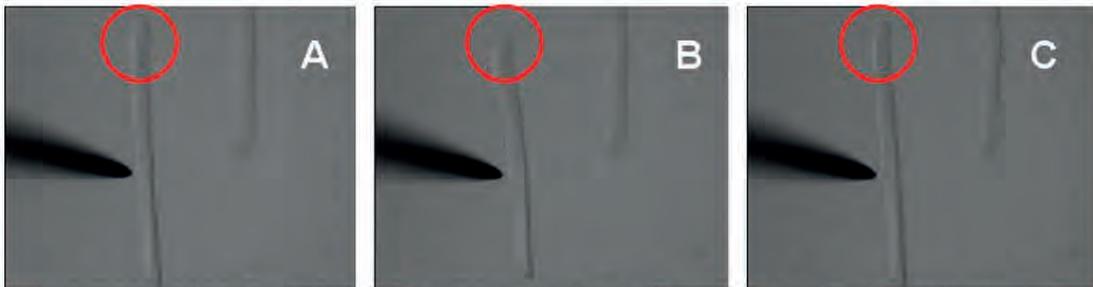


Fig. 4 Lenta risposta contrattile indotta dal campo elettrico in una singola fibra muscolare. A) prima della stimolazione, B) durante la stimolazione, C) dopo la stimolazione. Il campo elettrico è stato applicato per 500 ms (stimolazione).



Fig. 5 Migrazione di particelle all'interno del campo elettrico durante la stimolazione. Un gruppo di tre particelle è visibile vicino alla punta dell'elettrodo sul lato sinistro e una singola fibra sul lato destro. I relativi cambiamenti di posizione sono rilevabili a occhio nudo confrontando le tre immagini riprese in momenti successivi.

Il danno nella morfologia della membrana fibrosa era l'impostazione di bassa potenza con la punta di 50 μm di distanza da una superficie del muscolo di piccole dimensioni (circa 150 μm di diametro) indotta su muscoli e muscoli approssimativamente centrati attorno alla punta dell'elettrodo, effetti transitori delle fibre, completamente scomparsi e quindi corrispondenti alla dimensione prevista dopo la fine della fase di stimolazione. Durante il campo elettrico (confrontare con la Figura 1). La stimolazione, le fibre muscolari mostravano che un movimento circostante le regioni appariva quasi completamente reminescente di una lenta contrazione (Figura 4). Anche in questo caso,

confermando in modo straordinario questo caso, la risposta è stata limitata al limitato effetto di taglio. La regione del muscolo più vicina alla punta dell'elettrodo era caratterizzata da una fase di contrazione corrispondente alla durata della stimolazione (500ms) seguita da una fase di rilassamento dopo la fine della stimolazione. Lo stesso fenomeno con caratteristiche temporali simili era rilevabile anche in singole fibre muscolari dissociate dove un cambiamento di forma, che ricorda ancora una lenta contrazione, si verificava nella regione della fibra più vicina alla punta dell'elettrodo lasciando il resto della fibra non modificato (Figura 4).

Come ulteriore conseguenza del campo elettrico, le cellule non aderenti che popolano le piastre di coltura sono state indotte a muoversi e hanno mostrato un lento movimento continuo durante la stimolazione che si avvicina alla punta dell'elettrodo (Figura 5).

La microscopia a fluorescenza rivela meccanismi sottostanti al cambiamento di forma cellulare

I cambiamenti fisiologici indotti dalla stimolazione delle fibre muscolari sono stati studiati mediante sonde fluorescenti. I parametri analizzati erano il potenziale transmembranico monitorato mediante colorazione Di-8-ANEPPS delle fibre e la concentrazione di ioni di calcio citosolici monitorata con un'etichettatura Fluo4. Per entrambi i parametri, è stato effettuato un confronto con i cambiamenti indotti dalla stimolazione bipolare classica a supra-soglia con due elettrodi in grado di indurre il potenziale d'azione e innescare la contrazione.

1. Il potenziale della membrana cambia durante la stimolazione

La stimolazione classica del campo a impulso singolo ha indotto un cambiamento nel potenziale di membrana che era molto veloce, vicino ai limiti della risoluzione temporale del sistema di rilevamento, basato sull'emissione di luce fluorescente di Di-8-ANEPPS e sulla registrazione di videocamere. Tali rapidi cambiamenti sono mostrati nella Figura 6A e corrispondono probabilmente a potenziali d'azione, come confermato anche dalla variazione transitoria che accompagna la concentrazione di calcio (vedi sotto).

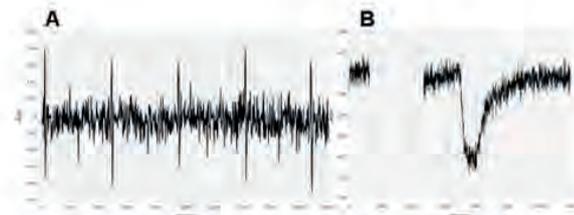


Fig. 6 Cambiamento del potenziale di membrana come monitorato dalla fluorescenza di Di-8-ANEPPS. A) Cambiamenti rapidi relativi alla stimolazione a singolo impulso, probabilmente corrispondente al potenziale d'azione. B) Cambiamenti di lunga durata dovuti all'applicazione di campi elettrici a bassa potenza ad alta frequenza. Sull'ascissa una piccola divisione corrisponde a 40 ms in A e 100 ms in B

La stimolazione ad alta frequenza e bassa potenza ha determinato un lento cambiamento del potenziale di membrana che è durato per l'intera durata della fase di stimolazione ed è stato seguito da una lenta inversione nell'intervallo dopo la fine della stimolazione (Figura 6B). L'ampiezza della variazione totale registrata per il potenziale di membrana era di circa 18% nella regione di membrana più vicina alla punta dell'elettrodo e diminuiva progressivamente lungo la fibra come illustrato nella figura

7. Quindi, con la stimolazione ad alta frequenza, la membrana cellulare sembrava passare attraverso un processo di carica verso un livello di stato stazionario durante la fase di stimolazione, dopo che il potenziale tornava lentamente al suo livello iniziale.

2. La concentrazione di calcio citosolico cambia durante la stimolazione

La stimolazione classica del campo a impulso singolo, che porta a una rapida variazione del potenziale di membrana come descritto sopra, ha innescato il processo dipendente dalla tensione del rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico e ha indotto un aumento della concentrazione di calcio citosolico. Il decorso temporale di questo processo era totalmente indipendente dai tempi di stimolazione ed è durato circa 100 millisecondi, con una fase di lievitazione rapida (<20ms) e una fase di decadimento più lenta (<100ms) come mostrato nella Figura 8A. Da un punto di vista spaziale, il processo ha coinvolto l'intera fibra muscolare, da un'estremità all'altra, consentendo così l'attivazione della contrazione lungo la fibra.

La stimolazione ad alta frequenza ha mostrato la proprietà peculiare di focalizzare i suoi effetti su una regione limitata della fibra, inducendo un aumento della concentrazione di calcio principalmente nei segmenti rivolti verso l'elettrodo di stimolazione con un effetto progressivamente decadente lungo la fibra come mostrato nella Figura 9.

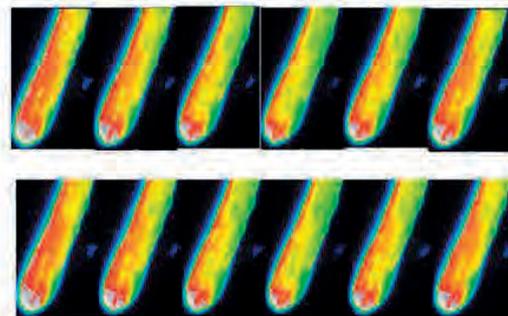


Fig. 7 Distribuzione spaziale dei cambiamenti nell'emissione di luce fluorescente di una fibra muscolare caricata con Di-8-ANEPPS per monitorare otticamente il potenziale della membrana durante, durante e dopo la stimolazione AC. Il punto blu indica la posizione dell'elettrodo. I cambiamenti di potenziale sono proporzionali alla luce verde emessa.

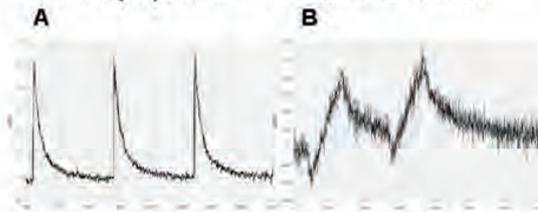


Fig. 8 Cambiamenti nell'emissione di luce fluorescente di una fibra muscolare caricata con Fluo4 per monitorare otticamente la concentrazione di calcio libero citosolico. A) Cambiamenti determinati dalla stimolazione bipolare a impulsi singoli, probabilmente corrispondenti a valori transitori che seguono potenziali d'azione. B) Variazioni lente e di bassa ampiezza indotte dall'applicazione di campi elettrici a bassa potenza ad alta frequenza. Una piccola divisione sull'ascissa corrisponde a 40 ms su A e 100 ms su B

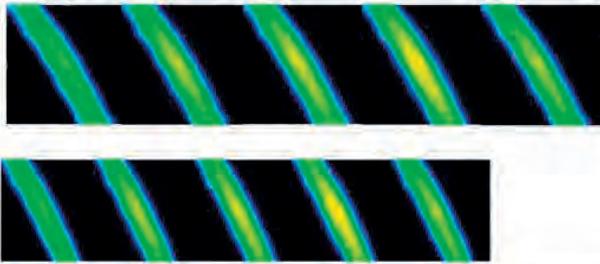


Fig. 9 Distribuzione spaziale dei cambiamenti nell'emissione di luce fluorescente di fibre caricate con Fluo4 per monitorare otticamente la concentrazione di calcio libero citosolico. Una regione della fibra vicino all'elettrodo (non visibile) è mostrata in immagini sequenziali. La concentrazione di calcio è proporzionale alla luce rossa emessa.

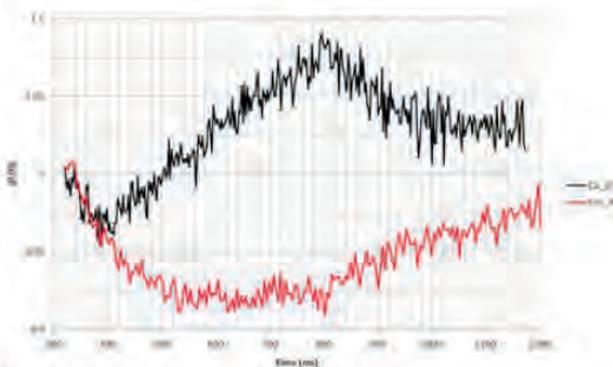


Fig. 10 Decorso temporale dei segnali fluorescenti corrispondenti al potenziale di membrana (rosso) e alla concentrazione di calcio citosolico (nero) durante l'applicazione del campo elettrico a bassa potenza e ad alta frequenza per 500 ms, a partire da 350 ms. Si noti che il campo elettrico induce una lenta depolarizzazione che è accompagnata da un lento e continuo aumento della concentrazione di calcio.

Anche il decorso temporale dell'aumento della concentrazione di calcio era completamente diverso da quello prodotto dalla stimolazione bipolare poiché, dopo l'inizio della stimolazione, una rapida deflessione iniziale nel segnale di fluorescenza era seguita da una fase di aumento continuo quasi lineare nel segnale di fluorescenza, che durava per la durata della stimolazione. Una fase di recupero con una diminuzione del segnale fluorescente è stata rilevata dopo la fine della stimolazione, come mostrato nella Figura 8B. Anche l'ampiezza del segnale fluorescente era molto diversa in quanto ha raggiunto un aumento del 50% per la stimolazione bipolare e solo del 10% con la stimolazione ad alta frequenza. La relazione temporale tra i cambiamenti nel gradiente di tensione della membrana e i cambiamenti nella concentrazione di calcio citosolico è mostrata nella Figura 10. È importante sottolineare che il decorso temporale e l'ampiezza dell'aumento citosolico del calcio erano simili in presenza o in assenza di calcio nel mezzo extracellulare, indicando così che il calcio veniva rilasciato dalle riserve intracellulari (dati non mostrati).

Discussione

I risultati ottenuti nel presente studio forniscono la prima

descrizione del comportamento delle fibre muscolari esposte ad un campo elettrico oscillante ad alta frequenza (4-64 MHz). La scelta di questo intervallo di frequenza specifico è correlata al recente sviluppo di uno stimolatore commerciale (Rexonage™, Telea), che viene applicato in molte attività chirurgiche e mediche e utilizza una gamma di frequenze ben definita e brevettata. Come sottolineato nell'introduzione, molti studi hanno esaminato le risposte di cellule e tessuti ai campi elettrici oscillanti. Gli effetti diretti dei campi elettrici oscillanti sono attribuiti alla dispersione dielettrica, cioè alle variazioni della permittività di un materiale dielettrico in relazione alla frequenza del campo elettrico applicato.

In questo studio, un tessuto eccitabile come il muscolo scheletrico è stato esposto a un campo elettrico oscillante e il suo comportamento che dipende in parte dai fenomeni di dispersione β (effetto di Maxwell Wagner, vedi [1, 8]) è stato descritto in dettaglio. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando un sottile elettrodo ad ago per applicare il campo elettrico con un'elevata risoluzione spaziale e due distinti intervalli di tensione. Mentre ad alta tensione l'effetto principale dell'applicazione sul campo era un taglio veloce e netto della fibra muscolare o del fascio di fibre in una posizione adiacente alla punta dell'elettrodo, a bassa tensione l'applicazione sul campo induceva cambiamenti lenti nella forma della fibra muscolare. Tali cambiamenti di forma ricordavano una contrazione, ma si sviluppavano in modo continuo per tutto il periodo di applicazione del campo elettrico, non coinvolgevano l'intera fibra e rimanevano localizzati in una regione vicina alla punta dell'elettrodo. Tali cambiamenti di forma potrebbero essere confrontati con la deformazione precedentemente osservata nei globuli rossi esposti a un campo elettrico oscillante nell'intervallo MHz [5, 6].

Le fibre muscolari, tuttavia, sono in grado di modificare attivamente la loro forma e dimensione, quando viene attivata una contrazione, rendendo importante separare gli effetti diretti del campo elettrico dalla risposta contrattile attiva. Le sonde fluorescenti sono state impiegate per seguire i cambiamenti nel potenziale di membrana e nella concentrazione di calcio libero citoplasmatico e questo ci ha permesso di dimostrare che la risposta a un campo elettrico a bassa tensione non era una contrazione. In realtà, la membrana è stata lentamente e progressivamente depolarizzata per l'intera durata dell'applicazione sul campo senza raggiungere una soglia sufficiente a innescare un potenziale d'azione. Apparentemente, i cambiamenti nel potenziale di membrana non erano sufficienti per innescare l'apertura dei canali di sodio voltaggio-dipendenti. Tale depolarizzazione lenta e subliminare è stata seguita da un piccolo ma progressivo aumento della concentrazione di calcio libero.

Esperimenti condotti in assenza di calcio nel mezzo extracellulare hanno dimostrato che l'origine di tale aumento di calcio era probabilmente localizzata nelle riserve di calcio intracellulare. Potremmo quindi ipotizzare che l'applicazione del campo elettrico ad alta frequenza induca una depolarizzazione della membrana non sufficiente a causare l'apertura di canali di sodio voltaggio-dipendenti, ma sufficiente a indurre l'apertura dei canali del calcio dei recettori rianodinici alle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico e causare il rilascio di una piccola quantità di calcio. Tale aumento della concentrazione intracellulare di

calcio rappresenta una grande differenza se gli effetti sulle fibre muscolari vengono confrontati con gli effetti osservati nelle cellule non eccitabili, in particolare i globuli rossi [5, 6].

I risultati ottenuti sono ricchi di potenziali applicazioni. Ad alta potenza, i campi elettrici oscillanti sono in grado di tagliare la membrana e l'intera cellula in modo molto rapido ed efficace. Il danno è estremamente limitato, non solo nelle cellule adiacenti, ma anche la regione adiacente delle stesse fibre muscolari rimane inalterata. A bassa potenza, i campi elettrici oscillanti sono in grado di provocare un prolungato accumulo di calcio nel citosolo a un livello sufficiente a suscitare una piccola risposta contrattile ed evitare l'innesco di una completa contrazione. Un aumento a lungo termine e basso della concentrazione di calcio nel citoplasma è probabilmente un segnale ottimale per attivare percorsi di

segnalazione intracellulari calcio-dipendenti. Ad esempio, la chinasi e la fosfatasi calmodulina-dipendenti sono noti per essere attivati da un basso e continuo aumento della concentrazione di calcio meglio che da transienti veloci e di grandi dimensioni [3, 9]. In questa prospettiva, il presente studio apre la strada a ulteriori lavori finalizzati a valutare se tale attivazione dei percorsi di segnalazione avvenga realmente e a comprendere completamente la possibile applicazione di campi elettrici ad alta frequenza per stimolare la plasticità delle fibre muscolari.

Ringraziamenti

Lo studio è stato realizzato con il sostegno finanziario di Biotech II, Regione Veneto.